

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**KAREN SIGNORI PEREIRA**  
**Bióloga**

**IDENTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE  
*STAPHYLOCOCCUS* spp. COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS A PARTIR DE  
SALAMES BRASILEIROS INDUSTRIALIZADOS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA DO PRODUTO**

Campinas  
2006

**KAREN SIGNORI PEREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE  
*STAPHYLOCOCCUS* spp. COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS A PARTIR DE  
SALAMES BRASILEIROS INDUSTRIALIZADOS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA DO PRODUTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Luiz Pereira.

Campinas

2006

KAREN SIGNORI PEREIRA

IDENTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE  
*STAPHYLOCOCCUS* spp. COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS A PARTIR DE SALAMES  
BRASILEIROS INDUSTRIALIZADOS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA DO PRODUTO

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da  
Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, para  
obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. José Luiz Pereira** (Orientador)

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP-Campinas

---

**Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye**

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP-Campinas

---

**Prof. Dr. Bento da Costa Carvalho Júnior**

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - Campinas

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes R. S. da Cunha**

Instituto de Biociências- UNESP - Botucatu

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Christina A. Junqueira**

Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas

---

**Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça**

Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP-Botucatu

À pessoa responsável pela minha “orientação” pessoal e emocional durante o desenvolvimento deste trabalho... Sem suas palavras, amor e carinho tudo teria sido mais difícil...

Tia Sílvia, esta tese é dedicada a você...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e tudo de bom que ela tem me proporcionado, pela força e pessoas que não só cruzaram o meu caminho, mas caminham junto comigo;

Ao Prof. Dr. José Luiz pelos ensinamentos de microbiologia, desde o meu início nesse caminho, e pela compreensão nos diversos momentos difíceis ao longo destes anos... Pela amizade e pela confiança que depositou em mim e em meu trabalho com “seus” estafilococos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Doutorado Direto (processo 02/13365-2) e financiamento do Projeto de Pesquisa (processo 04/07009-4);

A Norma Miya pela acolhida logo em minha chegada e momentos de descontração proporcionados durante o convívio no laboratório.

A “Dona Laura” pelo convívio no laboratório, carinho e serviços prestados;

A grande amiga Lílian pelo “imenso ouvido”... Sua companhia no laboratório foi um presente... Sempre disposta me ouvir (!!!!!) e também me ajudar. Não tenho como agradecê-la;

A amiga Liliane pelos bons momentos que tivemos e amizade que provou superar qualquer diferença... Nossos finais de semana no laboratório foram inesquecíveis;

A Daniela Bazzaco pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela possibilidade de aprendizado como “co-orientadora”;

A todos os funcionários da FEA pelos serviços prestados e ajuda quando de minha chegada. Em especial ao “Marcão”, “Marquinhos”, Jardete, Sr. Valter, Marcelo Luís e Cosme Perota;

Ao José Roberto do Laboratório de Carnes do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela disponibilidade em me ajudar nas análises de Aw e pelo carinho com o qual sempre me tratou;

A Dr<sup>a</sup>. Dirce do Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos por ter sempre deixado as portas abertas para utilização de equipamentos, livros e trocas de experiências;

Aos professores da FEA... Alguns deles muito especiais para mim;

Ao Prof. Pedro Eduardo de Felício pelo carinho, por ser além de professor um “pai” pra mim e exemplo de profissional. Obrigada!

Ao Prof. Bento da Costa Carvalho pelo incentivo desde o início deste trabalho, aliás, pela idéia surgida em agradáveis conversas informais;

À Prof. Gláucia Pastore pela atenção a mim dispensada desde meu primeiro ano na FEA... Obrigada pelo carinho, confiança e incentivo neste caminho acadêmico;

À Prof. Helena Teixeira Godoy que quando coordenadora de Pós-Graduação deixou o caminho aberto e não colocou empecilhos para que tentássemos o Doutorado Direto. Agradeço a liberdade e, também, confiança;

Aos colegas que a Faculdade me trouxe e nestes últimos meses foram fundamentais pela força, carinho e atenção... Alessandra “mãe”, Alessandra “filha” (obrigada em especial pelas caronas que me permitiram ficar até mais tarde no laboratório), Anderson (pelo carinho, torcida, preocupação e palavras de amizade) e Verônica;

Aos alunos FEA/03 diurno... Conhecê-los foi uma oportunidade de aprender muito profissionalmente como professora e ver que “adoro uma sala de aula” não só na cadeira de aluna (como sempre pensei ser meu lugar favorito)... Com vocês pude ver que posso aprender muito à frente da lousa... E isso é quase mágico! Obrigada pela torcida e incentivo!

Aos membros da Banca examinadora pelas correções, sugestões e dicas para finalização deste trabalho, e por terem prontamente atendido às “minhas datas”;

Ao Prof. Arnaldo pela oportunidade de trabalhar como colaboradora em sua disciplina... E pelas correções bastante pertinentes;

Ao Prof. Dr. Roberto Roça pelo olhar atento nas correções da tese e exemplo de profissional que sempre foi para mim... E isso já faz algum tempo!

À Prof<sup>a</sup>. Maria de Lourdes pelo apoio mesmo que à distância... Sempre pronta a me ajudar durante a identificação dos estafilococos;

À Prof<sup>a</sup>. Valéria... Além de exemplo de pesquisadora, pelo rigor com o qual conduz seus trabalhos, é uma excelente professora para aqueles que a procuram com as mais diversas dúvidas;

Aos meus pais Hélide e Luiz Carlos por terem sempre me deixado livre na escolha de minha profissão, pelo investimento nela e, principalmente, pela educação e valores que me passaram... Fundamentais para minha formação moral e ética;

À minha irmã Camila, cuja distância no dia-a-dia fez com que nos tornássemos mais unidas ao longo dos anos;

A todos os meus familiares pelo apoio desde os meus primeiros passos. Em especial pela “família campineira” (vó Cinira, tia Sílvia, Paulo Henrique e Ana Luísa) que conseguiu dar outro tom aos anos de estudo do Doutorado, além da grande força;

Ao meu noivo Sérgio. Sua presença em minha vida foi essencial. Muito obrigada pelo amor, força e por ser meu porto-seguro. Além disso, você me deu dois grandes presentes: os amigos Wesley e Graça que tanto gosto e que tanto me ajudaram;

Às amigas e vizinhas Viviane, Paula e Vanessa pelos momentos de diversão que passamos juntas e cuja divisão dos problemas fez com que se tornassem mais leves;

Ao Dr. Antônio Miguel que desde o ano 2000 tem me ajudado a entender melhor as “coisas da vida” e a mim mesma... Saber que posso contar com o senhor é muito confortável.

## RESUMO

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são bastante peculiares porque apesar de terem distribuição ubiqüitária e formarem a microbiota residente na pele e mucosa de humanos também podem ser causadoras de diversas enfermidades aos mesmos, tais como a intoxicação alimentar estafilocócica. Todavia, para a indústria de produtos cárneos a importância dos estafilococos está além do fato de serem microrganismos patogênicos. Algumas espécies do gênero são coadjuvantes de tecnologia para a fabricação de salames, estando presentes como componentes de culturas *starter* ou iniciadoras. Entre as características importantes das espécies utilizadas em culturas iniciadoras está a incapacidade enterotoxigênica, o que tem sido diretamente relacionado às espécies coagulase positiva. Diversos trabalhos, porém, têm demonstrado a capacidade de estafilococos coagulase negativa produzirem enterotoxina em meio de cultivo laboratorial e há, inclusive, registros de surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies não produtoras de coagulase. Assim, 90 amostras de salames industrializados, pertencentes a seis diferentes marcas, foram analisadas visando a enumeração, identificação e verificação do potencial enterotoxigênico das espécies de estafilococos coagulase negativa (ECN). Determinações de pH,  $A_w$ , análises de coliformes termotolerantes, *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e bactérias lácticas também foram realizadas. *Salmonella* foi detectada em uma amostra. Entre os 266 isolados de ECN nenhum produziu enterotoxina, e dos 252 identificados cerca de 90% eram *S. xylosus* e *S. carnosus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Salames, Estafilococos Coagulase Negativa (ECN), Enterotoxina, Qualidade Microbiológica, Higiene.

**ABSTRACT**

*Staphylococcus* is ubiquitous distribution bacteria and present in skin of humans and other animals. However, staphylococci species can cause various diseases. Staphylococcal food poisoning is one of these diseases. But for meat industry staphylococci importance is not only because diseases. Some species are very important for the fermented sausage's manufacture like starter cultures. To be used, staphylococci have do not produce coagulase. However, many researches have demonstrated capacity of coagulase negative staphylococci (CNS) to produce enterotoxin and there are registers of staphylococcal food poisoning outbreaks linked to CNS. Ninety samples of industrialized salamis, for six different brands, had been studied. Enumeration, identification and potencial enterotoxigenic of CNS were analyzed. Additionally, termotolerants coliforms, staphylococci coagulase positive and lactic acid were counted; *Salmonella* isolated; pH and Aw measured. *Salmonella* was isolated of one sample. None of 266 CNS produced enterotoxins, 252 were identified and about 90% were *S. xylosus* and *S. carnosus*.

**KEY-WORDS:** Fermented Sausages, Coagulase Negative Staphylococci (CNS), Enterotoxin, Microbial Quality, Hygiene.

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b> Valores p da comparação entre lotes para cada uma das variáveis .....	44
<b>TABELA 2:</b> Valores p da comparação entre marcas para os lotes 1 e lotes 2 e 3 conjuntamente .....	45
<b>TABELA 3:</b> Valores p da comparação entre marcas para cada uma das variáveis.....	46
<b>TABELA 4:</b> Valores p da comparação entre categorias para a variável <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa.....	46
<b>TABELA 5:</b> Valores de pH das amostras de salames.....	47
<b>TABELA 6:</b> Valores de Aw para cada uma das seis marcas de salames .....	50
<b>TABELA 7:</b> Análises microbiológicas dos salames da marca A.....	52
<b>TABELA 8:</b> Análises microbiológicas dos salames da marca B.....	53
<b>TABELA 9:</b> Análises microbiológicas dos salames da marca C .....	54
<b>TABELA 10:</b> Análises microbiológicas dos salames da marca D .....	55
<b>TABELA 11:</b> Análises microbiológicas dos salames da marca E.....	56
<b>TABELA 12:</b> Análises microbiológicas dos salames da marca F.....	57
<b>TABELA 13:</b> Quantidade e tipos de microrganismos isolados de cada marca de salame.	69
<b>TABELA 14:</b> Resultados das análises de EEs nas amostras de salames .....	71
<b>TABELA 15:</b> Resultados da produção de EEs pelos ECN.....	73
<b>TABELA 16:</b> Número de ECN identificados e espécies para cada uma das seis marcas de salames .....	75
<b>TABELA 17:</b> Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro pH das seis marcas de salames .....	97

<b>TABELA 18:</b> Valores de p na comparação dos lotes e das marcas de salames para o parâmetro coliformes termotolerantes .....	97
<b>TABELA 19:</b> Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro bactérias lácticas das seis marcas de salames. ....	98
<b>TABELA 20:</b> Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa das sete categorias de salames.....	98
<b>TABELA 21:</b> Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro <i>Micrococcus</i> spp. das seis marcas de salames. ....	99

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1:</b> Amostras de salames .....	22
<b>FIGURA 2:</b> Representação dos resultados do teste de coagulase em tubo .....	27
<b>FIGURA 3:</b> Fluxograma de análises para identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	28
<b>FIGURA 4:</b> Crescimento das linhagens padrão de estafilococos e micrococos em ágar furazolidona.....	30
<b>FIGURA 5:</b> Galerias do <i>kit</i> API® Staph.....	33
<b>FIGURA 6 :</b> Ficha para anotação de resultados pelo uso do <i>kit</i> API® Staph.....	33
<b>FIGURA 7 :</b> Galerias do <i>kit</i> API® 20E.....	34
<b>FIGURA 8 :</b> Ficha para anotação de resultados do <i>kit</i> API® 20E .....	34
<b>FIGURA 9 :</b> Cultivo de estafilococos para produção de enterotoxinas.....	37
<b>FIGURA 10 :</b> Esquema da ligação Anticorpo – EE – Conjugado (anticorpo + fosfatase alcalina).....	38
<b>FIGURA 11:</b> À esquerda vista frontal do aparelho mini VIDAS® pertencente ao Lab. de Toxinas Microbianas – FEA/ UNICAMP .....	39
<b>FIGURA 12:</b> Esquema da vista lateral de um barrete do <i>kit</i> Vidas SET II® .....	40
<b>FIGURA 13:</b> Esquema do teste Vidas SET II® .....	40
<b>FIGURA 14:</b> Protocolo para produção e detecção de enterotoxinas – VIDAS SET II® .	42
<b>FIGURA 15:</b> Variação dos valores de pH encontrados nas seis marcas de salames ...	48
<b>FIGURA 16:</b> Crescimento dos isolados em meio TSI .....	58
<b>FIGURA 17:</b> Variação dos valores de contagem de bactérias lácticas nas seis marcas de salames .....	61

<b>FIGURA 18:</b> Crescimento das bactérias láticas em meio MRS.....	63
<b>FIGURA 19:</b> Variação dos valores de contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa nas seis marcas de salames .....	64
<b>FIGURA 20:</b> Variação dos valores de contagem de <i>Micrococcus</i> spp. encontrados nas seis marcas de salames.....	66
<b>FIGURA 21:</b> Crescimento de colônias atípicas (BP) .....	68
<b>FIGURA 22:</b> Distribuição (%) dos microrganismos de acordo com a marca de salame analisada.....	69
<b>FIGURA 23:</b> Proporções entre as espécies de ECN de acordo com a marca de salame analisada.....	75

---

**SUMÁRIO**

<b>1 <u>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</u></b> .....	1
<b>1.1 O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i></b> .....	1
<b>1.1.1 <u>Aspectos taxonômicos</u></b> .....	1
<b>1.1.2 <u>Aspectos morfológicos e metabólicos</u></b> .....	3
<b>1.2 INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA</b> .....	4
<b>1.2.1 <u>Conceitos</u></b> .....	5
<b>1.2.2 <u>Estafilococos produtores de enterotoxinas</u></b> .....	7
<b>1.2.3 <u>Dados Epidemiológicos</u></b> .....	9
<b>1.3 SALAMES</b> .....	10
<b>1.3.1 <u>A produção de salames industrialmente</u></b> .....	12
<b>1.3.2 <u>Microrganismos de importância tecnológica</u></b> .....	13
<b>1.3.3 <u>Microrganismos patogênicos em salames</u></b> .....	16
<b>1.3.4 <u>Qualidade microbiológica de salames no Brasil</u></b> .....	17
<b>1.4 SALAMES E INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA</b> .....	19
<b>2 <u>OBJETIVOS</u></b> .....	20
<b>3 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u></b> .....	21
<b>3.1 AMOSTRAS DE SALAME</b> .....	21
<b>3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	23
<b>3.2.1 <u>Determinação do pH dos salames</u></b> .....	23

---

3.2.2 <u>Determinação da Aw dos salames</u> .....	23
3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	24
3.3.1 <u>Contagem de coliformes termotolerantes</u> .....	24
3.3.2 <u>Isolamento de <i>Salmonella sp.</i></u> .....	25
3.3.3 <u>Contagem de <i>Staphylococcus spp.</i> coagulase positiva, negativa e <i>Micrococcus spp.</i></u> .....	26
3.3.4 <u>Contagem de bactérias lácticas</u> .....	31
3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS .....	32
3.4.1 <u>Identificação de <i>Staphylococcus spp.</i> coagulase negativa</u> .....	32
3.4.2 <u>Identificação de <i>Salmonella</i></u> .....	34
3.5 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA, EM MEIO DE CULTURA, PELAS ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA .....	35
3.6 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS .....	37
3.6.1 <u>Análise de enterotoxinas estafilocócicas nos salames</u> .....	41
3.6.2 <u>Análise de enterotoxinas estafilocócicas em meio de cultura</u> .....	41
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
4 <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	44
4.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
4.2 DETERMINAÇÕES DE pH DOS SALAMES .....	47
4.3 DETERMINAÇÕES DE Aw DOS SALAMES .....	50
4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	51
4.4.1 <u>Isolamento e Identificação de <i>Salmonella spp.</i></u> .....	58

---

4.4.2 <u>Contagem de coliformes termotolerantes</u> .....	60
4.4.3 <u>Contagem de bactérias lácticas</u> .....	61
4.4.4 <u>Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva, <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa e <i>Micrococcus</i> spp.</u> .....	64
4.4.5 <u>Isolamento de microrganismos de meio Baird-Parker</u> .....	68
4.5 ANÁLISE DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS NAS AMOSTRAS DE SALAMES .....	71
4.6 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS PELOS <i>Staphylococcus</i> sp. COAGULASE NEGATIVA .....	73
4.7 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus</i> spp. COAGULASE NEGATIVA .....	74
5 <u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u> .....	79
6 <u>CONCLUSÃO</u> .....	80
7 <u>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</u> .....	81
8 <u>REFERÊNCIAS</u> .....	82
APÊNDICE A - Tabelas das análises estatísticas para comparação entre marcas/ categorias de salames .....	97

## **1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS***

O nome *Staphylococcus* tem origem do grego (*staphyle* cacho de uva, e *coccus* grão ou semente) e foi dado por Alexander Ogston em 1880 (HOLT et al., 1994). Refere-se à morfologia e ao arranjo de tais bactérias quando observadas ao microscópio óptico.

#### **1.1.1 Aspectos taxonômicos**

Em meados de 1880 o médico cirurgião Ogston conseguiu, por meio de vários experimentos, demonstrar a importância de estafilococos em infecções purulentas. Paralelamente, Koch, em 1878, e Pasteur, em 1880, já haviam observado e descrito a existência de tais microrganismos em pus. Entretanto, foi somente em 1884 que o pesquisador Rosenbach, estudando microrganismos isolados a partir de pus, propôs a criação do gênero *Staphylococcus*. Ele foi o primeiro a descrever *Staphylococcus* separadamente do gênero *Micrococcus* (BERGDOLL, 1989), diferentemente da descrição constante na sexta edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”. (BENETT e MONDAY, 2003; DACK, 1943; HAYNES e HUCKER, 1946).

Desde então, o gênero vem sofrendo diversas modificações e alterações a cada edição do manual e muitas propostas taxonômicas surgem, em diversas publicações científicas, com o avanço de métodos para identificação de microrganismos.

Na mais recente edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (HOLT et al., 1994) tal gênero consta de 28 espécies: *S. arlettae*, *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. caseolyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. delphini*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*,

*S. hominis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xylosus*.

Menos de dez anos depois, a publicação de Koneman e colaboradores (2001) considera 33 espécies como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. As espécies *S. muscae*, *S. pasteurii*, *S. piscifermentans*, *S. pulvereri* e *S. vitulus* são adicionadas à lista constante no “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”.

No ano de 2003, a publicação do “Manual of Clinical Microbiology” (BANNERMAN, 2003) apresenta 35 espécies como pertencentes ao gênero. De todas as espécies até aqui citadas, o manual considera ainda as espécies *S. condimenti*, *S. fleurettii*, *S. lutrae*, *S. succinus* e *S. vitulinus*, esta última em lugar de *S. vitulus*. Não constam as espécies *S. caseolyticus*, reclassificada como *Macrococcus caseolyticus* (JAY, 2003), e *S. pulvereri*, comprovadamente igual à *S. vitulinus* (SVEC et al., 2004).

Atualmente, o número de espécies de estafilococos descritas chega a 39. Além das 35 espécies citadas anteriormente, há a descrição das espécies *S. pettenkoferi* (TRÜLZSCH et al., 2002), *S. nepalensis* (SPERGSEER et al., 2003), *S. simiae* (PANTUČEK et al., 2005) e *S. pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005).

As modificações constantes das espécies do gênero *Staphylococcus* não foram acompanhadas, no mesmo ritmo, pelos táxons superiores. Desde sua proposição por Rosenbach, *Staphylococcus* tem sido classificado dentro da família *Micrococcaceae*. Mais de um século depois de sua proposição, na primeira edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (KLOOS e SCHLEIFER, 1986) a família *Micrococcaceae* constava dos gêneros *Micrococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus* e *Stomatococcus*.

Foi somente na última década, com o avanço da biologia molecular, que a taxonomia e filogenia do gênero passaram a ser revistas. Estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição de parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S de bactérias conduziram à proposição de várias mudanças taxonômicas e filogenéticas.

Assim, 15 anos depois de sua primeira publicação, na segunda edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (GARRITY e HOLT, 2001) a família *Micrococcaceae* consta das espécies *Micrococcus*, *Kocuria* e *Stomatococcus* e está classificada dentro do filo Actinobacteria.

O gênero *Micrococcus* consta atualmente de duas espécies: *M. luteus* e *M. lylae*. As espécies *M. roseus*, *M. varians* e *M. kristinae* pertencem agora ao gênero *Kocuria*: *K. roseus*, *K. varians* e *K. kristinae*; as espécies *M. halobius*, *M. nishinomiyaensis*, *M. sedentarius* e *M. agilis* foram reclassificadas em gêneros distintos: *Nesterenkonia halobia*, *Kytococcus nishinomiyaensis*, *Dermacoccus sedentarius* e *Arthrobacter agilis* (KONEMAN et al, 2001).

O gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: *Staphylococcaceae*. Esta família consta dos gêneros *Staphylococcus*, *Gamela*, *Macrococcus* e *Salicinococcus* (GARRITY e HOLT, 2001).

Diferentemente de *Micrococcaceae*, a família *Staphylococcaceae* pertence ao filo Firmicutes, evidenciando-se, depois de um século desde sua primeira descrição, a distância filogenética entre *Staphylococcus* e *Micrococcus*. Além disso, *Staphylococcaceae* pertence à ordem Bacillales bem como a família *Bacillaceae*, demonstrando íntima relação genética dos *Staphylococcus* spp. com bactérias do gênero *Bacillus* (GARRITY e HOLT, 2001).

### **1.1.2 Aspectos morfológicos e metabólicos**

*Staphylococcus* spp. são bactérias do tipo cocos, Gram positivas, imóveis e não formadoras de esporos. O metabolismo dessas espécies é bastante diversificado; podem realizar respiração aeróbica, anaeróbica e fermentação de carboidratos. São catalase positiva (exceção para *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*) e oxidase negativa (exceto *S. caseolyticus*, *S. lentus* e *S. sciuri*) (HOLT et al., 1994).

Parâmetros extrínsecos como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e atividade de água ( $A_w$ ) influenciam diretamente o crescimento dos estafilococos. Tal crescimento pode ser observado numa faixa de temperatura entre 10°C e 46°C, com faixa de ótimo de 30-37°C. O pH ótimo situa-se próximo da neutralidade (entre 6,0 e 7,0), mas o crescimento poderá ocorrer entre valores de 4,0 e 9,8. Com relação à  $A_w$ , considera-se 0,86 como o valor mínimo, mas há registro de crescimento com valores inferiores a 0,83 sob condições ideais (JAY, 2005).

Podem ser consideradas bactérias de distribuição ubiqüitária e componente da microbiota residente de mucosas e/ou peles de mamíferos e aves. Entretanto, há exemplos de espécies que evoluíram adaptadas a um determinado hospedeiro, como indicado pelo epíteto específico da nomenclatura binomial: *S. caprae*, *S. delphini*, *S. gallinarium* e outras.

Apesar da ampla distribuição como microbiota normal residente de espécies animais, alguns estafilococos estão diretamente associados a infecções oportunistas e toxinfecções em animais, incluindo humanos (BAIRD-PARK, 1990).

## 1.2 INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA

A associação dos estafilococos com doenças transmitidas por alimentos, por parte de estudiosos, surgiu paralelamente aos primeiros estudos do gênero nas últimas décadas do século XIX e início do século XX. Já em 1884, nos Estados Unidos, um grande surto de intoxicação alimentar associado ao consumo de queijo foi atribuído a “organismos esféricos” isolados do mesmo (BENETT e MONDAY, 2003).

