

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E LINHAGENS COM AÇÃO ANTAGÔNICA EM
STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE QUEIJO DE COALHO**

JULIANA DE OLIVEIRA MORAES

Maceió
2014

JULIANA DE OLIVEIRA MORAES

GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E LINHAGENS COM AÇÃO ANTAGÔNICA EM STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE QUEIJO DE COALHO

Dissertação apresentado à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção de título Mestre em Nutrição - Análise de Alimentos e Segurança Alimentar, sob a orientação do Prof^o Doutor Irinaldo Diniz Basílio Júnior e coorientação Prof. (a) Doutora Maria Cristina Delgado da Silva.

Orientador: Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior

Coorientadora Prof. Dr. Maria Cristina Delgado da Silva.

Faculdade de Nutrição- FANUT

Universidade Federal de Alagoas

Maceió
2014



**MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**



Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E LINHAGENS COM AÇÃO ANTAGÔNICA E
EM STAPHYLOCOCCUS SPP ISOLADOS DE QUEIJO DE COALHO**

por

JULIANA DE OLIVEIRA MORAES

A Banca Examinadora, reunida as 07 dias do mês de fevereiro do ano de 2014,
considera a candidata **APROVADA.**

Prof. Dr. (Irinaldo Diniz Basílio Júnior)
Escola de Enfermagem e Farmácia
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Prof. Dr.a (Maria Cristina Delgado da Silva)
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Coorientador)

Prof. Dr.a (Camila Braga Dornelas)
Escola de Enfermagem e farmácia
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

Prof. Dr.a (Tânia Lúcia Montenegro Stamford)
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Nutrição
(Examinador)

*À minha amada família (Moraes,
Marinei, Werner, Mariana e Lua).
Sem vocês essa conquista não
faria sentido.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que tem me sustentado e sobre tudo tem cuidado de mim.

À minha família, que entendeu minha ausência em momentos tão importantes.

Aos meus pais, Moraes e Marinei, que me apoiaram e sempre acreditaram em mim, até mesmo nos momentos que eu mesma já não acreditava. E pelas orações constantes e incessantes.

Aos meus irmãos, Mariana e Werner, por acreditaram na minha capacidade e por sempre estarem disponíveis a me escutar e prontos a apoiar minhas decisões.

Ao Prof.Dr. Irinaldo Diniz Basílio Junior, meu orientador, pela confiança e apoio.

À minha querida coorientadora, Maria Cristina Delgado da Silva, a quem admiro como pessoa, pesquisadora e docente. Muito Obrigada pelo apoio, pela confiança e aprendizado que tive ao longo desses anos de pesquisa. Parte dos meus objetivos acadêmicos e profissionais foram inspirados na sua figura, que me serviu de referencial.

À doce e atenciosa amiga e professora, Danielle Gomes de Lyra, que esteve presente em todas etapas do mestrado me incentivando e dando direcionamentos e soluções, quando muitas vezes me senti sem direção e sem soluções para os vários desafios que enfrentei nessa pesquisa. Muito Obrigada pelo carinho, paciência e atenção que sempre teve comigo.

Ao Prof. Ticiano Gomes do Nascimento, por sempre disponibilizar o laboratório e equipamentos necessários para execução da minha pesquisa.

Às amigas e bolsistas, Rozália e Louise, que foram minhas parceiras durante a execução de toda a pesquisa. Muito obrigada meninas por todos os momentos que passamos juntas, momentos de verdadeira agonia, mas também momentos de superação! Sem vocês eu não teria conseguido terminar em tempo hábil esta pesquisa.

À minhas companheiras e companheiros de Laboratório desses longos anos que passei no Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos: Erika Thayse, Cantídio Filho, Jacilene, Bruna, Camila, Amália Luisa, Wanessa, Erika, Adélia, Alciléa e Ledja. Levarei comigo tudo que aprendi com vocês, pois vocês ajudaram a formar a pessoa e profissional que sou hoje.

Ao Cantídio, técnico do Laboratório Controle e Qualidade de Alimentos, pela paciência e apoio constante nesses anos que dividimos pipetas, meios de cultura, reagentes e parte de nossas vidas. Nunca me esquecerei de tudo que aprendi ao lado dessa pessoa maravilhosa, que até no silêncio ensina.

Às amadas irmãs em Cristo e amigas: Jussara, Keilla e Jackeline, que foram e são minhas intercessoras. Obrigada por sempre terem uma palavra inspirada por Deus para me levantar quando eu me achava cansada e desanimada.

A todos meus amigos, que torceram e confiaram em mim. E que sobre tudo perdoaram e entenderam minha ausência neste período de dois anos.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho que se tornou realidade.

*Senhor, tu me sondas e me conheces.
Sabes quando me sento e quando me levanto; de
longe percebes os meus pensamentos.*

*Sabes muito bem quando trabalho e quando
descanso; todos os meus caminhos te são bem
conhecidos.
Antes mesmo que a palavra me chegue à língua,
tu já a conheces inteiramente, Senhor.*

*Tu me cercas, por trás e pela frente, e pões a tua
mão sobre mim.
Tal conhecimento é maravilhoso demais e está
além do meu alcance, é tão elevado que não o
posso atingir.*

*Para onde poderia eu escapar do teu Espírito?
Para onde poderia fugir da tua presença?*

*Se eu subir aos céus, lá estás; se eu fizer a minha
cama na sepultura, também lá estás.
Se eu subir com as asas da alvorada e morar na
extremidade do mar,
mesmo ali a tua mão direita me guiará e me
susterá.*

(Salmos 139:1-10)

RESUMO GERAL

O gênero de bactérias *Staphylococcus* tem sido alvo de pesquisas na avaliação da capacidade bacteriocigênica e estudos relacionados com a detecção de genes codificadores de enterotoxinas. Muitas linhagens de *Staphylococcus* spp. são capazes de produzir bacteriocinas, assim como, enterotoxinas estafilocócicas. A ingestão de alimentos contaminados com essas toxinas é uma das principais causas de intoxicações alimentares em todo mundo. Particularmente, o queijo de coalho produzido a partir de leite cru, é alvo de investigação quanto a possível presença de substâncias antagônicas frente a microrganismos patogênicos e a presença de genes codificadores de enterotoxinas. Este trabalho objetivou avaliar a capacidade bacteriocigênica e o perfil enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus* isolados de queijo de coalho produzido a partir de leite cru do sertão de Alagoas. Cento e dez linhagens foram submetidas aos testes de antagonismo em meio sólido frente a *Listeria monocytogenes*. Aquelas linhagens de *Staphylococcus* spp. que apresentaram ação antagônica á *L. monocytogenes*, foram avaliadas quanto a capacidade bacteriocigênica frente a outros patógenos (*S.typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E.coli*), a identificação taxonômica através do sistema comercial API-Staph (BioMérieux®) e a pesquisa de genes enterotoxigênicos clássicos (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) através da técnica da PCR – Uniplex. Das 110 linhagens de *Staphylococcus* spp avaliadas, 34,5% (38/110) apresentaram ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Dessas, nenhuma foi capaz de inibir *S. typhimurium* e *E. coli*, porém, 42,1% (16/38) apresentou inibição frente a *P. aeruginosa* e 2,6% (1/38) identificada como *S. xylosus*, apresentou ação antimicrobiana frente a *S. aureus*. Das linhagens com efeito bacteriocigênico 9 (23,7%) pertenciam ao grupo *S. coagulase* positiva (*S. aureus*) e 29 (76,3%) ao grupo *S. coagulase* negativa (*S. lentus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hominis*). O maior número de linhagens com potencial antimicrobiano pertenceu a espécie *S. haemolyticus*. Dentre as linhagens avaliadas, 60,5% (22/38) apresentaram pelo menos um gene codificador de enterotoxina estafilocócica clássica, sendo, 67,6% (6/9) *Staphylococcus* coagulase positivo e 55,2% (16/29) *Staphylococcus* coagulase negativo. O gene *sea* foi detectado em 50,0% (19/38) das linhagens e o *sec* em 44,7% (17/38). A associação mais frequente foi a *sea* + *sec* e *sea* + *seb* + *sec*. Das linhagens com ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* 42,1 % (16/38) não apresentaram genes enterotoxigênicos clássicos. Conclui-se, que não há uma relação direta entre atividade antagonista e presença de genes codificadores de enterotoxinas clássicas. Os resultados também apontam elevado percentual de linhagens *Staphylococcus* coagulase negativa com potencial enterotoxigênico, os quais confronta a legislação brasileira vigente que preconiza somente a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo para alimentos como análise de rotina e revelam que algumas linhagens de *Staphylococcus* possuem caráter bioprotetor frente a *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Palavras chaves: *Staphylococcus*. Enterotoxinas. Bacteriocinas.

ABSTRACT

The genus *Staphylococcus* has been target of research in the assessment of capacity and bacteriocigênica related to the detection of genes encoding enterotoxins studies. Many strains of *Staphylococcus* spp are able to produce bacteriocin, as well as staphylococcal enterotoxins. The ingestion of food contaminated with these toxins is a major cause of food poisoning worldwide. Particularly, the farmhouse cheese made from raw milk, is under investigation as the possible presence of antagonistic substances against pathogens and the presence of genes encoding enterotoxins. This study evaluated the ability bacteriocigenic and toxin profiles of staphylococcal strains isolated from curd cheese produced from raw milk of the hinterland of Alagoas. One hundred and ten strains were subjected to the test on solid medium antagonism against *Listeria monocytogenes*. Those strains of *Staphylococcus* that showed antagonistic action will *L. monocytogenes* were evaluated for the ability bacteriocigenic against other pathogens (*S.typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. coli*), the taxonomic identification through the commercial system API - Staph (BioMérieux®) and search enterotoxigenic classics genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) by PCR technique - Uniplex . Of the 110 strains of *Staphylococcus* spp evaluated, 34,5 % (38/110) showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. Of these, none were able to inhibit *E. coli* and *S. typhimurium*, however, 42,1 % (16/38) showed inhibition against *P. aeruginosa* and 2,6 % (1/38) *S. xylosus* identified as presented antimicrobial activity against *S. aureus*. Strains with effect bacteriocigênico 9 (23,7%) belonged to group *Staphylococcus* coagulase positive (*S. aureus*) and 29 (76,3 %) to *S.* coagulase negative group (*S. lentus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hominis*). The largest number of strains with antimicrobial potential belonged to species *S. haemolyticus*. Among the tested strains, 60,5% (22/38) had at least one gene encoding staphylococcal enterotoxin classic, being 67,6% (6/9) *Staphylococcus* coagulase positive and 55,2% (16/29) *Staphylococcus* coagulase negative. The *sea* gene was detected in 50,0% (19/38) and the lines *sec* in 44,7% (17/38). The most frequent association was the *sea* and *sea* + *sec* e *sea* + *seb* + *sec*. The strains with antimicrobial activity against *L. monocytogenes* 42,1% (16/38) showed no enterotoxigenic classics genes. That there is a direct relationship between antagonist activity and the presence of genes encoding classical enterotoxins thus far. The results also showed high percentage of strains with enterotoxigenic potential *Staphylococcus* coagulase negative, which confronts the current Brazilian legislation, which favors only the count of coagulase positive for foods such as routine analysis and reveal that some strains of *Staphylococcus* have bioprotector character opposite *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus*. Enterotoxin. Bacteriocins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de ação da Classe I e II das bacteriocinas, segundo a descrição de Drider et al. (2006).	25
Figura 2 -	Cidades do sertão que compõem a bacia leiteira de Alagoas (destacada com círculo vermelho).	44
Figura 3 -	Halos de inibição de linhagens de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de queijo de coalho frente a <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.	73
Figura 4 -	Resultados de amplificadores de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. com o par de <i>primers</i> SEA-3b/SEA-4b; M- 100bp DNA ladder; P - Controlo Positivo - ATCC13565 (127pb).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das bacteriocinas (Heng et al., 2007)	26
Tabela 2 -	Bacteriocinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp.	28
Tabela 3 -	Algumas linhagens de <i>Staphylococcus</i> e locais que comumente são encontradas.	35
Tabela 4 -	Ocorrência de altas contagens <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijo de coalho produzidos no nordeste do Brasil.	38
Tabela 5 -	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a detecção por PCR dos genes <i>sea – see</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de amostras de queijo de coalho.	69
Tabela 6 -	Perfil Taxonômico das Linhagens de <i>Staphylococcus</i> spp	73
Tabela 7 -	Perfis genotípicos das Linhagens de <i>Staphylococcus</i> spp.	74
Tabela 8 -	Perfis de associação de genotípicos distribuídos por espécies identificadas.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

APHA	American Public Health Association
ATP	adenosina trifosfato
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
APT	Água Peptonada Tamponada
ATCC	American Type Culture Collection
aW	Atividade da Água
BHI	Brain Heart Infusion
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
GRAS	substances generally recognaized as as safe
SE	Enterotoxinas Estafilocócica
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FFDCA	Federal Food, Drug and Cosmetic Act
kDa	Kilodalton
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido desoxirribonucleico
SE	Gene para enterotoxinas estafilocócicas
<i>sea-see</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas A-E
<i>seg-ser</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas G-R
<i>seu-sev</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas U-V
Ses	Staphylococcal Enterotoxins
SEA-SEF	Staphylococcal Enterotoxins A-F
SEG-SER	Staphylococcal Enterotoxins G-R
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TE	Tris-EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Bacteriocinas e sua Aplicação na Indústria	19
3.2	Bacteriocinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp.	26
3.3	<i>Staphylococcus</i> spp. e suas Enterotoxinas	30
3.4	Reação em Cadeia de Polimerase: um método de detecção de genes enterotoxigênicos	37
3.5	Produção de Queijo de Coalho em Alagoas	39
	Referências	41
4	ARTIGO DE RESULTADOS:	
	Título do Artigo: Potencial antimicrobiano e enterotoxigênico de linhagens de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de queijo de coalho	56
	Referências	73
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

Nos últimos anos houve um crescente interesse em pesquisas pela busca de compostos alternativos para um emprego racional como conservantes de alimentos. Em um mesmo alimento podemos encontrar tanto a presença de microrganismos patogênicos causadores de doenças transmitidas por alimentos e/ou produtores de enterotoxinas, como também, substâncias com atividade antimicrobiana.

As bacteriocinas, em particular, as estafilococcinas (peptídeos antimicrobianos produzidos por linhagens de *Staphylococcus* spp.) têm sido alvo de estudos devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias patogênicas (ERSFELD-DRESSEN; SAHL; BRANDIS, 1984; ALLGAIER et al., 1986; HEIDRICH et al., 1998; NETZ et al., 2001 e 2002a,b; ASO et al., 2005; CEOTTO, 2009; DALY et al., 2010). A maioria delas, inibe muitas espécies bacterianas, inclusive, aquelas caracterizadas como perigo de alta severidade para o consumidor, como no caso de *Listeria monocytogenes* frequentemente isolados de produtos lácteos (SILVA et al., 1998; LEITE JUNIOR et al., 2000; BRANCO et al., 2003; KABUKI et al., 2004; DUARTE et al., 2005; CARVALHO et al., 2007).

Dependendo de sua concentração, as estafilococcinas podem ser bactericidas ou bacteriostáticas e atuam permeabilizando as membranas de células sensíveis por meio da formação de poros, o que causa desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato.. A habilidade das bacteriocinas em inibirem vários patógenos presentes em alimentos, demonstram a relevância do estudo destas substâncias (ELOTMANI et al., 2002; LOESSNER et al., 2003; HERNÁNDEZ et al., 2005).

Vale também ressaltar que a aplicação tecnológica das bacteriocinas tem sido bastante explorada por pesquisadores e aplicada como alternativa de conservação nas indústrias de alimentos e em tratamentos veterinários (SIRAGUSA et al., 1999; COTTER et al., 2005; MARCOS et al., 2007). O estudo dessas contribui para o desenvolvimento tecnológico na área da ciência e tecnologia de alimentos, além de fornecer alimentos com maior vida útil, mais seguros e naturais.

