



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Gabriel Emiliano Motta

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PARA A
DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO MUTAGÊNICO 2-METIL-1,4-DINITRO-PIRROL
EM PRODUTO CÁRNEO**

FLORIANÓPOLIS
2020

Gabriel Emiliano Motta

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PARA A
DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO MUTAGÊNICO 2-METIL-1,4-DINITRO-PIRROL
EM PRODUTO CÁRNEO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.

FLORIANÓPOLIS

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Motta, Gabriel Emiliano

Potencial biotecnológico de bactérias ácido-láticas para a degradação do composto mutagênico 2-metil-1,4-dinitro pirrol em produto cárneo / Gabriel Emiliano Motta ; orientador, Juliano De Dea Lindner, 2020.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Conservantes de carne. 3. Biodegradação do DNMP. 4. Nitrorredutase. 5. Segurança de Alimentos. I. De Dea Lindner, Juliano. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Gabriel Emiliano Motta

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PARA A
DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO MUTAGÊNICO 2-METIL-1,4-DINITRO-PIRROL
EM PRODUTO CÁRNEO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Rodrigo Barcellos Hoff, Dr.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Profa. Carlise Beddin Fritzen Freire, Dra.

Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.

Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

Profa. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

Essa dissertação de mestrado não poderia ter seu bom fim sem o precioso apoio, colaboração e estímulo de diversas pessoas terrenas que influenciaram de forma direta e indireta a desenvoltura desse trabalho.

À minha mãe pelo eterno apoio e por sempre me proporcionar liberdade de escolhas.

À minha Avó Nágile pela alegria em existir e por me direcionar a ser quem sou.

Aos meus irmãos Lucas, Matheus, Milena e Natan por sempre estarem por perto e por serem amigos leais.

À Mariana minha amada companheira da vida, minha parceira de laboratório, minha namorada, minha colega de toca, ..., por todo amor, carinho e suporte em todos os aspectos de minha existência emocional, estrutural (ossos são difíceis de crescer), laboratorial e até musical. Obrigado por existir e fazer parte do meu mundo, você é meu maior exemplo de sabedoria e amor.

À Mel por existir e tornar minha vida mais simples, muito obrigado por me deixar participar de suas maravilhosas aventuras.

Aos Professores Carmen Maria e José Miguel por toda verdadeira amizade e exemplos como profissionais e como seres humanos.

Ao amigo e orientador Juliano pelas boas conversas, pelo suporte frequente em discussões, parcerias e pela desenvolvimento de um frutífero grupo de pesquisa.

Aos meus familiares de nascença (Emilianos e Mottas) e adquiridos (Angoneses e Bilibios) que sempre estiveram na torcida.

À Universidade Federal de Santa Catarina por me proporcionar formação acadêmica de excelente qualidade e de forma gratuita.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC e todos os seus funcionários e professores.

Ao Laboratório de Bioprocessos e Tecnologia de Alimentos da UFSC, pela estrutura e pelos amigos Marcelo, Nathalia, Ivan, Nataly, Leidiane e Catharina.

À Seção Laboratorial de Santa Catarina (SLAV-SC) e Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA-RS), em especial ao Dr. Heitor Daguer e ao Dr. Luciano Molognoni.

Ao laboratório de Defesas Celulares da UFSC, em especial ao Professor Alcir Luiz Dafre.

Ao laboratório de Bioquímica Experimental, em especial ao doutorando Jean Benassi.

Ao ITAL e à Sacco do Brasil pela disponibilização de cepas de micro-organismos que foram fundamentais para esse estudo, em especial à professora Ana Lúcia da Silva Correa Lemos e ao Hans Henrik Knudsen.

À banca avaliadora, Professor Pedro Barreto, Professora Carlise Freire e Dr. Rodrigo Barcellos, pelas correções e sugestões que aprimoraram esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigado a todos!

“O homem é a única criatura que consome sem produzir. Não dá leite, não põe ovos, é fraco demais para puxar o arado, não corre o que dê para pegar um lebre. Mesmo assim é o senhor de todos os animais. Põe-nos a mourejar, dá-nos de volta o mínimo para evitar a inanição e fica com o restante.”

(ORWELL, 2007).

RESUMO

Em 2018, as carnes processadas foram classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer como categoria 1, devido à relação direta entre o consumo e o aumento da incidência de câncer colorretal e estomacal. Os nitritos e sorbatos são conservantes comumente utilizados em carnes processadas, porém a legislação brasileira não permite o uso concomitante desses agentes preservantes. A interação entre esses conservantes pode formar o 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP), apontado como um composto mutagênico. Em 2018, testes detectaram a presença desse composto em carnes processadas. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de diferentes cepas de bactérias ácido-láticas (BAL), isoladas de matrizes alimentares, em biodegradar o DNMP em reações *in vitro* e em um modelo de matriz de carne processada. Além disso, também foi avaliado um possível mecanismo de biodegradação e a citotoxicidade do composto. O DNMP apresentou elevada citotoxicidade com $IC_{50\ 24h} = 0,487\ \mu M$ e $IC_{50\ 48h} = 0,595\ \mu M$ para fibroblastos de McCoy B. Treze cepas diferentes de BAL foram usadas na triagem e nove cepas reduziram mais de 98% da concentração inicial de DNMP. Depois, foi desenvolvido um fator empírico para avaliar a capacidade das cepas bacterianas em converter o DNMP a 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (um composto não mutagênico). Na matriz cárnea, três linhagens bacterianas (*Staphylococcus xylosum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus casei*) degradaram completamente o DNMP; além disso, o *S. xylosum* LYOCARNI RM-33 degradou o DNMP em tempo inferior a 30 minutos. Utilizando o extrato intracelular de *S. xylosum*, um possível mecanismo reacional foi testado para presença de nitrorredutases e o tipo de reação foi avaliado pelo consumo dos cofatores NADH e NADPH. Com isso, foi possível inferir que o extrato intracelular bacteriano demonstrou potencial para a presença de uma nitrorredutase insensível ao oxigênio tipo I classe B. Portanto, por meio desse trabalho, foi proposto um método para garantir a segurança de alimentos.

Palavras-chave: Conservantes de carne. Composto citotóxico e mutagênico. Nitrorredutase. Biodegradação do DNMP. LC-MS/MS. Segurança de Alimentos.

ABSTRACT

In 2018, processed meats were classified by the International Agency for Research on Cancer as category 1, due to the direct relationship between consumption and the increased incidence of colorectal and stomach cancer. Nitrites and sorbates are preservatives commonly used in processed meats, but Brazilian legislation does not allow the concomitant use of these preserving agents. The interaction between these preservatives can form 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole (DNMP), identified as a mutagenic compound. In 2018, tests detected the presence of this compound in processed meats. This study aimed to evaluate the ability of different strains of lactic acid bacteria (LAB), isolated from food matrices, to biodegrade DNMP in *in vitro* reactions and in a model of processed meat matrix. Also, a possible biodegradation mechanism and the cytotoxicity of the compound were evaluated. DNMP showed high cytotoxicity with $IC_{50\ 24h} = 0.477\ \mu M$ and $IC_{50\ 48h} = 0.595\ \mu M$ against McCoy B fibroblasts. Thirteen different BAL strains were used for screening and nine strains reduced more than 98% of the initial DNMP concentration. Then, an empirical factor was developed to assess the ability of bacterial strains to convert DNMP to 2-methyl-4-amino-1-nitro-pyrrole (a non-mutagenic compound). In the meat matrix, three bacterial strains (*Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus casei*) completely degraded the DNMP; also, *S. xylosus* LYOCARNI RM-33 degraded DNMP in less than 30 minutes. Using the intracellular extract of *S. xylosus*, a possible reaction mechanism was tested for the presence of nitroreductases and the type of reaction was evaluated by the consumption of the NADH and NADPH cofactors. With this, it was possible to infer that the bacterial intracellular extract showed potential for the presence of type I, oxygen insensitive nitroreductase, class B. Therefore, through this work, a method was proposed to guarantee food safety.

Keywords: Meat preservatives. Cytotoxic and Mutagenic compound. Nitroreductase. DNMP biodegradation. LC-MS/MS. Food Safety.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Classificação dos tipos de Nitrorredutase. 34
- Figura 2 – Resultados de citotoxicidade usando o ensaio de viabilidade MTT em 24 (linha tracejada com quadrados) e 48 (linha contínua com círculos) horas. 44
- Figura 3 – Condições teóricas e experimentais que garantem a eficácia do modelo de detecção DNMP e NMAP: perfil de fragmentação igual em MS/MS, razão isotópica característica e seletividade na retenção de RP-CN..... 45
- Figura 4 – Conversão de 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) por *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01..... 47
- Figura 5 – Fatores de conversão 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) obtidos pela biodegradação de DNMP por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435, *Pediococcus pentosaceus* isolado do LYOCARNI RHM-33, *Staphylococcus xylosus* isolado do LYOCARNI SXH-01, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* LB-UFSC 0014, *Lactobacillus fermentum* LB-UFSC 0017, *Lactobacillus acidophilus* LB-UFSC 0018, *Lactobacillus casei* LB-UFSC 0019 e *Lactobacillus sakei* LB-UFSC 0022 ou ácido ascórbico..... 48
- Figura 6 – Conversão do 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) (a) em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) (b) na matriz de mortadela inoculada com *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01 com sinal de intensidade de detecção na mesma ordem de magnitude. 50
- Figura 7 – Decaimento na absorbância de NADH (círculos), NADPH (cruzamentos) na presença do extrato livre de células de *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01 e DNMP; NADH (triângulos) e NADPH (quadrados) na ausência do extrato livre de células. 53
- Figura 8 – Mecanismo enzimático Ping Pong Bi Bi; uma das possibilidades de ação para as enzimas nitrorredutase de tipo I..... 54