Contudo, o estudo de um surto pelo professor Denys, na França, em 1894 é considerado o pioneiro na associação de gastroenterite humana e “estafilococos piogênicos”. O surto ocorreu entre membros de uma família e foi associado ao consumo de carne de vaca. O animal morrera com sintomas de febre puerperal e de seus restos

foram isolados “micrococos amarelados”. Um dos comensais veio a óbito, com sintomas descritos como semelhantes aos de cólera, e os mesmos “micrococos amarelados” foram isolados de seu baço (DACK, 1943, HAYNES e HUCKER, 1946).

### **1.2.1 Conceitos**

A intoxicação estafilocócica é uma enfermidade transmitida por alimentos contaminados com espécies de estafilococos produtoras de enterotoxinas. São as toxinas pré-formadas no alimento, e não os próprios estafilococos, as responsáveis pelo desenvolvimento da gastroenterite. Tal hipótese foi pela primeira vez aventada por Barber em 1914. Ele estudou “*Staphylococcus* brancos” isolados de uma vaca, já acometida por mastite, cujo leite causara recorrentes surtos de gastroenterite nos moradores de uma fazenda das Filipinas. Seu estudo consistiu na inoculação de leite com os “*Staphylococcus* brancos” e acondicionamento do mesmo em temperatura ambiente. O leite era, então, administrado a pessoas voluntárias que logo desenvolviam sintomas semelhantes àqueles apresentados pelas pessoas envolvidas nos surtos anteriores. Por outro lado, a administração via oral da cultura microbiana, advinda do leite, a gatos, filhotes de cães e macacos não levava ao desenvolvimento de sintomas (DACK, 1943; HAYNES e HUCKER, 1946).

Todavia, muitos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica continuaram a acontecer até que se conseguisse comprovar, irrefutavelmente, que estafilococos quando presentes em alimentos poderiam produzir uma toxina ou, na época denominada, “veneno”. Isso ocorreu, somente, em 1930 com a publicação do trabalho “An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow haemolytic *Staphylococcus*” por Dack e colaboradores. O estudo foi conduzido a partir de bolo de Natal implicado em surto de toxinfecção alimentar, na cidade de Chicago, que envolveu 11 pessoas. *Staphylococcus* amarelos foram isolados da massa do bolo e cultivados em meio

estéril, posteriormente filtrado e administrado a três voluntários humanos. Após três horas da ingestão os sintomas de emese, febre e diarreia puderam ser observados nos indivíduos, sintomas semelhantes aos experimentados pelas 11 pessoas envolvidas no surto (BAIRD-PARKER, 1990; DACK, 1943; HAYNES e HUCKER, 1946).

O quadro clínico da intoxicação caracteriza-se pelo curto período de incubação (2 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado), náusea, emese, dores abdominais e diarreia, sendo esta última nem sempre observada. Quadros febris são raramente observados.

A quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação ainda não foi exatamente estabelecida, considera-se que o consumo de um alimento contaminado com enterotoxina estafilocócica (EE) em concentrações da ordem de 1ng/g possa levar ao desencadeamento dos sintomas de intoxicação. Um estudo, nos Estados Unidos, com leite achocolatado implicado em surto de intoxicação estafilocócica permitiu concluir que em humanos a dose mínima de EE A suficiente para o desencadeamento dos sintomas é de 100 a 200ng (EVENSON et al., 1988). Entretanto, fatores como idade, massa corpórea e condições físicas do indivíduo irão influenciar o desencadeamento dos sintomas.

Quanto ao número de células de estafilococos necessárias à produção de enterotoxinas, em quantidade suficiente para causar gastroenterite, considera-se que sejam necessários números em torno de  $10^6$  células/g (BENETT e MONDAY, 2003). Porém, estudo de Pereira e colaboradores (1991), com creme de confeitaria e presunto cozido, demonstrou que  $10^3$  células de *S. aureus*/g foram suficientes para produção de enterotoxina D em concentrações superiores a 1ng/g após 24h de incubação à 37°C .

Atualmente são conhecidas diversas enterotoxinas estafilocócicas, identificadas a partir de reações com anticorpos específicos, que são denominadas por letras maiúsculas. Até o presente, 18 EEs foram identificadas: A, B, C (subdividida em três subtipos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R e U. Todavia, o potencial emético de algumas EEs ainda não foi testado (JØRGENSEN et al., 2005). A EEA é a

mais freqüentemente envolvida em surtos de intoxicação alimentar, seguida da EED (JAY, 2005).

A regulação gênica da produção de EEs pelas linhagens estafilocócicas é variável. A produção de EEA, EEB, EEC<sub>2</sub> e EEE é regulada por genes cromossômicos, enquanto a produção de EED sofre regulação gênica plasmidial (JAY, 2005).

As EEs são moléculas protéicas de cadeia simples com peso molecular entre 22 e 27KDa e funcionam como superantígenos – moléculas com elevada capacidade de estimulação do sistema imune. Bastante estáveis, resistem à ação proteolítica das enzimas tripsina, quimiotripsina, renina e papaína (BAKER e ACHARYA, 2004), e ao aquecimento ( $D_{98,9} \geq 2h$ ) (FORSYTHE, 2002).

### **1.2.2 Estafilococos produtores de enterotoxinas**

A princípio, a capacidade de produção das enterotoxinas era considerada característica exclusiva de membros da espécie *S. aureus*, cuja maioria é produtora da enzima coagulase<sup>1</sup>. Assim, o teste de presença da enzima coagulase passou a servir como marcador de enterotoxigenicidade quando da identificação de estafilococos presentes em alimentos implicados em surtos de intoxicação (DESMARCHELIER et al., 1999; ICMSF, 1983).

Apenas cinco espécies são produtoras de coagulase (livre): *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. delphini*, *S. hycus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*.

Casos de intoxicação estafilocócica como os ocorridos nos Estados Unidos, associados a uma mistura de manteiga, em que a espécie *S. intermedius* fora isolada

---

<sup>1</sup>A coagulase pode ser encontrada sob duas formas. A coagulase ligada, ou “clumping factor”, que se encontra ligada à parede celular bacteriana; e a coagulase livre que é produzida pela bactéria e liberada extracelularmente. De um modo geral, a diferença entre elas é que a primeira age diretamente sobre o fibrinogênio plasmático causando uma aglutinação das bactérias com o fibrinogênio, enquanto a coagulase livre atua sobre a protrombina para o desencadeamento da reação de coagulação plasmática.

vinham corroborar a correlação entre produção de coagulase e capacidade enterotoxigênica (BENETT, 1996).

Em função desta correlação, no ano de 2001 a Legislação Brasileira de Padrões Microbiológicos para Alimentos sofreu alteração. A determinação de *S. aureus* foi substituída por enumeração de “estafilococos coagulase positiva” (ECP) (BRASIL, 2001). Além do Brasil, a contagem de ECP em alimentos está regulamentada apenas na Austrália (DESMARCHELIER et al., 1999). Os Órgãos de regulamentação em países como Canadá, Estados Unidos e aqueles pertencentes à União Européia ainda preconizam a determinação de *S. aureus* em alimentos.

No entanto, a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos subestima a quantidade de *Staphylococcus* spp. potencialmente enterotoxigênicos.

Pesquisas com *Staphylococcus* spp. coagulase negativa têm demonstrado potencial enterotoxigênico em meio de cultivo laboratorial (UDO et al., 1999) e em alimentos (LI e CHENG, 1997; OLIVEIRA, 1999). As espécies já relatadas como produtoras de enterotoxinas são: *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. warneri* e *S. xylosus* (JAY, 2005).

Há, ainda, na literatura três relatos de surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativas. O primeiro deles ocorreu em Osaka no Japão no ano de 1959 (OMORI e KATO, 1959). Envolveu 40 estudantes que tomaram café da manhã e almoçaram em um hotel. A investigação do surto foi conduzida a partir de amostras fecais dos doentes com diarreia (sete), restos de alimentos do café da manhã e culturas de isolados dos dedos dos manipuladores, tábuas de cozinha, facas e pratos. Apenas três coproculturas e um prato foram positivos para o crescimento de estafilococos. A caracterização desses estafilococos indicou serem espécies não produtoras de coagulase. O teste de produção de enterotoxinas foi feito administrando-se cultivos de estafilococos (um isolado de fezes e outro do prato) a dois filhotes de gatos, que vomitaram após 30 minutos.

O segundo teve lugar nos Estados Unidos em 1969. 145 pessoas que consumiram refeições de um mesmo restaurante apresentaram sintomas de intoxicação estafilocócica. O cardápio consistiu de arroz, espetinhos de carne, molho de carne e sorvete. Apenas as culturas dos cubos de carnes, picados um dia antes de serem servidos, revelaram a presença de *S. epidermidis* produtora de EEA. A mesma espécie foi isolada das mãos do cozinheiro. Culturas concentradas dos estafilococos isolados da carne e do manipulador foram administradas a macacos que apresentaram emese. A enterotoxina identificada nessas culturas foi a EEA (BRECKINRIDGE e BERGDOLL, 1971).

Já o terceiro surto ocorreu no Brasil em 1999 e foi associado ao consumo de leite cru (CARMO et al., 2002) do qual não se conseguiu isolar nenhuma espécie coagulase positiva. Apenas estafilococos coagulase negativa (ECN), produtores de EEC e EED, foram isolados e em contagens superiores a  $2,0 \times 10^8$  UFC/g. A contaminação do leite ocorreu devido à mastite do gado leiteiro. Estudos posteriores concluíram contaminação com *S. epidermidis* (VERAS et al., 2003).

Além destes três surtos, há, nos Estados Unidos, relato de um caso de intoxicação estafilocócica associada ao consumo de frango assado, do qual fora isolada uma espécie de estafilococo coagulase negativa produtora de EEA (CRASS e BERGDOLL, 1986).

### **1.2.3 Dados Epidemiológicos**

Entre os anos de 1993 e 1997, nos Estados Unidos, foram notificados 42 surtos de intoxicação estafilocócica, 1413 casos da doença estiveram associados e destes um resultou em óbito (CDC, 2000). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a intoxicação alimentar estafilocócica corresponde a aproximadamente 4,5% das doenças alimentares de origem bacteriana, sendo responsável por 1.753 hospitalizações e duas mortes a cada ano (USDA, 2002).

No Brasil, entre os anos de 1996 e 2000 foram notificados 68 surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, correspondentes a 1287 casos da enfermidade e um óbito (SIRVETA, 2002). Adicionalmente, dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) demonstram a ocorrência de aproximadamente 400 surtos de intoxicação alimentar causada por *S. aureus* (SVS, 2005).

A ocorrência de óbito é bastante rara e acontece, aproximadamente, em 0,03% dos casos de intoxicação. Essa frequência pode aumentar em populações de risco (SORIANO et al., 2002).

Exemplos de alimentos freqüentemente associados a esse tipo de intoxicação incluem o leite e seus derivados como queijos, cremes e achocolatados; saladas do tipo maionese e produtos cárneos curados ou fermentados (BERGDOLL, 1992). Os surtos geralmente ocorrem pela manipulação e conservação inadequada desses alimentos.

Devido à baixa severidade da intoxicação, os surtos acabam sendo subnotificados aos órgãos de Saúde Pública. Além disso, a maior parte dos surtos ocorre em ambiente residencial envolvendo um número restrito de indivíduos. A notificação da intoxicação estafilocócica acaba acontecendo quando envolve um número elevado de pessoas.

Exemplo de um surto de intoxicação alimentar estafilocócica em massa ocorreu no ano de 1998 no Estado de Minas Gerais, acometendo 4000 pessoas após consumirem arroz, feijão, frango e rosbife numa festa religiosa. A manipulação inadequada e manutenção dos alimentos à temperatura ambiente foram apontadas como a causa (CARMO et al., 2004).

### 1.3 SALAMES

Os produtos cárneos fermentados são historicamente considerados como o resultado da seleção de uma microbiota diferente daquela presente na carne “in natura” mediante adição de sais e submissão ao processo de cura. A atividade lipolítica e proteolítica destes microrganismos selecionados conferem a estes produtos características sensoriais peculiares de gosto, aroma, textura e cor (PEARSON e TAUBER, 1984).

O início da história desses produtos deu-se com as chamadas lingüiças que eram compostas de pedaços de carnes temperados, salgados e embutidos em intestinos limpos de animais, visando aumentar a durabilidade da carne que não seria imediatamente consumida. A fermentação microbiana era um evento “acidental”, muitas vezes resultante da contaminação das matérias-primas, utensílios e processadores pela chamada “house-flora”. Há registro escrito desta produção no século VII a.C. na obra *Odisséia* do poeta grego Homero, e de seu consumo já pelos povos babilônicos, gregos e romanos na Idade Antiga (BACUS, 1986).

Ao longo dos anos, o processo de fermentação dos salames foi sendo conduzido de forma artesanal e empírica. Manipulavam-se os diversos ingredientes e matérias-primas utilizadas na sua fabricação conforme as preferências do salameiro, aproveitando-se as bactérias naturalmente presentes na carne, ou conseqüentes da contaminação das matérias-primas e utensílios utilizados. Esta situação originou uma grande diversidade de salames nas diferentes regiões do mundo, muitas delas emprestando seu nome aos produtos fabricados (HAMMES e KNAUF, 1994).

De um modo geral, produtos cárneos fermentados como os salames podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com o pH e a  $A_w$  final do produto.

O primeiro grupo compreende os salames ditos ácidos e semi-secos, cujo período de fermentação é curto. O produto final apresenta valores de pH inferiores ou iguais a 5,3 e valores de  $A_w$  inferiores a 0,95. O outro grupo é formado pelos salames

ditos de baixa acidez e secos, como resultado de um longo período de fermentação. O pH final do produto é ao redor de 6,0 e a  $A_w$  geralmente menor do que 0,88. (PEARSON e GILLET, 1999).

Em teoria, os salames brasileiros encaixam-se no grupo dito seco e de baixa acidez (TERRA, FRIES e TERRA, 2004). Galli (citado por LOBO et al., 2001) relata que sua produção teve origem com a imigração italiana, começando de forma caseira, a qual, com o passar do tempo, originou as pequenas fábricas.

De acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade de salame, este produto é definido como “produto cárneo industrializado, obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado”. É classificado como “produto cru, curado, fermentado, maturado e dessecado”. Para comercialização será designado salame e poderá vir acompanhado de expressões que indiquem sua origem ou processo de obtenção: salame tipo italiano, salame tipo milano, salame tipo hamburguês, salame tipo friolano, salame tipo calabrés, salame tipo alemão, salaminho e uma série de outras denominações. (BRASIL, 2000).

### **1.3.1 A produção de salames industrialmente**

A fabricação de salames em escala industrial pode ser resumida em duas fases principais: fermentação e desidratação. Na fase de fermentação ocorre a maioria das transformações físicas, bioquímicas e microbiológicas (BERIAIN, PEÑA e BELLO, 1993). Isto é decorrência da atividade microbiana com produção de ácidos, reações de lipólise, proteólise e redução de nitratos (responsável pela cor característica do produto). Assim, esta fase é de extrema importância na medida em que está

diretamente relacionada à definição das características sensoriais (cor, gosto, aroma e textura) do salame (TERRA, 2000).

A segunda fase, de desidratação, é consequência principalmente da fermentação com grande produção de ácido lático. Atualmente, porém, os ácidos orgânicos são comercializados e têm sido diretamente adicionados aos produtos. Ao final deste período, o salame deverá apresentar pH ao redor de 5,2 e atividade de água aproximadamente 0,87, caracterizando o final do processo. A importância desta fase está na redução da atividade de água do produto final a valores (menores do que 0,88) em que microrganismos deterioradores e patogênicos não consigam desenvolver-se; aumentando, deste modo, a vida de prateleira e segurança do salame. (TERRA, 2003). O armazenamento destes produtos poderá ser feito à temperatura ambiente, sem necessidade de refrigeração, já que além da baixa  $A_w$  o produto possui uma elevada acidez. Esta, inclusive, levaria à classificação dos salames brasileiros como ácidos e não de baixa acidez.

Ambas as fases ocorrem em câmara de maturação dotadas de controles de temperatura, umidade relativa e velocidade do ar.

### **1.3.2 Microrganismos de importância tecnológica**

A microbiota presente nos produtos curados e fermentados é bastante diversa, podendo ser composta por diferentes gêneros de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Estudos foram feitos visando identificar tais microrganismos e a contribuição de cada um deles para as características finais do produto, sendo pioneiro o estudo de Niinivaara na Finlândia em 1955 (TERRA, 1993a). Deste modo, em meados da década de 60 surgiram as culturas iniciadoras, ou “starter”, na tentativa de padronizar a etapa de fermentação.

A utilização de culturas “starter” tornou-se essencial não somente para refinar e padronizar características de gosto, aroma e textura dos embutidos fermentados, mas, também, para controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos.

Tais culturas são compostas por microrganismos liofilizados, geralmente mais de uma espécie e de gêneros diferentes, em um veículo que é freqüentemente um açúcar (TERRA, 1993b; TERRA, 2000).

Os microrganismos usados como cultivos iniciadores (*starter*) podem ser agrupados em dois grandes grupos. O primeiro, composto por bactérias ácido-lácticas, é responsável, principalmente, pelo processo de acidificação e produção de compostos como o diacetil, ácidos orgânicos e bacteriocinas, inibidores do crescimento de patógenos como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Salmonella* Typhimurium (FLORES e BERMELL, 1996; DABÉS SANTOS e PEREIRA, 2001; LUKE, 2000; PINTO, PONSANO e HEINEMANN, 2001; TERRA, 1993a, WEBER, 1994; WILMINK, 2001).

O segundo grupo de microrganismos presentes em culturas *starter* compreende os ditos flavorizantes, pois ao seu metabolismo estão diretamente relacionados a coloração, o aroma e o sabor do embutido fermentado. A este grupo pertencem algumas espécies de estafilococos (*S. carnosus* e *S. xylosus*) e *Kocuria varians*, referidos como *Micrococcaceae* (TERRA, FRIES e TERRA, 2004).

Com relação à cor do produto, a ação dos estafilococos ocorre de duas maneiras. A primeira delas está relacionada ao metabolismo aeróbio facultativo desses microrganismos que em presença de nitrato reduzem-no a nitrito, a partir do qual se formará óxido nítrico que reagirá com o pigmento da carne, a mioglobina, para formação da nitrosomioglobina (PEARSON e TAUBER, 1984). Tal composto é característico de produtos curados como salames.

A outra contribuição para a formação de cor está em impedir o esverdeamento do produto, em consequência da formação de coleglobina, como resultado da reação do peróxido de hidrogênio com a mioglobina (FRANCIS, 1993). Isto porque, esses microrganismos possuem a capacidade de produção da enzima catalase que degrada o

peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O peróxido de hidrogênio pode estar presente em salames oriundo do metabolismo de algumas espécies de bactérias láticas. É um composto extremamente indesejável devido à sua ação oxidante.

O peróxido de hidrogênio pode, também, reagir com lipídios da matéria-prima, levando ao desenvolvimento de sabores indesejáveis no salame em consequência da oxidação lipídica. Aqui, novamente, os estafilococos mostram-se interessantes devido à capacidade de produção de catalase, agora evitando a formação de compostos lipídicos com gosto e aroma de ranço (HAMMES e KNAUF, 1994).

Os *Staphylococcus* spp. podem, ainda, contribuir para o sabor do produto final não apenas na medida em que impedem a formação de compostos indesejáveis, mas, sim, sendo responsáveis pela formação de compostos químicos de sabor (aroma e gosto) característicos de salames. Estes compostos resultam da ação de proteases e lipases estafilocócicas sobre proteínas e lipídios componentes da carne. (HAMMES e KNAUF, 1994; LÜKE, 2000; TERRA, FRIES e TERRA, 2004).

As espécies de estafilococos já isoladas de salames, a partir de trabalhos realizados principalmente na Europa, são *S. saprophyticus* (COPPOLA et al., 2000; DROSINOS et al., 2005; SEAGER et al., 1986), *S. epidermidis* (COPPOLA et al., 2000; KOTZEKIDOU, 1992), *S. xylosus* (COPPOLA et al., 2000; DROSINOS et al., MIRALLES, FLORES e PEREZ-MARTINEZ, 1996), *S. warneri* (COPPOLA et al., 2000; SEAGER et al., 1986) *S. simulans* (ARKOUDELOS, NYCHAS e SAMARAS 1998; DROSINOS et al., KOTZEKIDOU, 1992), *S. cohnii* (SAMELIS et al., 1998; SEAGER et al., 1986), *S. carnosus* (ARKOUDELOS, NYCHAS e SAMARAS 1998; KOTZEKIDOU, 1992) e *S. chromogenes* (COPPOLA et al., 2000), além de outras. A origem de tais espécies é geralmente atribuída à pele suína e/ou humana em que tais microrganismos compõem a microbiota natural.

### **1.3.3 Microrganismos patogênicos em salames**

Bactérias como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são, há muito tempo, conhecidas como importantes patógenos causadores de toxinfecções alimentares.

Nos Estados Unidos, em outubro de 1995, há relato de um surto de infecção alimentar envolvendo 26 pessoas. O alimento implicado foi um tipo de salame (“lebanon bologna”) e o patógeno isolado *Salmonella* Typhimurium (SAUER et al., 1997). No mesmo período, *Salmonella* Typhimurium foi responsável por 83 casos de salmoneloses, também associados ao consumo de salames, na região da Lombardia na Itália (SODANO et al., 1998). Todavia, os salames implicados nos surtos dos Estados Unidos e da Itália não eram de mesma proveniência, ambos os salames eram produzidos por indústrias locais de cada um dos países.

Em 1994 foram notificados surtos de *E.coli* O157:H7 nos Estados Unidos relacionados ao consumo de salame industrializado e fatiado (CDC, 1995).

Moore (2004) relata, ainda, um surto causado por *L. monocytogenes*, a partir do consumo de salames, no estado da Filadélfia (EUA) na década de 80.

Embora a redução do pH iniba o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp., há registro de que tais bactérias podem se adaptar e criar resistência ao ácido láctico em meio com pH 5.0 (LEYER, WANG e JOHNSON, 1995).

As etapas de fermentação, em que ocorre queda nos valores de pH, e de secagem, com redução da  $A_w$ , dos salames são consideradas como Pontos Críticos de Controle (PCCs), ao longo de seu processo de fabricação, devido à possibilidade de crescimento de *Staphylococcus* enterotoxigênicos (VARNAM e EVANS, 1991).

Na década de 70 nos Estados Unidos há registros de diversos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica associada ao consumo de salames (USDA, 1978, BERGDOLL, 1992).

A literatura científica ainda contém registros da incidência de *Bacillus cereus* e *Listeria sp.* em salames comerciais da região de Pretoria na África do Sul (NORTJÉ et al., 1999) e *Listeria monocytogenes* em salames industriais brasileiros (BORGES et al., 1999; SAKATE et al., 2003).

#### **1.3.4 Qualidade microbiológica de salames no Brasil**

Existem poucos trabalhos brasileiros sobre qualidade microbiológica de salames, sendo que estudos sobre este produto são, majoritariamente, da região Sul do país e focando, principalmente, os salames artesanais ou de indústrias regionais. Além disso, o tipo de salame estudado é aquele denominado tipo colonial.

Magnani e colaboradores (2000) analisaram 50 amostras de salames coloniais em Chapecó (SC) e, destas, 6,0% apresentaram *Salmonella* e 84% contaminação por *E. coli*.

Em estudo realizado por Lobo e colaboradores (2001) com salames coloniais na cidade de Santa Maria (RS), das 60 amostras analisadas 66,67% foram classificadas como impróprias para o consumo. Em 65% das amostras, o número de *S. aureus* encontrado foi maior ou igual a  $10^6$  UFC/g, número este considerado como suficiente para haver produção de toxina.