Contudo, algumas linhagens de *Staphylococcus* naturalmente presentes em alimentos são capazes de promover gastroenterite estafilocócica, que são causadas pela ingestão de uma ou mais enterotoxina produzida e liberada nos alimentos por essas bactérias. As linhagens que albergam em seu genoma genes codificadores de enterotoxinas são capazes de causar sintomas como náuseas, câibras abdominais, diarreia, cefaleia, sudorese, prostração e queda de temperatura corporal durante 24 a 48 horas, sendo assim, denominadas de linhagens enterotoxigênicas (JAY, 2005).

Atualmente são conhecidas 23 tipos de enterotoxinas estafilocóccicas, sendo as clássicas (*sea-see*), as mais frequentemente relacionadas com surtos de intoxicação alimentar e as demais conhecidas como não-clássicas (CREMONESI et al., 2005). Trata-se de um produto termoestável, podendo estar presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a intoxicação alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Vários pesquisadores vêm relatando elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e detecção de *Staphylococcus* enterotoxigênicos em queijos produzidos no Brasil (SANTANA et al., 2008; BORGES et al., 2008; TIGRE; BORELLY, 2011; MENESES et al., 2012; EVÊNCIO-LUZ; LIMA-FILHO; EVÊNCIO-NETO, 2012). Sabe-se que, a manipulação dos alimentos pode ser uma forma de contaminação ou de transferência de microrganismos nocivos à saúde humana. Neste sentido, os manipuladores que atuam na produção de queijos são fundamentais na prevenção das doenças transmitidas por alimentos.

O queijo de coalho, particularmente, é um produto tipicamente nordestino, produzido na maioria das vezes de forma artesanal a partir de leite cru, o que lhe confere características sensoriais peculiares de cada região e bastante apreciadas pelos consumidores (CARVALHO, 2007). Contudo, falhas na implantação de programas de controle de qualidade, como o das boas práticas de fabricação, têm colocado em risco os consumidores, pois o queijo de coalho é um produto que apresenta características intrínsecas propícias a multiplicação de micro-organismos patogênicos e ou deterioradores.

Dentre as técnicas moleculares para identificação de microrganismos patogênicos e genes enterotoxigênicos, pode-se destacar, a reação em cadeia da polimerase (PCR), atualmente bastante utilizada na análise de alimentos. É uma técnica extremamente sensível, que faz uso de quantidades mínimas de DNA para identificação de genes enterotoxigênicos, sendo capaz de demonstrar a presença de linhagens de *Staphylococcus* toxigênicos, antes da expressão de toxinas. Esta ferramenta molecular vem se estabelecendo como um instrumento acurado para a pesquisa epidemiológica e avaliação da segurança de alimentos (GANDRA et al., 2008).

Sendo assim, fica evidente a importância de um estudo com objetivo de avaliar a capacidade bacteriocigênica e determinar o perfil enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de coalho produzido a partir de leite cru do sertão de Alagoas, já que inexistem dados no nosso estado a esse respeito.

Essa dissertação será apresentada conforme recomendação da Pós-Graduação em Nutrição, composta de dois capítulos; sendo o primeiro uma revisão da literatura sobre o tema proposto e o segundo os resultados da nossa pesquisa em forma de artigo original, o qual será submetido a publicação na Revista Foodborne Pathogens and Disease.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a capacidade bacteriocigênica e o perfil enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus* spp isoladas de queijo de coalho produzido a partir de leite cru do sertão de Alagoas.

2.1 Específicos

- Verificar a capacidade bacteriocigênica de linhagens de *Staphylococcus* spp. frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Identificar taxonomicamente as linhagens de *Staphylococcus* spp. que possuem capacidade bacteriocigênica.
- Investigar a presença de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas clássicas em linhagens de *Staphylococcus* spp. que apresentarem ação bacteriocigênica.
- Relacionar a ocorrência de ação bacteriocigênica e enteroxigenicidade de linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de coalho.

3.1 Bacteriocinas e suas utilizações na indústria

Desde a introdução na medicina humana, os antibióticos têm promovido um enorme impacto no tratamento das doenças infecciosas e no sucesso de procedimentos médicos invasivos, como cirurgias, e também no tratamento de doenças de origem veterinária. Contudo, o aumento da resistência microbiana aos antibióticos contrapõe-se às vantagens de seu emprego. Deste modo, o interesse na descoberta de novas substâncias que possuam ação antimicrobiana vem sendo cada vez maior (HANCOCK, 2001).

A maioria, senão todas as bactérias são capazes de produzir várias substâncias no curso de seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para si mesma quanto para outras bactérias. Essas substâncias poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático. Tais substâncias incluem: toxinas, enzimas bacteriolíticas, substratos das vias primárias metabólicas, substâncias antibióticas e bacteriocinas (JACK et al., 1995). Esses peptídeos são mediados por plasmídios ou cromossomos e reagem com sítios específicos ou inespecíficos de ligação nas bactérias sensíveis (EIJNSINK et al., 1996).

As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos bioativos com ação antimicrobiana, sendo sintetizados à nível de ribossomos e é produto de secreção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (KAISER; MONTVILLE, 1993; RILEY; WERTZ, 2002). As bacteriocinas apresentam ação bactericida ou bacteriostática a depender da concentração, podendo apresentar desde pequeno a amplo espectro de atuação. Os estudos sobre as bacteriocinas tiveram início em 1925, com uma estirpe de *Escherichia coli*, onde foi isolada uma bacteriocina que recebeu o nome de colina em referência ao microrganismo produtor original (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2004). Todavia, novas descobertas de substâncias similares produzidas por outras espécies de bactérias foram surgindo e diante disto, um termo mais generalista foi proposto, “bacteriocinas” (FERREIRA, 2005). Atualmente, por conta do grande número de estudos nesta linha de pesquisa se conhece inúmeras técnicas de detecção e isolamento de bacteriocinas produzidas por bactérias de vários gêneros.

A síntese de bacteriocinas envolve quatro diferentes genes: o responsável pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina; o gene responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o da produção das proteínas do transporte ABC que externalizam a bacteriocina e, por fim, o gene que codifica uma proteína acessório, não pertencente ao transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina (NES et al., 1996).

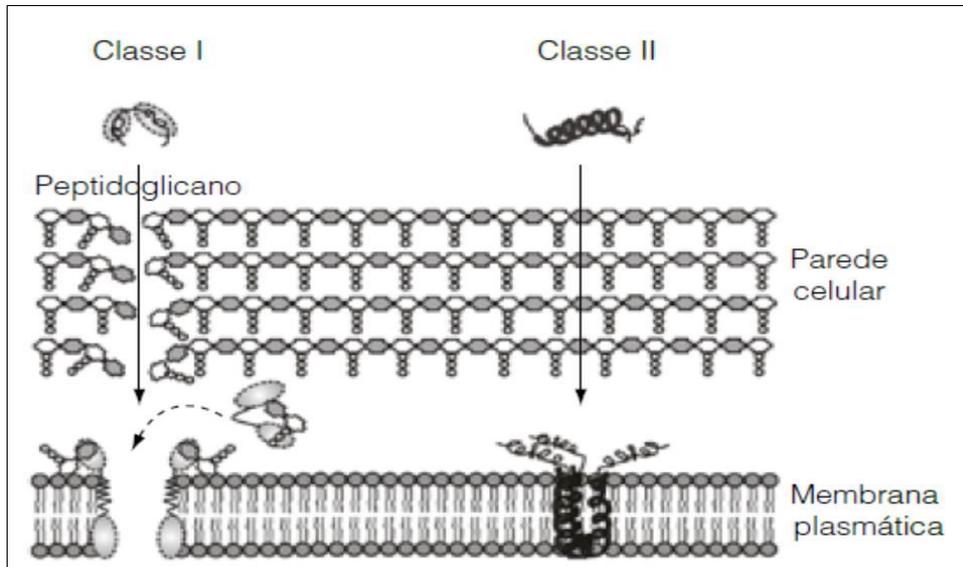
O sistema responsável pela regulação da produção de bacteriocinas é composto por três componentes: peptídeo indutor, histidina quinase transmembrana e regulador de resposta. O peptídeo indutor é sintetizado em baixa concentração na forma de um pré-peptídeo (pré-bacteriocina biologicamente inativa), o qual é clivado e secretado para o meio extracelular através do transportador. Quando este pré-peptídeo atinge determinada concentração, induz a ativação da enzima histidina quinase que se agrega às membranas. Esta conduz a uma autofosforilação do resíduo de histidina, transferindo para proteína reguladora de resposta um fosfato. Este regulador fosforilado ativa a transcrição da bacteriocina, além dos elementos que compõem o sistema regulador (NES; EIJSINK, 1999; NASCIMENTO et al., 2008).

As bactérias capazes de produzir bacteriocinas (bactérias produtoras) possuem um sistema de imunidade contra suas próprias bacteriocinas. Assim, cada bacteriocina apresenta a sua própria proteína que lhe confere imunidade, e esta é expressa concomitantemente com a bacteriocina (ABEE et al., 1995). Essas proteínas permanecem intracelulares e se ligam a proteínas de membrana da célula produtora, impedindo a atuação da bacteriocina (QUADRI et al., 1995). A imunidade bacteriana permite à célula bacteriana distinguir entre a bacteriocina produzida pela própria cultura e por outras (HOFFMANN et al., 2004).

Segundo Jack et al. (1995), para uma substância de origem proteica com capacidade antimicrobiana ser classificada como bacteriocina esta precisa apresentar algumas características como: amplo espectro de ação contra bactérias, abrangendo muitas vezes organismos de diferentes gêneros e espécies; termorresistência, determinantes genéticos localizados no cromossomo ou em transpósons conjugativos, embora a maioria seja codificada por plasmídios.

De acordo com classificação descrita por Heng et al. (2007), as bacteriocinas estão distribuídas em quatro grandes classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas. Cada classe de bacteriocina apresenta diferentes características bioquímicas e modo de ação sobre as células alvos (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismo de ação da Classe I e II das bacteriocinas, segundo a descrição de Drider et al. (2006).



Fonte: Nascimento et al., 2008.

A classe I de bacteriocinas apresenta em sua estrutura o aminoácido lantionina, por este motivo são chamados de lantobióticos. Esta classe apresenta dois mecanismos de ação, um dos mecanismos age impedindo a síntese da parede celular, não permitindo que haja multiplicação da célula alvo, e o outro, promove formação de poros na membrana do microrganismo alvo, fazendo com que moléculas essenciais para o metabolismo da célula sejam expelidas no ambiente e conseqüentemente ocorre morte celular.

A classe II é formada por pequenos peptídeos termoestáveis de forma espiralada (<10 kDa), estas se inserem na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana. Já a classe III, constituída de grandes peptídeos (>30kDa) termolábeis, promovem lise celular através da lise da parede celular do microrganismo alvo. E por fim, a classe IV composta por peptídeos cíclicos, onde o primeiro e o último ácidos aminados do peptídeo maduro são ligados covalentemente (Tabela 1) (BREUKINK et al., 1994).

Tabela 1 - Classificação das bacteriocinas descrita por Heng et al. (2007)

Classe	Características	Subclasses	Exemplos
		Tipo A (estrutura linear)	
Classe I	Dotada de lantionina e derivados, sendo termoestáveis de baixo peso molecular(<5 kDa)	Tipo B (estrutura globular)	Nisina Epidermina
		Tipo C (estrutura linear e globular)	
Classe II	Pequenos peptídeos espiralados termoestáveis (<10 kDa)	Subclasse IIa Subclasse IIb Subclasse IIc	Pediocina Aureocina A70, Aureocina A53,
Classe III	Peptídeos termolábeis de alto peso molecular (10 kDa)	Subclasse IIa Subclasse IIb Subclasse IIc	Lisostafina Helveticina J
Classe IV	Peptídeos cíclicos	-	Enterotoxina

Fonte: Autor, 2014 - adaptado Nascimento et al. (2008)

A ação das bacteriocinas ocorre na membrana citoplasmática, permeabilizando as membranas de células por meio da formação de poros (MONTVILLE; CHEN, 1998). As bacteriocinas se ligam à receptores da membrana, que são geralmente receptores responsáveis por ligação com vitaminas e fatores de crescimento. Logo a peculiaridade de ação sobre a membrana citoplasmática está restrita a bactérias Gram-positivas, visto que, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa impermeável à maioria das moléculas (ABEE et al., 1995). Embora a formação de poros seja uma característica geral, o tamanho, a condutividade e a estabilidade desses poros, diferem consideravelmente entre as bacteriocinas (HERRANZ et al., 2001).

A formação de poros promovida pelas bacteriocinas promove uma dissipação da força protônica no interior das células, causando lesões químicas específicas pela alteração da permeabilidade da parede celular, e ainda, causam inibição da síntese de DNA e RNA e outras

macromoléculas fundamentais para sobrevivência da célula, causando assim, a morte bacteriana (BRUNO; MONTVILLE, 1993; MOLL et al., 1999).

Existem diversos relatos de bacteriocinas com atividade contra bactérias patogênicas de interesse como contaminantes de alimentos, a citar *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* (URAZ et al., 2001; XIRAPHI et al., 2008; CHEIKHYOUSSEF et al., 2009; UDHAYASHREE et al., 2012; MESSAOUDI et al., 2012), bem como contra bactérias e fungos deterioradores e produtores de micotoxinas (DIGAITIENE et al., 2012; GHANBARI et al., 2013) evidenciando o potencial de aplicação destes compostos como conservantes de alimentos.

A síntese de bacteriocinas acontece na fase logarítima do crescimento bacteriano e está intrinsecamente relacionada com o crescimento e a atividade fisiológica da célula produtora. A quantidade de bacteriocina formada depende da biomassa formada. Portanto, a composição do meio de cultura e a suplementação com nutrientes especiais, assim como, temperatura e pH, são fatores que influenciam na produção de bacteriocinas. Esses fatores também podem interferir no modo de ação da bacteriocina formada. Além destes fatores, uma contaminação inicial elevada de um patógeno ou microrganismo competidor pode interferir na ação antimicrobiana de um gênero de bactéria produtora de bacteriocina, em alguns casos, a bactéria produtoras não consegue exercer seu efeito antimicrobiano esperado ou desejado (YANG; RAY, 1994; FERREIRA, 2005; RILLA et al., 2004).

Segundo Drosinos et al. (2005), o valor de pH ótimo para produção de bacteriocina (5,5) não coincide com o valor ótimo para o desenvolvimento microbiano (6,5). Em geral as condições que estimulam o crescimento bacteriano, propiciam a produção de bacteriocinas, porém alta taxa de crescimento celular e elevada concentração de massa celular não necessariamente favorecem a produção de bacteriocina. Sabe-se que quando uma população bacteriana tem um elevado crescimento, ou seja, aumento do número de células entende-se que a necessidade de substâncias de defesa é reduzida. Assim, quando a população atinge um determinado número de células, a produção de bacteriocinas tende a ser reduzida ou totalmente inibida (LEROY; DE VUYST, 2002; FERREIRA, 2005).

Estudos sobre bacteriocinas são de grande valia para tecnologia de alimentos e outras áreas da ciência. Todavia, a instabilidade na produção por inativações genômicas e a dificuldade de estabilizar as condições necessárias para a produção de bacteriocinas são desafios encontrados em estudos relacionados de síntese, caracterização e isolamento desses peptídeos. As metodologias convencionais de detecção podem subestimar a capacidade

bacteriocigênica das linhagens que sejam alvos de estudos, pois algumas particularidades das variadas técnicas podem proporcionar de forma indesejável uma mutação, perda ou rearranjo de genes codificadores, impedindo a bactéria de produzir a bacteriocina (GALVEZ et al., 2007; ORTOLANI, 2009).

Diante da forte procura por parte dos consumidores por alimentos naturais, as bacteriocinas e microrganismos produtores têm sido reconhecidos como uma potencial alternativa de bioconservantes para alimentos. Entre as características mais requeridas para uma bacteriocina ser aplicada como bioconservante estão; a termoestabilidade, a resistência a modificações de pH e ter amplo espectro de ação. O termo bioconservação reflete nos alimentos inúmeros benefícios como aumentar a vida de prateleira do alimento, aumentar a segurança, somar uma extra proteção durante condições de elevada temperatura, redução da aplicação de aditivos químicos, aplicação de tratamentos térmicos menos severos, redução de perdas nutricionais (ROSS et al., 1999; THOMAS, CLARKSON, DELVESBROUGHTON, 2000; FAGUNDES, 2008; NOGUEIRA, 2010).