Figura 9 – Reação de redução de nitro compostos a grupos amina utilizando enzima nitrorredutase tipo I e reação de oxido redução do grupo prostético. ... 55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Eventos que fizeram com que a segurança das carnes processadas ou curadas com nitrito fosse reavaliada.	28
Quadro 2 – Micro-organismos utilizados no estudo e as respectivas identificações.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de redução de DNMP em condição aeróbia e anaeróbia pelo extrato livre células da <i>Staphylococcus xylosus</i> LYOCARNI SXH-01 na presença ou ausência de cofatores.	52
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP Adenosina trifosfato
- AW Atividade da água (do inglês: Activity of water)
- BAL Bactérias ácido-lácticas
- BSA albumina sérica bovina
- CPS Contagens por Segundo (do inglês: Counts per Second)
- CN-RP Fase reversa ciano (do inglês: Cyano (CN) Reversed phase)
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNMP 1,4-Dinitro-2-Metil-Pirrol
- EFSA Escritório Europeu de Segurança de Alimentos
- FAD Flavina-adenina dinucleótido
- FADH Flavina-adenina dinucleótido reduzida
- FMN Flavina de mononucleótido
- GRAS Geralmente Reconhecido como seguro (do inglês: Generally Recognized as Safe)
- HAA Aminas Heterocíclicas Aromáticas (do inglês: Heterocyclic aromatic amines)
- HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina etanossulfônico
- IARC Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês: International Agency for Research on Cancer)
- ITAL Instituto de Tecnologia de Alimentos
- LC-MS/MS (do inglês: Liquid Chromatography Coupled to tandem mass spectrometry)
- NADH 1,4-di-hidroxi-nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH Dihidro-nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
- NMAP 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol
- NOC Compostos N- nitrosos (do inglês: N-Nitroso compounds)
- PAHS Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês: polycyclic aromatic hydrocarbones)
- WHO Organização Mundial da Saúde (do inglês: World Health Organization)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA CARNE	19
3.2 EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS DE CURA PARA CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS.....	20
3.3 AGENTES DE CONSERVAÇÃO	21
3.3.1 Nitrato/nitrito	21
3.3.2 Sal	22
3.3.3 Açúcares	23
3.3.4 Especiarias	23
3.3.5 Defumação	24
3.3.6 Ingredientes acidificantes antimicrobianos	25
3.4 SEGURANÇA DE PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS	26
3.4.1 Redução do uso de nitrito e consequências	29
3.4.2 Sobre o 2-metil-1,4-dinitro-pirrol	29
3.5 BACTÉRIAS NA SEGURANÇA DE ALIMENTOS.....	31
3.5.1 Bactérias ácido-láticas	31
3.5.2 Nitrorredutases	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 REAGENTES E PADRÕES	36
4.2 REATIVAÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	36
4.3 PRODUÇÃO DA AMOSTRA DE MODELO PRODUTO CÁRNEO.....	38

4.4 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE INTERAGIR COM O DNMP	38
4.5 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP A NMAP	39
4.6 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP EM MODELO DE MATRIZ CÁRNEA.....	40
4.7 EXTRAÇÃO DO MATERIAL INTRACELULAR BACTERIANO	40
4.8 AVALIAÇÃO DA NITRORREDUTASE DO EXTRATO INTRACELULAR.....	41
4.9 INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
4.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT	42
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 CITOTOXICIDADE DO DNMP.....	44
5.2 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE INTERAGIR COM O DNMP	45
5.3 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP A NMAP	46
5.5 EXTRAÇÃO DO MATERIAL INTRACELULAR BACTERIANO	51
5.6 AVALIAÇÃO DE NITRORREDUTASE DO EXTRATO INTRACELULAR.....	51
6 CONCLUSÃO	56
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A segurança de alimentos geralmente se refere a medidas aplicadas nos alimentos para garantir sua qualidade, evitando a propagação potencial de doenças que podem gerar perdas econômicas para indivíduos, para a indústria e o governo (WILCOCK; BALL, 2014). Ademais, o uso de conservantes, tratamentos tecnológicos (por exemplo, processamento térmico) e limites regulatórios devem ser respeitados pela indústria, para evitar a transmissão de doenças ou a formação de compostos nocivos, potencialmente prejudiciais à saúde humana.

Quando os conservantes são usados corretamente, garantem que as reações microbiológicas sejam mais lentas ou mesmo inibidas. Além disso, aumentam a viabilidade de mercado do produto e, conseqüentemente, ajudam a reduzir as perdas econômicas. Eles também reduzem o risco gerado pela multiplicação de microorganismos potencialmente patogênicos à saúde dos consumidores. Os principais conservantes usados no processamento de carne são ácidos orgânicos, bacteriocinas, nitrito e sorbato. O uso imprudente e/ou abusivo de conservantes e aditivos associados ou não às condições de processamento pode gerar concentrações significativas de contaminantes químicos tóxicos (IARC, 2018; MOLOGNONI *et al.*, 2018).

Desde o final da década de 40, compostos nitrogenados em alimentos cárneos são investigados quanto à sua formação, capacidade tóxica, mutagênica e carcinogênica. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) categoriza agentes, misturas e exposições com potencial capacidade cancerígena em quatro categorias (1, 2A, 2B, e 3), 3 significando não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos, 2B possivelmente carcinogênico para humanos, 2A provavelmente carcinogênico para humanos e o 1 carcinogênico para humanos (IARC, 2018).

Na década de 1970, estudou-se a potencial formação de compostos que danificam o DNA por reação de ácido sórbico e nitrito e, assim, o composto 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) foi identificado (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978). O DNMP é formado por nitração ou nitrosação seguida de descarboxilação do ácido sórbico em condições ácidas (pH inferior a 5,0), tratamento térmico utilizando temperaturas superiores a 60 °C e razão molar de nitrito de sódio em relação ao ácido sórbico superior a 2:1 (NAMIKI *et al.*, 1981; SOFOS, 1981; PÉREZ-PRIOR *et al.*, 2008). A

forte atividade mutagênica do composto foi demonstrada pelo ensaio de mutação reversa de *Salmonella* (teste de Ames) e pelo ensaio de recontagem usando *Bacillus subtilis* (NAMIKI *et al.*, 1980).

Em 2015, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) instou a comunidade científica a fornecer mais informações toxicológicas sobre a ocorrência do DNMP em condições reais de processamento de carne (EFSA, 2015). O consumo de carnes processadas (por exemplo, bacon, presunto, linguiça) foi correlacionado como agente cancerígeno classe 1 pela IARC da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa classificação foi baseada em evidências de que o consumo de alimentos processados aumenta a incidência de câncer colorretal e estomacal (IARC, 2018). Em 2018, empregando cromatografia líquida acoplada à análise por espectrometria de massa em modo *tandem* (LC-MS/MS), diferentes amostras de produtos cárneos processados comercializados no Brasil foram avaliadas por nosso grupo de pesquisa e, pela primeira vez, a ocorrência de DNMP foi relatada em várias amostras (MOLOGNONI *et al.*, 2018). Como o DNMP pode estar presente em produtos à base de carne processada, métodos para sua remediação devem ser estudados e empregados para mitigar a carga do DNMP e, assim, melhorar a segurança dos alimentos.

As bactérias ácido-láticas (BAL) geralmente são reconhecidas como seguras (GRAS) para aplicação em alimentos e são usadas pela indústria como cultura iniciadora em produtos fermentados por sua capacidade de melhorar características de textura, sabor, aroma e a disponibilidade de nutrientes (DE DEA LINDNER *et al.*, 2013; HOSPITAL *et al.*, 2015). Além disso, elas podem ser usadas como agentes de biocontrole, pois podem inibir a deterioração e o crescimento de micro-organismos patogênicos (DE DEA LINDNER *et al.*, 2008; BEN SLIMA *et al.*, 2017). Salienta-se que algumas BAL são capazes de metabolizar enzimaticamente compostos tóxicos como aminas aromáticas heterocíclicas, aminas biogênicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos usando-os como fonte de carbono e nitrogênio (STIDL *et al.*, 2008; NOWAK; LIBUDZISZ, 2009; BARTKIENE *et al.*, 2017). Dito isso, as nitrorredutases são um grupo de enzimas capazes de catalisar a redução de um grupo nitro na presença ou ausência de oxigênio (tipo I) ou apenas na ausência de oxigênio (tipo II) (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2011).

A aplicação de BAL ou de extratos intracelulares de BAL para a bioconversão de nitro compostos, como o DNMP, é uma estratégia promissora. Primeiramente,

porque as BAL possuem o *status* GRAS para aplicação em alimentos e, depois, porque as BAL possuem enzimas redutoras bioconversoras de nitro compostos como demonstrado neste estudo.

1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta dissertação.

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi selecionar bactérias ácido-láticas capazes de degradar o composto mutagênico 2-Metil-1,4-Dinitro-Pirrol (DNMP), presente em produtos cárneos, para garantir a segurança de alimentos.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar a citotoxicidade do DNMP;
- ✓ Testar a capacidade de interação de BAL com o DNMP;
- ✓ Testar a capacidade de BAL em converter o DNMP a NMAP;
- ✓ Testar a capacidade de bioconversão de DNMP em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) por BAL em modelo de produto cárneo;
- ✓ Preparar extratos intracelulares de BAL para testar ação conversora de DNMP a NMAP em produto cárneo;
- ✓ Avaliar a ação de potenciais nitrorredutases presentes em *Staphylococcus xylosus* biótipo LYOCARNI RM-33.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA CARNE

A carne é basicamente composta por água, proteínas (principalmente miosina e actina), lipídios, alguns carboidratos (geralmente ácido láctico e glicogênio), minerais e outros fatores e cofatores de crescimento (TOLDRÁ, 2002a). As proteínas encontradas na carne possuem alta digestibilidade (ca. 94%) e provêm todos os aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, leucina, isoleucina e valina) (WILLIAMS, 2007). Em proporções, o tecido muscular magro contém aproximadamente 74% de água, 21% de proteína, 4% de gordura e 1% de cinzas. Essas proporções podem mudar dependendo da quantidade de engorda do animal de corte e, especialmente, se o tecido adiposo é incluído (ARMERO *et al.*, 2001). A composição da carne torna a mesma um substrato rico para a multiplicação microbiana.

A deterioração dos alimentos de origem animal deve-se a uma vasta gama de reações, tendo destaque as de origem microbiológica. As reações que degradam a superfície da carne normalmente são causadas por bolores, leveduras e bactérias aeróbicas, enquanto que as reações ocorridas no interior da carne são causadas por bactérias anaeróbicas ou facultativas. Além do dano à matéria-prima, alguns microorganismos que podem estar presentes na carne fresca são patogênicos e destacam-se os dos gêneros *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Acinetobacter* que podem causar botulismo, meningite transmitida da mãe para o recém-nascido (via translocação sistêmica ou transvaginal), intoxicação alimentar e septicemia, respectivamente (GILL 1986; JAY, 2000).