Um estudo realizado, também no Rio Grande do Sul, com 13 amostras de salames artesanais coloniais revelou a presença de coliformes fecais em mais de 50% das amostras e também uma amostra com contagem de *S. aureus* da ordem de  $10^5$  UFC/g (RITTER et al., 2003).

No ano de 2004 (VIOTT, STOLBERG e PELISSER, 2006) 12 salames coloniais da região do Alto Uruguai Catarinense foram analisados. Os resultados demonstraram a presença de *E. coli* em níveis acima de  $1 \times 10^3$  NMP/g em 25% das amostras.

Perazolli e Gelinski (2006) estudaram a qualidade microbiológica de salames artesanais de Arroio Trinta (SC). Foram selecionados 15 produtores rurais e de cada um deles 45 amostras de salames coletadas. Os resultados foram insatisfatórios para coliformes totais (100% das amostras), coliformes termotolerantes (67%), *S. aureus* coagulase positiva (58%) e *Salmonella* spp. (7%). Além disso, a bactéria *E. coli* foi isolada de 27% dos salames.

Além desses estudos com salames coloniais, existem três outros estudos com salames industriais. Em dois deles, apenas a presença de *Listeria monocytogenes* fora estudada.

Estudo realizado em São José do Rio Preto, SP, com 8 amostras de salames de uma indústria da região demonstrou que 25% continham *Salmonella* sp. e outros 25%, contagens de *S. aureus* da ordem de  $10^4$  UFC/g (HOFFMAN, GARCIA-CRUZ e VINTURIM, 1997).

Borges e colaboradores (1999) analisaram um total de 81 amostras de salames (tipo Italiano, Milano, Friolano e Hamburguês) industrializados e comercializados na cidade do Rio de Janeiro. *L. monocytogenes* fora isolada de seis amostras de salame tipo Italiano.

O estudo de Sakate e colaboradores (2003) com 45 amostras de salames industrializados, fatiados e embalados à vácuo demonstrou a presença de *L. monocytogenes* em 3 amostras.

Há registro, ainda, por parte dos órgãos da Vigilância Epidemiológica, de três surtos de intoxicação alimentar estafilocócica associada a salames industriais, no estado do Rio Grande do Sul em 1999 e, em 2000, no Paraná, houve um surto de salmonelose e o alimento implicado fora salame (SIRVETA, 2003).

A Divisão Nacional de Vigilância Sanitária, órgão do Ministério da Saúde, estabelece como Padrões Microbiológicos para salames a ausência de *Salmonella* em 25g de amostra, máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/g para estafilococos coagulase positiva e máximo de  $1 \times 10^3$  NMP/g para coliformes à 45°C (BRASIL, 2001).

#### 1.4 SALAMES E INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA

Produtos cárneos como presunto, lingüiças e salames estão, freqüentemente, associados a enfermidades veiculadas por alimentos. Entre estas, destaca-se a intoxicação por enterotoxinas estafilocócicas.

Isto acontece devido ao fato dos salames serem produzidos com carnes cruas, as quais naturalmente possuem uma microbiota associada, não havendo, em geral, cocção ou defumação durante o processamento (BRYAN, 1980). Outros contribuintes de contaminação podem ser os utensílios e equipamentos utilizados para o processamento, bem como os manipuladores.

Na década de 70 nos Estados Unidos há registro de diversos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica associada ao consumo de produtos cárneos fermentados do tipo salame (CDC, 1971a, 1971b, 1971c, 1975, 1979, 1980, BERGDOLL, 1992). No Brasil, há três registros de surtos de intoxicação estafilocócica, no ano de 1999, em consequência do consumo de salames (SIRVETA, 2002).

De acordo com o registro literário, as intoxicações estafilocócicas veiculadas por salames sempre foram associadas a *S. aureus*, ou a elevadas contagens de estafilococos coagulase positiva no produto. Entretanto, Nanu e Narayan (1992) isolaram de salame três espécies de estafilococos coagulase negativa produtoras de SEC, enquanto já no ano de 1971 pesquisadores dos Estados Unidos não conseguiram isolar *S. aureus* nem estafilococos coagulase positiva de amostras de salame implicado em um surto de intoxicação alimentar estafilocócica (BRECKINRIDGE E BERGDOLL, 1971).

## **2 OBJETIVOS**

- ✓ Verificar o potencial enterotoxigênico de estafilococos coagulase negativa (ECN) presentes em salames industrializados brasileiros;
- ✓ Identificar as espécies de ECN isoladas;
- ✓ Verificar a qualidade microbiológica de amostras de salames com base nos padrões microbiológicos estabelecidos na legislação brasileira.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os salames foram adquiridos em estabelecimentos comerciais de grande porte da cidade de Campinas durante o período de agosto de 2004 a dezembro de 2005. O transporte das amostras até o laboratório foi feito sob temperatura ambiente, já que esta era a temperatura de armazenamento destes salames nos locais de venda.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Toxinas Microbianas da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP/ Campinas), bem como as medições de pH.

As análises de  $A_w$  foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Carnes da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP/ Campinas).

#### **3.1 AMOSTRAS DE SALAME**

Foram avaliadas seis (6) marcas de salames, aqui denominadas pelas letras A, B, C, D, E e F. Todas as marcas possuíam selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e de cada uma das marcas foram analisados três (3) lotes diferentes de produto.

Quanto ao tipo de salame, trabalhou-se com o tipo MILANO para a marca D e ITALIANO para as demais marcas. Pretendia-se trabalhar com todos os salames de tipo italiano, no entanto para a marca D este tipo era menos freqüente nos estabelecimentos comerciais.

Com relação ao uso de culturas “starter”, apenas os salames da marca F não continham no rótulo do produto a declaração de uso. As demais marcas sempre continham entre seus ingredientes a expressão “cultivo bacteriano liofilizado”.

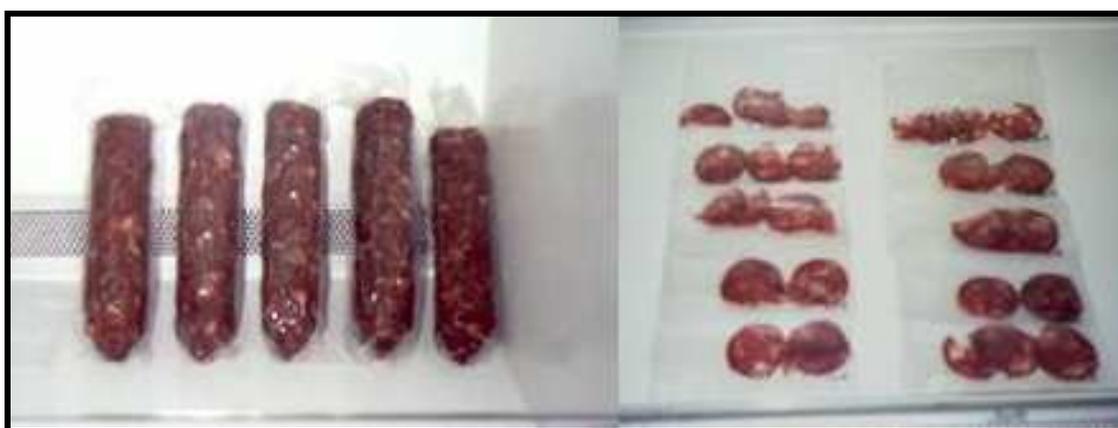
A vida de prateleira dos salames variou de acordo com o fabricante: três (3) meses para os salames das marcas A, D e F; quatro (4) meses para os salames das marcas C e E e cinco (5) meses para os salames da marca B.

Na tentativa de padronizar as determinações e análises dos produtos, com prazos de validade tão diferentes, optou-se por fazê-las com os salames antes que atingissem metade de sua vida de prateleira.

No laboratório, as amostras foram assepticamente retiradas de sua embalagem e cortadas na quantidade requerida para cada uma das determinações e análises (FIGURA 1).

De acordo com o delineamento experimental, o número amostral foi de cinco (5) unidades amostrais (mínimo de 200g cada, peças inteiras e embalagem inviolada) para cada um dos três (3) diferentes lotes de produto a serem analisados, compondo um total de 15 peças de salame analisadas para cada marca; e totalizando 90 unidades amostrais para o trabalho.

O número de unidades amostrais (por marca) está de acordo com aquele preconizado no Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001). Já o número de diferentes lotes analisados segue aquele utilizado em estudos prévios de caracterização da microbiota de salames (DROSINOS et al., 2005; METAXOPOULOS, SAMELIS e PAPAPELLI, 2001; PAPAMANOLI et al., 2002).



**FIGURA 1:** Amostras de salames.

FONTE: PEREIRA, K. S., 2005a.

## **3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Com o intuito de obter uma melhor caracterização dos salames, medições de pH e Aw do produto foram realizadas.

Além disso, o pH de salames influencia diretamente a composição qualitativa e quantitativa da microbiota estafilocócica do produto (BARBER e DEIBEL, 1972; MAURIELLO et al., 2004), maior interesse deste trabalho.

### **3.2.1 Determinação do pH dos salames**

Para determinação, as amostras foram acrescidas de água destilada na proporção 1:10 (25g de amostra para 225ml de água destilada), feita a homogeneização e imersão do eletrodo (potenciômetro Corning Digital 110) até a estabilização dos valores medidos. A determinação de cada unidade amostral foi realizada em triplicata (TERRA e BRAUN, 1985).

### **3.2.2 Determinação da Aw dos salames**

Foi realizada diretamente pela utilização do aparelho AquaLab<sup>®</sup> calibrado com soluções de KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e água destilada. Cada unidade amostral foi analisada em triplicata e seguindo-se as instruções do fabricante do aparelho.

### 3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A análise microbiológica visava verificar se os produtos estavam dentro do Padrão Microbiológico estabelecido na legislação: ausência de *Salmonella* sp. em 25g de produto; máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/g de produto para estafilococos coagulase positiva e  $10^3$  UFC/g de produto no máximo para coliformes termotolerantes (ou à 45°C) (BRASIL, 2001).

Para enriquecimento do trabalho a contagem de bactérias lácticas também foi realizada.

A análise de cada unidade amostral foi realizada sempre em duplicata. No caso da análise de coliformes termotolerantes, pelo método do Número Mais Provável, foi utilizada uma série de três (3) tubos para cada uma das três (3) diluições decimais.

#### 3.3.1 Contagem de coliformes termotolerantes

O método do Número Mais Provável (NMP) foi utilizado para estimativa do número de coliformes termotolerantes no produto.

A primeira etapa do método consistiu na inoculação de três (3) alíquotas de 1ml (de cada uma das três diluições) em tubos, contendo tubos de *Durhan* invertidos, com 9ml de meio *Lauril Tryptose Broth* (LTB); perfazendo um total de nove (9) tubos. Os tubos foram incubados durante 24-48h à 35°C. Esta primeira etapa é também chamada de teste presuntivo para análise de coliformes.

A segunda etapa do método é a que permite a expressão do número de coliformes termotolerantes. A partir dos tubos positivos em meio LTB – turvação do meio e produção de gás, uma alçada destas amostras foi inoculada em tubos contendo

tubos de Durham invertidos e caldo *Bacto EC-Medium*. Os tubos foram, então, incubados durante 24h em banho-maria numa temperatura de 45,5°C. Foram considerados como positivos para coliformes termotolerantes aqueles tubos em que houve turvação do meio *Bacto EC* e, também, a produção de gás.

Para expressão do resultado consultou-se a tabela do NMP referente à série de tubos utilizada (3) e diluição da amostra em que houve tubos positivos em meio *Bacto EC* à 45,5°C (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

### **3.3.2 Isolamento de *Salmonella* sp.**

Para isolamento de *Salmonella* sp. o procedimento consistiu de pré-enriquecimento em caldo lactosado com incubação à 35°C por 24h, seguido de enriquecimento seletivo em caldo tetrionato e caldo selenito cistina com incubação à 35°C por 24h. Na seqüência, esgotamento em meio ágar bismuto sulfito (BSA), ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e agar entérico de Hektoen (HE) com incubação à 35°C durante 24-48h para visualização de colônias típicas (ANDREWS et al., 2001).

Para confirmação, as colônias típicas foram submetidas à triagem bioquímica em tubos de Ágar Tríplice de Açúcar (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), incubados durante 24h à 35°C. Nos casos de reações típicas para *Salmonella* sp. em TSI e/ou LIA, seguiu-se com a realização dos testes bioquímicos da série denominada IMVC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato), com incubação à 35°C por 24-48h. Havendo resultados indicativos de salmonela nestes testes, prosseguiu-se com os testes de urease, dulcitol, malonato e teste sorológico somático e flagelar polivalente (ANDREWS et al., 2001).

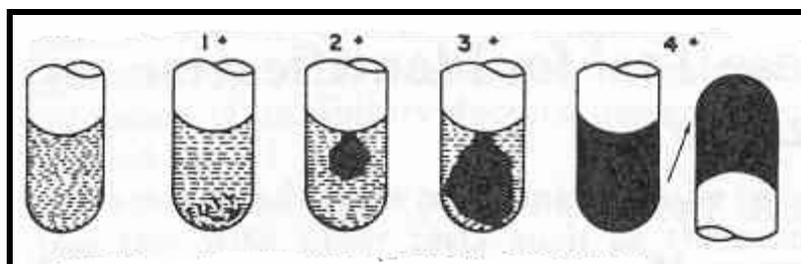
### **3.3.3 Contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, negativa e *Micrococcus* spp.**

Os estafilococos coagulase positiva foram enumerados (UFC/g) por plaqueamento em superfície em meio seletivo diferencial de Baird-Parker (BP), acrescido de gema de ovo e telurito de potássio, seguido de incubação por à 35°C durante 24-72h. De acordo com a metodologia preconizada, um total de 1ml da diluição decimal  $10^{-1}$  foi semeado em 3 placas (0,3 ml, 0,3ml e 0,4ml) para a total individualização das colônias. As demais diluições ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foram inoculadas na quantidade de 0,1ml e em duplicata.

Para contagem de estafilococos coagulase positiva (ECP) consideram-se as colônias típicas: negras, brilhantes, convexas e circundadas por halo claro evidenciando a reação de lecitinase (LANCETTE e BENNETT, 2001). Não havendo colônias típicas devem ser contados os diferentes tipos de colônias que apresentaram crescimento no meio BP.

Feita a contagem em meio BP, seguiu-se com o isolamento em meio “Brain Heart Infusion” (BHI) sólido e líquido, de cinco colônias (de cada tipo) para cada unidade amostral. Os isolados (25 para cada amostra de cada marca) foram incubados à 35°C por 24h, e posteriormente feita a coloração de Gram e teste de catalase (LANCETTE e BENNETT, 2001).

Os isolados que se apresentaram como cocos Gram positivos e catalase positiva foram, ainda, submetidos ao teste de coagulase em tubo. O teste consiste na adição de uma gota de cultura microbiana líquida a 0,5 ml de plasma de coelho (liofilizado e com EDTA, preparado de acordo com instruções do fabricante). De acordo com a literatura, podem ser consideradas coagulase positivas as culturas com formação de coágulo 3+ e 4+, ou 1+ e 2+ com produção de DNase termoresistente em ágar DNA azul de toluidina (LANCETTE e BENNETT, 2001). A Figura 2 representa esquematicamente os quatro tipos de coágulos para a prova de coagulase em tubo.



**FIGURA 2:** Representação dos resultados do teste de coagulase em tubo.

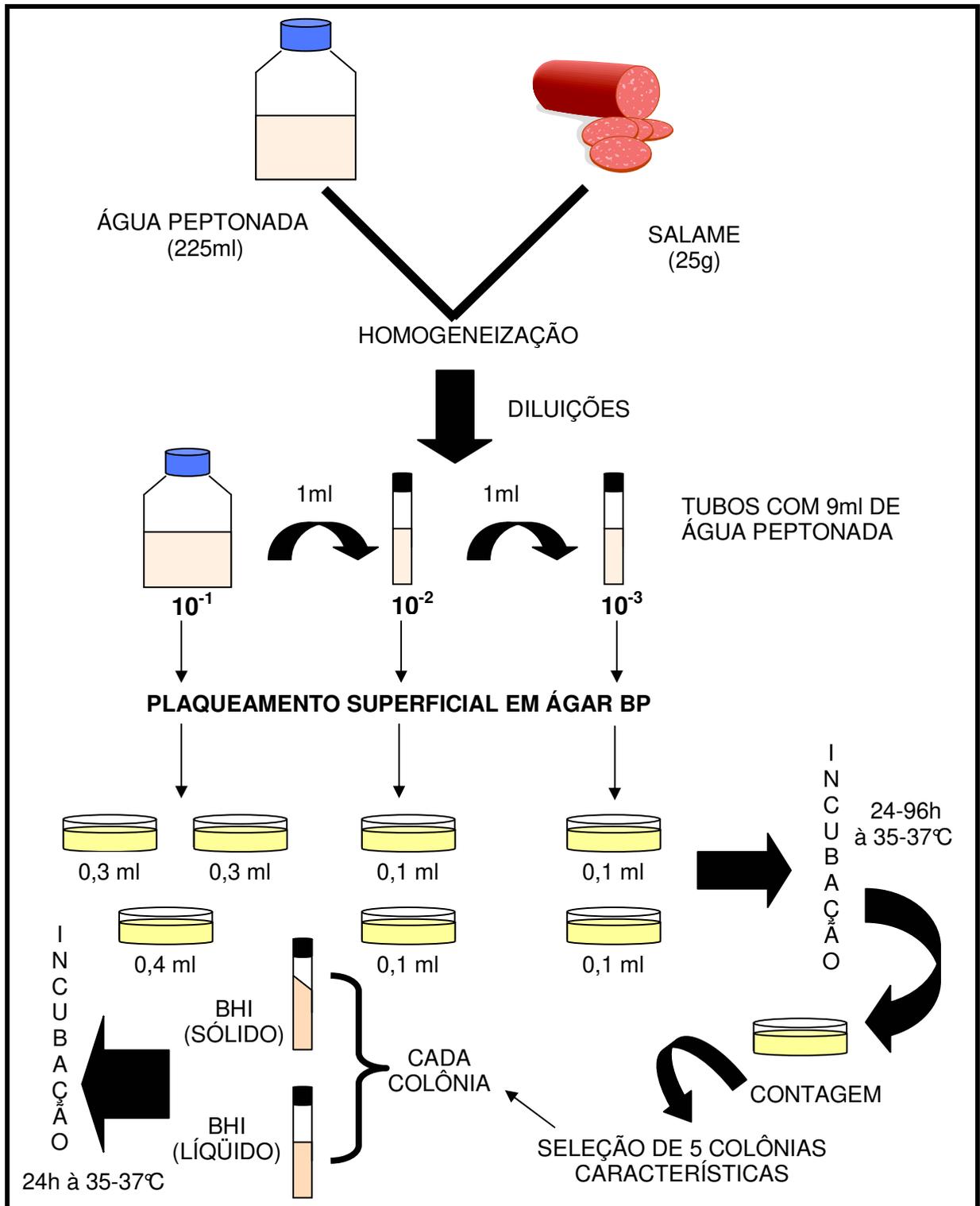
FONTE: SPERBER, W. H. e TATINI, S. R., 1975.

Os cocos Gram positivos, catalase positiva e coagulase negativa foram submetidos ao teste de sensibilidade/resistência em meio contendo o antibiótico furazolidona (20µg/ml). Isto para separar os isolados entre aqueles pertencentes ao gênero *Micrococcus* e aqueles pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, estes últimos sensíveis à furazolidona (KLOOS e SCHLEIFER, 1986). Esse método tem sido considerado mais eficiente para separação dos dois gêneros, quando comparado ao método de oxidação/ fermentação da glicose, inclusive para linhagens isoladas a partir de alimentos (COPPOLA et al., 2000; WU, KIMURA e FUJII, 2000; VON RHEINBABEN e HADLOK, 1981).

O procedimento para realização do teste consistiu de inoculação de culturas líquidas (crescimento em caldo BHI durante 24h) em placas de ágar furazolidona (VON RHEINBABEN e HADLOK, 1981) e incubação à 35°C por 24-48h.

Um fluxograma da análise de *Staphylococcus* spp. em alimentos realizada neste trabalho pode ser visualizado na Figura 3.

A Figura 4 ilustra o comportamento de linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* S-6 e *Micrococcus luteus* (ATCC4698) em ágar furazolidona (20µg/ml): não há crescimento para *S. aureus*, enquanto o crescimento de *M. luteus* pode ser percebido pela massa celular de coloração amarela na placa.



**FIGURA 3:** Fluxograma de análises para identificação de *Staphylococcus* spp.

FONTE: O autor.

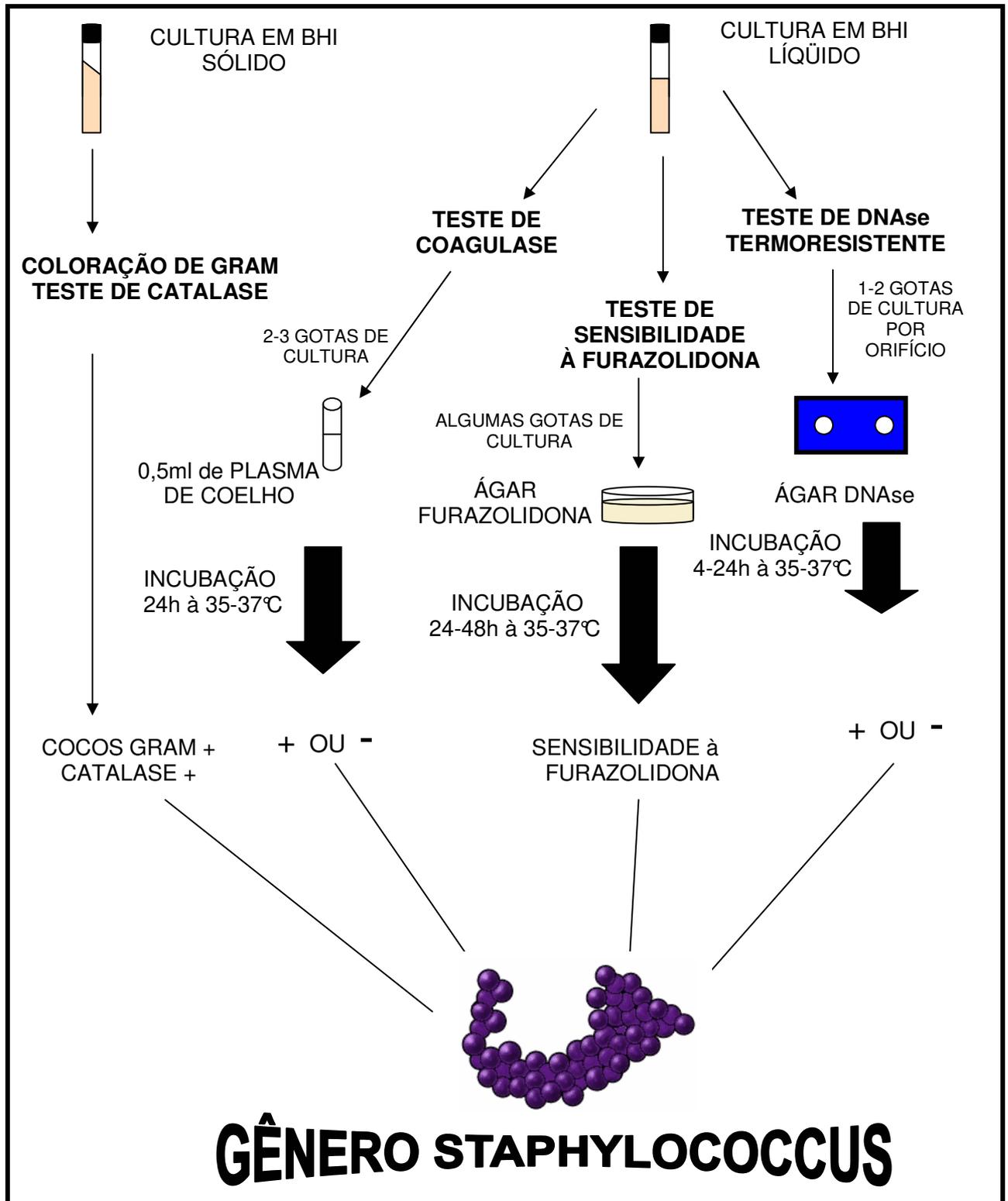


FIGURA 3: continuação.