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (NASCIMENTO et al., 2008). Todavia, sabe-se que algumas características inerentes aos alimentos podem interferir na atividade bacteriocigênica da bacteriocina, como: os componentes naturais dos alimentos, a ação do pH, a concentração de sal e nitrato, a atividade de água, o conteúdo lipídico e a atividade das proteases e outras enzimas. Além da interação com componentes dos alimentos, as bacteriocinas podem ser adversamente afetadas pelas condições de processamento e estocagem, como pH e temperatura do produto (SCHILLINGER et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2008; NOGUEIRA, 2010).

Nos Estados Unidos, a utilização de bacteriocinas purificadas, microrganismos produtores de bacteriocinas, ou expressão genética de bacteriocinas em alimentos, está sob jurisdição da *Food and Drug Administration* (FDA) e são regulamentados como ingredientes alimentares sob o *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* (FFDCA). No FFDCA, as substâncias são reconhecidas como seguras (*substances generally recognized as safe - GRAS*), ou seja, apresentam evidências científicas suficientes de que não são prejudiciais a saúde humana (MORENO, 1995).

A adição de nisina em alimentos foi realizada pela primeira vez em um experimento com linhagens de *Lactococcus lactis subsp. lactis* na fabricação do queijo suíço, que teve ação

inibitória, obtendo como resultado a inibição contra o estufamento tardio causado pelo *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum* (DELVES-BROUGHTON, 1990).

A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê do Codex Alimentarius da FAO (Food and Agriculture Organization) como GRAS e de uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano e comercializada em mais de 50 países, inclusive no Brasil, na inibição do desenvolvimento pós-germinativo de esporos e formação de toxina por *Clostridium botulinum* em queijos fundidos pasteurizados (NOGUEIRA, 2010).

No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria nº 6 de 1990), para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, numa dose máxima de 12,5 mg/Kg. As portarias 34(1992) e 29 (1996), do Ministério da Saúde autorizam a utilização da nisina em requeijão e em queijo fundido, respectivamente (BRASIL, 1996). Já o Ministério da Agricultura e do Abastecimento aprovaram, no ano de 1998, a utilização de nisina em solução 0,02% para o emprego em superfícies externas de embutidos, mais especificamente de salsichas.

As pesquisas existentes sobre aplicação de bacteriocinas em alimentos sustentam a hipótese do potencial de aplicação das bacteriocinas na conservação de alimentos. As evidências são fortes na indústria láctea, devido a sua aplicação em alimentos fermentados, mas a atividade de bacteriocinas contra patógenos também tem sido evidente contra a *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (ROSS et al., 2002).

Como opção tecnológica para aplicação na indústria de alimentos é que podem ser aplicadas imobilizadas a uma matriz ou embalagem. Uma variedade de métodos de imobilização vem sendo propostos, como: adsorção das bacteriocinas a materiais plásticos, incorporação a matrizes de diversos tipos, como gelatina, alginato, celulose, polietileno, entre outros. Um recente avanço neste campo foi a utilização de bacteriocinas imobilizadas para o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas ou ativas (FAGUNDES, 2008; SOUZA, 2010).

As embalagens bioativas são um sistema inteligente que envolve as interações entre a embalagem ou seus componentes e o alimento. Esta tem como objetivo inibir ou retardar o crescimento de microrganismos que possam contaminar o alimento embalado. A incorporação de moléculas bioativas, como bacteriocinas, pode ser de três formas distintas: a) pela incorporação das substâncias antimicrobianas em sachês conectados à embalagem, dos quais a substância bioativa é liberada durante o armazenamento; b) incorporação direta do agente antimicrobiano ao filme e c) incorporação do agente antimicrobiano ao revestimento da embalagem que atua como sua carreadora (COOKSEY, 2001; MAURIELLO et al., 2004).

Alguns autores confirmam a efetividade da adição de bacteriocinas incorporada a matriz de embalagens. Siragusa et al. (1999) demonstraram a aplicação da nisina ao imobilizá-la em gel de alginato de sódio, que recobria carnes, permitindo a sua liberação de maneira gradativa resultando em uma redução de 3 log UFC/cm² na contagem de *Brochotrix thermosphacta*. Já Marcos et al. (2007), ao adicionarem enterocinas, uma bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium* CTC492 em embalagem filme de alginato para embalar presunto cozido, constaram o controle de *L. monocytogenes* durante 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

Para o controle de mastite bovina, foi desenvolvido uma espécie de lenço (Wipe-out[®]), a base de nisina, que é comercializada para a limpeza das tetas, que previne a mastite bovina (COTTER et al., 2005). Segundo COELHO et al. (2007), aureocina A53 também possui potencial de aplicação no tratamento da mastite bovina causada por estirpes de *S. aureus*, uma vez que, esta bacteriocina foi capaz de inibir 82% de *S. aureus* e 68% de *Streptococcus agalactiae* envolvidos em casos de mastite.

3.2 Bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp.

O gênero de bactérias *Staphylococcus* é bastante estudado, e dentre os motivos que movem as pesquisas desse grupo de bactérias, destaca-se a capacidade de produção de bacteriocinas.

Em 1885, Babes observou a ação antimicrobiana de estirpes de *Staphylococcus* por outra estirpe de *Staphylococcus* sp. durante o crescimento em meio de cultura sólido (JACK et al, 1995). Mas somente em 1946, as substâncias dotadas de capacidade antimicrobianas produzidas por esse gênero de bactérias receberam o nome de estafilococcinas. Desde então, iniciou-se a pesquisa e estudos com o objetivo de detecção e caracterização das substâncias. A maioria das estafilococcinas pertence a classe I e II das bacteriocinas. Na tabela 2 são apresentadas algumas bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* ssp.

Tabela 2 - Bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp.

Bacteriocina	Estirpe Produtora	Referências
Pep5	<i>S. epidermidis</i> 5	ERSFELD-DRESSEN, SAHL; BRANDIS (1984)
Epicidina 280	<i>S. epidermidis</i> BN280	HEIDRICH et al. (1998)
Epidermina	<i>S. epidermidis</i> Tü3298	ALLGAIER et al. (1986)
Epilancina k7	<i>S. epidermidis</i> K7	VAN DE KAMP et al. (1995)
Nukacina ISK-1	<i>S. Warneri</i> ISK-1	ASO et al. (2005)
Simulacina3299	<i>S.simulans</i> 3299	CEOTTO (2009)
Estafilococcina C55á C55â	<i>S. aureus</i> 55	NAVARATNA; SAHL; TAGG (1999)
EstafilococcinaBsa	<i>S. aureus</i> CA	DALY et al. (2010)
Estafilococcina 462	<i>S. aureus</i>	HALE, HINS DILL (1973)
EstafilococcinaIYS2	<i>S. aureus</i>	NAKAMURA et al. (1983)
Aureocina A53	<i>S. aureus</i> A53	NETZ et al. (2001)
Aureocina A70	<i>S. aureus</i> A70	NETZ et al. (2002a)
Bacteriocina 1829	<i>S. aureus</i> KSI1829	CRUPPER, IANDOLO (1996)

Fonte: Autor, 2014 - adaptado de Bastos et al., 2009; Souza, 2010.

As estafilocóccinas promovem a saída de moléculas de baixo peso molecular da célula alvo, como íons, aminoácidos e moléculas energéticas (ATP). A perda dessas moléculas, pela formação de poros, acarreta despolarização da membrana, além de promover o bloqueio da síntese de DNA e RNA, assim como a síntese de proteínas e polissacarídeos. Além disso, as estafilocóccinas também atuam sobre a síntese de parede celular, impedindo a formação do peptidoglicano (BASTOS et al., 2009).

As estafilocóccinas são produzidas tanto pelo grupo *Staphylococcus* coagulase negativo quanto no grupo *Staphylococcus* coagulase positivo. Dentro desses dois grupos existem espécies que se destacam, sendo alvo da maioria dos estudos sobre a produção de

estafilocóccinas. Aquelas produzidas por *Staphylococcus* sp coagulase negativa mais estudadas atualmente são as produzidas por *S. epidermidis* e são classificadas como bacteriocinas de classe I. Porém, outras bacteriocinas produzidas por outras espécies de *Staphylococcus* sp. também já foram identificadas e purificadas e são objeto de estudos (SOUZA, 2010).

A Pep5, produzida pela estirpe *S. epidermidis*, também é bastante estudada, trata-se de uma bacteriocina de classe I, com massa molecular de 3.448 Da (BASTOS et al., 2009). A atuação desta se dá pelo encaixe sobre a membrana da célula alvo e subsequente formação de poros, ou ainda, pela inibição de biossíntese de parede celular (HOFFMANN et al., 2004).

A epicidina 280 produzida por *S. epidermidis* BN280 pertence a classe I e possui 30 aminoácidos em sua molécula, sendo a sua sequência de aminoácidos muito similar a sequência da Pep5, porém as poucas diferenças que existem, permitem que a ação antimicrobiana de epicidina 280 seja maior do que a apresentada pela Pep5 (HEIDRICH et al., 1998).

A epidermina foi inicialmente isolada e purificada da estirpe *S. epidermidis* Tü3298, porém pode ser isolada de outros *S. epidermidis* e outras espécies de *Staphylococcus* sp. Essa bacteriocina apresenta 2.164 Da de massa molecular, sendo esta da classe I. A expressão do gene de síntese dessa molécula é controlada pelo sistema *quorum sensing*. Sendo assim, a produção de epidermina é controlada pela interação da célula bacteriana e o meio ambiente, assim como, a densidade populacional, a presença suficiente de nutrientes no meio no qual a bactéria se encontra, entre outros interferentes (KIES et al., 2003; BAI; RAI, 2011).

A Nukacina ISK-1 é um peptídeo antimicrobiano que foi isolado de *Staphylococcus warneri*, oriundo de arroz fermentado. Bastos (2009) relata que mesmo em tratamento térmico de 120°C por 20 minutos, a mesma permaneceu com 60% da sua atividade bacteriocigênica.

A produção de bactericidas por *Staphylococcus* sp. coagulase positiva está relacionada com estirpes de *S. aureus*. Geralmente são classificadas como bacteriocinas da classe I e II. Muitas estão bem caracterizadas genética e bioquimicamente, porém algumas ainda estão parcialmente caracterizadas, necessitando de estudos que esclareça características bioquímicas e genéticas. Todavia, mesmo apresentando poucas informações sobre algumas estafilocóccinas, as características preliminares destas substâncias tem comprovado seu potencial para aplicação prática (BASTOS et al., 2009).

Dajani et al. (1969) purificaram um agente inibidor de culturas de *S. aureus* C55, onde demonstraram a resistência da mesma quando armazenada a -20°C durante várias semanas, porém verificaram que, diante da fervura durante 15 minutos, a sua atividade sofria uma

ligeira diminuição. Porém Navaratna et al (1998), estudando esta mesma substância, perceberam que ação antimicrobiana ocorria da produção de três peptídeos distintos, sendo denominados de C55 α , C55 β e C55 γ , e não de somente um por um peptídeo como foi anteriormente descrito em 1969.

Crupper e Landolo (1996) isolaram um agente antimicrobiano (Bac 1829), que caracterizaram como sendo uma molécula sensível a enzimas proteolíticas e estável ao calor, porém sendo inativada em tratamento térmico de 95°C/15 minutos ou mais. Esta apresentou ação bactericida contra *Streptococcus suis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* e *Moraxelabovis*.

A bacteriocina A53 é um peptídeo extraído de uma estirpe de *S. aureus* isolado de leite comercial. Esta apresenta características atípicas, pois apresenta estrutura rígida em meio aquoso e alta estabilidade a temperaturas elevadas e pH extremos (NETZ et al., 2002a). Possui atividade antimicrobiana frente a bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*. Além disso, apresenta ação antagônica também frente a estirpes de *L. monocytogenes* e outras estirpes de *S. aureus* associadas à mastite bovina (OLIVEIRA et al., 1998 a, c).

A bacteriocina A70 foi isolada da estirpe *S. aureus* A70, isolada de leite comercial, sendo caracterizada como termoestável e com ação inibitória contra bactérias Gram-positivas, incluindo outras estirpes de *Staphylococcus*, dos gêneros *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e de *Listeria*, incluindo *L. monocytogenes* (OLIVEIRA et al., 1998a).

A estafilococcina 462 foi isolada em 1973 de um isolado de *Staphylococcus* sp. de origem animal e apresenta em torno de 9kDa de peso molecular. Esse peptídeo é sensível a tratamento térmico e apresenta perda parcial de sua capacidade antimicrobiana, quando tratado com enzimas proteolíticas (BASTOS et al., 2009).

A estafilococcina IYS2 foi isolada de *S. aureus* oriundo de saliva humana, sendo selecionada de 200 estirpes, pois apresentou maior zona de inibição contra a bactéria indicadora. A molécula não resiste a aquecimento de 100°C/15min., porém quando a temperatura é ajustada para 120°C há uma perda de 75% da atividade. A atividade antimicrobiana é totalmente perdida quando a mesma é tratada com enzimas proteolíticas (BASTOS et al., 2009).

3.3 *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas

Somente entre 1879 e 1882, as bactérias do gênero *Staphylococcus* foram mencionadas pela primeira vez, como a causadora de enfermidades infecciosas em humanos. O termo *Staphyle* tem origem grega, que significa cacho de uva e *coccus* significa grão ou semente, estando relacionado com a organização celular desse gênero de bactérias (EUZÉBY, 2011).

A primeira associação do gênero de *Staphylococcus* a doenças de origem alimentar foi em 1884 sendo relacionado ao consumo de queijo. Em 1914, M.A. Barber demonstrou reproduzindo em si mesmo, que ao beber leite proveniente de vacas com mastite havia manifestação de uma doença de origem alimentar. Mas foi somente em 1930 que foi constatado a relação entre a bactéria e sintomas de uma doença de origem alimentar, quando observou-se que os sintomas surgiram após a ingestão de um filtrado de cultura de *Staphylococcus aureus* (ICMF, 1995).

Fazem parte desse gênero mais de 45 espécies e 24 sub-espécies (EUZÉBY, 2011), sendo estas divididas em coagulase positiva e coagulase negativa. *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas, catalase positiva e oxidase negativa. São anaeróbios facultativos, apresentam diâmetro de 0,5 a 1,5 μ m, são imóveis e não produzem esporos. Grande parte das espécies que compõem esse gênero apresentam complexo requerimento nutricional, necessitando de uma fonte protéica com 5 a 12 aminoácidos essenciais, e ainda, vitaminas do complexo B. Todas as espécies apresentam resistência a ambientes de alta salinidade, sobrevivendo em meio com até 10% de NaCl e alguns casos suportam até 20%. Todavia, não são bons competidores quando estão em ambiente onde existem outros microrganismos para concorrer com os nutrientes (ICMSF, 1995; JAY, 2005).

A respeito do pH, *Staphylococcus* cresce entre os valores de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo entre 6,0 e 7,0. Quanto à atividade de água, essas bactérias são capazes de crescer em valores mais baixos, como de 0,83, quando outros fatores, como: pH, presença de nutrientes e potencial de óxido-redução, forem favoráveis ao seu crescimento (JAY, 2005).

Staphylococcus sp apresentam fatores de virulência que são associados à sua capacidade enterotoxigênica. A pesquisa das enzimas coagulase e termonuclease são os testes mais realizados como evidência de sua propriedade enterotoxigênica, sendo amplamente utilizadas para correlacionar a cepa isolada com a produção de enterotoxina, embora a relação entre a produção de coagulase e da enterotoxina não seja absoluta (ORDEN et al., 1992; WONG; BERGDOLL, 2002).

A coagulase é um fator enzimático que causa coagulação da fibrina, resultando numa espécie de coágulo. A produção de coagulase é um importante determinante fenotípico de isolados de *Staphylococcus* sp., e por este motivo o gênero é dividido em dois grupos distintos, o grupo de linhagens *Staphylococcus* coagulase positivas e *Staphylococcus* coagulase negativas (LANCETTE; TANINI, 1992).