Nas carcaças, a maioria das bactérias são originárias da pele do animal (NEWTON *et al.*, 1978; GRAU 1986). No entanto, muitos tipos diferentes de microorganismos do solo, da água, do ar, da ração e do esterco, assim como a microbiota da superfície natural e os organismos intestinais, podem contaminar a carcaça durante as operações de processamento (PEGG; SHAHIDI, 2000a). Embora a carne sempre contenha algum nível de microorganismos, várias propriedades inerentes a produtos específicos e ambientes circundantes afetam a taxa, tipo e grau de contaminação.

Por ser a carne um meio ótimo para o crescimento microbiano, como já citado, métodos tecnológicos devem ser empregados para alterar fatores intrínsecos e

extrínsecos para que se possa manter a qualidade do alimento por mais tempo. Os principais fatores intrínsecos que alteram o crescimento dos micro-organismos são: atividade da água (a_w), pH, potencial de oxi-redução (Eh), nutrientes disponíveis e a presença ou ausência de substâncias inibitórias. Já para fatores extrínsecos: temperatura de armazenamento, umidade relativa, presença ou ausência de oxigênio e a forma física da carne (maior ou menor área de contato) (PEGG; SHAHIDI, 2000a).

Além das reações de degradação, a maturação/cura da carne promove alterações sensoriais a partir de reações bioquímicas e bacteriológicas como proteólise, lipólise e fermentação, resultando em alterações físico-químicas e organolépticas (TOLDRÁ, 2002c).

3.2 EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS DE CURA PARA CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Assim que o homem primitivo deixou de ser nômade, desenvolveu técnicas de plantio e de domesticação animal, isso há 100.000 a.C. Duas eram as preocupações principais quanto aos alimentos: como obter o alimento para o futuro e, em caso de grande sucesso (colheita e/ou caçada), como preservar o excesso de alimentos obtidos (TOLDRÁ, 2002a). Esse foi o início da necessidade de preservação dos alimentos excedentários para garantir a subsistência em tempos de escassez (TOLDRÁ, 2002b). Diferentes técnicas foram aplicadas com sucesso e hoje ainda são utilizadas, embora com uma tecnologia evoluída e avançada (TOLDRÁ, 2002b).

O armazenamento por frio era utilizado naturalmente nas regiões frias do norte da Europa, o emprego da secagem era aplicado em regiões quentes e secas como o norte da África. Outras técnicas como defumar e cozinhar surgiram com o controle do fogo. Por outro lado, a origem da salga como técnica de conservação foi transmitida ao longo do tempo (TOLDRÁ, 2002b). O homem primitivo esfregou pedaços de carne com sal marinho, que continha nitrato como impureza (TOLDRÁ, 2002b). O resultado foi uma carne com coloração avermelhada, preservada e com sabor específico (TOLDRÁ, 2002b).

A produção e o consumo de carnes-secas curadas provavelmente originou-se nos países do sul da Europa em torno do mar Mediterrâneo, porque o clima dessa região permite secagem e maturação natural. Por outro lado, o uso de fumaça foi

aplicado em áreas do norte e mais frias, onde o clima não permitia a secagem natural (PINEDA, 1989).

Da Europa, a boa experiência e prática na fabricação de produtos de carnes-secas curadas foi naturalmente levado para a América com os colonos imigrantes. Na América, receitas diferentes (sal, sal e açúcar, pimenta, outras especiarias, etc.) foram usadas pelos curadores, alguns dos quais tinham casas de gelo e casas de fumaça em suas fazendas (KEMP, 1982).

O termo carne curada é usado para um grande número de produtos cárneos, embora seu significado possa variar dependendo do tipo de produto e país de origem. Tradicionalmente, o termo cura geralmente significa o uso de um sal de cura (cloreto de sódio e nitrato/nitrito) que gera ou produz cor e sabor (FLORES; TOLDRA, 1993). No Brasil, os produtos curados, elaborados a partir de carne de suínos, bovinos ou aves, são regulamentados quanto a identidade e qualidade segundo as Instruções Normativas números 20, 21 e 22 do ano de 2000 e número 6 do ano de 2001 (FLORES; TOLDRA, 1993; BRASIL, 2000a; BRASIL, 2000b; BRASIL, 2000c; BRASIL, 2001).

3.3 AGENTES DE CONSERVAÇÃO

3.3.1 Nitrato/nitrito

O histórico do uso de sal para a preservação de carnes vem de longa data. Entretanto, algumas vezes o sal utilizado para a conservação, obtido em cavernas e/ou salinas, continha salitre (nitrato de potássio). O uso desse sal era mais eficiente que o uso de apenas do cloreto de sódio para a preservação, gerava um sabor próprio e coloração avermelhada específica. Em 1908 o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) permitiu o uso oficial de nitrato para a cura de carnes (USDA, 1926; KERR *et al.*, 1926; BINKERD; KOLARI, 1975; SOFOS *et al.*, 1979a).

Pesquisas realizadas no último século demonstraram que o nitrato adicionado à carne é reduzido a nitrito por bactérias em condições de anaerobiose por meio da enzima nitrato-redutase, principalmente as da família Micrococcaceae (WALKER, 1996, FEINER, 2006). O nitrito é o responsável pela fixação da cor da carne curada através da reação com a mioglobina, além disso é essencial para fornecer o sabor

característico, evitar a oxidação lipídica, por possuir atividade antioxidante, e inibir a atividade microbiana (LEWIS; VOSE; LOWRY, 1925; GRAY; PEARSON, 1987).

Na década de 80 foram estudados compostos bacteriostáticos formados pelo nitrito. Mostrou-se que a ação conservante do nitrito era aumentada pela acidificação, dessa forma sugeriu-se que o ácido nitroso (HONO) seria a forma ativa. Em meios bacteriológicos, a ação inibitória do nitrito em várias espécies de bactérias mostrou-se aumentada com a diminuição do pH, incluindo células vegetativas e esporos de *Clostridium botulinum*, particularmente em pH menores do que 6,0 (TARR, 1941). O efeito da acidificação é presumivelmente porque o ácido nitroso é uma espécie muito mais ativa que o ânion, mas está presente em concentrações muito baixas em pH neutro (o pKa do ácido nitroso é 3,4) (CAMMACK *et al.*, 1999).

Para garantir a segurança do produto, a regulamentação do USDA exige um mínimo de 120 mg/kg de nitrito presente em todos os produtos, a menos que outros processos de preservação sejam verificados e implementados para garantir a segurança (USDA, 2010c). No Brasil os limites de nitrito e nitrato são avaliados em quantidade residual expresso como nitrito de sódio; para os sais de nitrato é de 300 mg/kg, enquanto que para os sais de nitrito é de 150 mg/kg. Além disso, caso ocorra o uso concomitante de nitrato e nitrito o limite deve ser inferior à 150 mg/kg (BRASIL, 2006).

3.3.2 Sal

O sal, cloreto de sódio, é o ingrediente mais comum no processamento de alimentos (PEARSON; GILLETT, 1999). É um ingrediente essencial encontrado em todas as carnes curadas e fornece múltiplas funções. Por ser um agente secante, aumenta a força iônica e diminui a atividade água. Além disso, alguns estudos sugerem que o cloreto apresenta toxicidade garantindo um maior poder preservativo (SPERBER, 1983; JAY, 2000; TAORMINA, 2010). Ainda, o ânion cloreto é responsável pela extração das proteínas miofibrilares durante o processamento. Sem isso, a retenção de gordura e umidade é reduzida e a textura do produto pode ser mole ou quebradiço (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

Em combinação com outros ingredientes, tratamentos e armazenamento, o sal pode servir como obstáculo ao crescimento bacteriano. O nitrito e o sal são essenciais na cura de carne e proporcionam efeitos sinérgicos para o controle bacteriano e o

desenvolvimento de características de carne curada (DOYLE; GLASS, 2010). O sal é considerado um ingrediente auto limitante, pois o uso excessivo (superior a 4 % em massa) resultará em um produto intragável. Assim, normalmente empregam-se concentrações entre 2 e 3 % (SULLIVAN, 2011). A OMS (Organização Mundial da Saúde) recomenda que a ingestão de sal seja inferior a 5 g por dia, isso porque a ingestão excessiva de sal está associada ao aumento da pressão arterial, que por sua vez é um fator de risco para derrames e outras patologias cardiovasculares, e também doenças renais (RUST; EKMEKCIOGLU, 2016).

3.3.3 Açúcares

Muitos ingredientes diferentes podem ser usados como adoçantes e o tipo usado afeta o sabor, as características de cor e o crescimento microbiano. O principal papel dos açúcares em carnes processadas é para a formulação, ou seja, neutralizar e equilibrar o sabor do sal (TOWNSEND; OLSON, 1987). Além disso, o sabor e a cor são afetados pela reação de Maillard durante o processamento térmico (PEARSON; GILLET, 1999). Tal como acontece com o sal, os açúcares e adoçantes são considerados auto limitantes e não existem regulamentos para os níveis de adição (SULLIVAN, 2011).

É importante ressaltar que para garantir o crescimento de bactérias com aptidão tecnológicas, como as BAL, é importante existir uma concentração mínima de açúcares fermentáveis na matriz cárnea (MASTANJEVIĆ *et al.*, 2017). Assim sendo, quando esses valores são muito baixos ou muito variáveis, são adicionados à matriz cárnea carboidratos fermentáveis como glicose, sacarose, lactose, maltodextrina, xarope de milho, amido e sorbitol (COMI *et al.*, 2005).

Apesar disso, os efeitos antibacterianos dos açúcares são semelhantes aos do sal e aumentam a força iônica e diminuem a atividade da água (JAY, 2000). No entanto, as concentrações de açúcares usadas em produtos de carne são muito baixas para proporcionar efeitos significativos (PEARSON; GILLET, 1999).

3.3.4 Especiarias

O sabor é o principal objetivo do uso de especiarias e ervas, no entanto, algumas têm demonstrado propriedades antimicrobianas devido a presença de

substâncias como piperina e eugenol (TIWARI *et al.*, 2009; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Da mesma forma, muitas especiarias e extratos contêm compostos fenólicos que demonstraram atividade antioxidante (SASSE; COLINDRES; BREWER, 2009).