**FIGURA 4:** Crescimento das linhagens padrão em ágar furazolidona.

FONTE: PEREIRA, K. S., 2005b.

Para expressar o número de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e *Micrococcus* spp. procedeu-se com os seguintes cálculos e correções a partir das cinco colônias isoladas e testadas para cada unidade amostral (APHA, 2001):

$$\text{N}^{\circ} \text{ de } Staphylococcus \text{ spp. Coagulase Positiva} = \frac{\text{ECP}}{\text{CI}} \times \text{CT} \times \text{ID} \times \text{Fc}$$

Onde: ECP = número de espécies coagulase positiva isoladas de meio BP ( $\leq 5$ );

CI = número de colônias isoladas de meio BP (=5);

CT = contagem total de colônias típicas em meio BP;

ID = inverso da diluição em que fora feita a contagem;

Fc = fator de correção (=10 para inóculo de 0,1 ml) ou (=1 para inóculo de 1ml).

$$\text{N}^{\circ} \text{ de } \textit{Staphylococcus} \text{ spp. Coagulase Negativa} = \frac{\text{ECNS}}{\text{CI}} \times \text{CT} \times \text{ID} \times \text{Fc}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de } \textit{Micrococcus} \text{ spp.} = \frac{\text{ECNR}}{\text{CI}} \times \text{CT} \times \text{ID} \times \text{Fc}$$

Onde: ECNS = número de espécies coagulase negativa isoladas de meio BP e sensíveis à furazolidona (20µg/ml) ( $\leq 5$ );

ECNR = número de espécies coagulase negativa isoladas de meio BP e resistentes à furazolidona (20µg/ml) ( $\leq 5$ );

CI = número de colônias isoladas de meio BP ( $= 5$ );

CT = contagem total de colônias típicas em meio BP;

ID = inverso da diluição em que fora feita a contagem;

Fc = fator de correção ( $= 10$  para inóculo de 0,1 ml) ou ( $= 1$  para inóculo de 1 ml).

Quando o número de ECP, ECNS e/ou ECNR confirmado pelos testes de coagulase, DNase e sensibilidade/resistência à furazolidona (20µg/l) foi igual a zero, o número destes microrganismos foi expresso como inferior ao limite de detecção do método.

### **3.3.4 Contagem de bactérias lácticas**

As bactérias lácticas foram enumeradas pelo método de inóculo em profundidade (HALL, LEDENBACH e FLOWERS, 2001) com incubação à 30°C por 48-72h em atmosfera microaerófila dentro de jarras de anaerobiose.

Foi utilizado o ágar Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (RANTSIOU et al., 2005)

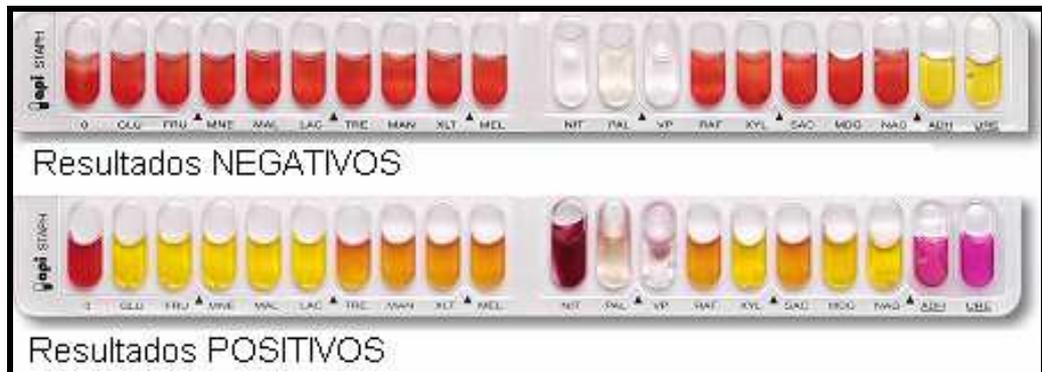
### 3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

#### 3.4.1 Identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase negatlva

As cepas foram identificadas de acordo com os critérios descritos em manuais como o “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (KLOOS e SCHLEIFER, 1986), “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (HOLT et al., 1994), “Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido” (KONEMAN et al, 2001), “Manual of Clinical Microbiology” (BANNERMAN, 2003) e por Cunha, Sinzato e Chalita (2004). Os seguintes testes foram realizados:

- ✓ Crescimento em meio Baird-Parker acrescido de gema de ovo e telurito de potássio; coloração de Gram; produção de catalase, produção de coagulase livre, produção de DNase e DNase termoresistente e sensibilidade à furazolidona (20µg/ml);
- ✓ Sistema API<sup>®</sup> Staph (bioMérieux SA). O sistema é composto por testes bioquímicos padronizados e em miniatura, para identificação de espécies do gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus* (FIGURA 5). A positividade em cada um dos testes do sistema corresponde a um determinado número, e ao final o que se obtém é um perfil numérico para o microrganismo que se deseja identificar. A identificação é, então, obtida confrontando-se o perfil numérico obtido com aqueles disponíveis na base de dados do fabricante e aos quais correspondem microrganismos identificados por gênero e espécie. A base de dados utilizada foi aquela do sistema *on-line* API *web*<sup>®</sup>. A Figura 6 ilustra a ficha para anotação de resultados e inserção na base de dados do sistema API *web*<sup>®</sup>;
- ✓ Testes complementares de oxidase modificada, descarboxilação da ornitina, hemólise em ágar sangue de carneiro 5%, crescimento anaeróbico em meio tioglicolato, hidrólise da esculina, resistência à novobiocina (concentração

inibitória mínima  $\geq 1,6\mu\text{g/ml}$ ), fermentação dos carboidratos turanose, ribose e melezitose.



**FIGURA 5:** Galerias do *kit* API® Staph.

**FONTE :** <http://apiweb.biomerieux.com>

**FIGURA 6:** Ficha para anotação de resultados pelo uso do *kit* API® Staph.

**FONTE:** *kit* API® Staph.

### 3.4.2 Identificação de *Salmonella*

Bastonetes Gram negativos suspeitos de serem *Salmonella* sp. foram submetidos à identificação pelo sistema API® 20E (bioMérieux SA) (FIGURAS 7 e 8) (ENTIS et al., 2001). Este sistema é constituído por provas bioquímicas padronizadas e em miniatura, além dos testes de oxidase, motilidade e crescimento em meio MacConkey, para identificação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e demais bastonetes Gram negativos. A identificação é feita conforme já descrito para o sistema API® Staph.

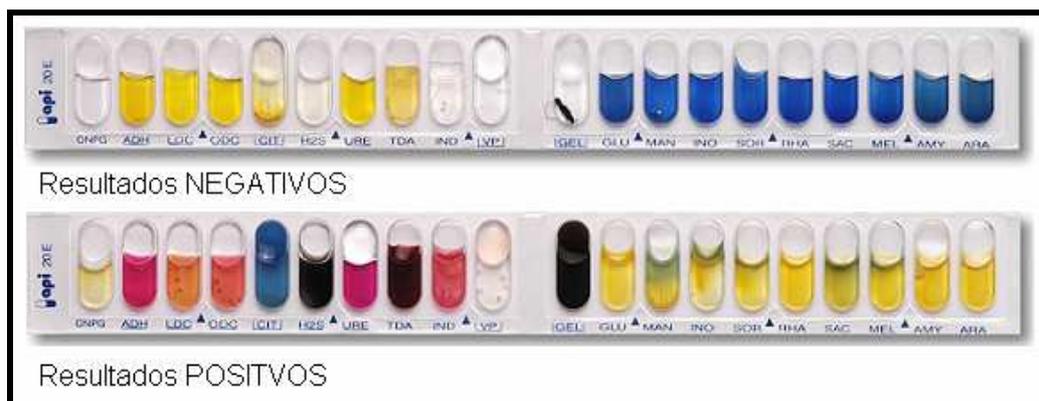


FIGURA 7: Galerias do kit API® 20E.

FONTE : <http://apiweb.biomerieux.com>

FIGURA 8: Ficha para anotação de resultados do kit API® 20E.

FONTE: kit API® 20E.

Para caracterização detalhada e confirmação definitiva de cepas positivas para o gênero *Salmonella*, as mesmas foram enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ no Rio de Janeiro.

### **3.5 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA, EM MEIO DE CULTURA, PELAS ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASE NEGATIVA**

Existem diversas metodologias descritas para cultivo de estafilococos e produção de enterotoxinas. As mais utilizadas, ainda hoje, são as técnicas denominadas “membrane-over-agar” e “sac culture”, ambas adequadas à posterior detecção por métodos, na época disponíveis, como o “optimum sensitivity plate” (OSP) e, posteriormente, o “microslide test method”. Os níveis de detecção desses métodos podem chegar a até 0,1µg/ml e 0,05µg/ml de enterotoxina em meio de cultura, respectivamente (LANCETTE e BENNETT, 2001).

Os estudos de novas metodologias para detecção de enterotoxinas levaram ao desenvolvimento de técnicas imunológicas mais sensíveis como “Reversed Passive Latex Agglutination” (RPLA) e “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA). Atualmente, diversos *kits* comerciais possibilitam detecção de 0,1-2,0ng de enterotoxina/ml de fluido sobrenadante de cultura (PEREIRA et al. 1999). Deste modo, novas metodologias de cultivo e produção de enterotoxinas vêm sendo estudadas visando-se não mais a otimização das quantidades de EEs a serem produzidas, já que estão disponíveis métodos mais sensíveis, mas, sim, dos custos e tempo requeridos para análise.

Entretanto, apesar dos diversos estudos e publicações disponíveis a respeito das diversas técnicas de cultivo para produção de enterotoxinas, poucas são oficialmente aprovadas pelo “Food and Drug Administration” (FDA) e pela “Association of Official Agricultural Chemists” (AOAC).

O único método oficial aprovado pela AOAC e descrito no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” para produção de EEs em meio de cultura é o “semisolid agar” (LANCETTE e BENNETT, 2001).

O cultivo em meio de cultura BHI líquido é o método para produção de enterotoxinas recomendado nos *kits* comerciais para detecção de EEs. Estudos de Casman e Bennett (1963) e de Lotter e Genigeorgis (1975) já relatavam o uso de BHI líquido para produção de enterotoxinas, mas com a necessidade de concentração do sobrenadante obtido do cultivo devido à baixa sensibilidade dos métodos de detecção. Atualmente, alguns estudos relatam a eficiência do cultivo de estafilococos em BHI líquido para produção de enterotoxinas, inclusive ECN, e detecção das EEs pelo uso de *kits* comerciais sem necessidade de concentração do cultivo (CHOU e CHEN, 1997; CUNHA NETO, SILVA e STAMFORD, 2002; MARÍN, ROSA e CORNEJO, 1992).

Posto isto, este trabalho propõe o seguinte protocolo para produção de EEs: ativação dos isolados de estafilococos coagulase negativa em meio BHI líquido (5ml) durante 18-24h à 35°C, inoculação de 2ml desta cultura em 23 ml de meio BHI líquido com pH 5,3 (perfazendo um total de 25ml) e incubação durante 48h à 35°-37°C sob agitação à 150-170 rpm (FIGURA 9).

Trabalhou-se com o volume de 25ml, pois esta é sempre a alíquota mínima a ser tomada de um alimento para sua análise. Além disso, as metodologias descritas no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (APHA, 2001) e no “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) *online* (2001) consideram tal volume de meio BHI semi-sólido 0,7% de ágar e pH 5,3 para cultivo de estafilococos e produção de enterotoxina.

A opção por trabalhar-se com meio BHI líquido foi com intuito de submeter as culturas à agitação favorecendo a aeração do meio e a produção de enterotoxinas, inclusive de linhagens pauciprodutoras (PEREIRA et al., 1991). O uso do ágar semi-sólido não possibilitaria tal procedimento. A velocidade de rotação foi escolhida com base em estudos prévios (CUNHA NETO, SILVA E STAMFORD, 2002; PEREIRA et al., 1991).



**FIGURA 9:** Cultivo de estafilococos para produção de enterotoxinas.

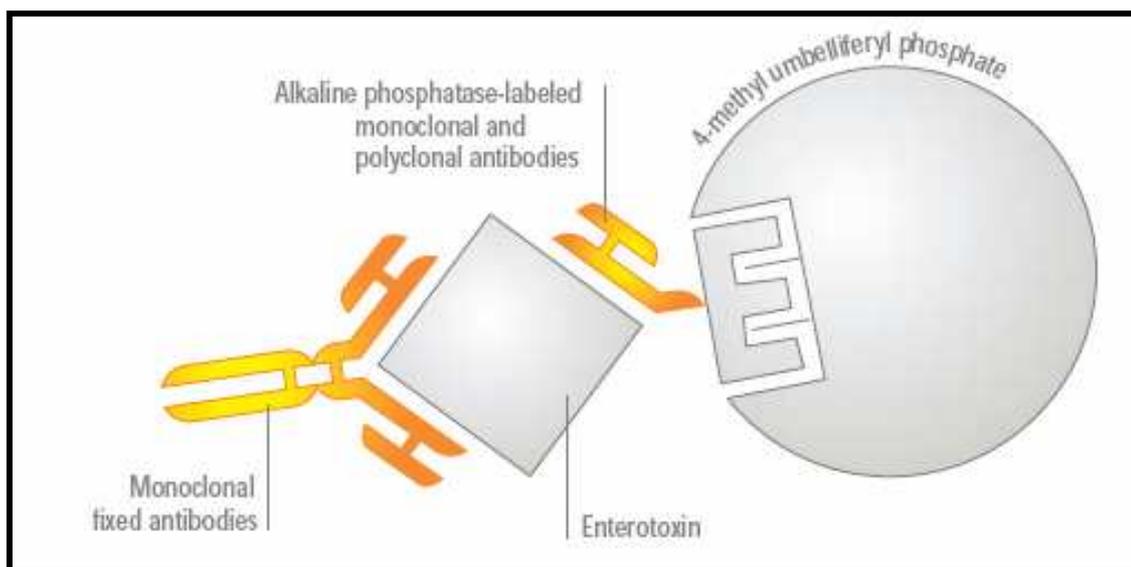
FONTE: PEREIRA, K. S., 2005c.

### 3.6 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Para detecção foi utilizado o teste Vidas SET II<sup>®</sup> (bioMérieux SA) em que é possível a detecção das enterotoxinas A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D e E com sensibilidade de até 0,05-0,1ng/g.

O fundamento desse método é a reação antígeno/anticorpo e é conhecido pelo nome de ELFA (“Enzyme Linked Fluorescent Assay”) do tipo *sandwich*: os anticorpos monoclonais para as EEs são adsorvidos numa fase sólida, e nesta são adicionadas as amostras suspendidas. Em seguida, são acrescentados anticorpos mono e policlonais anti-EE, porém ligados à enzima Fosfatase Alcalina (o que se conhece por conjugado).

Segue-se, então, com a adição do substrato enzimático, o 4 Metil Umbeliferil Fosfato (4 MUP) (FIGURA 10). Caso haja toxina na amostra haverá adsorção do conjugado e conseqüente hidrólise do substrato enzimático com formação de umbeliferona e emissão de fluorescência pela mesma.



**FIGURA 10:** Esquema da ligação Anticorpo - EE - Conjugado (anticorpo + fosfatase alcalina).

FONTE: Folder VIDAS SET II<sup>®</sup> bioMérieux, 2003.

Na prática, a realização do teste é feita adicionando-se as amostras em barretes que são inseridos no aparelho mini VIDAS<sup>®</sup> (bioMérieux SA) (FIGURA 11). Os barretes contêm, além do orifício para inoculação da amostra, várias cúpulas com soluções de lavagem, o conjugado e o substrato enzimático. A cada barrete inserido corresponde um cone, que é a fase sólida onde estão adsorvidos os anticorpos monoclonais, que deve ser, também, inserido no aparelho. A partir deste ponto, o teste é totalmente automatizado, sendo realizado pelo equipamento.

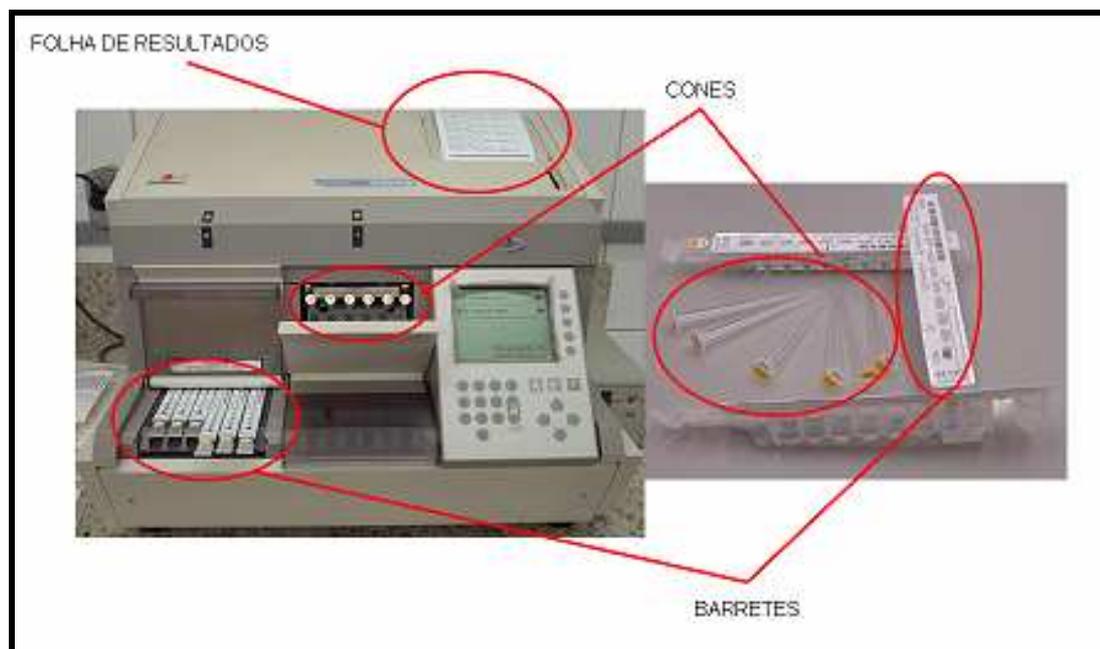
Os resultados da emissão de fluorescência são analisados automaticamente pelo sistema e uma folha de resultados é impressa. Para isso, o aparelho efetua duas medidas de fluorescência na cúpula de leitura que contém o substrato enzimático (FIGURA 12). A primeira é realizada antes do substrato entrar em contato com o cone e a segunda após contato do substrato com o cone que pode ou não conter a enzima

fosfatase alcalina dependendo da presença de enterotoxina na amostra (FIGURA 13). A diferença entre essas duas medidas de fluorescência é chamada “Relative Fluorescence Value” (RFV). A partir do valor de RFV obtido para cada amostra o sistema VIDAS faz a relação entre o RFV da amostra e o RFV do padrão de EE do teste, gerando assim o Valor do Teste (VT). A partir dos valores de VT de cada amostra os testes são interpretados como positivos ou negativos:

$$VT = \text{RFV amostra} / \text{RFV padrão}$$

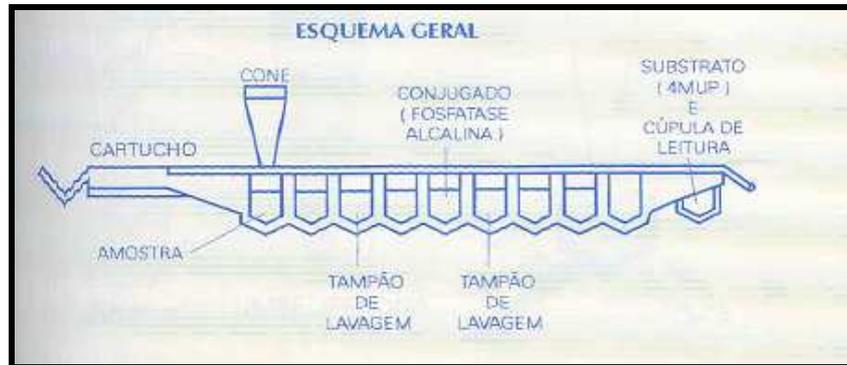
**VT < 0,13 - RESULTADO NEGATIVO**

**VT ≥ 0,13 - RESULTADO POSITIVO**



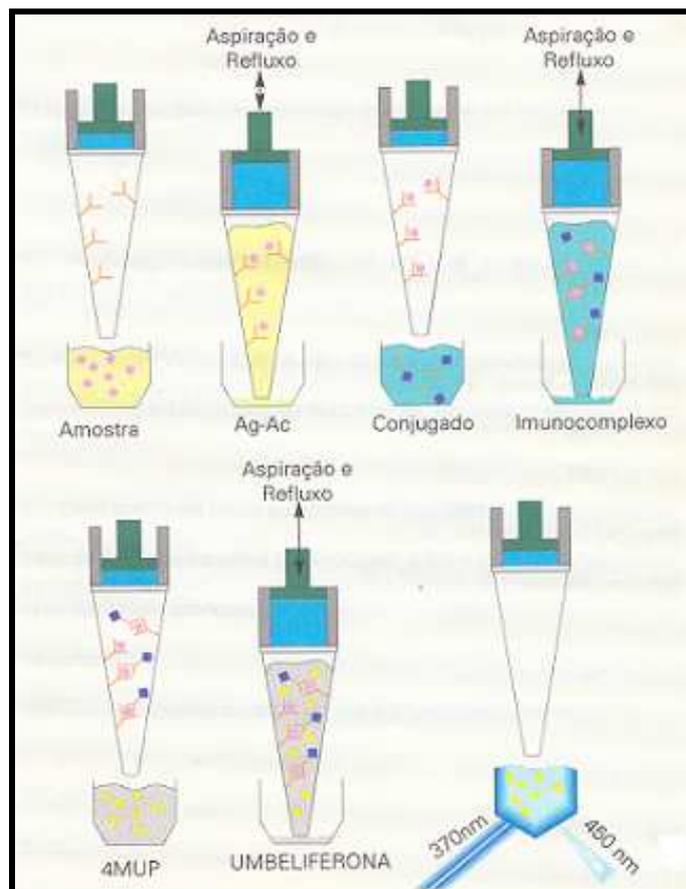
**FIGURA 11:** À esquerda vista frontal do aparelho mini VIDAS® pertencente ao Lab. de Toxinas Microbianas – FEA/ UNICAMP e à direita cones e barretes do *kit* VIDAS SET II®.

FONTE: PEREIRA, K. S., 2005d.



**FIGURA 12:** Esquema da vista lateral de um barrete do *kit VIDAS SET II®*.

FORTE: BIOLAB-MÉRIEUX, [s.d.].



**FIGURA 13:** Esquema do teste VIDAS SET II®.

FORTE: BIOLAB-MÉRIEUX, [s.d.].

### **3.6.1 Análise de enterotoxinas estafilocócicas nos salames**

A detecção de EEs nos salames foi feita de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

Consistiu na preparação de um extrato a partir de salame e solução de extração (para produtos de charcutaria é indicado o uso água destilada) na proporção de 25g de salame para 25 ou, no máximo, 50ml de solução de extração.