Sabe-se que o coágulo produzido pela enzima coagulase resulta no acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesas do hospedeiro. A produção de coagulase é muitas vezes associada à capacidade de produção de toxinas por espécies de *Staphylococcus*, sendo desta forma um indicador indireto do potencial patogênico do microrganismo, justificando assim, seu isolamento (SANT'ANA; AZEREDO, 2005, LUZ, 2008).

Esses microrganismos estão presentes na superfície corpórea dos animais de sangue quente e de humanos. A maioria encontra-se principalmente nas fossas nasais, mãos e braços. Grande parte dos animais domésticos abriga *Staphylococcus* e esses são conhecidos como “linhagens animais”. Assim, as linhagens que geralmente estão associadas a mucosa e a pele humana são chamadas de “linhagens humanas”. Essas espécies de *Staphylococcus* estão distribuídas de maneira diversas nos alimentos, animais, tecidos humanos e também estão relacionadas a infecções em animais e humanos (Tabela 3).

Tabela 3 - Algumas linhagens de *Staphylococcus* e locais que comumente são encontradas.

Linhagens	Local de Identificação
<i>S.aureus</i>	Animais domésticos, mastite bovina, pele humana e pele animal, leite e queijos.
<i>S.aureus subsp. anaerobius</i>	Infecção em ovelhas
<i>S. delphini</i>	Golfinhos
<i>S. cohnii</i>	Pele humana, trato urinário, feridas infectadas
<i>S. epidermidis</i>	Pele humana
<i>S. haemolyticus</i>	Pele humana, infecções humanas
<i>S. hyicus</i>	Pele de porcos, leite, frangos,
<i>S. xylosus</i>	Pele humana e primatas inferiores
<i>S. simulans</i>	Pele humana e primatas
<i>S. schleiferi subsp. schleiferi</i>	Infecções humanas
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	Infecção de orelhas de cães
<i>S. sciuri</i>	Pele de roedores
<i>S.lentus</i>	Cabras e leite de cabra
<i>S.caprae</i>	Cabras e leite de cabra

Fonte: Autor, 2014 - adaptado de JAY (2005)

A incidência de *Staphylococcus* em alimentos é comum e está relacionada geralmente a produtos de origem animal e alimentos manipulados por pessoas hospedeiras assintomáticas ou por manipuladores que não apresentam condições de higiene satisfatórias (WONG; BERGDOLL, 2002). A proliferação de *Staphylococcus* em alimentos pode também ocorrer devido a tratamento térmico inadequado ou a um subprocessamento; calor insuficiente para destruir as células bacterianas, além de uma contaminação pós-processamento (JAY, 2005).

O gênero *Staphylococcus* está relacionado com elevado índice de doença de origem alimentar, principalmente pela espécie *S. aureus*. Sabe-se que a intoxicação alimentar estafilococcica é causada por enterotoxinas produzidas por estirpes enterotoxigênicas, ou seja, linhagens que contenham genes codificadores de enterotoxinas. Todavia, nem todas as linhagens de *Staphylococcus* sp podem ser caracterizadas como produtores de enterotoxinas, pois, para isto, necessitam carregar em seu genoma genes codificadores de enterotoxinas (LONCAREVIC et al., 2005).

A primeira notificação de surto de intoxicação alimentar relacionado a *Staphylococcus* sp. ocorreu em 1884, no Estado de Michigan, EUA, relacionado com o consumo de queijo tipo cheddar contaminado (SANTANA et al., 2010). As espécies que geralmente estão associadas a intoxicação alimentar são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenese* e *S. intermedius*, sendo *S. aureus* a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar, representando, em média, 98% dos surtos por este gênero (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O período de incubação pode variar de 1 a 6 horas, mas geralmente é de 4 horas. Os sintomas têm duração de 24 a 48 horas e o indivíduo pode apresentar náuseas, câibras abdominais agudas, diarreia, cefaleia, sudorese, prostração, queda de temperatura corporal, e em alguns casos, febre, que está associada a alta ingestão de toxinas. Ressaltando que, o período de incubação e a sintomatologia também está correlacionada à sensibilidade individual e a quantidade de toxina no alimento ingerido. O tratamento de pessoas saudáveis consiste em repouso e manutenção do balanço hidroeletrólítico (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Surto de intoxicação alimentar por produtos lácteos, são descritos no decorrer de décadas passadas até os dias de hoje em vários países (BORGES et al., 2008; BARANCELLI et al., 2011). Vários estudos têm classificado o queijo de coalho, principalmente o artesanal, como impróprio para o consumo humano, devido ao elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas, dentre essas: *E. coli* enteropatogênica, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; BRUNO et al., 2005; SILVA et al., 2010).

No Brasil, surtos de doenças veiculadas por alimentos envolvendo produtos lácteos estão geralmente relacionados com o consumo de queijos tipo Minas frescal, Minas padrão e queijo de coalho. As vias de contaminação desses queijos podem ser o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. Além disso, a mastite bovina, que tem o *Staphylococcus* como principal agente etiológico e a contaminação pós-processamento térmico se revelam como importantes causas da contaminação de *Staphylococcus* em produtos lácteos (BORGES et al., 2008).

A diversidade de espécies do gênero *Staphylococcus* observadas no leite e produtos lácteos fabricados a partir de leite cru é influenciada por vários fatores. O leite é definido como estéril, porém a sua microbiota é composta por microrganismos oriundos do processo de obtenção e beneficiamento. A passagem pelo canal da teta, o contato com a pele do animal e com o ambiente a qual o animal está inserido e, ainda, a higiene dos manipuladores e equipamentos de ordenha são fatores intrinsecamente relacionados a presença de *Staphylococcus* do leite e seus derivados (GILL et al., 2006). Portanto, todo o caminho percorrido pelo leite até o seu beneficiamento pode também estar colonizado por bactérias patogênicas como *Staphylococcus enterotoxigênico*.

De acordo com Câmara (2002), entre 1991 e 1992 ocorreram oito surtos de intoxicação estafilocócica em Minas Gerais, dos quais 62,5 % (5/8) foi associado ao consumo de queijo Minas Frescal. No período compreendido entre os anos de 2000 a 2010 foram notificados no estado de São Paulo 239, surtos envolvendo 2.418 casos de gastroenterite relacionados ao consumo de leite e derivados, onde *Staphylococcus aureus* foi o agente bacteriano mais frequente (MERUSSI; MAFFEI; CATANOZI, 2012).

Altas contagens de *Staphylococcus* em queijo de coalho produzido em vários estados da Nordeste brasileiro têm sido relatadas por vários pesquisadores (Tabela 4).

Tabela 4 - Ocorrência *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos de coalho produzidos no nordeste do Brasil.

Tipo de queijos	Estado	Amostras Impróprias* (%)
Santos et al. (1995)	Fortaleza	62,5%
Borges et al. (2003)	Fortaleza	92,0%
Santana et al., (2008)	Sergipe	46,7%
Fai et al. (2009)	Pernambuco	72,7%
Tigre e Borelly (2010)	Bahia	35,0%
Meneses et al. (2012)	Bahia	45,0%
Evêncio-Luz, et al. (2012)	Pernambuco	31,2%

Fonte: Autor, 2014.

* Percentuais de amostras em desacordo com a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2001).

O registro de casos de intoxicação alimentar estafilocócica no Brasil ainda não é frequente, o que restringe informação segura sobre a prevalência das enterotoxinas estafilocócicas. Sua notificação não é considerada compulsória no Brasil, devido a ligeira recuperação e à sintomatologia geralmente branda, pois é necessário a ocorrência de um grande surto para a vigilância sanitária e epidemiológica ser acionada (FRAZIER; WESTHOFF, 2000; SANTANA et al., 2010; LUZ, 2008). Quando há uma investigação por conta de órgãos competentes, a confirmação da intoxicação alimentar estafilocócica é estabelecida a partir da recuperação de linhagens de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênico nas sobras de alimentos e das culturas de fezes das pessoas acometidas, pela detecção de enterotoxinas nos alimentos suspeitos (ICMSF, 1995; CREMONESI et al., 2005).

As enterotoxinas são exotoxinas, que são proteínas bacterianas tóxicas excretadas no meio durante o crescimento do microrganismo. Esse tipo de toxina bacteriana promove diarreia extremamente líquida, agindo diretamente no tecido intestinal promovendo lesões estruturais e/ou químicas, desencadeando a perda de líquido no intestino (FORSYTHE, 2002). São produzidas por *Staphylococcus* spp. e classificadas como superantígenos bacterianos, devido ao reconhecimento do antígeno *in vivo*. Esse superantígeno atua sobre diferentes células T, estimulando essas a produção de citocinas, interferon-gama e fator de necrose

tumoral, moléculas proteicas estimulantes do sistema imunológico que são responsáveis pelos sintomas da intoxicação (JAY, 2005).

As enterotoxinas apresentam baixo peso molecular (27,5 a 30,0 kDa) e suas cadeias polipeptídicas apresentam quantidades apreciáveis de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina. Elas são higroscópicas, sendo facilmente solúvel em água e soluções salinas e apresentam ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,6. São amplamente estáveis, resistindo à maioria das enzimas proteolíticas, como pepsina, quimotripsina, renina, papaína e tripsina, por isso continuam ativas no trato digestivo após a ação das enzimas digestivas. (BALABAN; RASOOLY, 2000; JAY, 2005; SANTANA et al., 2010).

O sítio de ação das enterotoxinas é sobre o trato gastrointestinal por meio de estímulo, transferido pelo nervo vago ao centro do vômito que induz a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado, provocando vômitos intensivos. Assim, também atuam sobre a mucosa intestinal causando inflamação e irritação da mucosa do estômago e intestino delgado (BORGES et al., 2008).

A produção de enterotoxinas ocorre durante todas as fases do crescimento bacteriano, sendo influenciada pela temperatura, pH, atividade de água, tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato. Em temperaturas ótimas, a enterotoxina torna-se detectável entre 4 a 6 horas. Curiosamente as enterotoxinas estafilocócicas quando purificadas tornam-se mais termossensíveis que as não purificadas, enquanto que, a inativação por tratamento térmico é mais rápida em solução tampão que em meios de cultura e alimentos (WONG; BERGDOLL, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A termoestabilidade das enterotoxinas é um problema para as indústrias de alimentos, pois essas são capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Todavia, Bergdoll (1973) demonstrou que quando presentes em pequenas concentrações podem ser inativadas por tratamento térmico de esterilização aplicado a alimentos enlatados. Segundo Baird-Parker (1990), a inativação da toxina ocorre em tratamento de 3 a 8 minutos a 121° C. Já para a FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2012), a toxina estafilocócica torna-se sensível em tratamentos de 98,9° C por 68,5 min ou a 126,7° C por 6,2 minutos. A produção de enterotoxina é ideal em alimentos com pH neutro, sendo o pH ácido desfavorável, ocorrendo a inibição de síntese de enterotoxinas em pH menor que 5,0. Por outro lado, pHs alcalinos levam a diminuição da síntese de enterotoxinas do tipo A, C e D (LOIR et al., 2003).

As linhagens de *Staphylococcus* conseguem crescer em ambientes desfavoráveis para a síntese de enterotoxinas (JAY, 2005). Portanto, a presença de células de *Staphylococcus* não confirma a existência de enterotoxinas. A composição do meio em que a linhagem produtora se encontra pode interferir, chegando até inibir a produção da enterotoxina (FRIEDMAN, 1966; MORSE, MAH, DOBROGOSZ, 1969, KATSUNI, KONDO, 1973).

O estudo do genoma de linhagens produtoras de enterotoxinas demonstra uma grande variabilidade de produção, onde a expressão temporal de cada gene é controlada por uma complexa rede de regulação, envolvendo reguladores ligados à densidade populacional (*quorum sensing*) e modificações das condições físico-químicas e nutricionais do meio, revelando uma interação entre metabolismo celular e capacidade enterotoxigênica (CRETENET; EVEN; LE LOIR, 2011).

As enterotoxinas são denominadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Atualmente são conhecidas 23 tipos de enterotoxinas estafilocócica (*sea, seb, sec1, sec2, sec3, sed, see, seg, seh, sei, selj, selk, sell, selm, seln, selo, selp, selq, ser, ses, set, selu e selv*) (CUNHA, 2009; LYRA et al., 2013). As enterotoxinas clássicas, *sea, seb, sec, sed, see*, são assim denominadas por serem as mais frequentemente relacionadas com surtos de intoxicação alimentar. Sendo as demais conhecidas como não clássicas. Aproximadamente 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica são causados pelas enterotoxinas dos tipos *sea* a *see* (CREMONESI et al., 2005). Os 5% restantes de intoxicações devem estar associadas com outras enterotoxinas estafilocócica identificadas (DINGES, ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; MARTIN et al., 2001).

O gene para enterotoxinas estafilocócica tipo A (*sea*) é composto de 771pb e codifica uma proteína de 27,1 kDa (HUANG et al., 1987). *Sea* é expressa na metade da fase exponencial do crescimento dos estafilococos (TREMAINE et al., 1993), sendo a detecção do gene *sea* em isolados de *S. aureus* importante, pois a *Sea* é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988). Uma quantidade tão pequena como 100- 200ng de *Sea* pode produzir sintomas (ASAO et al., 2003). Além disso, é a enterotoxina mais comum envolvida em intoxicações alimentares seguida por *sed* e *seb* (BALABAN; RASOOLY, 2000).

O gene *seb* consiste de 798 nucleotídeos e codifica uma proteína de 31,4 kDa (JOHNS JR; KHAN, 1988). O gene *seb* é cromossomal em isolados clínicos de *S. aureus* envolvidos em intoxicação alimentar, embora seja carregado por um plasmídeo em outros isolados bacterianos (SHAFER; IANDOLO, 1978). A enterotoxina estafilocócica B pode ser considerada como uma potencial arma biológica (DINGES et al. 2000).

A enterotoxina *sec* é heterogênea e contém algumas variantes, designadas *sec1*, *sec2*, *sec3*, *secbovina* e *secovina*. Estas foram classificadas com base nas diferenças antigênicas e no hospedeiro animal com o qual elas estão associadas (MARR et al., 1993). O gene *sec1* contém 801pb e codifica uma proteína de 27,4 kDa, o gene *sec2* contém 801pb e codifica uma proteína de 26 kDa (BOHACH; SCHLIEVERT, 1989) e o gene *sec3* contém 798pb e codifica uma proteína de 27,4 kDa.

O gene *sed* foi encontrado no plasmídeo da penicilinase de 27,6 kb e codifica uma proteína de 26,3 kDa (BAYLES; IANDOLO, 1989). Esta enterotoxina D é produzida normalmente em quantidades reduzidas, todavia, doses entre 100 a 200 ng podem promover sintomas, especialmente, em crianças e idosos (KOKAN; BERGDOLL, 1987).

A enterotoxinas estafilocócicas tipo E (*see*) é uma proteína de 29 kDa (COUCH et al., 1989) que apresenta homologia com *sea* e *sed*, no entanto, maior homologia (81%) com SEA (BALABAN; RASOOLY, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são codificadas por genes presentes em bacteriófago, plasmídios, cromossomo e ilhas de patogenicidade cromossomal. As enterotoxinas estafilocócica podem ser rotineiramente detectadas por vários métodos sensíveis e específicos, através de testes bioquímicos, imunológicos e moleculares (SANTILIANO et al., 2011).

3.4 Reação em Cadeia de Polimerase: Um Método de Detecção de Genes Enterotoxigênicos

Nas ultimas décadas tem-se observado um crescimento expressivo de técnicas moleculares para detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos (DESTRO, 1995). Dentre essas técnicas destaca-se a PCR, que fundamentam-se na amplificação da sequencia de DNA pela reação de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR).