Extrato de alecrim, pimenta preta, entre outros são condimentos que apresentaram antioxidantes e são comumente utilizados na indústria de alimentos (VELASCO; WILLIAMS, 2011; ZHAI *et al.*, 2018). Como ocorre com o sal e o açúcar, a maioria das especiarias são consideradas auto limitantes do ponto de vista regulatório (SULLIVAN, 2011).

3.3.5 Defumação

A defumação como forma de conservação é conhecido pela humanidade desde a Idade da Pedra e representa um conjunto de processos químicos, térmicos, difusivos e bioquímicos que ocorrem em um produto salgado preliminarmente (ADEYEYE, 2016). Atualmente, a tecnologia é aplicada de várias formas e trata mais de 40% da quantidade total de produtos cárneos (ADEYEYE, 2016; ADEYEYE, 2018).

Geralmente a técnica combina três processos principais: (1) cozimento – a técnica à quente é realizada em temperaturas superiores a 80 °C, o calor destrói as bactérias e enzimas da carne; (2) secagem - o fogo que produz a fumaça também gera calor, que desidrata a carne reduzindo assim a *aw* (atividade água) a valores inferiores a 0,9, valor que nos quais geralmente não crescem bactérias e leveduras e (3) defumação - a fumaça é produzida pela queima da madeira que contém vários compostos, incluindo fenóis, álcoois, ácidos orgânicos, carbonilas, hidrocarbonetos e gases, que combinados contribuem para o sabor, aroma, cor, redução da atividade antimicrobiana, aumento da atividade antioxidante e formação da superfície do produto cárneo (PEARSON; GILLET, 1999; ABERLE *et al.*, 2001; ADEYEYE, 2018).

Os compostos fenólicos reagem com grupos sulfidril e carbonilas de cadeia curta dos aminoácidos para fornecer grande parte das características do sabor defumado. Os álcoois da fumaça são oxidados em ácidos orgânicos e responsáveis pela formação da “pele” proteica no exterior dos produtos (RUST, 1987). Os fenóis e outros compostos aromáticos presentes na fumaça têm propriedades antioxidantes devido à sua capacidade de doar elétrons (SOLDERA; SEBASTIANUTTO; BORTOLOMEAZZI, 2008). Alguns compostos, como formaldeídos e fenólicos,

presentes na fumaça possuem propriedades bacteriostáticas ou bactericidas (ABERLE *et al.*, 2001; ELLIS, 2001; URBAIN; CAMPBELL, 1987).

Por outro lado, o processo de defumação pode estar associado à formação de PAHS, compostos que têm a capacidade de penetrar o trato gastrointestinal humano, e estão correlacionados à carcinogenicidade e mutagenicidade (IARC, 2010). A legislação brasileira não avalia a presença ou concentração desses compostos em produtos cárneos defumados (PAZ *et al.*, 2017).

3.3.6 Ingredientes acidificantes antimicrobianos

Na fabricação de carnes processadas a alteração de pH está relacionada com propriedades tecnológicas, antimicrobianas e aromatizantes. A concentração de íons de hidrogênio afeta a extração de proteínas e a capacidade de retenção de água. Isso, por sua vez, influencia a capacidade de ligação proteína-proteína e/ou proteína-água do produto, a textura, a cor e a deterioração microbiana (RANKEN, 1976; HANNAN; CROOK, 1983).

A acidez é um fator importante na preservação de determinados produtos cárneos através da adição direta de ácido (produtos acidificados) ou através do desenvolvimento de ácido por bactérias específicas (produtos fermentados). Nestes produtos, o pH também desempenha um papel importante no sabor. O pH médio das carnes curadas está na faixa entre 5,5 e 6,6 (SOFOS, 1981).

A legislação brasileira de carnes e produtos cárneos permite a utilização de acidificantes (ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico e glucono-delta-lactona), assim como o uso de reguladores de acidez (sais de sódio, cálcio ou potássio produzidos a partir de ácidos orgânicos) e não há limite de adição para esses compostos (BRASIL, 2006). A adição de ácidos orgânicos é comumente realizada para atender exigências antimicrobianas e também estender a vida de prateleira retardando o crescimento de organismos deteriorantes (THERON; LUES, 2007).

O uso de sais de lactato e diacetato é comum na indústria cárnea, principalmente para o controle da *Listeria monocytogenes*, micro-organismos patogênico capaz de induzir abortos espontâneos, septicemias, encefalites e meningite, possui uma elevada taxa de mortalidade em pessoas idosas, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (SWAMINATHAN, 2001;

SHAFIT; WILLIAMS, 2010). Segundo a legislação brasileira não há limite de adição de sais de lactato tanto de sódio quanto de potássio (BRASIL, 2006).

O ácido sórbico é utilizado desde a década de 30, quando foi patenteado, como agente fungistático para alimentos e para embalagens de alimentos (STOPFORTH *et al.*, 2005). Por ser uma substância GRAS, o sorbato pode ser utilizado em qualquer alimento que permita a adição de conservantes. Dessa maneira, pode ser aplicado diretamente no produto, através de imersão ou pulverização (SOFOS; BUSTA, 1981). A atividade antimicrobiana do ácido sórbico é bastante pronunciada contra leveduras e fungos filamentosos e contra muitos gêneros de bactérias gram-positivas e negativas (por exemplo *Clostridium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*) (RAHARJO; SOFOS, 1993; THOMAS; DELVES-BROUGHTON, 2001). A eficácia do ácido sórbico como agente antimicrobiano é maior em baixos valores de pH, o que resulta em altas concentrações do ácido não dissociado; em pH 4,8, 50 % do ácido é indissociável assim, nesse valor ou abaixo, ao menos metade do total de ácido sórbico presente é eficaz (EL-SHENAWY; MARTH, 1988; BUAZZI; MARTH, 1991). O limite de adição de sorbatos na legislação brasileira é de 200 mg/kg e é permitido apenas para tratamento da superfície de produtos que não sofrem tratamento térmico (produtos cárneos industrializados secos, curados e/ou maturados ou não e produtos cárneos salgados crus) (BRASIL, 2006).

3.4 SEGURANÇA DE PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS

Segundo Sofos (1981), os produtos de carne curada produzidos comercialmente nos EUA apresentaram controle exemplar contra o *Clostridium botulinum*, isso foi atribuído à interação de diversos fatores envolvidos na formulação, fabricação, manuseio e distribuição dos produtos. Esses fatores incluem a concentração de nitrito; pH do produto; concentração de sal; tratamento térmico; baixa incidência de esporos botulínicos em carnes cruas; baixas temperaturas de armazenamento; controle da atividade de água da carne; composição do produto; contaminação microbiana natural (competitiva); processamento sanitário; correto manuseio; embalagem dos produtos. Dessa forma, o nitrito constitui um dos mais importantes fatores para as carnes curadas e processadas. Por outro lado, de acordo

com a IARC, compostos nitrogenados podem ser formados pela interação do nitrito com a carne durante o processamento (IARC, 2018).

Carnes curadas, defumadas e/ou processadas podem conter compostos N-nitrosos (NOCs), aminas heterocíclicas aromáticas (HAAs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) que podem ser produzidos durante o processamento, armazenamento e preparo de alimentos, muitos desses podem ser classificados como carcinogênicos para humanos (grupo 1) (EFSA, 2015). A produção desses compostos é dependente das condições de reação (pH, temperatura de exposição durante o preparo), da composição cárnea, do processamento (maturação, defumação, tratamento térmico, armazenamento) e do uso imprudente e/ou abusivo de conservantes e aditivos (IARC, 2018). No quadro 1 está apresentado um breve resumo de eventos que levaram à reavaliação da segurança das carnes curadas com nitrito. Mais de 300 compostos (diversificados entre HAAs, PAHs e NOCs) já foram testados em diferentes animais, e mais de 90% demonstraram ser carcinogênicos (PREUSSMANN; STEWART 1984; TRICKER; PREUSSMANN 1991).

Quadro 1 – Eventos que fizeram com que a segurança das carnes processadas ou curadas com nitrito fosse reavaliada.

Data	Eventos	Referência
1930	Doença hepática em trabalhadores que inalaram N-nitrosodimetilamina.	(FREUND, 1937)
1958	Hepatotoxicidade pelo consumo de carne curada com nitrito contendo NOCs.	(LIJINSKY, 1999)
1964	Nitrosaminas investigadas quanto a carcinogenicidade.	(PEGG; SHAHIDI, 2000b)
1970	Ingestão de aminas secundárias (formadas possivelmente pelo cozimento) com nitrito potencializam formação de nitrosaminas.	(LIJINSKY; EPSTEIN, 1970)
1972	Centro de Ciência de Interesse Público faz petições ao USDA para proibir ou reduzir uso de nitritos em carnes curadas.	(PEGG; SHAHIDI, 2000b)
1973	Primeiros relatórios epidemiológicos em que carnes processadas são associadas ao câncer.	(ZALDIVAR; ROBINSON, 1973)
1974	Descoberto deteriorantes de DNA oriundos da reação do nitrito de sódio e do ácido sórbico.	(KADA, 1974)
1975	O USDA propõe a redução da quantidade de nitrito em bacon de 200 para 120 ppm. Elimina o uso de nitrato em bacon, e requer que outros compostos, como antioxidantes, sejam adicionados.	(NATIONAL ARCHIVES AND RECORDS ADMINISTRATION, 1978)
1978	2-metil-1,4-dinitro-pirrol (potencial atividade mutagênica) formado pela reação de ácido sórbico e nitrito.	(KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978)
1990	As nitrosaminas podem formar-se endogenamente a partir do nitrato da dieta.	(TRICKER; PREUSSMANN, 1991)
1991	Degradação do DNMP por sucos vegetais, bactérias intestinais e pelo uso de ácido ascórbico e cisteína.	(OSAWA <i>et al.</i> , 1980; SHU <i>et al.</i> , 1991; BINSTOK; CAMPOS; GERSCHENSON, 1998)
2003	OMS recomenda moderação no consumo de carnes em conserva.	(WHO, 2003)
2010	A IARC conclui que o nitrato ou nitrato ingerido sob condições que resultam em nitrosação endógena é provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2A).	(IARC, 2010)
2018	A IARC declara que as carnes processadas são carcinogênicas do Grupo 1 com base em dados relacionando o consumo ao câncer colorretal e câncer de estômago.	(IARC, 2018)
2018	Detecção de DNMP por meio de HPLC-MS/MS em produtos cárneos comerciais no Brasil.	(MOLOGNONI <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.4.1 Redução do uso de nitrito e consequências

Em virtude do extenso uso do nitrato e nitrito na cura de carnes, muitos estudos a respeito da ingestão desse conservante foram realizados no século XX. Nesses estudos, concluiu-se que o agente conservante é altamente reativo em baixos valores de pH, elevadas temperaturas e em determinados meios em que hajam compostos passíveis de nitrosação; essa reatividade pode fazer com que compostos com potencial carcinogênico sejam formados (PEGG; SHAHIDI, 2000b; SONG; WU; GUAN, 2015). Por essa razão, o uso de nitrito teve que ser recalculado para minimizar problemas à saúde humana.