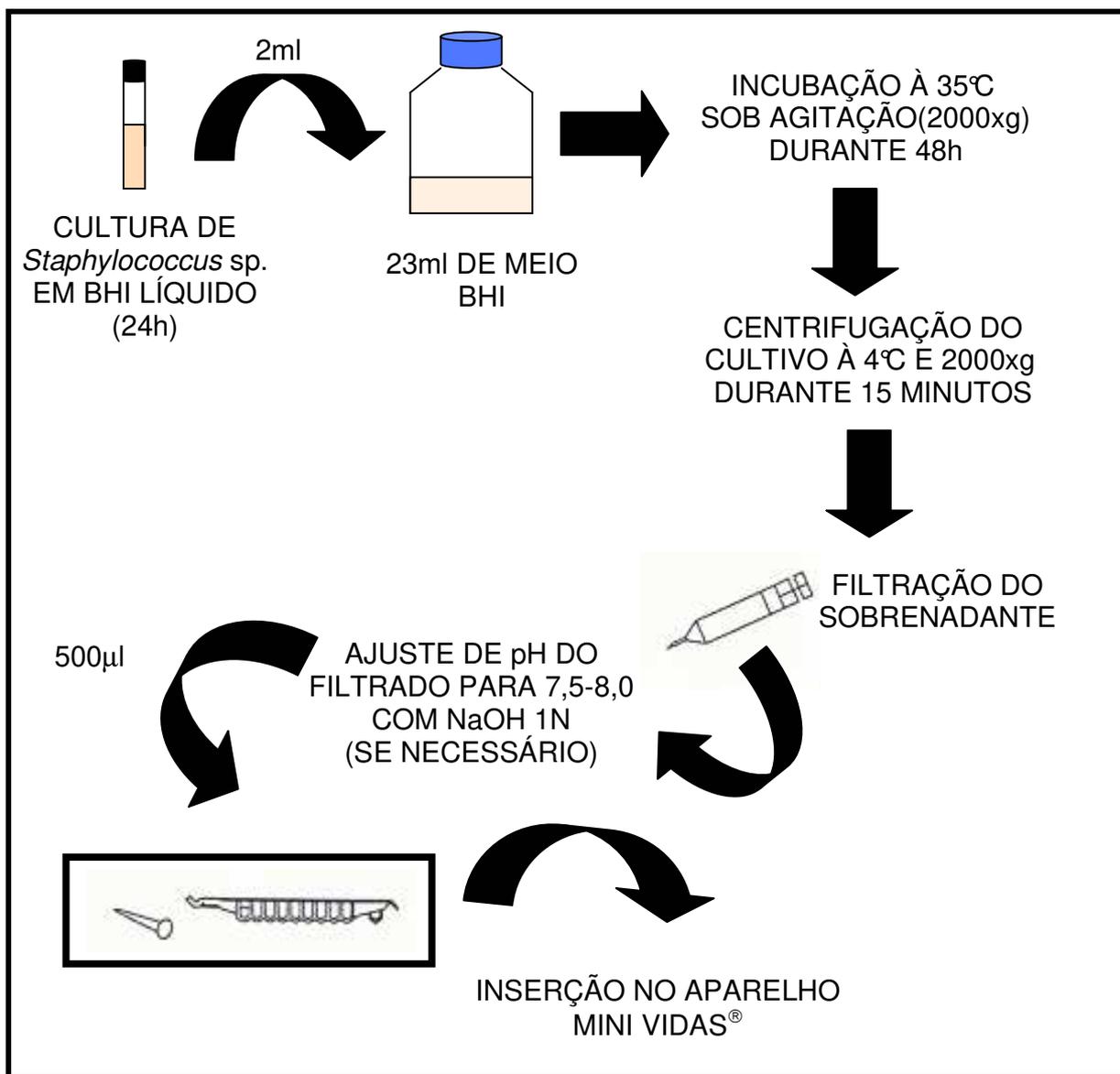
Esta mistura foi triturada em *stomacher* até que se formasse uma pasta homogênea. Posteriormente, ajustou-se o pH do extrato para 4,0, com HCl 5N, e incubou-se à 18-25°C durante 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se este extrato sob temperatura de 18-25°C a 5000x g durante 15 minutos. Todo o volume de sobrenadante foi recuperado e filtrado. Ajustou-se, então, o pH do filtrado entre 7,5 e 8,0, com NaOH 1N, e 500µl foram transferidos para os barretes do *kit* VIDAS Staph enterotoxin (SET)<sup>®</sup> (bioMérieux SA). Estes barretes foram, então, inseridos no aparelho e realizada a leitura; com expressão do resultado como presença ou ausência de enterotoxina na amostra.

### **3.6.2 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em meio de cultura**

A análise de EEs em meio de cultura foi realizada centrifugando-se todo o volume de meio de cultura em que foram inoculados os estafilococos.

Para extração de enterotoxinas a partir de meio de cultura seguiu-se o protocolo geral de extração indicado pelo fabricante. A temperatura de centrifugação foi de 4°C a 2000xg durante 15 minutos. Em seguida, filtrou-se o sobrenadante ajustando-se o pH do filtrado entre 7,5 e 8,0, com NaOH 1N, quando necessário. 500µl foram transferidos para os barretes do *kit* VIDAS Staph enterotoxin (SET)<sup>®</sup> (bioMérieux SA). Estes

barretes foram inseridos no aparelho e, então, feita a leitura da amostra para presença de enterotoxinas (FIGURA 14).



**FIGURA 14:** Protocolo para produção e detecção de enterotoxinas – VIDAS SET®.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados descritivamente pelo cálculo de frequências absolutas (n), médias, desvio padrão, mediana e quartis.

As variáveis pH, bactérias lácticas, *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, dos diferentes lotes e marcas de salames, foram avaliadas analiticamente por testes de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis, segundo distribuição normal ou não, seguidos de teste de Tukey ou Mann-whitney, respectivamente.

A variável coliformes termotolerantes, para os lotes e as marcas de salames, foi analisada pelo teste de Qui-quadrado e Teste exato de Fisher.

O nível de significância assumido foi de 5% em todo trabalho, portanto só foi considerado significativo se  $p < 0,05$ .

O *software* utilizado para análise foi o *Statistical Analysis System* (SAS) versão 8.2.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística será apresentada juntamente com os resultados obtidos experimentalmente para facilitar a visualização, interpretação e discussão.

### 4.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada análise estatística para avaliação da homogeneidade entre os três lotes das 90 unidades amostrais para as variáveis pH, contagem de bactérias lácticas, contagem de *Staphylococcus* spp coagulase negativa e contagem de *Micrococcus* spp.

Na Tabela 1 estão contidos os valores de p obtidos para cada uma das variáveis.

**TABELA 1:** Valores p da comparação entre lotes para cada uma das variáveis.

Variável	Valor-p
pH	0,5318 <sup>(1)</sup>
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase NEGATIVA (Log de UFC/g)	0,0277 <sup>(1)*</sup>
<i>Micrococcus</i> spp. (Log de UFC/g)	0,6122 <sup>(1)</sup>
Bactérias Lácticas (Log de UFC/g)	0,1699 <sup>(2)</sup>
Comparação dos Lotes - <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa(Log de UFC/g)	Valor-p
1 X 2	0,0174 <sup>(3)*</sup>
1 X 3	0,0337 <sup>(3)*</sup>
2 X 3	1,0000 <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>ANOVA, <sup>(2)</sup>Teste de Kruskal Wallis, <sup>(3)</sup>Teste de Mann-Whitney;

\*Indica diferença estatística.

Para as variáveis pH, contagem de bactérias lácticas, contagem de *Micrococcus* spp. e contagem de coliformes termotolerantes (APÊNDICE A), os lotes, de cada marca de salames, apresentaram-se de maneira homogênea, ou seja, não diferiram estatisticamente.

Já no que diz respeito à análise dos lotes para a variável *Staphylococcus* spp coagulase negativa foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os lotes, especificamente o lote 1 diferiu dos lotes 2 e 3, que não diferiram entre si.

Nova análise estatística foi realizada para detectar em qual(is) marca(s) encontrava(m)-se esta heterogeneidade entre lotes, sendo os lotes 2 e 3 considerados conjuntamente. Na Tabela 2 estão contidos os valores de p para a comparação do lote 1 com o lote 2 e 3 de cada uma das seis marcas pelo Teste de Mann-Whitney.

**TABELA 2:** Valores p da comparação entre marcas para os lotes 1 e lotes 2 e 3 conjuntamente.

<b>Comparação DOS LOTES EM CADA MARCA</b>	<b>Valor-p</b>
<b><i>Staphylococcus</i> spp. coagulase NEGATIVA (UFC/g)</b>	
A1 x A23	0.8569
B1 x B23	0.1481
C1 x C23	0.0870
D1 x D23	0.8095
E1 x E23	0.0221*
F1 x F23	0.7161

\*Indica diferença estatística.

De acordo com a tabela 2 pode-se perceber que a marca com heterogeneidade entre lotes foi a marca E. Assim, para a variável *Staphylococcus* spp. coagulase negativa sete categorias passaram a ser consideradas para análise estatística entre marcas: A, B, C, D, E1, E23 e F.

Uma vez realizada a análise de homogeneidade entre lotes, para cada uma das variáveis, partiu-se para um estudo estatístico descritivo de cada variável para cada uma das seis marcas/ categorias de salames (TABELAS 3 e 4). As freqüências absolutas (n), médias, desvios-padrão, medianas, quartis (q) e valores mínimos e máximos para cada variável foram calculados.

**TABELA 3:** Valores p da comparação entre marcas para cada uma das variáveis.

MARCA / Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mín.	q1 (25%)	Mediana	q3 (75%)	Máx.	valor-p
<b>pH</b>									
A	15	5,07	0,24	4,66	4,95	5,03	5,19	5,63	< 0.0001 <sup>(2)*</sup>
B	15	5,37	0,23	4,75	5,24	5,42	5,56	5,62	
C	15	6,06	0,53	5,22	5,40	6,30	6,47	6,52	
D	15	5,28	0,17	4,94	5,12	5,34	5,41	5,52	
E	15	6,20	0,39	5,63	5,78	6,19	6,57	6,68	
F	15	5,32	0,13	5,17	5,20	5,28	5,47	5,52	
<b>Log de <i>Micrococcus</i> spp. (UFC/g)</b>									
A	15	4,036	1,97	0,95	0,95	4,81	5,20	6,23	0.0006 <sup>(2)*</sup>
B	15	4,035	1,74	0,95	3,60	4,18	5,45	5,83	
C	15	2,513	2,28	0,95	0,95	0,95	5,46	5,78	
D	15	5,386	1,82	0,95	5,68	5,98	6,32	6,51	
E	15	4,372	1,53	0,95	4,11	5,04	5,30	5,86	
F	15	3,592	1,59	0,95	2,43	3,46	5,18	6,04	
<b>Log de Bactérias Láticas (UFC/g)</b>									
A	15	6,085	0,40	5,00	5,95	6,08	6,32	6,63	< 0.0001 <sup>(1)*</sup>
B	15	6,861	0,89	5,63	6,08	6,84	7,66	8,32	
C	15	6,173	0,59	5,20	5,64	6,15	6,56	7,49	
D	15	7,025	0,45	6,51	6,68	6,94	7,20	7,94	
E	15	7,438	0,54	6,15	7,04	7,46	7,79	8,28	
F	15	6,427	0,84	4,88	5,96	6,28	7,30	7,88	

<sup>(1)</sup>ANOVA, <sup>(2)</sup>Teste de Kruskal Wallis.

\*Indica diferença estatística.

**TABELA 4:** Valores p da comparação entre categorias para a variável *Staphylococcus* spp. coagulase negativa.

CATEGORIA/ Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mín.	q1 (25%)	Mediana	q3 (75%)	Máx.	valor-p
<b>Log de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase NEGATIVA (UFC/g)</b>									
B	15	5,12	0,80	3,78	4,42	5,30	5,99	6,26	< 0.0001 <sup>(2)*</sup>
C	15	6,00	0,35	5,18	5,86	6,00	6,26	6,49	
D	15	6,02	0,27	5,48	5,81	6,11	6,20	6,38	
E1	5	5,54	0,41	5,20	5,26	5,28	5,86	6,08	
E23	10	4,73	0,72	3,08	4,51	4,91	5,15	5,68	
F	15	3,63	2,23	0,95	0,95	3,36	5,48	7,88	

<sup>(2)</sup>Teste de Kruskal Wallis.

\*Indica diferença estatística.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DE pH DOS SALAMES

Os valores obtidos para a medição do pH das 90 amostras de salames estão demonstrados na Tabela 5.

**TABELA 5:** Valores de pH das amostras de salames.

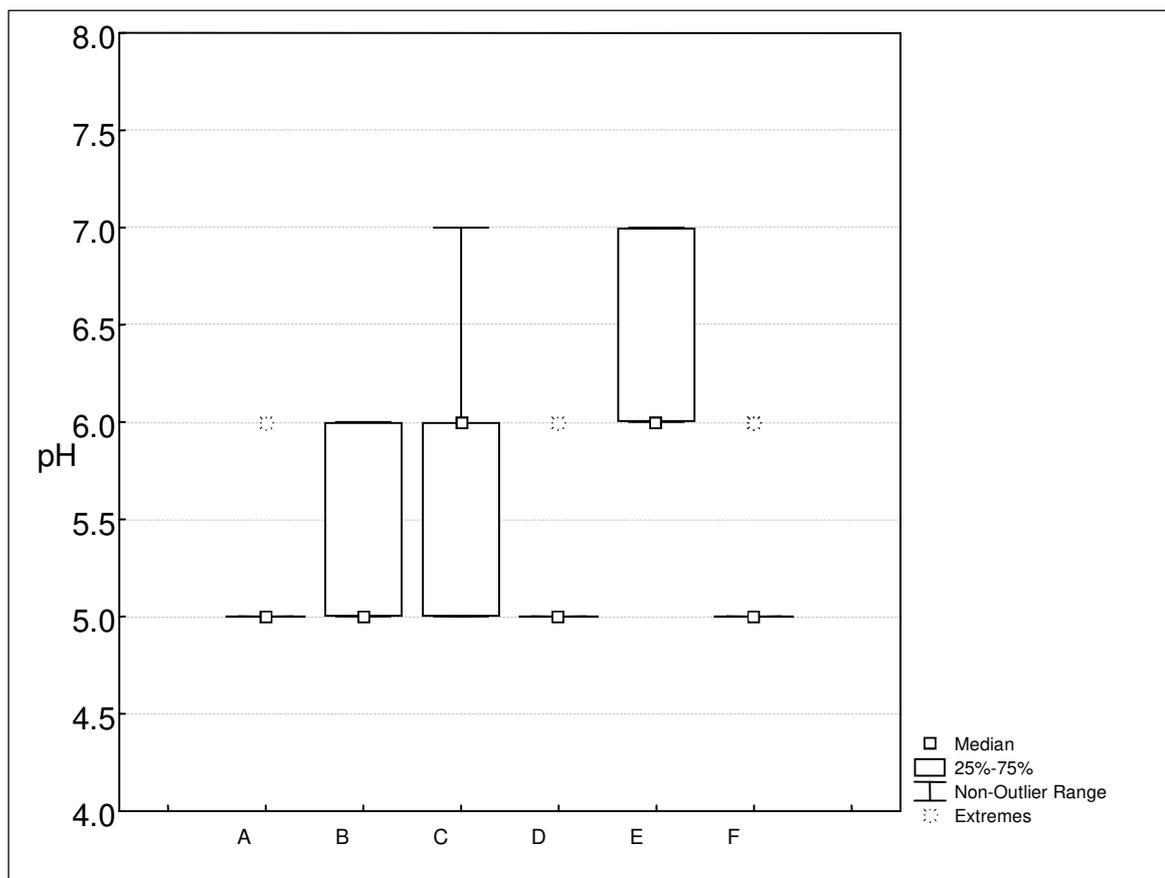
L O T E	A M O S T R A	pH					
		MARCAS					
		A	B	C	D	E	F
1	1	4,99	5,48	5,22	5,18	6,10	5,17
	2	5,03	5,47	5,46	5,34	5,72	5,47
	3	5,37	5,13	5,34	5,41	6,10	5,49
	4	5,29	5,25	5,31	5,34	5,95	5,47
	5	5,63	5,24	5,40	5,20	5,64	5,26
2	1	4,95	4,75	6,52	5,42	6,61	5,27
	2	4,86	5,57	6,52	4,94	6,68	5,28
	3	4,96	5,62	6,45	5,09	5,78	5,28
	4	4,97	5,35	6,47	5,48	5,63	5,29
	5	4,66	5,56	6,44	5,05	6,19	5,28
3	1	5,19	5,57	6,51	5,12	6,57	5,17
	2	5,13	5,42	6,30	5,41	6,48	5,52
	3	5,12	5,24	6,28	5,52	6,43	5,20
	4	5,15	5,52	6,21	5,41	6,53	5,51
	5	4,85	5,30	6,43	5,28	6,65	5,18

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH das marcas pelo teste de Kruskal Wallis (TABELA 3).

As marcas foram, então, comparadas duas a duas pelo Teste de Mann-Whitney (APÊNDICE A).

Os valores de  $p$  obtidos indicam que a marca A é diferente das cinco demais ( $p < 0,05$ ). As marcas B, D e F não diferem estatisticamente entre si, assim como a marca C e E.

A variação nos valores de pH dos salames de uma mesma marca e entre as diferentes marcas pode ser visualizada na Figura 15.



**FIGURA 15:** Variação dos valores de pH encontrados nas seis marcas de salames.

Os salames da marca A apresentaram, em média, os menores valores de pH encontrados neste trabalho e os da marca E os maiores valores.

Para o parâmetro pH o tipo de salame não teve influência estatisticamente significativa, lembrando que o salame da marca D era tipo Milano e não diferiu dos salames B e F do tipo Italiano.

Não há um parâmetro legal para que se possa comparar com os valores encontrados. Dentro do Padrão de Identidade e Qualidade de salames não há definição de valor mínimo nem máximo permitido para estes produtos (BRASIL, 2000). Apesar disso, há consenso na literatura para que este valor no produto final não seja maior do que 5,4 (TERRA, 1998; TERRA, FRIES e TERRA, 2004) para garantia da qualidade microbiológica.

De maneira geral os salames encontravam-se com pHs próximos a 5,4, exceção para todos os salames da marca E e todas as amostras dos lotes 2 e 3 da marca C. Nestes salames, os valores de pH encontrados foram ao redor de 6,0. Assim, os salames industrializados nacionais, analisados, podem ser classificados como ácidos ou de baixa acidez dependendo da marca.

Uma possível explicação para os salames com pH acima daquele preconizado na literatura nacional seria a utilização de maiores quantidades de carne suína em detrimento da carne bovina, já que a primeira tem por característica pHs mais elevados (SAMELIS et al., 1993). Além disso, a utilização de carne “Dry, Firm and Dark” (DFD) como matéria prima também contribuiria para este aumento nos valores de pH. Este tipo de carne é rejeitado para venda ao consumidor como carne “in natura”, mas sua utilização em salames é registrada na literatura específica. (SAMELIS et al., 1994; METAXOPOULOS, SAMELIS e PAPADELLI, 2001).

Outra consideração a ser feita em relação aos valores de pH mais elevados dos salames é a atividade microbiana dos micrococos e estafilococos, cujo metabolismo de proteínas contribui consideravelmente para o desenvolvimento de sabor do produto, resultado da liberação de aminas e produção de amônia que podem levar ao acréscimo nos valores de pH (LUCKE citado por SAMELIS et al., 1994).

O registro de valores de pH ao redor de 6,0 para salames é raro na literatura, exceto para alguns salames de países mediterrâneos cujo pH pode chegar a valores de 6,2 (AYMERICH et al., 2003). Rantsiou e colaboradores (2005) pesquisando bactérias lácticas em salames italianos, húngaros e gregos registraram para o produto final valores de pH iguais a 5,8, 5,6 e 4,8, respectivamente. Em contrapartida, os salames belgas,

alemães e espanhóis são caracterizados pela elevada acidez, com pH variando entre 4,6 e 5,0 após a fermentação (SAMELIS et al., 1994).

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ÁGUA DOS SALAMES

Os resultados médios obtidos para medidas de  $A_w$  estão apresentados na Tabela 6. As temperaturas registradas durante as análises variaram de 24,8°C a 25,6°C. Apenas duas unidades amostrais de um mesmo lote foram analisadas.

**TABELA 6:** Valores de  $A_w$  para cada uma das seis marcas de salames.

MARCA	$A_w$
A	0,87
B	0,82
C	0,87
D	0,86
E	0,84
F	0,82

Os valores de atividade de água encontrados estão em total concordância com o valor estabelecido pelo Padrão de Identidade e Qualidade de salames que é de no máximo 0,90 (BRASIL, 2000).

Infelizmente, devido às análises não terem sido realizadas concomitantemente com as demais, nada pode ser inferido com relação aos demais dados obtidos. A falha temporal nas análises de  $A_w$  ocorreu devido ao aparelho estar quebrado quando do início do trabalho. Optou-se por coletar novas amostras, de cada uma das marcas, ao

final dos estudos. Foram adquiridas duas unidades amostrais pertencentes a um mesmo lote e as análises realizadas em triplicata.

Vale ressaltar a importância da relação entre os parâmetros pH e  $A_w$ , que, de maneira geral, é inversamente proporcional. Todavia, esta relação não pôde ser observada em algumas marcas de salames analisadas.

Os salames da marca A que apresentaram menores valores de pH, apresentaram o maior valor médio de  $A_w$ ; dentro do que seria esperado. No entanto, os salames da marca C, com maiores valores de pH, apresentaram os mesmos valores de  $A_w$  dos salames da marca A.

Os menores valores de  $A_w$  foram verificados nos salames das marcas B e F que não apresentaram os maiores valores de pH.

#### **4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**

As tabelas de número 7 a 12 apresentam os resultados obtidos para as contagens de coliformes termotolerantes, ECP, ECN, bactérias lácticas e isolamento de salmonela.

Para discussão dos resultados obtidos, os grupos microbianos serão considerados separadamente e conjuntamente à referente análise estatística.