Métodos moleculares baseados na PCR podem demonstrar a presença de linhagens de *Staphylococcus* toxigênicos, antes da expressão das toxinas, com base nas sequências específicas dos genes. Desse modo, estes métodos tornam-se técnicas simples e reprodutíveis, para a detecção enterotoxinas estafilocócicas funcionando como ferramenta genética para estudos epidemiológicos de doenças transmitidas por alimentos (HOLECKOVÁ et al., 2002; LUZ, 2008; SANTANA et al., 2010).

A técnica da PCR foi desenvolvida na década de 80 que consiste na amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, fazendo uso de *primers*, que são duas sequências de nucleotídeos iniciadores que possuem o objetivo de hibridizar com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Para essa reação ocorrer faz-se necessário alguns componentes básicos como nucleotídeos, taq DNA polimerase, solução tampão, magnésio, *primers* e DNA molde. Assim, a reação ocorre em três etapas e geralmente se repete de 20 a 35 vezes, os chamados ciclos, e, assim, obtém-se quantidade DNA para visualização em gel de agarose ou poliacrilamina (SCHAEFER, 2006).

A primeira etapa é chamada de fase de *Desnaturação*, onde se faz uso de temperatura entre 92 e 96°C, com o objetivo de desnaturar o DNA bacteriano e promover separação da fita dupla em fitas simples. A etapa de *Anelamento* é a segunda etapa, ocorrendo entre 37 e 65°C, onde os *primers* se ligam a regiões específicas das fitas simples de DNA bacteriano. A última é denominada de etapa de *Extensão*, onde a enzima DNA polimerase adiciona nucleotídeos nas fitas em crescimento, ocorrendo a 72°C. Após essas etapas são obtidas milhões de cópias de sequências de ácidos nucleicos específicos (GANDRA et al. , 2008).

Todas as etapas da reação são realizadas em um equipamento automatizado, chamado termociclador, que promove a alternância de temperaturas pelo período de tempo e número de ciclos (KONEMAM et al., 2001)

A técnica da PCR tem sido uma ferramenta bastante útil na detecção de estirpes de *Staphylococcus* enterotoxigênico, sendo utilizado para identificar espécies e detectar genes codificadores de enterotoxinas. E, para isso, vários protocolos foram desenvolvidos para aprimorar e melhorar a sensibilidade da técnica (CREMONESI et al, 2006). Dessa maneira, vários autores têm padronizados protocolos específicos para identificação de genes codificadores de enterotoxinas esfilocócica em leite e produtos lácteos (MARTIN et al., 2004; CHIANG et al., 2006; LUZ, 2008).

Freitas et al. (2005), avaliando cepas coagulase negativa de *Staphylococcus* isolados de queijo de coalho comercializado em Pernambuco, detectaram genes codificadores de enterotoxinas em 90% (18/20), sendo a prevalência de *sec* (2/18), *sed* (2/18), *seg* (4/18), *seh* (3/18), *sei* (4/18) e *sej* (2/18).

Borges et al. (2006), avaliaram o perfil enterotoxigênico de *Staphylococcus* isolados de leite cru, coalhada, câmara de maturação e queijo de coalho e constataram que em 37,5% (12/32), obtiveram incidência de *sec* (11/12) e *sea* (1/12). Já Nicolau et al. (2001), avaliaram amostras de queijo mussarela da região de Goiânia e verificaram que 13 linhagens de 127 produziram *sea*, 23,1% *seb*, 7,7% *sec* e 7,7% *sea* e *seb*.

Luz (2008), avaliando leite e queijo de coalho da região agreste de Pernambuco através de PCR, verificou que 20 linhagens de *S. aureus* apresentaram genes codificadores de enterotoxinas não clássicas (*seg*, *seh*, *sei*, *seg + seh*, *seg + sei*, *seg + sej*, *seh + sei*, *seg + seh + sei*, *seg + sei + sej* e *seg + seh + sei + sej*). Já Andrade (2009), pesquisando genes codificadores de enterotoxinas de linhagens de *Staphylococcus aureus* oriundos de queijo coalho produzido em Fortaleza, encontrou um percentual de 45,7% de genes codificadores de enterotoxinas.

Atualmente as técnicas moleculares e suas variações têm auxiliado bastante as pesquisas em saúde pública, sendo um instrumento mais acurado para a pesquisa epidemiológica e avaliação da segurança de alimentos produzidos no Brasil.

3.5 Produção de queijo de coalho em Alagoas

De acordo com a legislação brasileira atual, o queijo de coalho é obtido por coagulação do leite por meio da adição do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não, pela ação de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001).

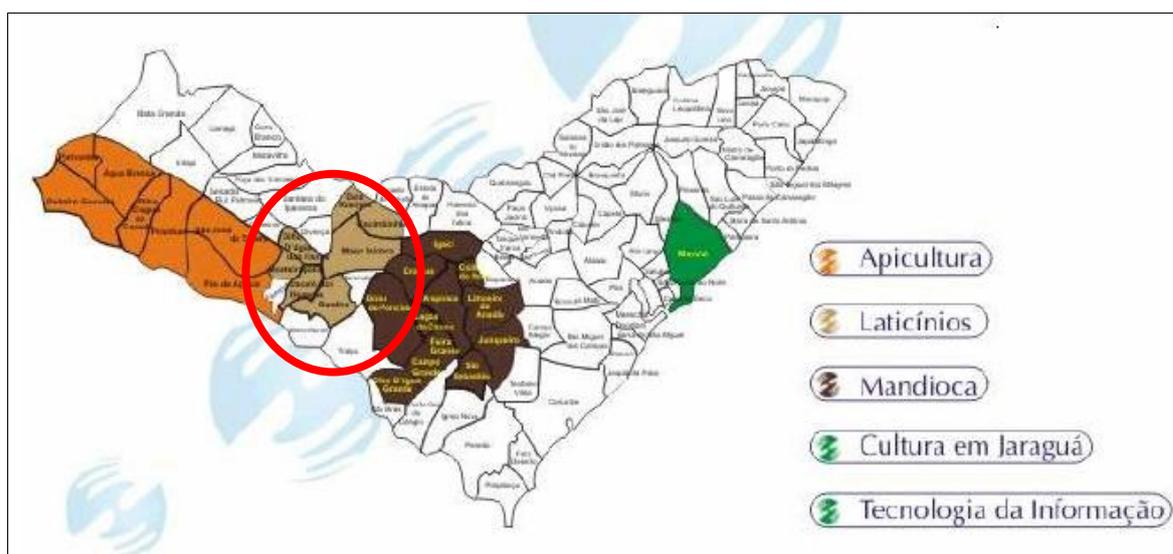
A produção de queijo de coalho no Brasil se destaca na região Nordeste, principalmente nos estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Alagoas onde o produto é tradicional e bastante consumido (LEITE JÚNIOR et al., 2000). A produção rural de queijo de coalho tem participação considerável na economia, colocando-se como extremamente expressiva na formação de renda dos produtores de leite, principalmente daqueles que não têm acesso às usinas de beneficiamento (NASSU et al., 2001). Por ser elaborado na maioria das vezes, em quantidade considerável, a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, o mesmo não vem apresentando-se dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente (FEITOSA et al., 2003; FAI et al., 2009; BORGES et al., 2008; MENESES et al., 2012; EVÊNCIO-LUZ, et al., 2012).

No estado de Alagoas a produção de queijo de coalho representa uma atividade de importância social, econômica e cultural, pois faz parte da agricultura familiar em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras (CERRI, 2002; BORGES, 2006).

Alagoas possui no sertão sua da bacia leiteira, que se destaca como um Território Produtivo de Laticínios, considerando os seguintes municípios: Olho D'Água das Flores, Monteirópolis, Jacaré dos Homens, Batalha, Cacimbinhas, Santana do Ipanema e Major

Izidoro, sendo o referencial da Bacia Leiteira Alagoana. Este território concentra cerca de 30% da produção do estado, onde se tem como especialização produtiva os queijos tipos coalho e manteiga, e bebidas lácteas (Figura 2).

Figura 2 – Cidades do sertão que compõem a bacia leiteira de Alagoas (em destaque com círculo vermelho).



Fonte: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2013.

A bacia leiteira de Alagoas possui aproximadamente 200 fabriquetas de queijo. Com relação à produção diária de derivados do leite, estima-se que cada fabriqueta produz em média 120 Kg de queijo de coalho por dia. Assim, o território produz em média 2.400 Kg de queijo de coalho/dia. Somente 12 laticínios de 69 existentes no município de Major Izidoro apresentam-se devidamente regularizados e podem comercializar seus produtos dentro do estado de Alagoas e apenas dois possuem SIF (Serviço de Inspeção Federal) e podem comercializar fora do estado de Alagoas (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2013).

Daí a preocupação com a qualidade e segurança do queijo de coalho produzido nesta região e em outros estados do nordeste. A contaminação microbiológica deste produto assume destacada relevância para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos que podem agravar o estado de saúde de indivíduos imunodeprimidos ou mesmo levá-lo a óbito (BORGES, 2006; SILVA et al., 2010).

REFERÊNCIAS

ABEE, T. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, n.1, p.1-9, 1995.

ANDRADE, A. P.C. **Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxina de *Staphylococcus* ssp. isolado de queijo coalho.** Dissertação (Pós-graduação de ciência e tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ALLGAIER, H. et al. Epidermin: sequencing of a heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. **European Journal Biochemistry**, v.160, p. 9-22, 1986.

ASO, Y. et al. A novel type of immunity protein, NukH for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warnesi* ISK-1. **Journal of Molecular Biology**, v.69, n.7, p. 1403-1410, 2003.

ASAO, T. et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 33-40, 2003.

BARANCELLI *et al.* *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.

BASTOS, M. C. F.; CEOTTO, H.; COELHO, M. L. V.; NASCIMENTO, J. S. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 38-61, 2009.

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial *Quorum Sensing* and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement**, p. 1S-8S, 1990.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N.; WEISS, R.N.; BORJAC, R.; HUANG, Y.; CHU, F.S. The staphylococcal enterotoxins. **Contributions to Microbiology and Immunology**, v. 1, p. 390-396, 1973.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1431-1438, 2008.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; ARCURI, E. F.; KUAYE, A. Y. Avaliação da contaminação por coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* em uma indústria processadora de queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, p. 309-314, 2006.

BORGES, M. F. et al. Microorganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil / Pathogenic and indicator microorganisms isolated from Ceará, Brazil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Conservation of the Biologically Active Portions of Staphylococcal Enterotoxins C1 and C2. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2249-2252, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro DE 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Revisão n.6 do compendio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde**. São Paulo: ABIA, 1996. v. 1, p.3-31.

BREUKINK, E.; WIEDEMANN, I.; Van KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; SAHL, H. G.; KRUIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2361-2364, 1999.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 393-408, jun./dez. 2003.

BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.9, p. 3003-3010, 1993.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001**. Campo Grande: Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, 2002. Monografia de Especialização em Gestão em Saúde.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. 2007. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G. & HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 1-16, 1997.

CEOTTO, H. **Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus ssp.*** Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 181 p, 2009.

CERRI, C. **Artesãos do futuro**. Globo Rural, Ed. Globo, n. 200, p. 36-49, 2002.

CHEIKHYOUSSEF, A. et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. **Food Control**, v. 20, p. 553-559, 2009.

CHIANG, Y-C. et al. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 66-73, 2008.

COELHO M. L. V.; NASCIMENTO, J. S.; FAGUNDES, P. C.; MADUREIRA, D. J.; OLIVEIRA, S. S.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, M. C. F. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. **Research Microbiology**, v. 158, n. 10, p. 625-630, 2007.

COOKSEY, K. Antimicrobial food packaging materials. **Additives for Polymers**, v. n.8, p. 6-10, 2001.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 299-305, 2005.

CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 127–150, 2011.

CRUPPER S. S.; IANDOLO J.J.. Purification and Partial Characterization of a Novel Antibacterial Agent (Bac1829) Produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3171-3175, 1996.

CUNHA, M. L. R. S. et al. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* and Bovine Mastitis. **International Journal of Medical and Biological**, v. 15, p. 1031-1042, 2009.

DALY, K. M. et al. Production of the lantibiotic by community-acquired *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of bacteriology**, v. 92, n. 4, p. 1131-1142, 2010.

DAJANI, A. S.; TAUBE, Z. Plasmid-mediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 6, p. 594 – 598, 1974.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **Journal of Dairy Technology**, v. 43, n. 3, p. 73- 76, 1990.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DIGAITIENE, A. et al. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. **J Appl Microbiol**, v.112, n. 4, p. 732-742, 2012.

DRIDER, D. et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, n.2, p.564-582, 2006.

DROSINOS, E. H. et al. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1314-1323, 2005.

DESTRO, M.T. **Listeria monocytogenes em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. 1995. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DUARTE, D. A. M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list n° 132. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.469-472, 2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 14 de outubro 2013.

EIJNSINK, V. G. H. et al. Production of class II bacteriocins of lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81., n. 1 – 4, p.639-654, 2002.

ELOTMANI, F. et al. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raïb, a Moroccan traditional fermented milk. **Current Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 10-17, 2002.

EVANGELISTA - BARRETO, N. S. et al. Aplicação de bacteriocinas nos alimentos: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 126/127, p. 44-50, 2004.

EVÊNCIO-LUZ L.; LIMA-FILHO, J. V.; EVÊNCIO-NETO, J. Occurrence of *Salmonella* sp. and coagulase-positive staphylococci in raw eggs and Coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's northeast. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 1463-1466, 2012.

ERSFELD-DRESSEN, H.; SAHL, H. G. & BRANDIS, H. Plasmid involvement in production of and immunity to the staphylococcal-like peptide Pep5. **Journal general. Microbiology**, v.130, n. 1, p. 3029-3035, 1984.

EVENSON, M. L. et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 311-316, 1988.

FAGUNDES, P. C. **Análise da produção das aureocinas A70 e A53 para uso em alimentos e caracterização da Bac 3682**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2008.

FAI, A. E. C. et al. Avaliação da qualidade de queijos de coalho comercializados no entorno da cidade universitária, Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 172-173, p. 160- 165, maio/jun. 2009.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FRIEDMAN, M.E.. Inhibition of Staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures. **Journal of Bacteriology**. v. 92, n. 1, p. 277-278, 1966.

FREITAS, E.I. **Identificação de genes de enterotoxina de *Staphylococcus* ssp. isolado de queijo minas frescal**. Dissertação (Pós-graduação em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed: Atheneu, 2008. 182p.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 681 p.

FOOD AND DRUG ASSOCIATION. **Antimicrobial resistance**: a growing threat. Disponível em: <http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/anti_resist.html>. Acesso em: 17 set. 2012.

FORSYTHE, S.J.. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GALVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R.L. & OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.1-2, p. 51-70, 2007.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas á microbiología de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GHANBARI, M. et al. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria: A review. **Food Sci Technol**, Vienna, v. 54, n. 2, p. 315-324, 2013.

GILL J.J. , et al. 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56 n. 3, p. 471– 481, 2006.

HALE, E. M.; HINNS DILL, R. D. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, n. 6, p. 634-640, 1973.

HANCOCK, R. E. Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, n. 3, p. 156-164, 2001.

HEDRICH, C. et al. Isolation, characterization and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3140-3146, 1998.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, n. 6, p.77-84, 2005.

HERRANZ, C. et al. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiology**. v. 18, n. 2, p. 115-131, 2001.

HENG, N. C. K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In **Bacteriocins: ecology and evolution**. RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. (eds). Springer, New York, p. 45-83, 2007.

HOFFMANN, A. et al. Localization and functional analysis of Pep I, the immunity peptide of Pep 5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.6, p. 3263-3271, 2004.

HOLECKOVÁ, B. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 179-182, 2002.

HUANG, I.Y. et al. Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 15, p. 7006-7013, 1987.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Staphylococcus aureus*. In: ICMSF. Microorganisms in food 5: characterization of microbial pathogens. New York: Kluvers Academic, 1996. p. 299-333.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução de Eduardo César Tondo, et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.

JOHNS JR, M. B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 4033-4039, 1988.

KATSUNI, S.; KONDO, M. Regulation of of staphylococcal enterotoxinB synthesis and its relation to other extracellular proteins. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 26, n. 1, p. 26-29, 1973.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, 2004.