Visando manter as características do nitrito em alimentos, propôs-se utilizá-lo em baixas concentrações com o emprego sinérgico de outros conservantes. Para esse fim, conservantes com capacidade de inibir micro-organismos deteriorantes, que não apresentassem características sensoriais marcantes, com boa solubilidade e baixo custo, foram requeridos. O sorbato de potássio foi sugerido por cumprir os requisitos e apresentar efetiva inibição sobre *Clostridium botulinum* (SOFOS; BUSTA; ALLEN, 1979).

3.4.2 Sobre o 2-metil-1,4-dinitro-pirrol

Na década de 70 descobriu-se que compostos mutagênicos eram formados em produtos tratados com nitrito de sódio e ácido sórbico sob aquecimento (KADA, 1974). Em 1974 foram realizados trabalhos para isolar e identificar os primeiros compostos formados pela interação desses conservantes (KADA, 1974; NAMIKI; KADA, 1975). Em 1977 o DNMP (2-metil-1,4-dinitro-pirrol) foi isolado e identificado por meio de espectroscopia por ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massa (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978).

O DNMP é formado pela nitração ou nitrosação seguido de descarboxilação do ácido sórbico. Em condições de laboratório o rendimento máximo de formação de DNMP ocorreu em pH 3,5 até 4,2 e em temperatura de 60 °C e uma relação molar de nitrito de sódio e ácido sórbico de 8:1 (KITO; NAMIKI; TSUJI, 1978; SOFOS, 1981; NAMIKI *et al.*, 1981; PÉREZ-PRIOR *et al.*, 2008).

O composto apresentou uma potente atividade genotóxica e mutagênica. Para mutagenicidade foram realizados teste de Ames com cepas de *Salmonella*

typhimurium (cepas: TA98 e TA100), com e sem ativador S9. O teste de Ames é um procedimento que avalia aumentos na taxa de mutações reversas (reversões) em linhagens bacterianas na presença de compostos químicos mutagênicos. As linhagens estudadas possuem alterações pontuais (por exemplo, remoção de aminoácidos específicos – como a histidina que é fundamental para o crescimento da colônia) que impossibilitam a formação de colônias típicas; entretanto, caso haja células com mutação reversa, será possível mensurar o número de colônias. Já para genotoxicidade foram realizados ensaios Rec com cepas de *Bacillus subtilis* (cepas: H17 e M45), com e sem ativador S9. O ensaio Rec avalia a diferença relativa de sobrevivência de uma cepa capaz de reparar o DNA (rec +) e sua cepa deficiente (rec-) na presença de um determinado composto. No nosso atual conhecimento, ainda não foram realizados testes *in vivo* (NAMIKI *et al.*, 1980; TAKIGAMI *et al.*, 2002; PÉREZ-PRIOR *et al.*, 2008; PÉREZ-PRIOR *et al.*, 2009; MADIGAN *et al.*, 2015).

A EFSA declarou que há informações limitadas sobre a ocorrência de produtos de reação dignos de preocupação toxicológica sob condições realistas de processamento e armazenamento de alimentos. Declarou, ainda, de forma desafiadora e animadora para a ciência, que mais pesquisas são necessárias para o melhor entendimento da problemática (EFSA, 2015).

Por meio de LC-MS/MS diferentes amostras de produtos cárneos cozidos foram avaliadas recentemente por nosso grupo de pesquisas para verificar a presença do DNMP. De forma alarmante, confirmou-se a presença do composto nas concentrações de 50,06 µg/kg em salsichas, de 18,47 µg/kg em mortadelas comerciais, 59,59 µg/kg em mortadelas produzidas em escala piloto com proporção 8:1 de nitrito de sódio e sorbato de potássio, 19,25 µg/kg em presunto cozido, 67,76 µg/kg em bacon, 22,64 µg/kg em linguiça calabresa e 13,20 µg/kg em lombo cozido (MOLOGNONI *et al.*, 2018).

O uso de agentes antioxidantes, como o ascorbato tem sido a maneira mais comum para controlar a formação de compostos nitrogenados em produtos cárneos (HERRMANN *et al.*, 2015). Outras estratégias também foram utilizadas para causar a desestabilização química e/ou inibição de compostos mutagênicos, como o uso de sucos vegetais, adição de cisteína, alteração de pH, uso de bactérias intestinais e adição de BAL (GRAY; RANDALL 1979; OSAWA *et al.*, 1986; SHU *et al.*, 1991; BINSTOK; CAMPOS; GERSCHENSON, 1998; PÉREZ-PRIOR *et al.* 2008; GUILLÉN *et al.*, 2009).

3.5 BACTÉRIAS NA SEGURANÇA DE ALIMENTOS

A deterioração de alimentos é um processo complexo. É causada por várias alterações bioquímicas que ocorrem tanto naturalmente quanto, e mais comumente, em decorrência de atividades microbianas (GRAM *et al.*, 2002). A deterioração microbiana constitui uma grande preocupação na indústria de alimentos, uma vez que provoca expressivas perdas econômicas e pode acarretar em sérias consequências para a saúde pública (KUMAR; ANAND, 1998).

Os processamentos térmicos e não térmicos são práticas comuns para a preservação de alimentos crus e seus produtos finais. O objetivo de qualquer tecnologia envolvida no processo de conservação de alimentos é evitar a deterioração e prolongar a vida útil (AKBAR *et al.*, 2016). Contudo, a aplicação de aditivos, quando os limites de segurança não são respeitados, podem causar contaminações químicas. Por isso, agências reguladoras devem: estabelecer limites para a adição desses compostos, inspecionar a presença desses compostos e restringir/ banir determinado aditivo com histórico de causador de danos à saúde. Porém, inesperadamente, algumas vezes a interação entre agentes de preservação mediante processamento, contato com compostos poliméricos migrantes da embalagem, contato com determinados compostos naturais do alimento, ou pior, o uso abusivo e inconsequente de aditivos podem formar compostos tóxicos (ATTERBURY, 2009; MASTOVSKA, 2013).

Dessa forma, com a existência de restrições quanto ao uso de aditivos em alimentos, muitas pesquisas foram realizadas para avaliar micro-organismos e compostos microbiológicos na segurança de alimentos. Uma solução possível é a biopreservação, esse método é eficaz por causa da fermentação que faz com que aconteça: a redução de pH (acidificação do meio), uma maior competição por nutrientes, produção de antibióticos, metabólicos, enzimas, agentes líticos e bacteriocinas. Para esse fim, as BAL são as principais linhagens de micro-organismos utilizados (O'SHEA *et al.*, 2013; GHALFI *et al.*, 2010; AKBAR *et al.*, 2016).

3.5.1 Bactérias ácido-láticas

As BAL recebem esta denominação devido à sua capacidade de converter carboidratos fermentáveis em, principalmente, ácido lático. As formas podem ser de

bastonetes, cocos ou tétrede. São bactérias gram-positivas, geralmente imóveis pela ausência de flagelos, não formam esporos, crescem em ampla faixa de temperatura entre 10 e 45 °C. Por não sintetizarem citocromos e porfirinas em geral não podem gerar ATP pelo gradiente de prótons, dessa forma, não utilizam oxigênio na produção de energia. Portanto, só conseguem obter ATP por via fermentativa. São positivas para a peroxidase, o que faz com que tolerem o oxigênio (aerotolerantes) (KHALID, 2011).

As BAL são amplamente conhecidas por suas aplicações industriais como iniciadoras da fermentação em alimentos, agentes de biocontrole e probióticos (DE DEA LINDNER, 2016). São geralmente reconhecidas como seguras (GRAS-status), conforme definido pela Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, 2013). Colonizam diversas matrizes alimentares como leite, carne, vegetais e grãos. Possuem grande influência sobre o perfil de produtos, resultando em melhora da textura, do sabor, do aroma, além disso, possuem a capacidade de inibir outros microrganismos de deterioração ou mesmo patógenos, prolongando a vida útil dos produtos e aumentando a segurança do alimento (DE DEA LINDNER *et al.*, 2008; PÉREZ-CHABELA; TOTOSAUS; GUERRERO, 2008; BEN SLIMA *et al.*, 2017; ZAROOUR *et al.*, 2017).

O grupo pode ser isolado de muitas matrizes alimentares e é composto por diversos gêneros de bactérias como: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, entre outros (DE DEA LINDNER *et al.*, 2013; ZAROOUR *et al.*, 2017).

O trato gastrointestinal de mamíferos é colonizado por muitas bactérias, algumas prejudiciais e outras promotoras da saúde: as cepas com propriedades benéficas, são fontes potenciais de probióticos, e muitas pertencem ao grupo das BAL. Essas propriedades vão desde barreiras naturais contra micro-organismos exógenos, degradação de polissacarídeos, síntese de vitaminas até a ação desintoxicante de carcinógenos do cólon humano (NOWAK; LIBUDZISZ, 2009).

Os efeitos protetores dos probióticos contra alguns tipos de carcinógenos foram obtidos de experimentos *in vitro*, estudos em animais e em voluntários humanos. Por exemplo, as BAL demonstraram prevenir danos ao DNA e mutações *in vitro* e inibiram o crescimento de células tumorais em culturas. Em testes com animais, a administração oral, em ratos, de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*

rhamnosus e *Bifidobacterium longum* demonstrou inibir danos ao DNA da mucosa do cólon, os danos foram induzidos por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), ou por 1,2-dimetil-hidrazina (DMH). Em outro estudo a administração de cepas de *B. longum*, na alimentação de ratos, reduziu significativamente a incidência de tumores de cólon e de fígado induzidos por HAA. Estudos sobre potenciais efeitos de prevenção do câncer em seres humanos são limitados; no entanto, alguns estudos relacionam o consumo de lactobacilos com a baixa concentração de compostos como as HAAs, PAHs e NOCs na urina e nas fezes, após a ingestão de carne tostada (ROWLAND, 1998; ROLDÁN *et al.*, 2008; STIDL *et al.*, 2008).