TABELA 7: Análises microbiológicas dos salames da marca A

M A R C A	A M O S T R A	MICROORGANISMOS					
		<i>Salmonella</i> spp. em 25g	Coliformes à 45°C (NMP/g)	ECP (LogUFC/g)	ECN (LogUFC/g)	<i>Micrococcus</i> spp. (LogUFC/g)	Bactérias Láticas (LogUFC/g)
1	1	-	<3	<1	5,00	5,20	6,32
	2	-	<3	<1	4,95	4,78	6,49
	3	-	<3	<1	5,76	0,95	6,56
	4	-	<3	<1	5,94	5,34	6,30
	5	-	<3	<1	5,79	5,18	6,63
A 2	1	-	<3	<1	6,72	0,95	6,08
	2	-	<3	<1	6,71	0,95	6,04
	3	-	<3	<1	6,58	5,98	5,96
	4	-	<3	<1	6,08	6,23	5,87
	5	-	<3	<1	4,72	0,95	5,00
3	1	-	<3	<1	5,15	4,56	6,15
	2	-	<3	<1	5,42	4,81	6,08
	3	-	<3	<1	5,40	4,79	6,23
	4	-	4	<1	4,88	5,04	5,62
	5	-	9	<1	4,98	4,81	5,95

TABELA 8: Análises microbiológicas dos salames da marca B

M A R C A	L O T E R A	MICROORGANISMOS					
		<i>Salmonella</i> spp. em 25g	Coliformes à 45°C (NMP/g)	ECP (LogUFC/g)	ECN (LogUFC/g)	<i>Micrococcus</i> spp. (LogUFC/g)	Bactérias Láticas (LogUFC/g)
A	1	-	4	<1	4,56	0,95	6,45
	2	-	<3	<1	5,34	5,15	5,93
	3	-	4	<1	4,67	4,08	5,64
	4	-	<3	<1	4,34	4,15	5,63
	5	-	<3	<1	4,42	4,58	6,15
B	1	-	<3	<1	4,76	4,18	6,08
	2	-	<3	<1	5,99	0,95	6,84
	3	-	<3	<1	6,26	0,95	7,11
	4	-	<3	<1	6,00	5,83	6,88
	5	-	<3	<1	5,68	5,68	6,61
3	1	-	<3	<1	6,04	5,45	8,04
	2	-	<3	<1	4,26	4,08	7,66
	3	-	<3	<1	5,30	5,15	8,32
	4	-	4	<1	3,78	3,60	7,66
	5	-	<3	<1	5,92	5,75	7,91

TABELA 9: Análises microbiológicas dos salames da marca C

M A R C A	L O T E R A	MICROORGANISMOS					
		<i>Salmonella</i> spp. em 25g	Coliformes à 45°C (NMP/g)	ECP (LogUFC/g)	ECN (LogUFC/g)	<i>Micrococcus</i> spp. (LogUFC/g)	Bactérias Láticas (LogUFC/g)
1	A 1	-	<3	<1	5,63	5,46	6,52
	A 2	-	9	<1	6,00	0,95	7,49
	A 3	-	9	<1	5,61	5,45	6,56
	A 4	-	9	<1	5,95	5,78	6,93
	A 5	-	23	<1	5,86	5,68	6,67
C 2	A 1	-	23	<1	6,49	0,95	5,98
	A 2	-	<3	<1	6,26	0,95	6,28
	A 3	-	9	<1	5,18	0,95	6,23
	A 4	-	9	<1	6,18	0,95	5,61
	A 5	-	<3	<1	6,00	0,95	6,04
3	A 1	-	<3	<1	6,38	0,95	5,20
	A 2	-	<3	<1	5,93	0,95	5,64
	A 3	-	<3	<1	6,23	0,95	5,63
	A 4	-	<3	<1	5,93	0,95	5,65
	A 5	-	<3	<1	6,40	5,78	6,15

TABELA 10: Análises microbiológicas dos salames da marca D

M A R C A	L O T E R A	MICROORGANISMOS						
		<i>Salmonella</i> spp. em 25g	Coliformes à 45°C (NMP/g)	ECP (LogUFC/g)	ECN (LogUFC/g)	<i>Micrococcus</i> spp. (LogUFC/g)	Bactérias Láticas (LogUFC/g)	
D	1	1	-	<3	<1	6,11	5,94	6,68
		2	-	<3	<1	6,20	0,95	6,69
		3	-	<3	<1	5,81	5,98	6,87
		4	-	<3	<1	6,26	0,95	6,57
		5	-	<3	<1	5,48	5,48	6,53
	2	1	+	<3	<1	5,75	5,92	7,80
		2	-	<3	<1	6,08	6,26	6,51
		3	-	4	<1	6,15	6,32	7,15
		4	-	4	<1	5,64	5,82	7,94
		5	-	4	<1	5,86	5,68	6,94
	3	1	-	<3	<1	6,15	6,34	6,68
		2	-	<3	<1	5,86	6,04	7,15
		3	-	4	<1	6,32	6,51	7,15
		4	-	4	<1	6,20	6,38	7,52
		5	-	9	<1	6,38	6,20	7,20

TABELA 11: Análises microbiológicas dos salames da marca E

M A R C A	L O T O	A M O R A	MICROORGANISMOS				
			<i>Salmonella</i> spp. em 25g	Coliformes à 45°C (NMP/g)	ECP (LogUFC/g)	ECN (LogUFC/g)	<i>Micrococcus</i> spp. (LogUFC/g)
1	1	-	<3	<1	6,08	5,48	6,08
	2	-	<3	<1	5,86	0,95	5,86
	3	-	<3	<1	5,26	4,78	5,26
	4	-	<3	<1	5,20	5,04	5,20
	5	-	<3	<1	5,28	0,95	5,28
E 2	1	-	<3	<1	5,04	5,65	5,04
	2	-	<3	<1	5,68	5,86	5,68
	3	-	<3	<1	3,08	3,26	3,08
	4	-	<3	<1	4,11	4,28	4,11
	5	-	<3	<1	5,15	5,30	5,15
3	1	-	<3	<1	4,92	5,11	4,92
	2	-	4	<1	4,71	4,11	4,71
	3	-	7	<1	5,20	4,60	5,21
	4	-	<3	<1	4,90	5,08	4,90
	5	-	7	<1	4,51	5,11	4,51

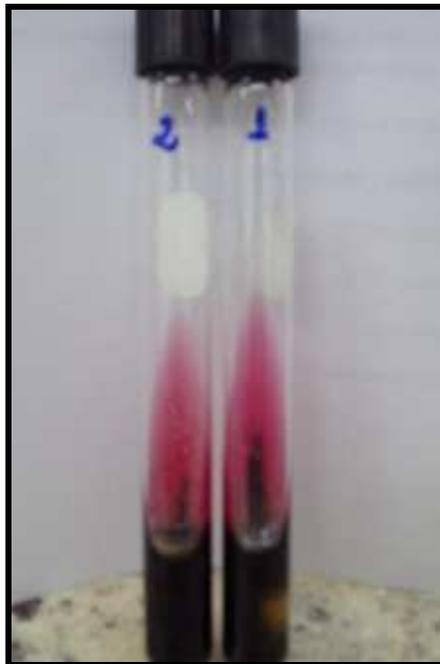
TABELA 12: Análises microbiológicas dos salames da marca F

M A R C A	L O T E R A	A M O R A	MICROORGANISMOS				
			<i>Salmonella</i> spp. em 25g	Coliformes à 45°C (NMP/g)	ECP (LogUFC/g)	ECN (LogUFC/g)	<i>Micrococcus</i> spp. (LogUFC/g)
1	1	-	<3	<1	4,86	0,95	6,04
	2	-	<3	<1	0,95	3,46	6,30
	3	-	<3	<1	4,15	4,15	6,32
	4	-	<3	<1	3,36	2,76	6,15
	5	-	<3	<1	3,20	3,79	6,11
F 2	1	-	<3	<1	6,00	5,42	7,88
	2	-	<3	<1	5,77	5,18	7,40
	3	-	<3	<1	7,88	6,04	7,18
	4	-	<3	<1	5,48	5,65	7,43
	5	-	<3	<1	5,48	4,88	7,30
3	1	-	<3	<1	0,95	1,56	5,38
	2	-	4	<1	0,95	3,11	4,88
	3	-	<3	<1	0,95	1,98	5,81
	4	-	<3	<1	2,51	2,51	5,96
	5	-	<3	<1	1,95	2,43	6,28

#### **4.4.1 Isolamento e Identificação de *Salmonella* spp.**

O crescimento nos meios seletivos diferenciais foi bastante escasso. Mesmo colônias atípicas foram isoladas e inoculadas em meio TSI e LIA, onde também apresentaram resultados atípicos.

Apenas uma unidade amostral do lote 2 da marca D apresentou colônias típicas nos meios XLD e HE que se mostraram como bastonetes Gram negativos. A reação dos isolados nos meios TSI e LIA foi também típico de salmonela (FIGURA 16).



**FIGURA 16:** Crescimento dos isolados em meio TSI.

FONTE: PEREIRA, K. S., 2005e.

Os dois isolados foram, então, submetidos à série bioquímica preliminar IMVC, para a qual se apresentaram como não produtores de indol, metabolismo do tipo ácidos-mistos, não produtores de acetoina e incapacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono, respectivamente. Na seqüência, foram realizados os testes

malonato, dulcitol e urease que foram negativos. A identificação das cepas pelo sistema API<sup>®</sup> 20E (bioMérieux SA) também revelou, com 100% de probabilidade, tratar-se de uma bactéria pertencente ao gênero *Salmonella*; especificamente *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. Entretanto, o teste com antígeno Poli O (PROBAC<sup>®</sup>) foi negativo.

Na dúvida, as cepas foram, então, enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ para identificação. O laudo indicou serem duas cepas de *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* reagente ao antígeno O:39 e sem reatividade aos antígenos H, apesar de apresentarem motilidade.

Diversos trabalhos, europeus, com salames relatam a ausência desse patógeno em salames (SAMELIS et al., 1998; METAXOPOULOS, SAMELIS e PAPADELLI, 2001; DROSINOS et al., 2005).

Quanto à subespécie isolada, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* é o primeiro registro, na literatura, de seu isolamento a partir de salames. No Brasil, o registro de seu isolamento é baixo. Entre 4.581 linhagens analisadas pelo Instituto Adolfo Lutz, isoladas a partir de alimentos implicados em surtos de infecção alimentar, menos de 1% eram pertencentes a essa subespécie (TAVECHIO et al., 2002).

A subespécie encontrada não consta na base de dados do *kit* API<sup>®</sup> 20E (bioMérieux SA), daí sua identificação como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. Além disso, as provas de utilização do malonato e de dulcitol não constam na série bioquímica do *kit*, mas são discriminatórias para essas duas subespécies. *S. enterica* subespécie *houtenae* é negativa para ambos, assim como as duas cepas isoladas (POPOFF, BOCKEMÜHL, GHEESLING, 2004).

#### **4.4.2 Contagem de coliformes termotolerantes**

A quantidade de coliformes à 45°C foi classificada em  $< 3$  e  $\geq 3$  para realização da análise estatística. Os lotes e marcas foram analisados estatisticamente em relação a esta classificação.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os lotes, nem entre as marcas de salames. Portanto, os lotes e as marcas podem ser considerados homogêneos quanto à quantidade de coliformes à 45°C. (APÊNDICE A)

Para contagem de coliformes termotolerantes o tipo do salame não influenciou, já que não houve diferenças entre as marcas tipo Italiano (A, B, C, E e F) e tipo Milano (D).

O número de coliformes encontrado para todos os salames avaliados (TABELAS 7 a 12) esteve bastante abaixo do máximo permitido pela Legislação ( $10^3$  NMP/g), indicando boa qualidade higiênica dos produtos.

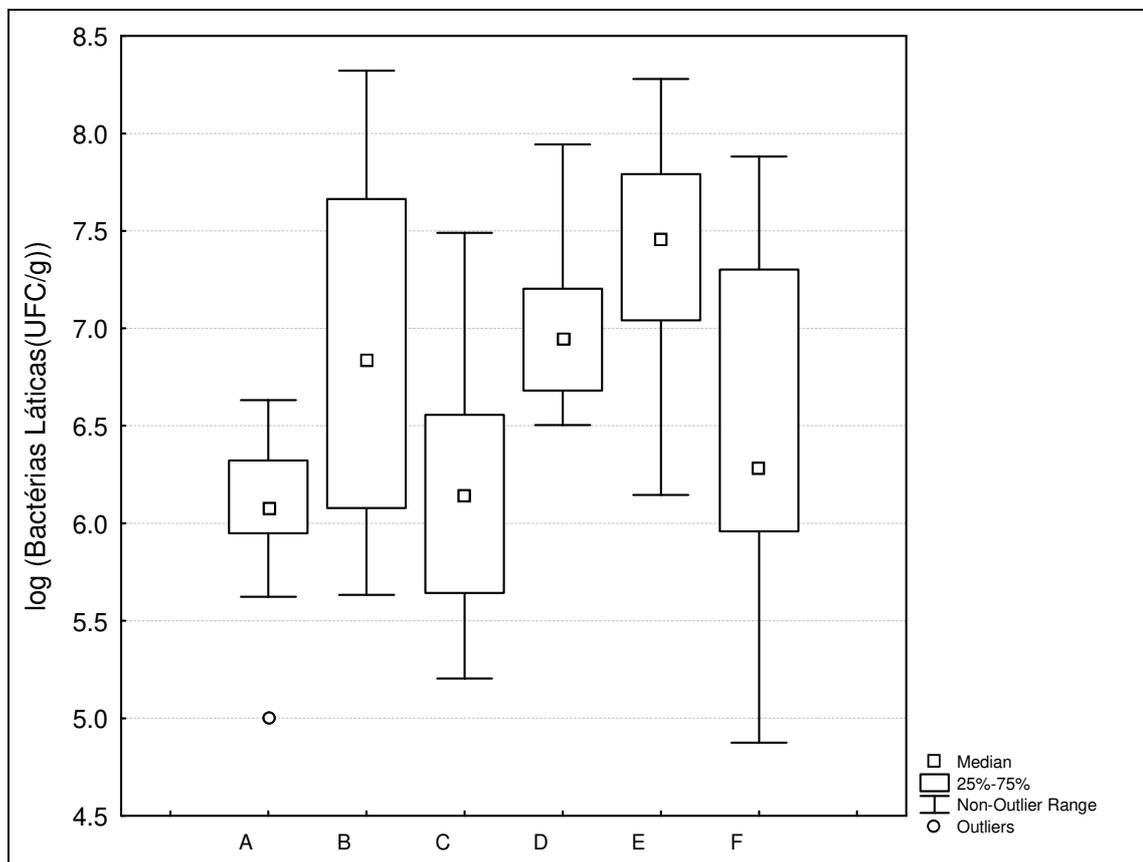
Os resultados encontrados estão em concordância com aqueles já descritos por outros autores que analisaram a presença de enterobactérias em salames. Samelis e colaboradores (1998) analisaram quatro lotes de salames e obtiveram contagens de enterobactérias inferiores a  $10^2$  UFC/g. Já nos trabalhos de Metaxopoulos, Samelis e Papadelli (2001) e Drosinos et al. (2005) a quantidade de enterobactérias foi  $<10$  UFC/g, assemelhando-se muito ao encontrado nesta pesquisa.

Esses resultados são bastante diferentes daqueles encontrados para salames artesanais (MAGNANI et al., 2006; PERAZOLLI e GELINSKI, 2006; VIOTT, STOLBERG e PELISSER, 2006).

#### 4.4.3 Contagem de bactérias lácticas

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), pelo teste ANOVA (TABELA 3), nos valores de contagem de bactérias lácticas (TABELAS 7 a 12) das seis diferentes marcas de salames.

A Figura 17 ilustra a variação nas contagens de bactérias lácticas dos salames de uma mesma marca e entre as diferentes marcas.



**Figura 17:** Variação dos valores de contagem de bactérias lácticas nas seis marcas de salames.

Para a comparação dos valores de contagens das marcas, duas a duas, foi utilizado o Teste de Tukey. (APÊNDICE A).

A análise estatística do parâmetro contagem de bactérias lácticas mostrou que a marca A juntamente com a marca E foram as que mais se diferenciaram das demais.

A marca A mostrou-se diferente de B, D, e E; não diferindo de C e F. Já a marca E mostrou-se diferente de A, C e F e não diferiu de B e D.

A marca B diferiu apenas de A e a marca F diferiu apenas de E.

Novamente, a diferença no tipo de salame não se refletiu no resultado das análises, bem como a vida de prateleira dos produtos (três (3) meses para os salames das marcas A, D e F; quatro (4) meses para os salames das marcas C e E e cinco (5) meses para os salames da marca B).

Os resultados encontrados para bactérias lácticas variaram de acordo com a marca e o lote do salame analisado. Encontrou-se uma variação de  $10^5$  UFC/g a  $10^8$  UFC/g. Estes valores estão, de maneira geral, abaixo daqueles encontrados em estudos sobre microbiota natural de salames, que, para bactérias lácticas, apresentam valores da ordem de  $10^7$  e  $10^8$  UFC/g (SAMELIS et al., 1994, COPPOLA et al., 1998, SAMELIS et al., 1998, COPPOLA et al., 2000; METAXOPOULOS, SAMELIS e PAPAPELLI, 2001; COMI et al., 2005; RANTSIOU et al., 2005).

As maiores contagens de bactérias lácticas, neste trabalho, foram aquelas obtidas para os salames da marca E (maioria de  $10^7$  UFC/g), enquanto os menores níveis destas bactérias foram detectados nos salames da marca A. Nestes últimos, as contagens não excederam  $10^6$  UFC/g. Paradoxalmente, os menores valores de pH foram obtidos dos salames com menores contagens de bactérias lácticas (marca A), enquanto os salames com maiores valores de pH (marca E) foram aqueles com contagens mais elevadas de bactérias lácticas.

Uma explicação para a baixa acidificação do produto, apesar da presença significativa das bactérias lácticas, pode estar no tempo de maturação do produto e tipo de carboidrato adicionado para fermentação por estas bactérias. Sabe-se que a adição de carboidratos complexos ao salame levaria a uma fermentação mais lenta e, portanto, haveria necessidade de um maior tempo de maturação do produto. Caso não se leve

isto em conta, a tendência é a obtenção de um produto final com pH mais elevado (ACTON, DICK e NORRIS, 1977).

Para a marca B, aquela de produtos com maior vida de prateleira, foram encontradas as maiores variações de valores nas contagens de bactérias lácticas,  $10^5$  a  $10^8$  UFC/g

Os salames da marca F surpreenderam pelos níveis de bactérias encontradas ( $10^5$  a  $10^7$  UFC/g), mas sem declaração de uso das culturas “starter” no rótulo de seus salames.

A partir da coloração de Gram para algumas colônias, dos diversos salames analisados, percebeu-se a presença de bactérias do tipo bastonetes Gram positivos não esporulados e cocos Gram positivos catalase negativa. O aspecto das colônias em meio MRS está representado na Figura 18.



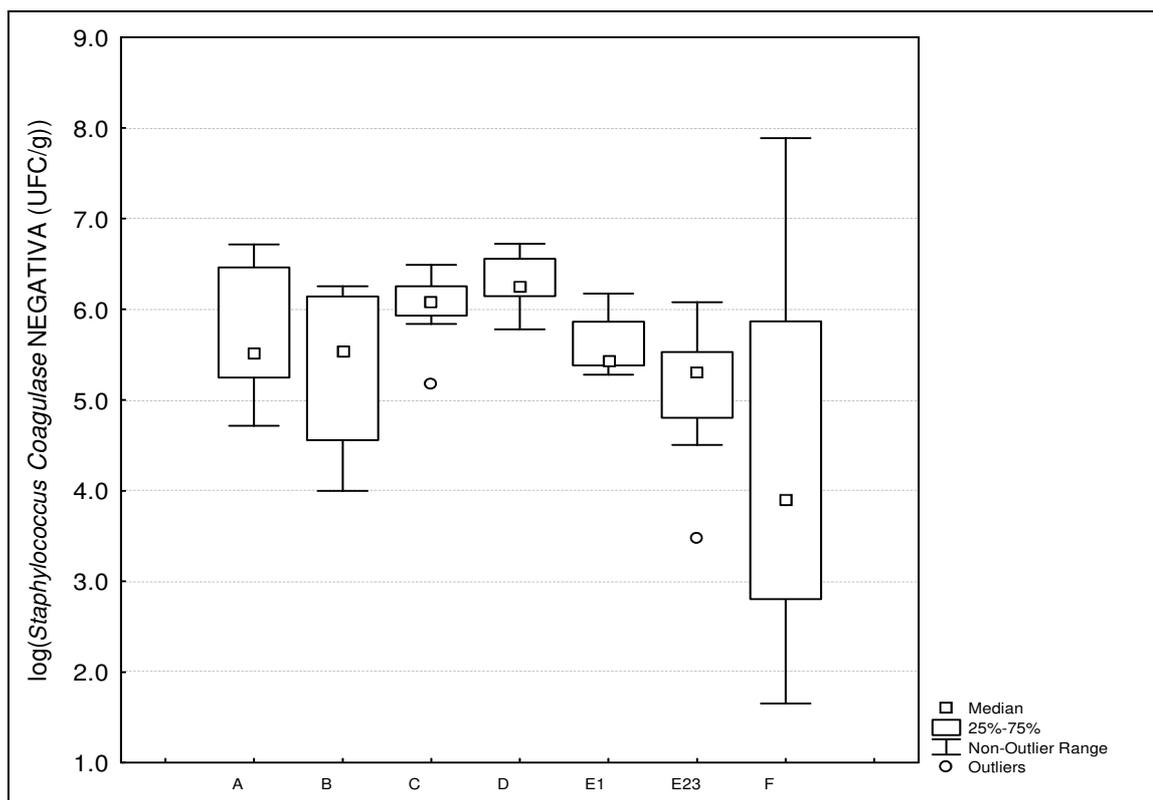
**FIGURA 18:** Crescimento das bactérias lácticas em meio MRS.

FONTE: PEREIRA, K. S., 2005f.

#### 4.4.4 Contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e *Micrococcus* spp.

Em nenhuma amostra de salame analisado foi detectada a presença de ECP. Apesar da dificuldade para interpretação do teste da coagulase em tubo, as culturas foram submetidas a testes adicionais como o da DNase e DNase termoresistente e repetições do teste de coagulase para serem confirmadas como ECN.

As variações nas contagens de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa para as marcas A, B, C, D e F e para E1 e E23 estão representadas na Figura 19.



**Figura 19:** Variação dos valores de contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa nas seis marcas de salames.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Kruskal Wallis (TABELA 4), nos valores de contagem de ECN das seis diferentes marcas/ categorias de salames.

A análise estatística das sete categorias, duas a duas, pelo teste de Mann-Whitney (APÊNDICE A) mostrou que as categorias E1 e E23 diferiram, também, na comparação com algumas das marcas para o parâmetro contagem de ECN.

A categoria E23 diferiu estatisticamente das marcas A e C, ao contrário de E1. Ambas (E1 e E23) diferiram estatisticamente de D, mas não de B e F.

As marcas C e D apresentaram as maiores médias de contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (TABELA 4).

As elevadas contagens de ECN encontradas nos salames da marca C estão em concordância com os elevados valores médios de pH encontrados nos salames da marca. Seguindo este raciocínio, seria de se esperar as menores contagens de ECN a partir dos salames da marca A (TABELA 3). Entretanto, isto não foi verificado, a marca A diferiu apenas de E23 e F, esta última a que apresentou as menores médias de contagem de ECN.

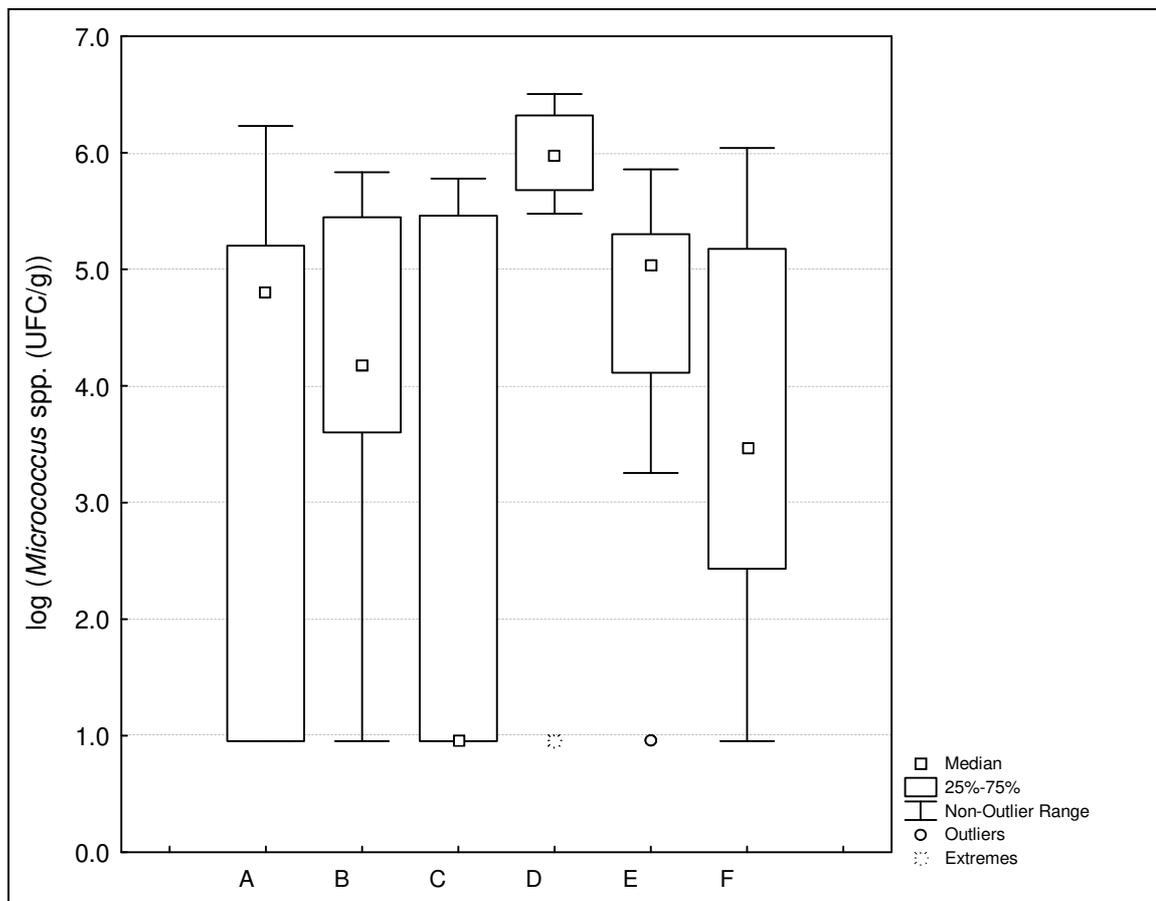
A marca B, com salames de maior vida de prateleira, diferiu estatisticamente apenas das marcas C e D, indicando que, assim como o tipo de salame, o prazo de validade diferenciado dos produtos não interferiu nas contagens de ECN.