KAISER, A. L. MONTVILLE, T.J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v.75, n. 6, p. 536-540, 1993.

KIES, S, et al. Control of antimicrobial peptide synthesis by the agr quorum sensing system in *Staphylococcus epidermidis*: activity of the lantibiotic epidermin is regulated at the level of precursor peptide processing. **Peptides**, v. 24,n. 3, p. 329-338, 2003.

KOKAN, N. P; BERGDOLL, M. S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 2675-2676, 1987.

KONEMAN, F. W. *et al.* Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p., p. 551-588.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

LEROY, F. e DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **International Journal of Food Microbiology**. v.72, n. 1-2, p.155-164, 2002.

LEITE JÚNIOR, A. F. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, v.14, n.74, p. 53-59, 2000.

LYRA, D. G. et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n. 2, p. 126-130, 2013.

LONCAREVIC, H. J.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; RORVIK, L. M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 344-350, 2005.

LOESSNER, M. et al. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1854-1857, 2003.

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

LUZ, I. S.. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco**. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J.M.; GARRIGA, M. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.1, p.152-158, 2007.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 149-158, 2004.

MCAULIFFE, O. ; HILL, C. ; ROSS, R. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. **J Appl Microbiol**, v. 86, n. 2, p. 251-256, 1999.

MARTIN, M. C. et al. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 279-286, 2004.

MARR, J. C. et al. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4254-4262, 1993.

MENESES, R. B. et al. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 381-392, 2012.

MERUSSI, G. D; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M.. Surtos de gastroenterite relacionados ao Consumo de laticínios no estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 639-645, 2012.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **APL Laticínios no Sertão** (Programa de Mobilização para o Desenvolvimento dos Arranjos e Territórios Produtivos Locais do Estado de Alagoas) Disponível em: http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1247145055.pdf. Acesso em: 10 de junho de 2013.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococcus* e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal**. 2003 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 1995.

MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, n. 5, p.511-519, 1998.

MOLL, G.N., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.76, n. 1-4, p.185-198, 1999.

MORSE, S.A.; MAH, R.A; DOBROGOSZ, W.J.. Regulation of staphylococcal enterotoxin. **Brazilian Journal of Bacteriology**, v. 98, n. 1, p. 4-9, 1969.

NASCIMENTO, N. S., MORENO, I; KUAYE, A. Y.. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NASSU, R.T. et al. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza: **Boletim de pesquisa e desenvolvimento Embrapa Agroindústria Tropical**, n.1, p.28, 2001.

NAKAMURA, R. et al. **Determination of a new antibacterial agent (AT-2266) and its metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography, v. 278, n. 2, p. 321-328, 1983.

NAVARATNA, M.A.; SAHL, H.-G.; TAGG, J.R. Identification of genes encoding two-component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage group II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4268-4271, 1999.

NETZ, D. J. A. et al. Molecular characterization of aureocin A70, a multipetide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 31, n. 5, p. 939-949, 2001.

NETZ, D. J. et al. Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68. n. 11, p. 5274-5280, 2002a.

NETZ, D. J.; et al. Biochemical characterization and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 19, n. 3, p. 745-756, 2002b.

NES, I.F. et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.70, n. 2-4, p.113- 128, 1996.

NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. **Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms.** In: DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. (Eds.). Cell-cell signalling in bacteria. Washinton: American Society for Microbiology. p. 175-192, 1999.

NICOLAU, E. S. et al. Avaliação do potencial de produção e tipo de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *Staphylococcus aureus* em extratos de amostras de queijo tipo mussarela fabricado na região de Goiânia - GO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 92-10, 2001.

NOGUEIRA, V. C. **Culturas de bactérias Lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservantes.** Dissertação (Mestrado em Ciência com área de concentração em Ciência Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, S. S. et al. Genetic analysis of the bacteriocin-encoding plasmids pRJ6 and pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 872-984, 1998a.

OLIVEIRA et al. Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolation from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 229-234, 1998c.

ORDEN, J.A. et al. Production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1 by coagulase negative staphylococci isolate from ruminant mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.39, n 2, p.144-148, 1992.

ORTOLANI, M.B. T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocigênicas. Caracterização da atividade antagonista e identificação Molecular.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de Viçosa, Viçosa, 2010.

QUADRI, L.E.N. et al. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of the carnobacteriocins B2 and BM1. **Journal of Bacteriology**. v.177, p.1144-1151, 1995.

RILEY, M. A; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 117-137, 2002.

RILLA, N.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'I Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**. v.67, n.5, p. 928-933, 2004.

ROSS, R. P. et al. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, n. 1-2, p. 3-16, 2002.

SANTILIANO, F. C., ALMEIDA, B. R., IGNACCHITI, M. D. C., Júnior, O. S. P., (2011). Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, v. 5, n. 3, Ed. 150, Art. 1009.

SANTOS, F. A. et al. Aspectos Microbiológicos Do Queijo Tipo "Coalho" Comercializado em Fortaleza – Ceará. **Boletim de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 13, n. 1, 1995.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTANA, A. S. AZEREDO, D. R. P.. Comparação entre o sistema petrifilm e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 531-535, 2005.

SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C. N.; WILLETT, J. L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 229- 235, 1999.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Science and technology**. v.7, n.3, p.158-165, 1996.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, M. C. D. et al. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SOUZA, A.D.F. **Caracterização da Sam 4244, um peptídeo bioativo com potencial como um bioconservativo em alimento**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do rio de janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SHAFER, W. M.; IANDOLO, J. J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infection and Immunity**, v. 20, n. 1, p. 273-278, 1978.

SCHAEFER, R. **Técnicas em biologia molecular**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006.

THOMAS, L. V.; CLARKSON, M. R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: **Natural food antimicrobial systems**. NAIDU, A. S.(ed). CRC Press, Boca Raton, FL, p. 463-524, 2000.

TIGRE, D. M.; BORELLY, M. A. Pesquisa de Estafilococos coagulase-positiva em amostras de "queijo coalho" comercializadas por ambulantes na praia de Itapuã (SALVADOR-BA). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.2, p.162-166, 2011.

TREMAINE, M. T.; BROCKMAN, D. K.; BETLEY; M. J. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene (*agr*). **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 356-359, 1993.

YANG, R e RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 11, n. 4, p.285-291, 1994.

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal food poisoning**. In: CLIVER, DO; RIEMANN, H.P. Foodborne Diseases. 2.ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. p.231-248.

URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. **Int J Dairy Technol**, v.54, p.146-150, 2001.

UDHAYASHREE, N. et al. Production of bacteriocin and their application in food products. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, n.1, p. 406-410, 2012.

VAN DE KAMP, M. et al. Sequence analysis by NMR spectroscopy of the peptide lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7. **European Journal of Biochemistry**, v. 227, n. 3, p. 757-771, 1995.

XIRAPHI, N. et al.. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Sci.**, v. 80, n.2, p. 194-203, 2008.

4 ARTIGO ORIGINAL

**MORAES, J. O. Potencial enterotoxigênico e antimicrobiano de linhagens de
Staphylococcus spp isolados de queijo de coalho**

* Este artigo será adaptado para submissão no periódico: Foodborne Pathogens and Disease.

RESUMO

Objetivando avaliar a capacidade bacteriocigênica e enterotoxigênica de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo de coalho produzido a partir de leite cru, 110 linhagens de *Staphylococcus* spp. foram submetidas a testes de antagonismo frente a *Listeria monocytogenes*. As linhagens com ação antagonista frente a *L. monocytogenes* foram submetidas a testes de antagonismo frente à *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e ainda, foram identificadas taxonomicamente e avaliadas quanto a presença de genes de enterotoxinas clássicas. Do total de *Staphylococcus* spp. avaliados, 34,5% (38/110) apresentaram ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Das 38 linhagens testadas frente a outros patógenos, nenhuma foi capaz de inibir *S. typhimurium* e *E. coli*, porém, 42,1% (16/38) apresentou inibição frente a *P. aeruginosa* e 2,6% (1/38) frente a *S. aureus*. Das 38 linhagens, 9 (23,7%) pertenciam ao grupo de *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus*) e 29 (76,3%) ao grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa (*S. lentus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hominis*). 60,5% (22/38) apresentaram pelo menos um gene codificador de enterotoxina estafilocócica clássica, presente em 67,6% (6/9) das linhagens do grupo de *Staphylococcus* coagulase positiva e em 55,2% (16/29) do grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa. O gene *sea* e *sec* foram os mais frequentes, 50% (19/38) e 44,7% (17/38), respectivamente. Conclui-se que 42,1% (16/38) das linhagens com ação antimicrobiana não apresentaram genes enterotoxigênicos clássicos. Conclui-se que a capacidade antimicrobiana não possui relação com a presença de genes enterotoxigênicos clássicos.

Palavras-chaves: *Staphylococcus*; Enterotoxinas; Potencial Antimicrobiano.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the bacteriocigênic and enterotoxigenic capacity strains of *Staphylococcus* spp. isolated from curd cheese produced from raw milk. 110 strains of *Staphylococcus* spp. were subjected to antagonism tests against *Listeria monocytogenes*. The strains with antagonistic activity against *L. monocytogenes* were subjected to tests of antagonism against the *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and yet, were taxonomically identified and evaluated for the presence of enterotoxin genes of classical. Of total *Staphylococcus* spp. evaluated, 34.5% (38 /110) showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. Of 38 strains tested against other pathogens, none was able to inhibit *S. typhimurium* and *E. coli* However, 42.1% (16/38) showed inhibition against *P. aeruginosa* and 2.6 % (1/ 38) against *S. aureus*. Of 38 strains , 9 (23.7 %) belonged to the group of coagulase positive *Staphylococcus* (*S. aureus*) and 29 (76.3 %) to the group of coagulase negative *Staphylococcus* (*S. lentus* , *S. haemolyticus* , *S. xylosus* , *S. simulans* , *S. sciuri* , *S. hominis*). 60.5% (22/38) had at least one gene encoding staphylococcal enterotoxin classic, present in 67.6% (6/9) strains of coagulase positive group and 55.2 % (16/29) the group of coagulase negative *Staphylococcus* . The sea and sec gene were the most frequent, 50% (19/38) and 44.7% (17 /38), respectively. It was concluded that 42.1% (16/38) of strains with antimicrobial genes showed no enterotoxigenic classics. It is concluded that the antimicrobial ability has no relationship with the presence of enterotoxigenic genes classics.

Key words: *Staphylococcus*; Enterotoxin; Antimicrobial Potential.

Staphylococcus sp. é um dos patógenos de interesse alimentar frequentemente isolados de alimentos de origem animal. Normalmente são encontrados na superfície corpórea dos animais de sangue quente e de humanos, principalmente nas fossas nasais, mãos, braços de manipuladores e pessoas hospedeiras assintomáticas (BORGES et al., 2008).

O gênero *Staphylococcus* é dividido, com base na capacidade de promover a coagulação do plasma sanguíneo através da enzima coagulase, em dois grandes grupos: coagulase positivo e coagulase negativo. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva é considerado o mais toxigênico por suas características bioquímicas e por frequentemente ser envolvido em surtos de intoxicação de origem alimentar (SORIANO et al., 2002; LONCARENVIC et al., 2005; ERTRAS et al., 2010). Contudo, alguns pesquisadores têm reportado espécies coagulase negativas envolvidas em doenças de origem alimentar e como portadoras de genes codificadores de enterotoxinas (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; DELBES et al., 2006; KIM et al., 2009, LYRA et al., 2013; RUARO et al., 2013).

Atualmente há 23 tipos de enterotoxinas estafilocócicas descritas, sendo as enterotoxinas clássicas (*sea-see*) as mais envolvidas em surtos de origem alimentar (PELLISSER et al., 2009). Os métodos mais utilizados para detecção de enterotoxinas têm sido os baseados no genótipo das bactérias, especialmente aqueles que utilizam a amplificação da sequência de nucleotídeos codificadores de enterotoxinas, como por exemplo, a Polymerase Chain Reaction - PCR (LOVSERT; LONCAREVIC; BERDAL, 2004; BLAIOTTA et al., 2004; CREMONESI et al., 2005; BOEREMA; CLEMEND; BRIGHTWELL, 2006; ERTAS et al., 2010).

Apesar do caráter patogênico que *Staphylococcus* sp pode apresentar, vários estudos (ERSFELD-DRESSEN et al., 1984; ALLGAIER et al., 1986; NETZ, 2002a e b; ASO, 2003; CEOTTO, 2009; DALY, 2010) têm evidenciado que algumas linhagens pertencentes a esse gênero são capazes de produzir estafilocócicas, que são peptídeos capazes de inibir o crescimento de linhagens do mesmo gênero e outros patógenos (OLIVEIRA, 1998b; COELHO, 2007). Esses estudos destacam o isolamento de bacteriocinas produzidas por linhagens de *Staphylococcus* de origem clínica e alimentar (GOV et al., 2001; ESSID et al., 2007; LAUKOVA; SIMONOVA; STROMPFOVA, 2010; RUARO et al., 2013). No entanto, ainda são escassos estudos que relacionem os dois aspectos, a capacidade bacteriocigênica e toxigênica de bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* isolados de alimentos.

Diversos pesquisadores em reportado altas contagens de *Staphylococcus* sp. vêm em produtos lácteos (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; SANTANA et al., 2008; MENESES et al., 2012), incluindo o queijo de coalho, que muitas vezes ainda é produzido a

partir de leite cru e sem os devidos cuidados higiênico-sanitários. Essa contaminação pode ser considerada um problema de saúde pública, visto que, o consumo desse tipo de queijo é bastante difundido no nordeste do Brasil (SANTANA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Diante do exposto esta pesquisa objetivou avaliar a capacidade bacteriocigênica e o perfil enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus* spp isoladas de queijo de coalho produzido a partir de leite cru do sertão de Alagoas.

MATERIAL E METODOS

Amostra

Foram avaliadas 110 linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo de coalho produzidos a partir de leite cru do sertão de Alagoas e realizado testes de antagonismo frente a *L. monocytogenes*. Posteriormente, as linhagens positivas neste teste foram avaliadas quanto a ação antagônica a outros patógenos (*Salmonella thyphimurium*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), a identificação taxonômica e a pesquisa de genes enterotoxigênicos.

Avaliação da capacidade bacteriocigênica das linhagens de *Staphylococcus* sp.

As linhagens de *Staphylococcus* sp foram submetidas ao teste de produção de bacteriocinas frente a *L. monocytogenes* ATCC 19115, utilizando a técnica descrita por Giambiagi-Demarval et al. (1990) com modificações nas quantidades de culturas e meios de cultura utilizados.

A técnica consistiu em adicionar 5µL de cada cultura na forma de pontos na superfície de uma placa contendo meio Brain Heart Infusion (BHI). Após um período de 18h a 37°C, as bactérias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio (30 minutos) e sobre a placa, foram vertidas por 10 mL de meio BHI semi-sólido, acrescido de alíquotas de 0,1 mL do patógeno a ser testado previamente crescido em caldo BHI a 37°C/24h. As placas foram posteriormente reincubadas a 37°C/18h e a atividade antimicrobiana foi observada através da formação de zonas de inibição ao redor dos pontos de crescimento das linhagens produtoras.

Aquelas linhagens que apresentaram caráter bacteriocigênico frente a *L. monocytogenes* (ATCC 19115) foram então testadas frente a outros microrganismos: *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Identificação Taxonômica

A identificação taxonômica foi realizada a partir da caracterização bioquímica e enzimática das linhagens, através do sistema comercial API-Staph (BioMérieux®), conforme recomendações do fabricante.

Identificação de genes enterotoxigênicos em *Staphylococcus ssp.* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as linhagens de *Staphylococcus sp* que apresentaram atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* foram submetidas à pesquisa de genes enterotoxigênicos através da técnica da PCR - Uniplex.