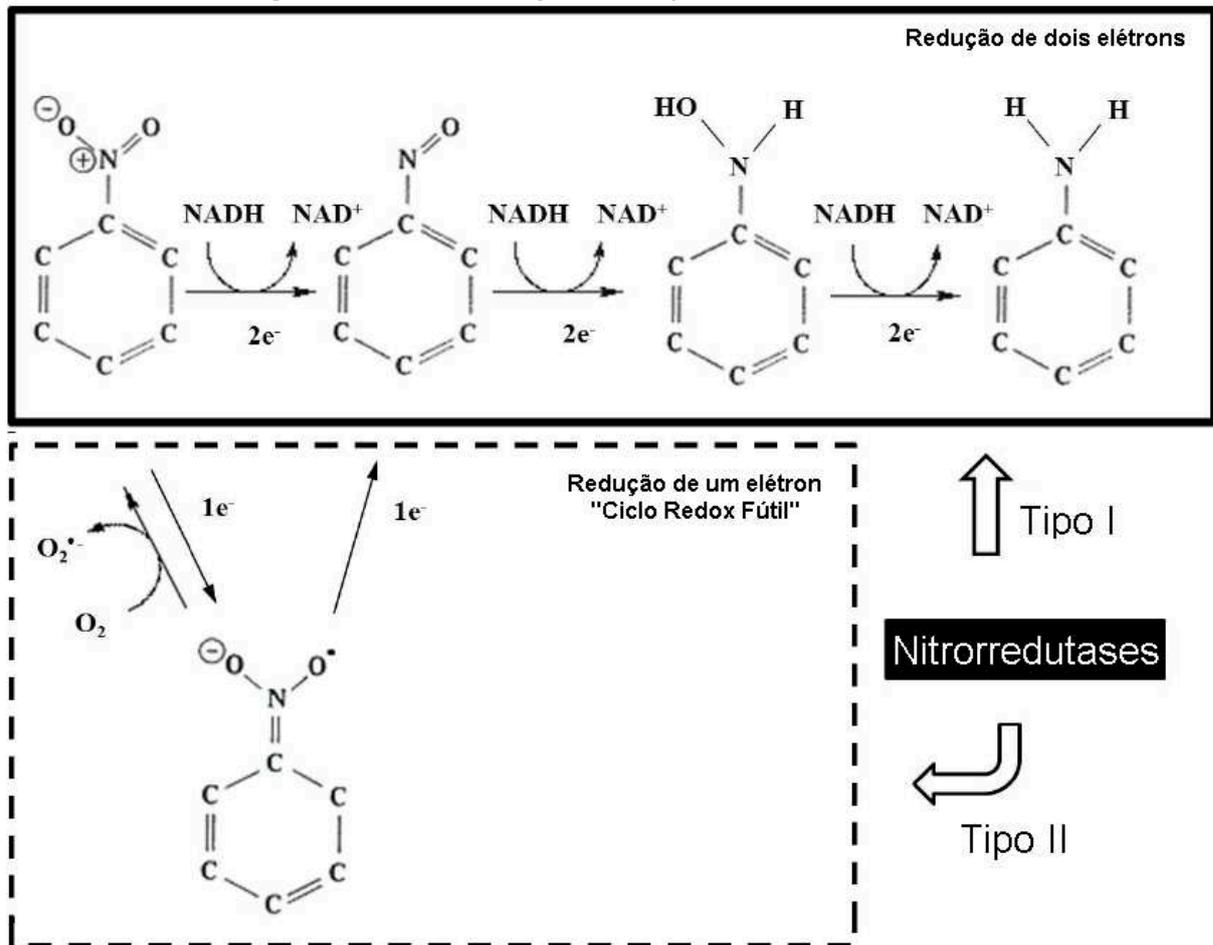
Dessa forma, as comunidades microbianas, presentes no trato gastrointestinal de mamíferos, teriam a capacidade de dissociar e/ou reduzir nitro compostos aromáticos, aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em metabólitos conjugados. Essas reações ocorrem por causa das enzimas β -glicuronidase, azorredutase e nitrorredutase (ROLDÁN *et al.*, 2008).

3.5.2 Nitrorredutases

A primeira observação de bactérias capazes de reduzir o grupamento nitro ocorreu em 1975, nesse experimento observou-se que um preparado celular contendo *Escherichia coli* reduziu o grupo nitro do cloranfenicol. Em 1976 extratos livres de células de *E. coli* foram estudados e com isso, confirmou-se a presença de uma flavoproteína específica para NADH que catalisava a nitrorredução de vários compostos nitro aromáticos (BRYANT; MCELROY, 1991).

As nitrorredutases compreendem uma família de proteínas com sequências conservadas e que foram agrupadas em conjunto com base na sua similaridade de sequência (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2011). Estas enzimas são capazes de catalisar a redução de compostos nitrosubstituídos usando mononucleotídeo de flavina (FMN) ou dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) como grupos prostéticos e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como agentes redutores. Os pesos moleculares encontrados variam de 26 até 760 kDa (BRYANT; MCELROY, 1991), e são divididas em dois tipos como mostrado na figura 1.

Figura 1 – Classificação dos tipos de Nitrorredutase.



Fonte: Adaptado De Oliveira, Bonatto e Henriques (2011).

As nitrorredutases do tipo I são as insensíveis ao oxigênio, ou seja, geram produtos finais nitrosos, hidroxilaminas e aminas na presença do oxigênio molecular. Essas enzimas catalisam a transferência sequencial de dois elétrons de NADPH (ou NADH) para os grupos nitro de compostos nitrosubstituídos. Esse tipo de nitrorredutase foi historicamente categorizado em grupo A e B, em função das enzimas NfsA ou NfsB, isoladas da *Escherichia coli*. A diferença entre esses grupos é o cofator utilizado para realizar a redução, grupo A utiliza apenas NADPH e o grupo B faz uso do NADH e do NADPH (BRYANT *et al.*, 1981; WILLIAMS *et al.*, 2015).

As nitrorredutases sensíveis ao oxigênio ou do tipo II, em anaerobiose, catalisam a redução de um único elétron do grupo nitro para produzir um radical nitro ânion e formando produtos como os descritos anteriormente. Por outro lado, quando essa reação ocorre aerobicamente o nitro ânion é reoxidado à estrutura original havendo a produção concomitante do ânion superóxido (ciclo fútil) (PETERSON *et al.*, 1979; ROLDÁN *et al.*, 2008).

Apesar do amplo espaço temporal desde a descoberta dessas enzimas e grande quantidade de material literário sobre nitrorredutases sensíveis ao oxigênio e insensíveis ao oxigênio, a base físico-química para a diferença entre os dois tipos de atividade, e a ação das nitrorredutases não foi elucidada (KODER *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E PADRÕES

Toda água utilizada nos experimentos de redução do DNMP e avaliação da nitrorredutase foi ultrapura produzida pelo sistema de purificação do sistema Integral 10 Milli-Q (Millipore SAS, Molsheim, França). Os reagentes utilizados eram de grau analítico, os solventes e os padrões cromatográficos eram pelo menos 98% puros. Nitrito de sódio, sorbato de potássio, 1-metilimidazol (1-MEI), ácido ascórbico, metanol, acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), 1,4-di-hidroxi-nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), dihidro-nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH), fosfato monobásico (KH₂PO₄), fosfato dipotássico (K₂HPO₄), ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina etanossulfônico (HEPES), albumina sérica bovina (BSA) e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi fornecido pela Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemanha). O caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), caldo de infusão cérebro-coração (BHI) e lactose foram fornecidos pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Soro fetal bovino (FBS), solução salina tamponada com fosfato (PBS), penicilina, estreptomicina e meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foram fornecidos pela Thermo Fisher GIBCO (Grand Island, EUA).

A síntese do DNMP foi realizada de acordo com Kito *et al.* (1978) e Namiki *et al.* (1981) e reproduzida em detalhes por nosso grupo de pesquisa (Molognoni *et al.*, 2018). O 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) foi obtido analiticamente seguindo o método descrito por Osawa *et al.* (1986). A solução de fortificação DNMP (0,01 e 1 mg / mL) foi preparada em DMSO.

4.2 REATIVAÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

As cepas de BAL foram fornecidas pelo Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Catarina (LB-UFSC), pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), pelo LFDA-RS (Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do MAPA), pela empresa SACCO Brasil e pela ATCC (*American Type Collection Culture*). Todas as linhagens empregadas foram culturas em potencial para a fermentação de carne. As culturas de estoque foram mantidas em MRS

(suplementado ou não com lactose) ou caldo BHI (infusão cérebro coração) com glicerol a 20% (p/v) a -80 °C. Todos os micro-organismos, assim como suas respectivas identificações e meios de cultura utilizado para reativação estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 – Micro-organismos utilizados no estudo e as respectivas identificações.

Micro-organismo	Identificação	Meio de Cultura
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 12046	MRS
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014	MRS
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	MRS
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 19435	MRS + lactose
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Isolado do LYOCARNI RHM-33 (SACCO Brasil)	BHI
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Isolado do LYOCARNI SXH-01 (SACCO Brasil)	BHI
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	LB-UFSC 0014	MRS
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LB-UFSC 0017	MRS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LB-UFSC 0018	MRS
<i>Lactobacillus casei</i>	LB-UFSC 0019	MRS
<i>Lactobacillus sakei</i>	LB-UFSC 0022	MRS
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LB-UFSC 0025	BHI
<i>Weissella minor</i>	LB-UFSC 4458	MRS

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

As cepas *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus thermophilus* e *Weissella minor* foram reativadas em seus respectivos caldos de cultura (MRS, MRS com lactose ou BHI) a 37 ± 1 °C, em estufa bacteriológica (DL-CBE42L, De Leo, Brasil) durante 48 h, e também repicadas nos mesmos meios contendo 0,2% de ágar. Para avaliar o crescimento, a cada duas horas foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 600 nm (Evolution 60S, Thermo

Scientific, EUA) e contagens das células viáveis nas respectivas placas (BEGOT *et al.*, 1996; SHAH, 2000).