A variação nas contagens de ECN foi de  $10^3 - 10^7$  UFC/g nas diferentes amostras. Tais resultados assemelham-se aos de Blaiotta e colaboradores (2004) ao estudarem lingüiças fermentadas típicas da região Sul da Itália, inclusive industrializadas, cujas variações nas populações de ECN foram de  $10^4$  e  $10^8$  UFC/g. No trabalho citado, uma amostra de salame tipo Milano foi analisada e a contagem de ECN no produto foi da ordem de  $10^6$  UFC/g e o valor de pH igual a 5,6.

A análise de ECN em amostras de “Salami de Senise”, uma lingüiça fermentada típica da região Sul da Itália, revelou contagens da ordem de  $10^4$  UFC/g, semelhante ao encontrado em nosso estudo, e valores de pH e  $A_w$  iguais a 4,6 e 0,82, respectivamente (BARUZZI et al., 2006).

A avaliação do parâmetro contagem de *Micrococcus* spp. demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Kruskal Wallis (TABELA 3), nos valores das seis diferentes marcas de salames.

A Figura 20 ilustra a variação das contagens de *Micrococcus* spp. dos salames de uma mesma marca e entre as diferentes marcas.



**Figura 20:** Variação dos valores de contagem de *Micrococcus* spp encontrados nas seis marcas de salames.

As marcas foram, então, comparadas duas a duas pelo Teste de Mann-Whitney (APÊNDICE A).

As maiores contagens de micrococos foram obtidas a partir dos salames da marca D e esta marca mostrou-se diferente das outras cinco marcas. Já as marcas A,

B, C, E, e F não diferem estatisticamente entre si. Para este parâmetro é interessante notar a diferenciação dos salames tipo Milano.

O número de estafilococos coagulase negativa e micrococcos mostrou-se elevado em todos os produtos, o que condiz com a adição de culturas “starter” contendo tais grupos de microrganismos. Foi interessante notar que os salames da marca F, que não declara uso de culturas “starter” no rótulo, apresentou elevados níveis destes mesmos microrganismos.

As médias das contagens de ECN foram superiores às de *Micrococcus* spp. para os salames de todas as marcas (TABELAS 3 e 4). A maior diferença foi encontrada para os salames da marca C e a menor para os salames da marca F.

Diversos trabalhos têm demonstrado essa superioridade nas contagens de *Staphylococcus* spp.

No começo da década de 90, o trabalho de Kotezidou (1992) com *Basturma* (produto cárneo de umidade intermediária e típico de países da região mediterrânea) demonstrou que entre 126 linhagens isoladas 92,5% eram pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Das 140 linhagens isoladas a partir de salame artesanal grego, 80% eram *Staphylococcus* de acordo com Samelis e colaboradores (1994).

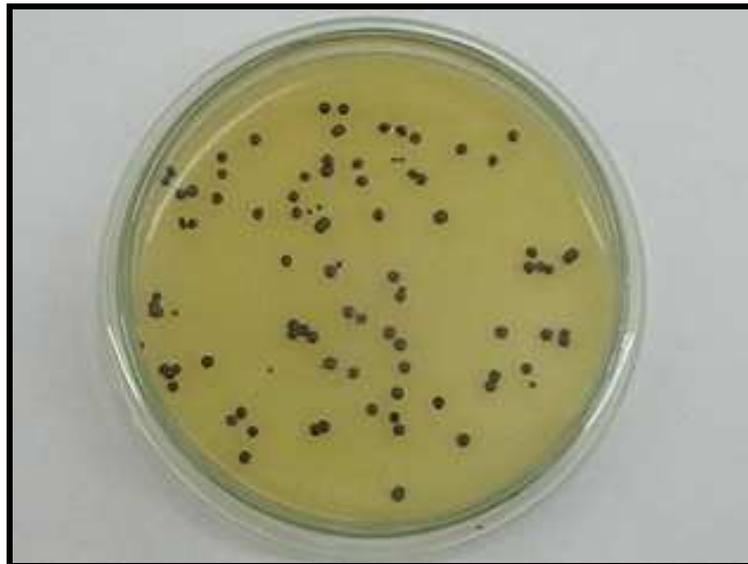
A partir de salames artesanais italianos 136 linhagens foram selecionadas e 135 classificadas como *Staphylococcus* de acordo com Coppola e colaboradores (2000).

Já em 2002, Papamanoli e colaboradores (2002) isolaram 91% de estafilococos a partir de lingüiças fermentadas industriais gregas, mas sem uso de cultivos iniciadores.

#### **4.4.5 Isolamento de microrganismos de meio Baird-Parker**

Não foi observado crescimento de colônias típicas de estafilococos coagulase positiva. As colônias que se desenvolveram em meio BP eram negras, opacas, pequenas e poucas vezes circundadas por halo de lecitinase, evidenciado por uma zona translúcida no meio de cultura ao redor da colônia. A formação do halo é resultado da atividade proteolítica e lipolítica das enzimas estafilocócicas sobre os componentes da gema de ovo. Também não foram verificadas diferenças consideráveis na morfologia das mesmas.

A Figura 21 ilustra o tipo de colônias isoladas a partir de meio BP para realização deste trabalho.



**FIGURA 21:** Crescimento de colônias atípicas (BP).

FONTE: PEREIRA, K. S., 2005g.

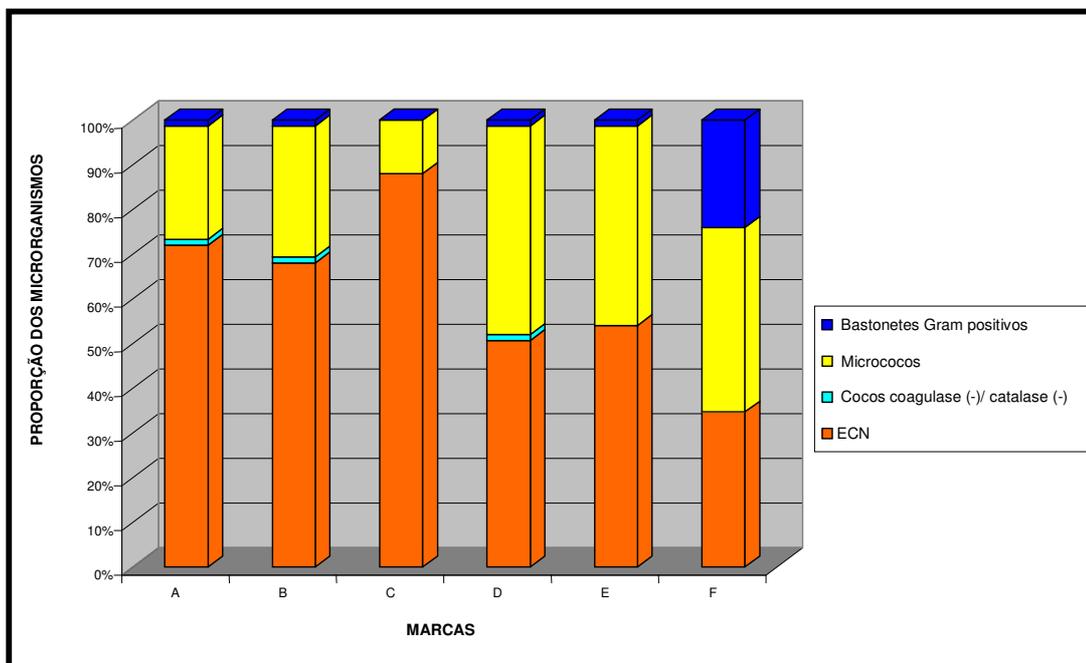
De cada marca de salame um total de 75 isolados foi obtido, devido ao isolamento de cinco colônias para cada unidade amostral perfazendo 15 por amostra de salame. Exceção para a marca E (74 microrganismos).

A caracterização prévia dos isolados consistiu de: coloração de Gram, teste de catalase e teste de sensibilidade/ resistência à furazolidona.

O número total e tipos de microrganismos isolados para cada marca de salame estão indicados na Tabela 13 e proporção entre eles estão representados na Figura 22.

**TABELA 13:** Quantidade e tipos de microrganismos isolados de cada marca de salame.

MARCA	Nº de ECN	Nº. de cocos coagulase (-)/ catalase (-)	Nº de <i>Micrococcus</i> sp.	Nº de bastonetes Gram positivos
A	54	1	19	1
B	51	1	22	1
C	66	0	9	0
D	38	1	35	1
E	40	0	33	1
F	26	0	31	18



**FIGURA 22:** Distribuição (%) dos microrganismos de acordo com a marca de salame analisada.

O meio BP foi escolhido para contagem de ECN em detrimento do meio *Mannitol Salt Agar* (MSA) que é o mais usado para contagem de *Micrococcaceae* nos trabalhos com fermentados cárneos (COPPOLA et al., 2000; PAPAMANOLI et al., 2002; SAMELIS et al., 1998). Isso porque, o intuito deste trabalho era o isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa. Blaiotta e colaboradores (2004) relataram o crescimento de *Bacillus* e *Lactobacillus* halófilos em MSA, dando preferência ao isolamento de ECN a partir de meio BP.

Em algumas marcas foram encontrados bastonetes esporulados Gram positivos, com características de estafilococos, isolados a partir de BP. Isso indica uma contaminação deste produto e a limitada seletividade do meio.

A limitação do meio BP já foi relatada em pesquisa com queijo Minas no Brasil, dando ênfase para o crescimento de leveduras com aparência de *S. aureus* (NASCIMENTO, CORBIA e NASCIMENTO, 2001).

Fica, neste trabalho, relatada a problemática da seletividade do meio BP. Houve o crescimento de *Bacillus* e de *Micrococcus* quando da análise dos salames. Fato este bastante relevante para posteriores estudos de *Staphylococcus* em alimentos, já que apenas pela morfologia e características das colônias em meio BP, coloração de Gram e teste de catalase não é possível se fazer a distinção entre *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

#### 4.5 ANÁLISE DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS NAS AMOSTRAS DE SALAMES

O resultado obtido para análise de enterotoxinas nas 90 amostras de salames está representado na tabela 14.

**TABELA 14:** Resultados das análises de EEs nas amostras de salames.

MARCA	A			B			C			D			E			F			
Lote	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amostra																			
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

(+) – indica presença de EE na amostra;

(-) – indica ausência de EE na amostra.

Das 90 amostras de salames avaliadas, apenas uma apresentou-se positiva para a presença de enterotoxina estafilocócica: a amostra de número cinco da marca F, pertencente ao primeiro lote avaliado.

É interessante notar que apesar de detectada a presença de enterotoxina na amostra, a mesma apresentou ausência de estafilococos coagulase positiva e de ECN produtores de enterotoxina. Podem ser aventadas duas explicações para este fato.

A primeira explicação para o ocorrido deve-se à própria limitação da metodologia de contagem de ECP. Isto porque não há como se trabalhar com todas as colônias que cresceram em meio BP. Como já citado, é preconizada a seleção de cinco colônias para realização dos testes adicionais. Deste modo, a cepa enterotoxigênica pode não ter sido uma das selecionadas e, portanto, não foi cultivada para produção de

enterotoxinas, nem mesmo identificada. Além disso a cepa enterotoxigênica pode ter sido responsável pela produção da EE no início do processamento do salame, ou mesmo na matéria-prima, mas não ter resistido ao longo do período de processamento e armazenamento.

A segunda hipótese seria um resultado falso positivo pelo teste Vidas SET II<sup>®</sup>. Mas, James e colaboradores (2006) ao avaliarem o desempenho do kit Vidas SET II<sup>®</sup> para detecção de EEs em alimentos experimentalmente inoculados detectaram apenas resultados falso negativos, que ocorreram em consequência do protocolo de extração para produtos lácteos recomendado pelo fabricante.

Os resultados falso-positivos em testes imunológicos, para detecção de EEs em alimentos, podem ocorrer devido à presença de enzimas, como a fosfatase alcalina e as peroxidases, e outras proteínas, como a proteína A de algumas espécies de estafilococos, na matriz alimentícia. Entretanto, o estudo de Vernozy-Rozand e colaboradores (2004) analisando 1980 amostras de alimentos, entre eles salames, inócuos e experimentalmente inoculados com EEs não detectou nenhum resultado falso positivo utilizando-se do *kit* Vidas SET II<sup>®</sup> para análise desses alimentos.

No folheto informativo que acompanha o *kit* Vidas SET II<sup>®</sup> está relatado um (1) resultado falso positivo para carne de rim, entre as 280 análises de diversos tipos de alimentos: conservas, alimentos líquidos, produtos lácteos, alimentos desidratados, produtos cárneos, etc.

#### 4.6 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS PELOS *Staphylococcus* sp. COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE SALAMES

Os cocos isolados que se apresentaram como Gram positivos, catalase positiva, coagulase negativa e sensíveis à furazolidona foram cultivados para verificação da produção de enterotoxinas.

A Tabela 15 apresenta o número de ECN testadas e os resultados da produção de EEs para cada marca de salames.

**TABELA 15:** Resultados da produção de EEs pelos ECN.

MARCA	Nº. de linhagens testadas	Produção de EE pelas linhagens	
		POSITIVA	NEGATIVA
A	53	0	53
B	51	0	51
C	66	0	66
D	36	0	36
E	34	0	34
F	26	0	26

Para algumas marcas, pode-se observar uma diferença entre o número de ECN isolados (TABELA 13) e o número de ECN testados (TABELA 15). Isso ocorreu devido à perda de alguns isolados devido à contaminação por fungos ou mesmo morte durante o armazenamento (em tubos com ágar BHI sob temperatura de 4°C) até que pudessem ser realizados os cultivos para produção de enterotoxinas.

Nenhum dos 266 ECN isolados demonstrou potencial enterotoxigênico.

Vale ressaltar, que o cultivo das ECN para produção de enterotoxina e posterior detecção era sempre acompanhado do cultivo de uma cepa controle positivo (*S. aureus* S-6) e uma cepa controle negativo (*Micrococcus luteus* ATCC4698).

O resultado da leitura das amostras pelo aparelho mini VIDAS<sup>®</sup> (bioMérieux SA) é dado apenas como positivo ou negativo, não sendo possível a quantificação quando da presença de toxina na amostra testada.

As leituras de RFV dos controles positivos dos *kits* utilizados situaram-se ao redor de 4.000 e o de VT ao redor de 0,98, lembrando que para ser considerado como positivo o VT da amostra deve ser maior ou igual a 0,13. O RFV dos cultivos de *S. aureus* S-6 situou-se ao redor de 8.000 e para VT foram verificados valores médios de 2,33. Já os valores médios de RFV registrados para os cultivos de ECN foram ao redor de 10,0, com máximo de 36,0, e os valores de VT iguais a 0,00; semelhantes aos valores dos cultivos de *M. luteus*.

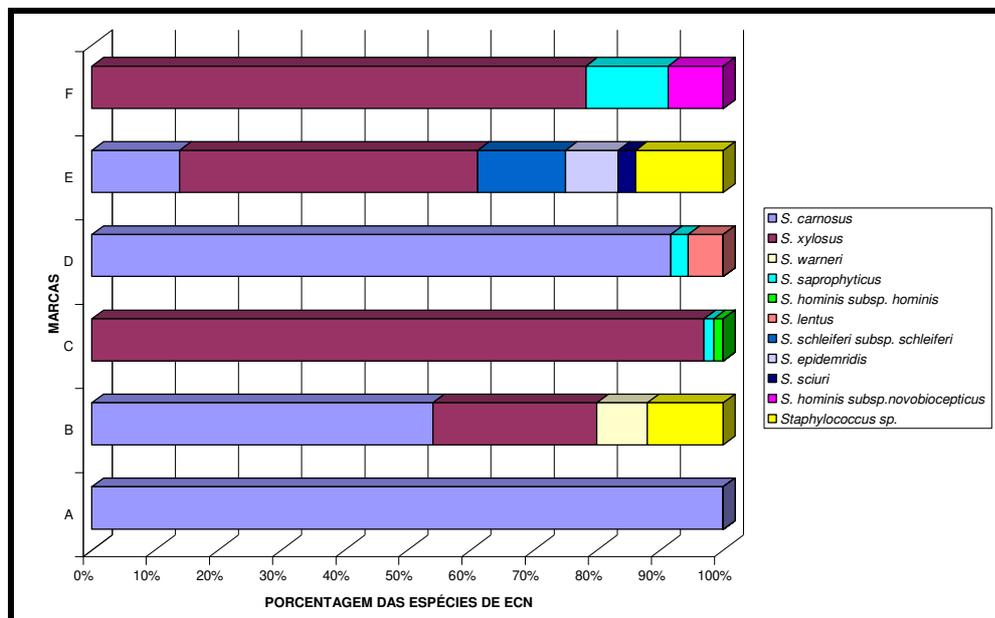
#### **4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS *Staphylococcus* spp. COAGULASE NEGATIVA**

Nem todos os isolados de ECN cultivados para a produção de enterotoxinas puderam ser identificados. Isso se deveu ao fato de a identificação não ter sido realizada concomitantemente ao cultivo para produção de enterotoxinas; o que levou à contaminação e, na maior parte das vezes, morte dos isolados. Essa lacuna temporal ocorreu, principalmente, devido à falta, no país, de alguns carboidratos e reagentes necessários à análise.

As espécies identificadas para cada marca de salame estão listadas na Tabela 15. A Figura 15 ilustra as proporções entre as diferentes espécies em cada marca de salame.

**TABELA 16:** Número de ECN identificados e espécies para cada uma das seis marcas de salames

MARCA	Nº. DE ISOLADOS		ESPÉCIES IDENTIFICADAS (nº.)
	Submetidos à identificação	IDENTIFICADOS	
A	52	52	<i>S. carnosus</i> (52)
B	50	44	<i>S. carnosus</i> (27), <i>S. xylosus</i> (13), <i>S. warneri</i> (4), <i>Staphylococcus</i> sp. (6)
C	66	66	<i>S. xylosus</i> (64), <i>S. saprophyticus</i> (1), <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (1)
D	36	36	<i>S. carnosus</i> (33), <i>S. lentus</i> (2), <i>S. saprophyticus</i> (1)
E	34	31	<i>S. xylosus</i> (17), <i>S. carnosus</i> (5), <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> (5), <i>S. epidermidis</i> (3), <i>S. sciuri</i> (1), <i>Staphylococcus</i> sp. (3)
F	23	23	<i>S. xylosus</i> (18), <i>S. saprophyticus</i> (3), <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiocepticus</i> (2)



**FIGURA 23:** Proporções entre as espécies de ECN de acordo com a marca de salame analisada.

Do total de isolados submetidos à identificação, nem todos puderam ser identificados, devido a resultados pouco conclusivos nos testes bioquímicos utilizados, sendo classificados como *Staphylococcus* sp. O sistema API Staph<sup>®</sup> mostrou-se bastante eficiente para identificação das espécies *S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. schleiferi*. Entretanto, possui uma base com número de espécies restrito, devido à diversidade de espécies de estafilococos já descritas, havendo necessidade de recorrer a testes bioquímicos tradicionais para uma melhor e mais confiável caracterização da espécie. Esta limitação encontrada é corroborada por outros estudos (ALEXOPOULOU et al., 2006; CUNHA, SINZATO e CHALITA, 2004; IACUMIM et al., 2006)

A identificação dos ECN revelou uma concordância entre as espécies encontradas em salames brasileiros e aquelas isoladas de salames artesanais europeus.

É interessante notar que os salames Brasileiros são industrializados e produzidos com utilização de culturas iniciadoras (a marca F não declara o uso no rótulo, mas nada se pode afirmar), ao contrário dos produtos europeus.

Entre as espécies mais freqüentemente isoladas, elas diferiram de acordo com a marca de salame analisada. Nas marcas A, B e D a espécie mais isolada foi *S. carnosus*; enquanto nas marcas C, E e F *S. xylosus* foi mais freqüente. Tal resultado faz sentido, e era esperado, já que essas são as espécies de estafilococos presentes em culturas iniciadoras comercializadas no Brasil.

*S. xylosus* foi a espécie de ECN mais isolada a partir de lingüiças fermentadas comercializadas e produzidas na Europa (BLAIOTTA et al., 2004; COPPOLA et al., 2000; MARTÍN et al., 2006).

A espécie *S. carnosus* tem sido isolada de produtos cárneos fermentados, mas em números pouco significativos. Em alguns estudos nem consta registro de seu isolamento (BARUZZI et al., 2006; DROSINOS et al., 2005; SAMELIS et al., 1998).

O isolamento das espécies *S. lentus* (PAPAMANOLI et al., 2002), *S. sciuri* (PAPAMANOLI et al., 2002), *S. saprophyticus* (SAMELIS et al., 1998), *S. warneri* (IACUMIN et al., 2006; PAPAMANOLI et al., 2002), *S. hominis* (PAPAMANOLI et al.,

2002), e *S. epidermidis* (IACUMIN et al., 2006) a partir de embutidos fermentados já fora relatada.

Apesar do uso de culturas *starter*, a microbiota de ECN não foi padrão entre os salames.

Outro dado relevante foi o isolamento da espécie *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* cujo isolamento a partir de salames não consta em nenhuma das diversas literaturas consultadas. Estudos sugerem que *S. schleiferi* seja habitante da microbiota axilar humana e seu potencial de virulência é considerado maior do que o de outras espécies de ECN (CALVO et al., 2000). No Brasil há registro de isolamento da espécie *S. schleiferi* a partir de leite cru (LAMAITA et al., 2005; STAMFORD et al., 2006). O importante é salientar que sua presença no alimento deve-se à manipulação inadequada do mesmo e condições higiênicas inadequadas.

#### Bastonetes Gram positivos

Dos 22 bastonetes Gram positivos e catalase positiva apenas 18 puderam ser recuperados após o período de armazenagem (em ágar sob refrigeração). Desses, 14 eram oriundos de salames da marca F e os quatro restantes foram (cada um) isolados de amostras da marca A, B, D e E.

O procedimento para identificação consistiu das seguintes análises:

- ✓ Coloração de Gram e coloração de esporos (APHA, 2001);
- ✓ Teste de catalase (APHA, 2001);
- ✓ Inoculação em meios *Manitol Egg Yolk Polimyxin* (MYP) (BAM, 2001);
- ✓ Teste de motilidade (BAM, 2001);
- ✓ Crescimento em anaerobiose;
- ✓ Provas bioquímicas miniaturizadas dos sistemas API<sup>®</sup> 50 CHB e API<sup>®</sup> 20E (bioMérieux SA).

Os resultados desses testes permitiram apenas a identificação da cepa isolada do salame da marca A. Tratava-se de um *Bacillus pumillus*, de acordo com a base de dados dos sistemas API<sup>®</sup> 50 CHB e API<sup>®</sup> 20E (bioMérieux SA) e a literatura específica (LOGAN e TURNBULL, 2001).

Os demais isolados não cresceram nas galerias do sistema API<sup>®</sup>, sendo, assim, identificados apenas como “*Bacillus non reactive*”. No “Manual of Clinical Microbiology” (LOGAN e TURNBULL, 2001) há descrição de espécies *nonreactive* aos testes bioquímicos convencionais (miniaturizados ou não) para identificação de *Bacillus*: *B. sphaericus* e *B. badius*.