Extração de DNA genômico

Para extração do DNA utilizou-se a técnica por fenol-clorofórmio, conforme metodologia descrita por Fritsch, Maniatis e Sambrook (1989), com algumas modificações. Utilizou-se 1,0 mL de cultura crescida em caldo TSB (Caldo Trypticase de Soja) centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram homogeneizadas em 500 µL de tampão TE 10:1 (Tris-EDTA a 10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1 mM de EDTA) e adicionadas de 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) para lise da parede celular. A suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos, seguida pela adição de 100 µL de tampão STE (2,5% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,25M de EDTA), e incubada por 15 minutos a 60°C, 5 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos no gelo. A reação foi neutralizada com 130 µL de acetato de amônio a 7,5 M, mantendo no gelo por 15 minutos, e então centrifugada a 14.000 rpm por 8 minutos. Aproximadamente 700 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo e misturados com o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1), seguido por centrifugação 14.000 rpm por 5 minutos. Aproximadamente 400 µL de sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e o DNA foi precipitado com aproximadamente 420 µL de isopropanol a -20°C por 60 horas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água deionizada estéril e armazenado sob refrigeração.

Detecção dos Genes Toxigênicos através da Técnica da PCR

Os *primers* utilizados para pesquisa dos genes toxigênicos na PCR foram os descritos por Becker et al. (1998), conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 - Sequências dos primers utilizados para a detecção por PCR dos genes *sea* – *see* em *Staphylococcus* ssp. isolados de amostras de queijo de coalho.

Primers	Sequência de Oligonucleotídeos (5'→ 3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>sea</i> -3b <i>sea</i> -4b	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG TCTGAACCTTCC CAT CAAAAA C	127
<i>seb</i> -1c <i>seb</i> -4b	TCG CAT CAA ACT GACAAA CG GCAGGT ACT CTATAAGTGCCTGC	477
<i>sec</i> -3b <i>sec</i> -4b	CTCAAGAACTAG ACA TAAAAGCTAGG TCAAAATCG GAT TAA CAT TAT CC	271
<i>sed</i> -3b <i>sed</i> -4b	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG TTAATGCTATATCTT ATA GGGTAA ACA TC	319
<i>see</i> -3b <i>see</i> -2c	CAGTACCTATAG ATA AAGTTAAAACAAGC TAACTTACCGTGGACCCTTC	178

Fonte: Autor, 2014.

As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes separadamente, consistiu de uma mistura de 10µL de 10x PCR Buffer (Invitrogen®), 2µL de dNTPmix (Invitrogen®), 3,0 µL do MgCl₂, 5,0 µL de cada *primer*, 0,5 µL da *Taq*DNA polimerase (Invitrogen®). A essa mistura foi adicionados 5µL do DNA genômico extraído e o volume foi completado para 50µL com água MilliQ. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biocycler®, São Paulo, Brasil) de acordo com a seguinte programação: aquecimento a 94°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de amplificação (desnaturação aquecimento a 94°C por 30segundos, anelamento e extensão a 72°C por 1 minuto de 30 segundos, com um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos e a manutenção das amostras a 4°C até a aplicação em gel de agarose. Como controle positivo e negativo foram utilizadas cepas de *Staphylococcus* sp. da *American Type Culture Collection*- ATCC.

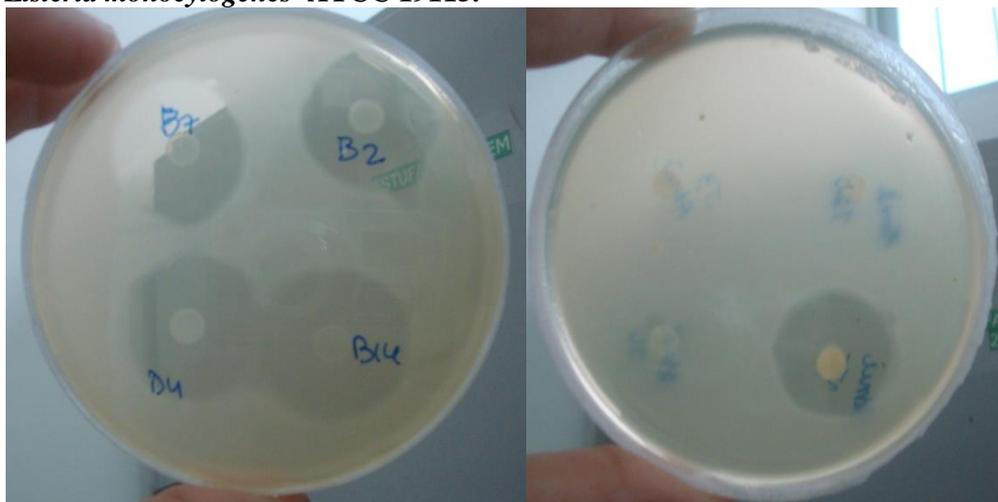
Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de Ultra Violeta (Major Science UVDI-110/220, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 110 linhagens de *Staphylococcus* spp isoladas de queijo de coalho e avaliadas quanto a capacidade bacteriocigênica, observou-se que 34,5% (38/110) possuem capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Os diâmetros dos halos de inibição obtidos variaram entre 3,6 e 22,3mm (Figura 3), onde 7,3% (8/38) apresentaram halos maiores que 20mm, sendo 75% (6/8) identificados como *S. haemolyticus*.

De acordo com a classificação sugerida por Garcia et al. (2006), halos de diâmetros maiores que 10mm representam uma forte inibição. Já Ceotto (2005) e Souza (2010) referem halos maiores que 20mm sendo os de melhor ação antimicrobiana. Esses testes de antagonismo são utilizados como ferramenta inicial na pesquisa da produção de substâncias antimicrobianas por bactéria produtora contra a bactéria indicadora. As zonas de inibição confirmam a presença de substância com potencial antimicrobiano.

Figura 3 - Halos de inibição de linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de coalho frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.



Fonte: Autor, 2014.

Diversos autores apontam resultados divergentes aos obtidos neste estudo, como o de Oliveira et al. (1998), que encontraram 8,7% (4/46) das linhagens de *Staphylococcus* spp isoladas de gado bovino caracterizadas como produtoras de substâncias antimicrobianas. Já Ceotto (2009) identificou 17,8% (46/257) das linhagens de *S. aureus* isolados de mastite bovina produtoras de substâncias antimicrobianas, sendo 14,8% (38/257) com halos maiores que 20mm. Nascimento et al. (2002), avaliando linhagens de *S. aureus* envolvidas em mastite bovina, detectaram 24% (12/50) das linhagens de *S. aureus* com halos de inibição maiores ou iguais a 20mm e no estudo realizado por Souza (2010) obteve-se 5,3% (26/47) linhagens de *S.*

aureus de origem alimentar e clínica com atividade bacteriocigênica, onde 19,2% (5/26) apresentaram halos de inibição maiores que 20mm.

Nenhuma das linhagens que apresentaram efeito bacteriocigênico contra *L. monocytogenes* foram capazes de revelar halos de inibição frente a *S. typhimurium* e *E. coli*, porém 42,1% (16/38) foram capazes de inibir *P. aeruginosa* e somente 2,6% (1/38) identificada como *S. xylosus*, apresentou ação antimicrobiana frente a *S. aureus*.

A ação antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* é um dado relevante, visto que este é um microrganismo deteriorador, que produz grandes quantidades de limosidade em superfície de alimentos, capaz de fermentar grande número de carboidratos, produzindo uma variedade de produtos que afetam o sabor dos alimentos. Além disso, são proteolíticos, lipolíticos e responsáveis pela formação de biofilmes, causando grandes problemas para a indústria de alimentos. Na indústria de produtos lácteos, os microrganismos psicotróficos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. são comumente associados à deterioração de leite cru, o qual é utilizado como matéria prima para produção de queijo de coalho (WANG; JAYARAO, 2001; KUDA; YANO; KUDA, 2007; CAIXETA et al., 2012).

Quanto a ação antimicrobiana de *S. xylosus* frente a *S. aureus*, vários autores relatam resultados semelhantes (GOV et al., 2001; ESSID et al., 2007). Brito et al. (2011), em estudo recente constataram a capacidade de *Staphylococcus* ssp. isolados de leite bovino em produzir uma bacteriocina ativa frente a *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Já Laukova; Simonova; Stropfova (2010) relataram a caracterização de uma bacteriocina produzida por *S. xylosus* com potencial antimicrobiano frente à *Staphylococcus* coagulase negativo, *Pseudomonas* sp. e fungos em salame seco fermentado. Essid et al. (2007) relatam uma linhagem de *S. xylosus* isolados de carne salgada tradicional com ação antimicrobiana frente a *P. aeruginosa*.

S. xylosus tem sido amplamente utilizado na produção de embutidos fermentados e lácteos, além de ocorrer naturalmente como microbiota normal de queijos (MANSOUR et al., 2009). Contudo, este microrganismo também é encontrado na pele e nas mucosas de mamíferos e aves, no solo e superfícies de utensílios (DORDET-FRISONI et al., 2007). Muitos autores caracterizam essa espécie como não patogênica, porém a mesma já foi descrita como agente de infecções oportunistas em animais e humanos (SIQUEIRA; LIMA, 2002, WON et al., 2002). Das 38 linhagens com ação bacteriocigênica frente a *L. monocytogenes*, 23,7% (9/38) pertenceram ao grupo dos coagulase positivas (*S. aureus*) e 76,3% (29/38) ao grupo dos coagulase negativas identificadas como: *S. lentus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hominis*, sendo o maior número pertencente a espécie *S. haemolyticus* (Tabela 6). Esse elevado percentual de *Staphylococcus* coagulase negativo em queijo de

coalho é comum, pelo fato de serem encontrados naturalmente na microbiota do leite bovino, além de serem isolados do úbere dos animais com mastite clínica ou subclínica.

Tabela 6 - Perfil taxonômico das linhagens de *Staphylococcus* sp.

	Espécies	N (%)
Coagulase (+)	<i>S. aureus</i>	9 (23,7)
	<i>S. haemolyticus</i>	12 (31,6)
Coagulase (-)	<i>S. hominis</i>	2 (5,3)
	<i>S. lentus</i>	8 (21,1)
	<i>S. sciuri</i>	1 (2,6)
	<i>S. simulans</i>	1 (2,6)
	<i>S. xylosus</i>	5 (13,2)

Fonte: Autor, 2014.

Semelhantemente a este estudo, Borges et al. (2008a) detectaram maior frequência de espécies *Staphylococcus* coagulase negativa 81,3% (5/6) em relação a 18,7% (1/6) de *Staphylococcus* coagulase positiva, porém, as principais espécies identificadas foram: *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. aureus*, *S. cohnii cohnii*, *S. haemolyticus* e *S. lentus*, sendo *S. epidermidis* em maior, ao avaliarem o perfil de espécies de *Staphylococcus* isoladas de queijo de coalho produzido em Fortaleza.

Coton et al. (2010) ao avaliarem leite cru de vaca e queijos na França identificaram como espécies prevalentes: *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* e *S. succinus*. Já Piessens et al. (2011), ao determinarem a distribuição de *Staphylococcus* coagulase negativa em leite de vacas leiteiras na Bélgica verificaram maior frequência de *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. simulans*; e Ruaro et al., (2013), ao avaliarem o perfil de *Staphylococcus* coagulase negativo em leite e queijo bovino na Itália, evidenciaram que *S. arlettae*, *S. carnosus*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, e *S. rostri* foram as mais frequentes.

As diferentes espécies de *Staphylococcus* identificadas no presente e nos demais estudo citados deve-se provavelmente a distribuição geográfica diferenciada, além da qualidade do leite cru utilizado e das medidas higiênico-sanitárias que devem ser adotadas durante todo processamento e comercialização do queijo de coalho (RUARO et al., 2013).

S. haemolyticus faz parte da microflora da pele de humanos, em especial nas regiões das axilas e perineo (ZADOKS; WATTS, 2009). Essa bactéria pode promover septicemia,

peritonite, otite e infecções do trato urinário, destacando-se pela sua multirresistência à meticilina e glicopeptídeos antibióticos (TAKEUCHI et al., 2005). Segundo Piessens et al. (2011), a presença de *S. haemolyticus* no leite de vacas leiteiras na Bélgica também eram frequentes nos isolados do ambiente no qual os animais estavam inseridos. Chaffer et al. (1999) e Thorberg et al. (2009) destacam o envolvimento de *S. haemolyticus* em mastite subclínica e Zadoks e Watts (2009) relatam que *S. haemolyticus* pode estar associado a vários hospedeiros, tanto em humanos como aves e felinos.

A elevada frequência de *S. haemolyticus* encontrada neste estudo pode estar associada à contaminação cruzada, portadores assintomáticos, contaminação do ambiente, mastite subclínica do gado leiteiro e/ou a falta de higiene durante a produção do queijo de coalho.

Vários estudos relatam elevada frequência de *Staphylococcus* coagulase negativo (PIESSENS et al., 2011, COTON et al., 2010; RUARO et al., 2013) em leite cru e queijos, sugerindo que algumas espécies coagulase negativas também são capazes de produzir enterotoxinas e, conseqüentemente, podem causar intoxicação alimentar.

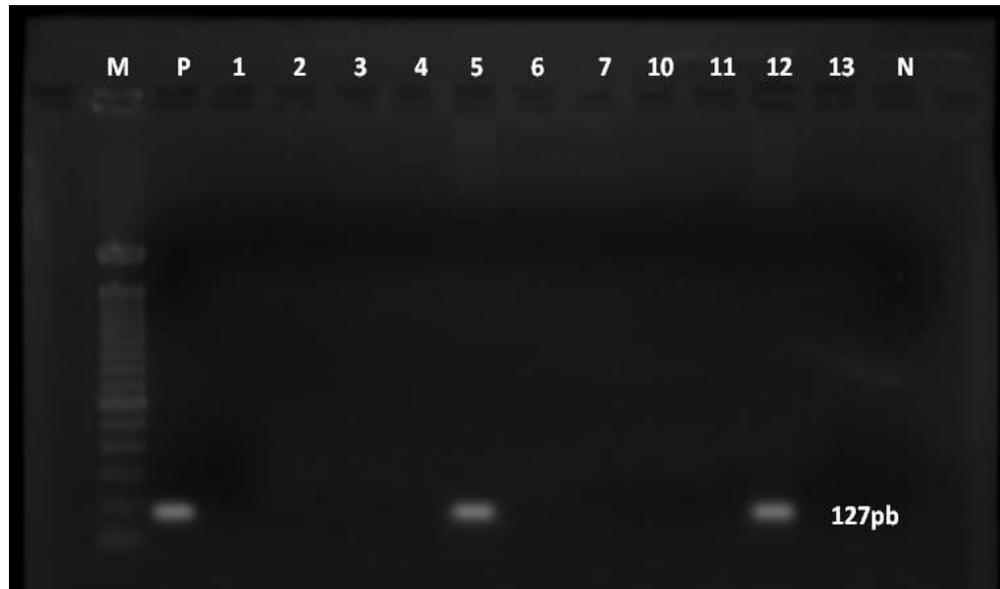
Quanto à pesquisa de genes enterotoxigênicos, 60,5% (22/38) das linhagens avaliadas apresentaram pelo menos um gene codificador de enterotoxina estafilocócica clássica, sendo 67,6% (6/9) do grupo *Staphylococcus* coagulase positiva e 55,2% (16/29) do grupo *Staphylococcus* coagulase negativa. O gene *sea* foi detectado em 50% (19/38) das linhagens avaliadas, seguido de *sec* presente em 44,7% (17/38). As associações mais frequentes observadas foram *sea* + *sec* e *sea* + *seb* + *sec*, ambas apresentando frequência de 22,5% (5/22) (Tabela 7 e Figura 3).

Tabela 7 - Perfis genotípicos das linhagens de *Staphylococcus* spp.

Genes Toxigênicos	Número de linhagens (%)
<i>sea</i>	4 (18,2)
<i>sec</i>	2 (9,1)
<i>sea</i> + <i>sec</i>	5 (22,7)
<i>sea</i> + <i>seb</i>	1 (4,5)
<i>seb</i> + <i>sec</i>	1 (4,5)
<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i>	5 (22,7)
<i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>see</i>	1 (4,5)
<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sec</i> + <i>see</i>	2 (9,1)
<i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>see</i>	1 (4,5)

Fonte: Autor, 2014.