4.3 PRODUÇÃO DA AMOSTRA DE MODELO PRODUTO CÁRNEO

Amostras de referência de mortadela foram preparadas sob condições específicas de processamento, com o objetivo de obter DNMP endógeno, segundo a metodologia de Molognoni *et al.* (2018). A formulação experimental de mortadela consistiu em carne de frango desossada mecanicamente (60%), carne de porco (26%), amido de mandioca (5,5%), proteína de soja texturizada (3,5%), cloreto de sódio (3,5%), sacarose (0,6%), e pirofosfato de sódio (0,3%). As amostras foram estocadas a -80 °C até as análises.

4.4 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE INTERAGIR COM O DNMP

A degradação do DNMP pela ação dos microrganismos foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Shu *et al.* (1991), com adaptações. Todas as 13 culturas foram reativadas à noite (14 h) em meio de cultura específico (BHI, MRS ou MRS com lactose) a 37 ± 1 °C. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 3.800 g por 10 min a 4 °C. O sedimento obtido foi lavado com 10 mL de solução tampão HEPES 0,1 mol/L (pH 7,6), e depois ressuspenso em 10 mL da mesma solução de HEPES. A densidade celular utilizada no experimento foi fixada em aproximadamente 10^7 células/mL e avaliada por análise turbidimétrica utilizando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) no comprimento de onda de 600 nm.

Para avaliar a interação das diferentes BAL com o DNMP, uma alíquota da suspensão de Hepes e BAL (1 mL) foi utilizada para o inóculo de 100 µg/L de DNMP. As suspensões foram incubadas por 4 h a 37 ± 1 °C. A reação foi parada em um banho de gelo e submetida à análise conforme descrito na seção “Instrumentação e métodos analíticos”. Depois, os resultados foram comparados através da capacidade de reduzir a concentração de DNMP, de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ DNMP Residual} = \left(\frac{\text{TotalDNMP}_1}{\text{TotalDNMP}_2} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: DNMP1 total: quantidade de DNMP fortificada no experimento em $\mu\text{g/L}$;
 DNMP2 total: quantidade de DNMP após incubação com o microrganismo em $\mu\text{g/L}$.

4.5 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP A NMAP

Essa etapa utilizou um desenho experimental semelhante ao utilizado na seção anterior, excluindo os micro-organismos que não interagiram com o DNMP. Além disso, nessa etapa foi adotado um critério mais específico e seletivo. Com base nos sinais analíticos (em cps) do DNMP e do NMAP obtidos por medições de LC-MS/MS, um fator de conversão empírico foi calculado para descrever a capacidade dos microrganismos em biodegradar o DNMP.

Cada microrganismo selecionado na primeira etapa e, de forma comparativa, uma solução de ácido ascórbico a 1%, foi submetido a um gradiente de concentração de DNMP na faixa de 50 a 5000 $\mu\text{g/L}$ e incubado conforme descrito na seção anterior. A linearização do gráfico obtido pelo sinal gerado em NMAP cps, pela concentração fortificada ($\mu\text{g/L}$ de DNMP) para cada micro-organismo, foi realizada com o *software* Analyst versão 1.6.2 de Sciex (Framingham, EUA).

A pureza de cada pico cromatográfico foi considerada. A derivada da relação funcional gerada por cada microorganismo foi dividida pela derivada de referência obtida por modelo linear no eixo x ($\mu\text{g/L}$ de DNMP) versus eixo y (cps de DNMP). Assim, o fator empírico, fundamental para avaliar a conversão do DNMP a NMAP uma vez que não existe padrão analítico do NMAP, foi calculado através da equação 2:

$$\text{Fator Empírico} = \frac{f'(x1) = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{f(x1+h) - f(x1)}{h}}{f'(x2) = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{f(x2+h) - f(x2)}{h}} \quad (2)$$

Em que: $f'(x1)$: a derivada da razão funcional de concentração em $\mu\text{g/L}$ de DNMP versus cps de NMAP, em unidades de cps $\mu\text{g/L}$; $f'(x2)$: a derivada da razão funcional de concentração em $\mu\text{g/L}$ de DNMP versus DNMP cps, também em cps $\mu\text{g/L}$.

4.6 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP EM MODELO DE MATRIZ CÁRNEA

Essa etapa utilizou um desenho experimental semelhante ao utilizado na seção anterior, removendo os micro-organismos que apresentaram baixa capacidade de conversão do DNMP a NMAP e com diferença do inóculo.

O inóculo das BAL suspenso em HEPES foi realizado em amostras de $2,0 \pm 0,1$ g do modelo cárneo e homogeneizada até formar uma pasta. Este procedimento foi repetido adicionando 100 $\mu\text{g/L}$ de DNMP. Os controles de recuperação de branco e de analito foram preparados sem o inóculo microbiano e submetidos aos mesmos procedimentos. As amostras foram incubadas a 37 ± 1 °C e a reação foi parada em um banho de gelo e submetida à análise conforme descrito na seção 4.9.

4.7 EXTRAÇÃO DO MATERIAL INTRACELULAR BACTERIANO

A extração do material intracelular foi realizada de acordo com Shrestha, Holland e Bundy (2012), com adaptações. Após o crescimento da cepa que apresentou a maior capacidade de converter DNMP em NMAP, as células foram colhidas por centrifugação a 4000 *g* a 4 °C por 10 min. Para a preparação do extrato intracelular bacteriano, os sedimentos celulares foram lavados duas vezes com 10 mL de solução tampão HEPES 20 mmol/L (pH 7,4) e ressuspensos em 1 mL da mesma solução. A parede celular bacteriana foi rompida com desmembrador sônico modelo 100 (Fisher Scientific, Hampton, EUA), com sonda, por 30 s, na intensidade média, alternando com 30 s sem sonicação em banho de gelo. Este processo foi repetido dez vezes. De forma comparativa, para a sonicação, foi realizada a extração do material intracelular por meio de uma suspensão de células com esferas de vidro de 0,1 mm de diâmetro (Scientific Industries, Bohemia, NY, EUA) na proporção de 50% (p/v). A suspensão de células e esferas foi agitada dez vezes em vórtice de mesa, Fisher Vortex Genie 2 (Scientific Industries), a 3200 rpm por 1 min com um período de resfriamento de 1 min entre cada agitação.

Os detritos celulares das diferentes formas de extração foram removidos por centrifugação a 20.000 *g* a 4 °C por 20 min, e o sobrenadante foi usado como o extrato livre de debris celular. As extrações foram comparadas pela concentração proteica dos extratos livre de células (Bradford, 1976).

4.8 AVALIAÇÃO DA NITRORREDUTASE DO EXTRATO INTRACELULAR

A atividade da nitrorredutase foi baseada nos métodos de Shu e colaboradores (1991) e de Rau e Stolz (2003) com adaptações. Foram realizados dois experimentos, o primeiro avaliou a preferência por cofatores e o segundo avaliou a importância da presença de oxigênio. O ensaio foi realizado em um leitor de placas de microtitulação de 96 poços (Infinite 200pro, Tecan, Männedorf, Suíça) em um meio contendo 100 mmol/L de fosfato de potássio, 0,1 mmol/L de EDTA, 0,5 mmol/L de NADH ou NADPH e 0,5 mmol/L DNMP.

A atividade da nitrorredutase de foi avaliada com base na taxa de diminuição da absorbância a 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ mol/L cm}$) dentro de 10 a 15 min da reação, a 35 °C. Já a avaliação da influência da presença do oxigênio, os experimentos foram realizados em anaerobiose utilizando sistema de geração de atmosfera livre de oxigênio (Fisher Scientific, Hampton, EUA).

4.9 INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS ANALÍTICOS

Para a análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), um espectrômetro de massa do tipo triplo quadruplo 5500 Sciex (EUA) acoplado ao cromatógrafo líquido 1290 Infinity Agilent Technologies, Inc. (Waldbronn, Alemanha) foram utilizados. Fonte de ionização por eletro pulverização (ESI) e monitoramento múltiplo de reações (MRM) em modo positivo e negativo foram empregados através dos softwares Analyst e MultiQuant (Sciex, EUA). Uma fase estacionária contendo di-isopropil-3-aminopropil silano ligado a sílica hidroxilada Zorbax 300SB-CN (150 mm x 4,6 mm id, tamanho de partícula de 5 μm , 300 Å) foi empregada na separação, fornecida pela Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, EUA).

As análises do DNMP foram realizadas de acordo com a metodologia validada descrita anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Molognoni *et al.*, 2018), adaptado para o NMAP. Para este propósito, a molécula foi otimizada no espectrômetro de massa, infundindo o composto em uma vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ a $\pm 50 \mu\text{g}/\text{L}$. A ionização foi realizada por eletro pulverização (ESI) no modo positivo. A

abordagem de detecção foi realizada por monitoramento de reação múltipla (MRM), pela seletividade no tempo de retenção em fase reversa ciano (CN-RP), pela razão entre os íons de fragmentação e o íon precursor da molécula. O NMAP e o DNMP foram monitorados pelos fragmentos do DNMP, transição 126,0 m/z (perda do NO₂), transição 110,9 m / z (perda do NO₂ e CH₃) e transição 66,8 m/z (perda do NO₂, NO₂ e CH₃).

Para a análise do modelo de produtos cárneos, o método de extração foi realizado de acordo com Molognoni *et al.* (2018). Para as amostras submetidas ao estudo *in vitro*, as soluções de HEPES e biomassa foram filtradas usando membranas de filtro de PTFE com tamanho de poro de 0,22 µm. Alíquotas de 200 µL foram transferidas diretamente para frascos de vidro com inserções e injetadas no sistema LC-MS/MS.

4.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT

A citotoxicidade do composto DNMP foi testada pelo ensaio MTT contra a linha celular de fibroblastos McCoy B (fibroblastos de *Mus musculus*) fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). A viabilidade celular foi estimada de acordo com a metodologia de Mosmann (1983).