O isolamento de *Bacillus* spp. a partir de salames está bem descrito, ainda que pouco, na literatura.

Em 1996, um trabalho realizado com lingüiças fermentadas espanholas descreve o isolamento de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. circulans*, e atenta para a dificuldade em trabalhar-se com a identificação desse grupo de microrganismos (ENCINAS et al., 1996).

Matarante e colaboradores (2004) isolaram *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* de salames europeus industriais e artesanais.

É interessante notar a ausência de *B. cereus*, nesses trabalhos e nos salames industriais brasileiros, apesar da presença de outras espécies do gênero.

Baruzzi e colaboradores (2006) consideram que algumas espécies de *Bacillus* estão naturalmente associadas a salames artesanais, assim como espécies de *Staphylococcus* e *Micrococcus*. Em especial, ressaltam a importância de *B. subtilis* na produção do *Salami de Senise* (um tipo de lingüiça fermentada do Sul da Itália).

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As espécies de estafilococos coagulase negativa isoladas a partir de salames industrializados e fabricados no Brasil não apresentaram potencial enterotoxigênico, não sendo, portanto, um potencial perigo para o consumidor desses produtos.

A partir disso, muito terá que ser estudado sobre metodologias para análise de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas em alimentos. Isso porque, é sabido que algumas espécies de ECN possuem capacidade de produção de enterotoxinas, e diante disso alguns estudiosos defendem a análise/ contagem de *Staphylococcus* spp. em alimentos como indicador de risco microbiológico. Por outro lado, estudos como este vêm demonstrar que tais espécies podem, também, não serem produtoras de enterotoxinas e que, deste modo, a contagem de *Staphylococcus* spp. em alimentos poderia superestimar o risco de intoxicação estafilocócica associada a determinado alimento (como salames, por exemplo).

Métodos de análise genética de microrganismos e de detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos necessitam de mais estudos e, principalmente, difusão do meio acadêmico para os serviços de saúde, vigilância sanitária e controle de qualidade das indústrias. Somente assim poderão ser possíveis os avanços na qualidade dos produtos e de mecanismos fiscais para garantir segurança de alimentos no que tange à contaminação por enterotoxinas estafilocócicas.

Os salames industrializados brasileiros apresentam, de maneira geral, uma higiênico-sanitária satisfatória, mas a presença de *Salmonella* demonstra a difusão e importância deste patógeno na atualidade.

## **6 CONCLUSÃO**

As principais conclusões a partir da realização deste trabalho podem ser pontuadas como sendo:

- ✓ As linhagens de ECN isoladas de amostras de salames industrializados não apresentaram potencial enterotoxigênico;
- ✓ A maior frequência de *S. xylosus* e *S. carnosus* nos produtos está em concordância com a utilização de culturas iniciadoras, já que estas são as duas espécies contidas em cultivos *starter* comerciais;
- ✓ Os salames analisados não possuíam valores de pH tão baixos quanto aqueles preconizados na literatura brasileira específica sobre o assunto;
- ✓ Apesar de industrializados, não há uma padronização nas características microbiológicas e de pH dos salames;
- ✓ Os testes bioquímicos, ou seja, a caracterização fenotípica para identificação de ECN é bastante laboriosa e às vezes apresenta resultados pouco conclusivos;
- ✓ A análise de *Staphylococcus* em alimentos pela utilização de meio BP requer cautela, já que outros grupos de microrganismos conseguem crescer no meio de cultura e tão bem quanto os estafilococos;
- ✓ A composição do meio BP, conforme preconizado para análise de ECP, permitiu um bom crescimento de ECN, ao contrário das descrições constantes nos manuais dos fabricantes;
- ✓ A análise de estafilococos enterotoxigênicos em alimentos deve ser acompanhada da análise de enterotoxinas estafilocócicas para maior confiabilidade dos resultados e, conseqüentemente, segurança do consumidor.

## **7 BIBLIOGRAFIA COSULTADA**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR: 6023:** Informação e Documentação - Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR: 14724:** Informação e Documentação – Trabalhos Acadêmicos – Apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

CRUZ, A. M. da C.; MENDES, M. T. R. **Trabalhos acadêmicos, dissertações de teses: estrutura e apresentação (NBR 14724/2002)**. 2ª ed. Niterói: Intertext, 2004, p.134.

FILHO, U. D. **Introdução à Bioestatística**. 9ª reimpressão. São Paulo: Elsevier, 2003, p. 158.

## 8 REFERÊNCIAS

ACTON, J. C.; DICK, R. L.; NORRIS, E. L. Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 1, p. 174–178, 1977.

ALEXOPOULOU, K. et al. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase – negative staphylococci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 450 – 454, 2006.

ANDREWS, W. H. et al. Salmonella. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D. C., 2001, cap. 37, p. 357-380.

ARKOUDELOS, J. S.; NYCHAS, G. J. E.; SAMARAS, F. The occurrences of Staphylococci on Greek fermented sausages. **Fleischwirtschaft International**, n. 4, p. 25-28, 1998.

AYMERICH, T. et al. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non-pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4583–4594, 2003.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL ONLINE (BAM). Página desenvolvida e mantida pelo Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN), centro ligado ao Food and Drug Administration (FDA), 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/>. Acesso em: 20 de julho de 2006.

BACUS, J. N. Fermented poultry and meat products. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Advances in meat research: Meat and poultry microbiology**. 1<sup>a</sup> ed. Westport Connecticut: AVI Publishing Company, 1986. v. 2, cap. 4, p.123-164.

BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology – Symposium Supplement**, v. 69, p. 1S-8S, 1990.

BAKER, M. D.; ACHARYA, K. R. Superantigens: structure-function relationships. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 7-8, p.529-537, 2004.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray, P. R. et al. (ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, Washington: American Society Microbiology, 2003, p. 384-404.

BAREBER, L. E.; DEIBEL, R.H. Effect of pH and Oxygen Tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 891-898, 1972.

BARUZZI, F. et al. Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. **Meat Science**, v. 72, n. 2, p. 262-269, 2006.

BENNETT, R. W. Atypical Toxigenic *Staphylococcus* and Non-*Staphylococcus aureus* Species on the Horizon? An Update. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1123-1126, 1996.

BENNETT, R. W.; MONDAY, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: MILLIOTIS, M. D.; BIER, J., W. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003, cap. 4, p. 41-59.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal Intoxication in Mass Feeding. In: TU, A. T. **Food Poisoning: Handbook of Natural Toxins**. 1<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992, v. 7, cap. 2, p. 25-47.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1989, cap. 11, p. 464-513.

BERIAIN, M. J.; PEÑA, M. P.; BELLO, J. A study of the chemical components which characterize Spanish saucisson. **Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p.31-37, 1993.

BIOLAB-MÉRIEUX. **Manual Mini VIDAS**. Jacarepaguá: Design gráfico da Crazy World Design, [s.d.]. 69p.

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

BORGES M. F. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 362-64, 1999.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997, publicado no DOU de 2 de julho de 1998. **Diário Oficial** (da União), Brasília 2 de janeiro de 2001. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01.rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.htm) . Acesso em: 6 ago. 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Instrução Normativa nº22, de 31 de julho de 2000, Anexo V. Dispõe sobre o regulamento técnico de identidade e qualidade de salame, publicado no DOU de 3 de agosto de 2000. **Diário Oficial** (da União), Brasília, seção 1, p.15-28, 3 de agosto de 2000. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm22\\_2000.htm](http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm22_2000.htm) . Acesso em: 5 fev. 2002.

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of Food-Borne Gastroenteritis Due to a Coagulase-Negative Enterotoxin-Producing Staphylococcus. **The New England Journal of Medicine**, v. 284, n. 10, p.541-543, 1971.

CALVO, J. et al. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification of this Staphylococcus species by an automated bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 10, p. 3887-3889, 2000.

CARMO, L. S. do 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.

CARMO, L. S. et al. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004.

CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W. Culture Medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. **Journal of Bacteriology**, v. 86, n. 1, p. 18-23, 1963.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). An Unusual Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Associated with Fermented Salami – United States. **Veterinary Public Health Notes**, p. 1-2, abril de 1980.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to commercially distribute dry-cured salami – Washington and California, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, n. 9, p. 157-160, 1995.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Gastroenteritis associated with Genoa salami – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 20, n. 29, p. 261, 266, 1971b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Gastroenteritis attributed to Hormel San Remo Stick salami - Maryland. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 20, n. 40, p. 370, 1971c.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Staphylococcal food poisoning associated with Italian dry salami - California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 24, n. 44, p. 374, 379, 1975.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Staphylococcal food poisoning associated with Genoa and hard salami – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 28, p. 179-180, 1979.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Staphylococcal gastroenteritis associated with salami – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 20, n. 28, p. 253, 258, 1971a.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 1993-1997, publicado no **Morbidity and Mortality Weekly Report** em 17 de março de 2000. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pub/Publications/mmwr/ss/ss4901.pdf>. Acesso em: 15 maio 2002.

CHOU, C. C.; CHEN, L. F. Enterotoxin Production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a Coagulase-Negative strain. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 8, p. 923-927, 1997.

COMI, G. et al. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 381-392, 2005.

- COPPOLA R. et al. Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 347-359, 1998.
- COPPOLA, S. et al. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. **Meat Science**, v. 56, n. 4, p. 321-329, 2000.
- CRASS, B. A.; BERGDOLL, M. S. Involvement of Coagulase-Negative Staphylococci in Toxic Shock Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 43-45, 1986.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.
- CUNHA, M. L. R. S.; SINZATO, Y. K.; CHALITA, L. V. A. S. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 855-860, 2004.
- DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.1, p.136-140, 2001.
- DACK, G. M. *Staphylococcus* Food Poisoning. In: DACK, G. M. **Food Poisoning**. Chicago: The University of Chicago Press, 1943, cap. V.
- DESMARCHELIER, P. M. et al. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 221-229, 1999.
- DEVRIESE, L. A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1569 – 1573, 2005.
- DROSINOS, E. H. et al. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 307-317, 2005.

- ENCINAS, J. P. et al. Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. **Meat Science**, v. 42, n. 2, p.127-131, 1996.
- ENTIS, P. Rapid Methods for Detection, Identification and Enumeration. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D. C., 2001, cap. 10, p. 89 - 126.
- 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.
- FLORES, J.; BERMELL, S. Dry-cured sausages: Factors influencing souring and their consequences. **Fleischwirtschaft International**, n. 1, p. 30-34, 1996.
- FORSYTHE, S.J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 1<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, cap. 5, p. 155-204.
- FRANCIS, F. J. Pigmentos y otros colorantes. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2<sup>a</sup> Ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993, cap. 8, p. 615-657.
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>a</sup> ed., New York, Berlin: Springer-Verlag, 2001, vol. 1, p. 119–166.
- HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-Producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D. C., 2001, cap. 19, p. 201 - 215.
- HAMMES, W. P.; KNAUF, H. J. Starters in the processing of meat products. **Meat Science**, v. 36, n. 1/2, p.155-168, 1994.
- HAYNES, W. M. C.; HUCKER, G. J. A review of *Micrococcus* enterotoxin food poisoning. **Food Research**, v. 11, n. 4, p. 281-297, 1946.

HOFFMANN L. F., GARCIA-CRUZ H. C., VITURIM M. T.: Estudo higiênico – sanitário preliminar de amostras de salame. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 42 – 44, 1997.

HOLT, J. G. et al. Groups within the four major categories of bacteria. *In*: HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ª ed., 1994, Baltimore: Williams & Wilkins, cap. 5 – Group 17, p. 527-558.

IACUMIN, L. et al. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented sausages. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 480 – 486, 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos 1 – Técnicas de análisis microbiológicas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1983, 431p.

JAMES, I. A. F. Evaluation of the VIDAS Staph Enterotoxin II (SET2) kit for detection of staphylococcal enterotoxins in food. *In*: FOOD MICRO, 20, 2006, Bologna. **Food safety and food biotechnology: diversity and global impact**. Bologna, 2006. p. 313. 1 CD ROM.

JAY, J. M. A Review of Recent Taxonomic Changes in Seven Genera of Bacteria Commonly Found in Foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 7, p.1304 -1309, 2003.

JAY, J. M. Gastreenterite Estafilocócica. *In*: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed., 2005, Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p.471-489.

JORGENSEN, H. J. et al. Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* Strains from Norwegian Bulk Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12. p. 8352-8361, 2005.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus*. *In*: SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, v. 2, Seção 12, p.1013-1019.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D. C., 2001, cap. 8, p. 69 - 82.

KOTZEKIDOU, P. Identification of *Staphylococci* and *Micrococci* isolated from an intermediate moisture meat product. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 249-251, 1992.

LAMAITA, H. C. et al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702 – 709, 2005.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D. C., 2001, cap. 39, p. 387 - 403.

LEYER, G. J.; WANG L. L.; JOHNSON, E. A. Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 Increases Survival in Acidic Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3752 – 3755, 1995.

LI, F. C.; CHENG, C. C. Growth and enterotoxins production by a coagulase-negative *Staphylococcus* strains *Staphylococcus warneri* CCRC 12929 and *S. haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. **Food Science**, v. 24, n. 1, p.120-128, 1997.

LOBO V. M., UGALDE G. M., FRIES M. L. L., KUBOTA H. E.: Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria – RS. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 57 – 61, 2001.

LOGAN, N. A.; TURNBULL, P. C. B. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Murray, P. R. et al. (ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, Washington: American Society Microbiology, 2003, p. 445-460.

- LOTTER, L. P.; GENIGEORGIS, C. A. Deoxyribonucleic Acid Base Composition and Biochemical Properties of Certain Coagulase-Negative Enterotoxigenic Cocci. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 152 – 158, 1975.
- LÜKE, FRIEDRICH-KARL. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 105-115, 2000.
- MAGNANI L. A., et al. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína *in natura* e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó – SC. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 44 – 47, 2000.
- MARIN, M. E.; ROSA, M. C.; CORNEJO, I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* Strains Isolated from Spanish Dry-Cured Hams. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 1067-1069, 1992.
- MARTIN, B. et al. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 148-158, 2006.
- MATARANTE, A. et al. Genotyping and toxigenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains occurring in industrial and artisanal cured sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n. 9, p. 5168-5176, 2004.
- MAURIELLO, G. et al. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p.149-158, 2004.
- METAXOPOULOS, J.; SAMELIS, J.; PAPADELLI, M. Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. **Italian Journal of Food Science**, v. 13, n.1, p. 3-18, 2001.
- MIRALLES, M. C.; FLORES, J.; PEREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. **Food Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 227-236, 1996.

MOORE, J. E. Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. **Meat Science**, v. 67, n. 5, p. 565-568, 2004.

NANU, E.; NARAYAN, K. G. Enterotoxin Production by *Staphylococci* Isolated from Pork *Kabab*, *Salami* and Other Sources by ELISA. **Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 383-384, 1992.

NASCIMENTO, M.G.F.; CORBIA; A.C.G.; NASCIMENTO, E.R. Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus*. **Comunicado Técnico 45**. Embrapa: Rio de Janeiro, 4p., 2001.

NORTJÉ G. L. et al. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yesinia enterocolitica* in South African retail meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 213-17, 1999.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento em alimentos de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos**. 1999. 92f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OMORI, G.; KATO, Y. A Staphylococcal Food-poisoning Caused by A Coagulase Negative Strain. **Biken's Journal**, n. 2, p. 92, 1959.

PANTŮČEK, R. et al. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p.1953-1958, 2005.

PAPAMANOLI E. *et al.* Characterization of *Microccaceae* isolated from dry fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 441-449, 2002.

PEARSON, A. M.; GILLETT, T. A. Sausages. In: PEARSON, A. M.; GILLETT, T. A. **Processed meats**. 3ª ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 1999, cap. 9, p. 210-241.

PEARSON, A. M.; TAUBER, F. W. Curing. In: PEARSON, A. M.; TAUBER, F. W. **Processed meats**. 2ª ed. Westport: AVI Publishing Company, 1984, cap. 3, p. 46-68.

PERAZOLLI, G. P.; GELINSKI, J. M. L. N. Qualidade higiênico-sanitária de salame artesanal elaborados por produtores rurais do município de Arroio Trinta – SC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XX, 2006, Curitiba. **Anais Alimentos e Agroindústrias Brasileiras no Contexto Internacional**. São Paulo: TecArt, 2006. 1 CD-ROM.

PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-production staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 19-26, 1991.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005a. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005b. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005c. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005d. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005e. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005f. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PEREIRA, K. S. **[Sem título]**. 2005g. 1 fotografia, colorida. Coleção particular.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; HEINEMANN, R. J. B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – Uma revisão. **Boletim SBCTA**, v. 35, n. 1-2, p. 109-116, 2001.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL J.; GHEESLING L. L. Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 568-570, 2004.

RANTSIOU K. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greek, Hungary and Italy. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 19-28, 2005.

RITTER R. et al. Microbiologia contaminante e patogênica de lingüiça (salame) colonial, analisada em quatro períodos distintos. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 113, p. 60 – 66, 2003.

SAKATE, R. I. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 2, p. 184-87, 2003.

SAMELIS, J. et al. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. **Food Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 447-460, 1994.

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

SAUER, C.J. et al. Foodborne illness outbreak associated with a semi-dry fermented sausage product. **Journal of Food Protection**. v.60, n.12, p.1612–1217, 1997.

SEAGER, M. S.; BANKS, J. G.; BLACKBURN, C. de W.; BOARD, R. G. A taxonomic study of *Staphylococcus* spp. isolated from fermented sausages. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 2, p. 295-297, 1986.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Ano 5, n. 6, 7p., 2005. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigido.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf). Acesso em 24 de outubro de 2006.

SISTEMA REGIONAL DE INFORMACIÓN PARA LA VIGILANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (SIRVETA). Página desenvolvida e mantida pelo Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis (INPPAZ). Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm>>. Acesso em 27 set. 2002.

SORIANO, J.M. et al. Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. **Journal of Food Protection**, v.65, n. 5, 857–860, 2002.

SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 502-505, 1975.

SPERGSEER, J. et al. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 2007- 2011, 2003.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41 – 45, 2006.

ŠVEC, P. et al. Reclassification of *Staphylococcus pulvereri* Zakrzewska – Czerwinska et al. 1995 as a later synonym of *Staphylococcus vitulinus* Webster et al. 1994. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p.2213- 2215, 2004.

TAVECHIO, A. T. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in Sao Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1041-1044, 2002.

TERRA, N. N.; BRAUN, M. A. R. Carne e seus derivados – Técnicas de controle de qualidade. **São Paulo: Ed. Nobel, 1985, 121p.**

TERRA, N. N. Princípios de fermentação de produtos cárneos (culturas “starter”). **Revista Nacional da Carne**, ano XVII, n. 191, p. 35-37, 1993a.

TERRA, N. N. Princípios de fermentação de produtos cárneos (culturas “starter”) (final). **Revista Nacional da Carne**, ano XVII, n. 192, p. 24-27, 1993b.

TERRA, N. N. Industrialização da carne. *In*: TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. 1ª ed. São Leopoldo: Editora UNISINOS, 1998, Seção 3, p. 51-172.

TERRA, A.; FRIES, L. L.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação do salame**. 1ª ed. São Paulo: Editora Varela, 2004, 152p.

TRÜLZSCH, K. et al. "*Staphylococcus pettenkoferi*", a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p.175-182, 2002.

UDO, E. E. et al. Enterotoxin production by a coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n.9, p. 819-823, 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Briefing Room – Economics of Foodborne Disease: food and pathogens. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/briefing/FoodborneDisease/foodandpathogens/>>. Acesso em: 7 março 2002.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Staphylococcus Aureus*. In: VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens – An Illustrated Text**. 1ª ed. London: Mosby Year Book., 1991, cap.12, p. 235-265.

VERAS, J. F. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Higiene Alimentar - Encarte**, v. 17, n. 104/105, p. 218, 2003.

VERNOZY-ROZAND, C et al. Enterotoxin production by a coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, 1996.

VERNOZY-ROZAND, C et al. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses. **Journal of Dairy Research**, v. 65, n. 2, p. 273-281, 1998.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 490-494, 2004.

VON RHEINBABEN, K. E.; HADLOK, R. M. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n.1, p.41-45, 1981.

WEBER, H. Dry sausage manufacture: The importance of protective cultures and their metabolic products. **Fleischwirtschaft**, v. 74, n. 3, p. 278-282, 1994.

WILMINK, M. Improving shelf life and safety. **Fleischwirtschaft International**, n. 4, p. 28-30, 2001.

WU, Y. C.; KIMURA, B.; FUJII, T. Comparison of three cultura methods for the differentiation of *Micrococcus* and *Staphylococcus* in fermented squid shiokara. **Fisheries Science**. V. 66, n. 1, p.142-146, 2000.

**APÊNDICE A** – Tabelas das análises estatísticas para comparação entre marcas/ categorias de salames

**TABELA 17:** Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro pH das seis marcas de salames.

<b>MARCAS</b>	<b>Valor- p</b>
A x B	0.0006*
A x C	0.0002*
A x D	0.0197*
A x E	< 0,0001
A x F	0.0044*
B x C	0.0104*
B x D	0.1207
B x E	< 0.0001*
B x F	0.2801
C x D	0.0024*
C x E	0.3582
C x F	0.0022*
D x E	< 0.0001*
D x F	0.6216
E x F	< 0.0001*

\*Indica diferença estatística.

**TABELA 18:** Valores de p na comparação dos lotes e das marcas de salames para o parâmetro coliformes termotolerantes

	<b>Coliformes à 45°C (UFC/g)</b>				<b>Valor-p</b>
	< 3		≥ 3		
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>LOTE</b>					
1	24	35.3	6	27.3	0.3819
2	24	35.3	6	27.3	
3	20	29.4	10	45.5	
<b>Marca</b>					
A	13	19.1	2	9.1	0.1012
B	12	17.6	3	13.6	
C	8	11.8	7	31.8	
D	9	13.2	6	27.3	
E	12	17.6	3	13.6	
F	14	20.6	1	4.5	

## APÊNDICE A – CONTINUAÇÃO

**TABELA 19:** Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro bactérias lácticas das seis marcas de salames.

MARCAS	Valor- p
A x B	0.0184*
A x C	0.9991
A x D	0.0020*
A x E	< 0,0001*
A x F	0.7001
B x C	0.0514
B x D	0.9825
B x E	0.1558
B x F	0.4506
C x D	0.0070*
C x E	< 0,0001*
C x F	0.8906
D x E	0.5062
D x F	0.1289
E x F	0.0007*

\*Indica diferença estatística.

**TABELA 20:** Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro *Staphylococcus* spp. coagulase negativa das sete categorias de salames.

MARCAS	Valor- p
A x B	0.1462
A x C	0.0782
A x D	0.0535
A x E1	0.8972
A x E23	0.0175*
A x F	0.0187*
B x C	0.0090*
B x D	0.0049*
B x E1	0.5484
B x E23	0.3023
B x F	0.0533
C x D	0.9017
C x E1	0.0823
C x E23	0.0007*
C x F	0.0016*
D x E1	0.0454*
D x E23	0.0005*
D x F	0.0011*
E1 x E23	0.0221*
E1 x F	0.1122
E23 x F	0.3140

\*Indica diferença estatística.

**APÊNDICE A – CONTINUAÇÃO**

**TABELA 21:** Valores de p na comparação, aos pares, do parâmetro *Micrococcus* spp. das seis marcas de salames.

<b>MARCAS</b>	<b>Valor- p</b>
A x B	0.7098
A x C	0.2470
A x D	0.0052*
A x E	0.8688
A x F	0.5513
B x C	0.1638
B x D	0.0028*
B x E	0.6508
B x F	0.3902
C x D	0.0009*
C x E	0.1336
C x F	0.1079
D x E	0.0026*
D x F	0.0039*
E x F	0.2156

\*Indica diferença estatística.