Figura 4 – Resultados de amplificadas de isolados de *Staphylococcus sp.* com o par de primers SEA-3b/SEA-4b; M- 100bp DNA ladder; P - Controle Positivo - ATCC13565 (127pb).



Fonte: Autor, 2014.

Vários autores apontam a relevância de *Staphylococcus coagulase* negativa como produtora de genes enterotoxigênicos. Lyra et al. (2013) avaliando leite de cabra produzido na Paraíba, identificaram 4,5% dos isolados de *Staphylococcus coagulase* negativo com genes enterotoxigênicos, enquanto Lamaita et al. (2005) detectaram 24,6% de *Staphylococcus coagulase* positivas e 41,3% de *Staphylococcus coagulase* negativas, isolados de leite cru refrigerado.

Já Arcuri et al. (2010), analisando linhagens de *S. aureus* isolados de leite cru bovino e queijo minas frescal produzidos no Brasil, encontraram 5,2% (15/291) de genes produtores de enterotoxinas clássicas isoladas ou em combinação com outros genes, sendo o gene *seb* o mais frequente seguido do *sec*. Também Normanno et al. (2005) na Itália, encontraram 55,9% (94/168) de *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de leite cru bovino, sendo os genes *sea* e *sec* os mais frequentes. Cremonesi et al. (2007), também na Itália, obtiveram 52,2% (12/23) isolados de *S. aureus* oriundos de leite cru bovino enterotoxigênicos, sendo que 9 desses eram portadores do gene *sea*. Enquanto, Ruaro et al. (2013), em estudo da diversidade de *Staphylococcus coagulase* negativo oriundos de queijo produzido com leite cru no nordeste da Itália, não detectaram genes enterotoxigênicos.

As linhagens identificadas como *S. hominis* e *S. sciuri* não apresentaram gene enterotoxigênico clássico. O gene *sea* e *sec* estiveram presentes nas demais linhagens isoladamente ou em associação com outros genes (Tabela 8). As associações de genes *sea* +

sec e *sea + seb + sec* se repetem nos isolados de *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. lentus* e *S. xylosum*.

Tabela - 8 Perfis de associação de genótipos distribuídos por espécies identificadas.

Espécies	Genes Toxigênicos
<i>S. aureus</i>	(<i>sea</i>), (<i>sea + sec</i>), (<i>sea + seb + sec</i>), (<i>sea + seb + sec + see</i>)
<i>S. haemolyticus</i>	(<i>sec</i>), (<i>sea + seb</i>), (<i>sea + sec</i>), (<i>sea + seb + sec</i>), (<i>sea + sec + see</i>)
<i>S. hominis</i>	-
<i>S. lentus</i>	(<i>sea</i>), (<i>sea + sec</i>), (<i>seb + sec</i>), (<i>sea + seb + sec</i>), (<i>sea + sec + see + see</i>)
<i>S. sciuri</i>	-
<i>S. simulans</i>	(<i>sea + seb + sec + see</i>)
<i>S. xylosum</i>	(<i>sea + sec</i>), (<i>sea + seb + sec</i>)

Fonte: Autor, 2014.

A prevalência dos genes *sea* e *sec* detectada neste estudo corrobora com dados da literatura que relatam a elevada frequência dos mesmos em casos de intoxicação alimentar e o isolamento desses em leite cru devido a mastite subclínica.

Destaca-se que do total de linhagens de *Staphylococcus* sp. com potencial antagônico frente a *L. monocytogenes* 42,0% (16/38) não apresentaram genes enterotoxigênicos clássicos. Sugere-se novas pesquisas que pesquisem genes enterotoxigênicos não clássicos com objetivo de avaliar a relação entre capacidade antagônica e a presença de genes codificadores de enterotoxinas não clássicas.

REFERÊNCIAS

ARCURI et al. toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine raw Milk and Minas frescal Cheese in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 12, p. 2225-2231, p. 2010.

ASO, Y. et al. A novel type of immunity protein, NukH for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warnesi* ISK-1. **Journal of Molecular Biology**, v.69, n.7, p. 1403-1410, 2003.

ALLGAIER, H.; et al. Epidermin: sequencing of a heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. **European Journal Biochemistry**, v.160, p. 9-22, 1986.

BLAIOTTA, G.; CASABURI, A.; VILLANI, F. Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR assays of sod A genes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 519–526, 2005.

BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* ssp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719-730, 2004.

BALABAN, N. ; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxinas. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BECKER K.; ROTH R.; PETERS G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2548-2553, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

BRITO, M. A.; SOMKUTI, G. A.; RENYE, J. A. J. Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1194-1200, 2011.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F de; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no

Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

BORGES, M. F. et al. Avaliação da contaminação por coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* em uma indústria processadora de queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, p. 309-314, 2006.

BORGES, M. F. et al. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.

BORGES, M. F., et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BOEREMA, J. A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G.. Evolution of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 192-201, 2006.

CARMO et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CAIXETA, D. S., et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 142-150, 2012.

CASTAÑEDA, V. H. et al. Occurrence and prevalence of bacterial pathogens in bovine mastitis in Jalisco, México. **Milchwissenschaften**, v.57, p. 123-124, 2002.

CEOTTO, H. **Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus ssp.*** Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 181 p, 2009.

CEOTTO, H. et al. Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1-2, p. 124-131, 2010.

CHAFFER, M. et al., Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 46, n. 10 707–712, 1999.

CHAVES, F. et al. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4877–4879, 2005.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

COTON, E. Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 221-9, 2010.

COELHO M. L. V. et al. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. **Research Microbiology**, v. 158, n. 10, p. 625-630, 2007.

CREMONESI, P. et al. Developmente of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular probes**, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.

CREMONESI, P. et al. Improved method for rapid DNA extraction of mastitis Bacterial RNA extraction methods from milk samples pathogens directly from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 163-169, 2006.

CRETENET, M., EVEN, S., LE LOIR, Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 2, p.127-150, 2011.

DALY, K. M. *et al.* Production of the lantibiotic by community-acquired *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of bacteriology**, v. 92, n. 4, p. 1131-1142, 2010.

D'AZEVEDO, P. A. et al. Outbreak of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* bloodstream infections in Sao Paulo city, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, n. 2, p. 256–257, 2008.

DELBES, C. et al. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. **Journal Food Protect**, v. 69, n. 9, p. 2161-2167, 2006.

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

ERSFELD-DRESSEN, H.; SAHL, H. G.; BRANDIS, H. Plasmid involvement in production of and immunity to the staphylococcin-like peptide Pep5. **Journal General Microbiology**, v.130, n. 11, p. 3029-3035, 1984.

ERSKINE, R. J. et al. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1111-1118, 2002.

EDIN, G.; WIDERSTROM, M. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 673–675, 1998.

ERTAS, N. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 74 –77, 2010.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 235 p.

GARCIA et al. Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**. v.101, p.263-268, 2006.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. et al. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of general microbiology**, v. 136, n. 8, p. 1591-1599, 1990.

GILL, J. J. et al. 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Ecology** v. 56 n. 3, p. 471– 481, 2006.

GOV, Y. et al. RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. **Peptides**, v. 22, n. 10, p. 1609–1620, 2001.

HALE, E. M.; HINS DILL R. D. Biological Activity of Staphylococcin 462: Bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 7, n. 1, p. 74-81, 1975.

HEDRICH, C. et al. Isolation, characterization and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3140-3146, 1998.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 302-10, 2008.

KIM, H. J. et al. Probabilistic risk model for Staphylococcal intoxication from pork-based food dishes prepared in food service establishments in Korea. **Journal Food Protect**, v. 72, n. 9, p. 1897-1908, 2009.

KOKSAL, F.; YASAR, H.; SAMASTI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. **Microbiological Research**, v.164, n. 4, p. 404–410, 2009.

KUNZ, F. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from mastitis milk samples from sheep and goats. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v.153, n. 2, p.63 – 69, 2011.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 988 - 993, 2007.

LAMAITA, H.C. et al. *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n. 5, p.702-709, 2005.

LAUKOVA, A.; SIMONOVA, M; STROMPFOVA, V. *Staphylococcus xylosum* S03/1M/1/2, bacteriocin-producing meat starter culture or additive. **Food Control**, v. 21, n. 7, p. 970–973, 2010.

LEITE, C. C. et al. Pesquisa de *Listeria e Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador. **Revista Analítica**, v. 2, n. 1, p. 38-41, 2002.

LI, H. et al. *Staphylococcus sciuri* Exfoliative Toxin C (ExhC) is a Necrosis-Inducer for Mammalian Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

LØVSETH, A., LONCAREVIC. S., BERDAL, K. G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, 2004.

LONCARENVIC, S. et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 344-350, 2005.

LYRA, D. G. et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n. 2, 2013.

MANSOUR, S. et al. Investigation of Associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosum*, and *Lactococcus lactis* in Culture as a First Step in Microbial Interaction Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6422–6430, 2009

MENESES, R. B. et al. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 381-392, 2012.

MIRANDA-MORALES, R. E. et al. Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 300-302, 2008.

MORENO-ENRIQUEZ, R.I. et al. Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail queso fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 11, p. 2596–2601, 2007.

MORK, T. et al. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 134-141, 2010.

NASCIMENTO, J. S. et al. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producer strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 133-144, 2002.

NASCIMENTO, J. S. et al. Growth conditions required for bacteriocin production by strains of *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 941–947, 2004.

NASCIMENTO, J. S. et al, Production of bacteriocins by coagulase-negative Staphylococci involved in bovine mastitis, **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1-2, p. 61–71, 2005.

NETZ, D. J. A. et al. Molecular characterization of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 31, n. 5, p. 939-949, 2001.

NETZ, D. J. et al. Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5274-5280, 2002a.

NETZ, D. J.; et al. Biochemical characterization and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 3, p. 745-756, 2002b.

OLIVEIRA, S. S. et al. Genetic analysis of the bacteriocin-encoding plasmids pRJ6 and pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 872-984, 1998a.

OLIVEIRA, S. S. et al. Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 229-234, 1998b.

PALAZZO, I. C. et al. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n.2, p. 1222–1226, 2008.

PELISSER M. R. et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazil Journal Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 145-148, 2009.

PIESSENS, V. et al. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2933-2944, 2011.

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.

SÁ, M. E. P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 321-326, 2004.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p.1517-1522, 2008.

SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C. N.; WILLETT, J. L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. **Food Microbiology**, v. 16, N. 3, p. 229- 235, 1999.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p.354 - 356, 1998.

SILVA, M. C. D. et al. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SIQUEIRA, J. F. JR., LIMA, K. C.. 2002. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. **Australian Endodontic Journal**, v.28, n. 2, p. 61 – 63, 2002.

STEPANOVIC, S. et al. *Staphylococcus sciuri*: an unusual cause of pelvic inflammatory disease. **International Journal of STD & AIDS**, v. 6, n. 7, p. 452–453, 2005.

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. 46, n. 2, p. 123 - 129, 2011.

SOUZA, A. D. F. **Caracterização da Sam 4244, um peptídeo bioativo com potencial como um bioconservativo em alimento**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do rio de janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SUNG, C. et al. Probiotic potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 as anti-*Staphylococcus aureus* agent isolated from the vaginal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 908 - 916, 2010.

SUNBUL, M. et al. Pacemaker lead endocarditis caused by *Staphylococcus hominis*. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 29, n. 5, p. 543 – 545, 2006.

TAKEUCHI, F. et al. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* Uncovers the Extreme Plasticity of Its Genome and the Evolution of Human-Colonizing *Staphylococcal* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7292 – 7308, 2005.

TEPANOVIC, S. et al. Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5262–5264, 2003.

THORBERG, B. M.; BRANDSTROM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 47, n. 9, p. 683 – 691, 2000.

TIGRE, D. M.; BORELLY, M. A. Pesquisa de Estafilococos coagulase-positiva em amostras de "queijo coalho" comercializadas por ambulantes na praia de Itapuã (SALVADOR-BA). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.2, p.162-166, 2011.

VAN DE KAMP, M. et al. Elucidation of the primary structure of the lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7. Cloning and characterization of the epilancin-K7-encoding gene and NMR analysis of mature epilancin K7. **European Journal Biochemistry**, v. 230, n. 2, p. 587-600, 1995.

VERNOZY-ROZAND, C., et al. Identification of Micrococcaceae isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 373-378, 1996.

VALLIANOU, N. et al. Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis due to *Staphylococcus simulans*: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 2, n. 183, p. 183, 2008.

VANDEPUTTE, O.M. et al Identification of Catechin as One of the Flavonoids from *Combretum albiflorum* Bark Extract That Reduces the Production of Quorum-Sensing-Controlled Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 243 – 253, 2010.

VERAS, J. F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 410 - 415, 2008.

VERDIER-METZ, I. et al. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 326–333, 2012.

VON EIFF, C. et al. In vitro activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from anterior nares and blood. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 47, n. 11, p. 3613 – 3615, 2003.

WANG, L.; JAYARAO, B. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1421-1429, 2001.

WALLET, F. et al. Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 32, n.6, p. 697–698, 2000.

WLADYKA, B. et al. Isolation, biochemical characterization, and cloning of a bacteriocin from the poultry-associated *Staphylococcus aureus* strain CH-91. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7229 – 7239, 2013.

WILAI PUN, P. et al. Identification of the nukacin KQU-131, a new type-A(II) lantibiotic produced by *Staphylococcus hominis* KQU-131 isolated from Thai fermented fish product (Pla-ra), **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, . v. 72, n. 8, p. 2232 – 2235, 2008.

WON, Y. S. et al. Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2tm1Lau mice with dermatitis. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 9, p. 629 – 632, 2002.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 20-28, 2009.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir as seguintes conclusões:

- Trinta e oito linhagens de *Staphylococcus* spp. apresentaram potencial bacteriocigênico frente a *L. monocytogenes*. As linhagens do grupo *Staphylococcus* coagulase negativo apresentaram-se em maior predominância 76,3% (29/38) seguido de 23,7% (9/38) *Staphylococcus* coagulase positivo.
- No perfil taxonômico das linhagens estudadas, *S. haemolyticus* foi a de maior predominância em 31,6% (12/38) dos isolados. Outras espécies também apresentaram potencial bacteriocigênico frente a *L. monocytogenes*; como *S. aureus*, *S. lentus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hominis*.
- Na pesquisa de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas clássicas em linhagens de *Staphylococcus* com potencial bacteriocigênico, observou-se que 60,5% (22/38) das linhagens apresentaram pelo menos um gene codificador de enterotoxina estafilocócica clássica, presente em 67,6% (6/9) das linhagens do grupo *Staphylococcus* coagulase positiva e 55,2% (16/29) do grupo *Staphylococcus* coagulase negativa.
- Os genes enterotoxigênicos *sea* (50,0%) e *sec* (44,7%) foram os mais frequentes nas linhagens com potencial bacteriocigênico frente a *L. monocytogenes*. Sendo que as associações de genes mais frequentes as *sea* + *sec* e *sea* + *seb* + *sec*.
- Quanto a relação entre linhagens bacteriocigênicas e enterotoxigenicidade, observou-se que do total de linhagens com ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* 42,1% (16/38) não apresentaram genes enterotoxigênicos clássicos.
- Das linhagens que apresentaram ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, simultaneamente, 70,6% (12/16) não apresentaram gene enterotoxigênico. Porém, somente uma linhagem, identificada como *S. xylosus*, apresentou ação bacteriocigênico frente a *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e não apresentou gene enterotoxigênico clássico.
- 11% (12/38) das linhagens estudadas apresentaram potencial de culturas bioprotetoras, e em especial a linhagem *S. xylosus*.

- Linhagens de *Staphylococcus* spp. oriundos de queijos de coalho produzido a partir de leite cru do sertão de Alagoas apresentaram capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, assim como, genes produtores de enterotoxinas.
- Considerando que a legislação brasileira vigente preconiza somente a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos e que os resultados desta pesquisa apontam a identificação de genes enterotoxigênicos em linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo, sugere-se uma revisão quanto aos padrões microbiológicos recomendados para alimentos, com o objetivo de incluir esse grupo como análise de rotina, o qual pode representar um perigo para o consumidor.
- Conclui-se, que não há uma relação direta entre atividade antagonista e presença de genes codificadores de enterotoxinas clássicas.