Primeiramente, as células McCoy foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, meio suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), mantidas a 37 °C sob atmosfera de CO₂ de 5% com 95% de umidade do ar. Após o estágio de confluência, as células foram plaqueadas (1 x 10⁴ células/poço) em uma placa de microtitulação de 96 poços à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em uma incubadora de CO₂ (5%) por 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com diferentes concentrações de DNMP (11,72; 23,44; 46,87; 93,75; 187,50; 375,00; 750,00; 1500,00 nM) e o controle negativo foi tratado com DMSO (1%), por 24 e 48 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas MTT (0,5 mg/mL) por 2 h.

A reação foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas multimodo modelo Infinite 200 pro (Tecan, Männedorf, Suíça). O ensaio foi expresso em IC₅₀, que representa o valor correspondente à concentração em que o composto é capaz de induzir a morte de 50% das células foi determinado no software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

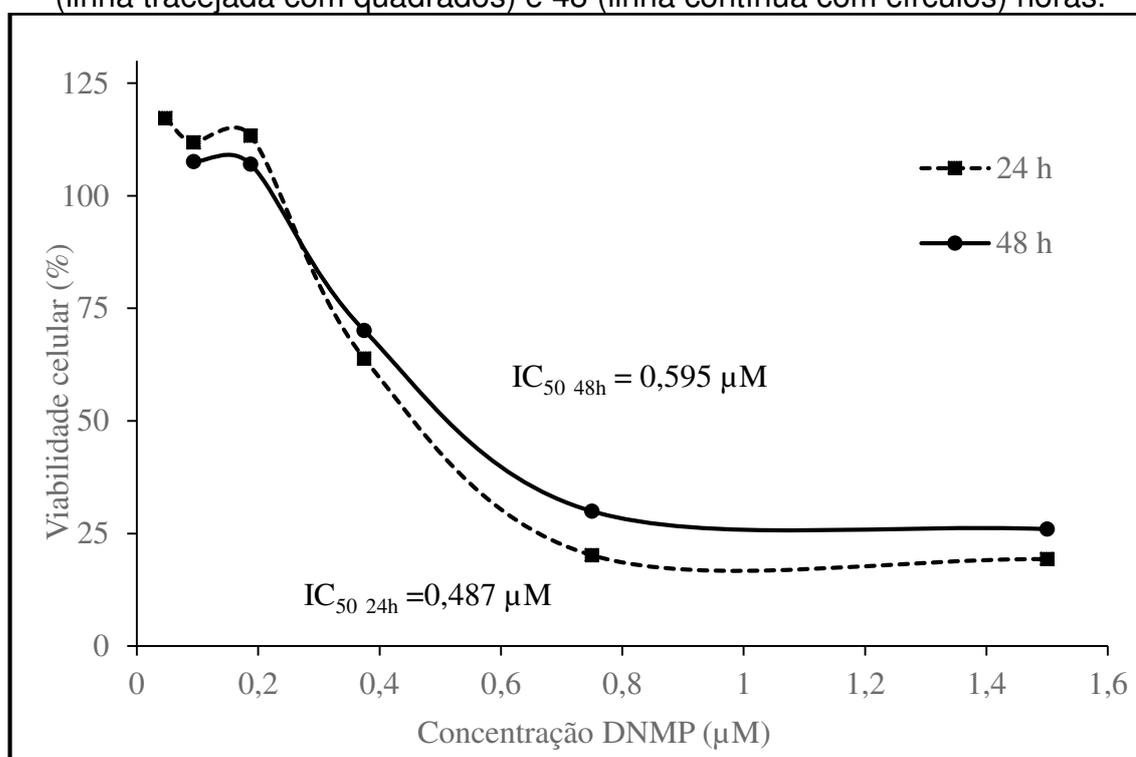
Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicatas e os resultados expressos em média \pm desvio padrão. As análises estatísticas dos dados foram realizada no software STATISTICA versão 7.0 (STATSOFT, 2011). Para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as análises, as variâncias foram comparadas pelo teste de Tukey (ANOVA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CITOTOXICIDADE DO DNMP

Após 24 h de incubação, a concentração de DNMP que causou a morte de 50% das células vivas foi de 0,487 μM , enquanto em 48 h a concentração foi de 0,595 μM (figura 2). Esse resultado, de forma alarmante mostra que o DNMP é uma molécula com elevada citotoxicidade, uma vez que concentrações na ordem de parte por bilhão do composto causaram a morte celular.

Figura 2 – Resultados de citotoxicidade usando o ensaio de viabilidade MTT em 24 (linha tracejada com quadrados) e 48 (linha contínua com círculos) horas.



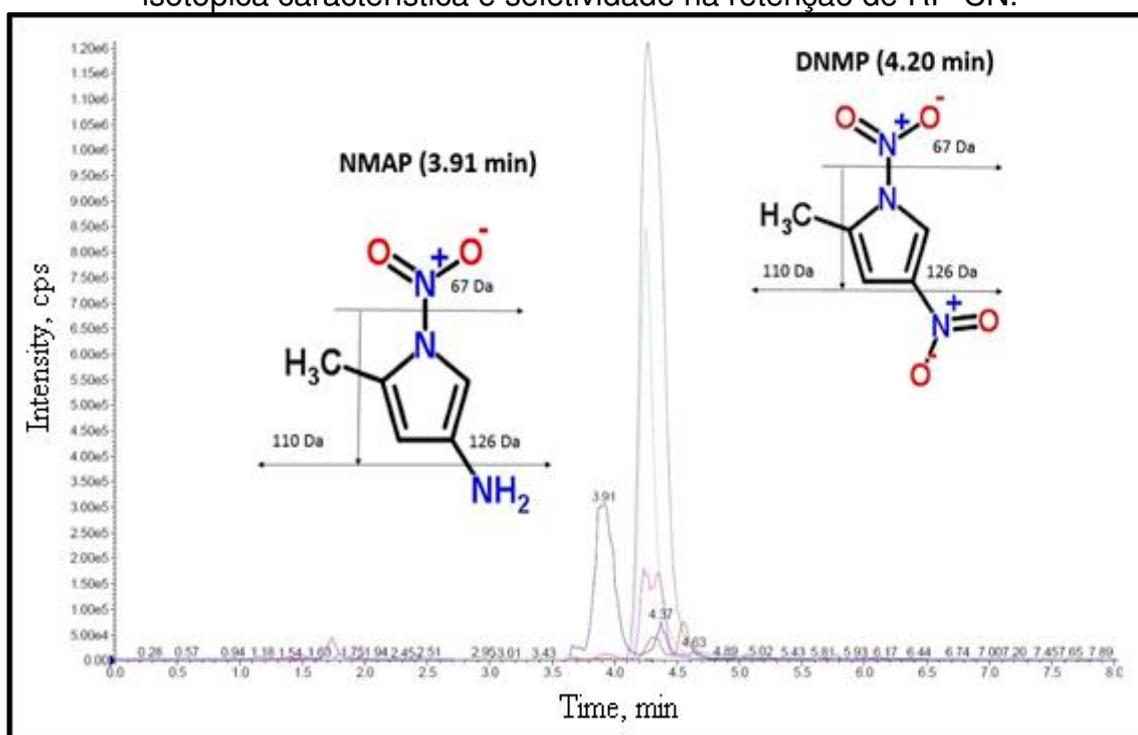
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

A citotoxicidade do DNMP se mostrou 20 vezes superior à do composto 7-metil-2-fenil-3-(fenilselenil)-imidazo[1,2-a]piridina, uma substância pouco seletiva utilizada contra o câncer de mama, mas que ataca outras linhagens celulares não cancerosas, como fibroblastos de McCoy B (ALMEIDA, 2018). Outro problema observado foi que, os valores de IC_{50} de 24 ou de 48 h são concentrações respectivamente de 83,28 e 101,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$, esses valores foram um pouco superiores aos detectados nas amostras de produtos cárneos no trabalho de Molognoni *et al.* (2018).

5.2 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE INTERAGIR COM O DNMP

O potencial de biodegradação *in vitro* do DNMP por micro-organismos foi avaliado utilizando diferentes BAL. As linhagens utilizadas na triagem eram de gêneros comumente relacionados à fermentação de produtos cárneos, como *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pediococcus spp.* e *Weissella sp.* (DE DEA LINDNER 2016; ZAROOUR *et al.* 2017). O fator usado para selecionar a BAL foi satisfatório - o que reflete a seletividade demonstrada na figura 3.

Figura 3 – Condições teóricas e experimentais que garantem a eficácia do modelo de detecção DNMP e NMAP: perfil de fragmentação igual em MS/MS, razão isotópica característica e seletividade na retenção de RP-CN.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Em relação ao DNMP, no nosso conhecimento, nenhum estudo, até os dias de hoje, realizou uma seleção de BAL para biodegradar esse composto em alimentos. Shu *et al.* (1991) avaliaram algumas bactérias intestinais na tentativa de reduzir o DNMP. Os melhores resultados foram obtidos em anaerobiose e a conversão apresentou valores superiores a 20%, valores baixos quando comparado aos

encontrados pelos melhores resultados da seleção bacteriana deste trabalho. Isso significa que as bactérias intestinais, que desempenham um papel importante na proteção do organismo, agindo sob metabólitos mutagênicos, têm baixa capacidade de conversão. Além disso, as carnes processadas estão relacionadas ao câncer de estômago, dessa forma, a ação das bactérias intestinais ocorreria ineficientemente contra o problema.

De acordo com a equação de % Residual de DNMP, a BAL mais eficiente nessa etapa experimental foi o *Lb. acidophilus* que deixou um resíduo de 0,37% de DNMP, seguido por *Lb. fermentum* com 0,49%, *Lc. lactis* com 0,49%, *P. pentosaceus* com 0,59%, *S. xylosus* com 0,65%, *Lb. paracasei* com 0,66%, *Lb. casei* com 0,81%, *Lb. ramosus* com 1,36%, *Lb. plantarum* com 1,55%, *Lb. sakei* com 2,02%, *St. thermophilus* com 22,23%, *Lb. helveticus* com 28,67% e *W. minor* com 100%. Os resultados obtidos na primeira etapa experimental foram fundamentais para inferir a capacidade de interação dos microrganismos com DNMP; de fato, 92,31% dos microrganismos selecionados reagiram com o composto. Por esse motivo, determinou-se que as bactérias com capacidade redutora inferior a 98% seriam descartadas para os testes a seguir, portanto, das 13 bactérias utilizadas, dez passaram para a próxima etapa.

5.3 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP A NMAP

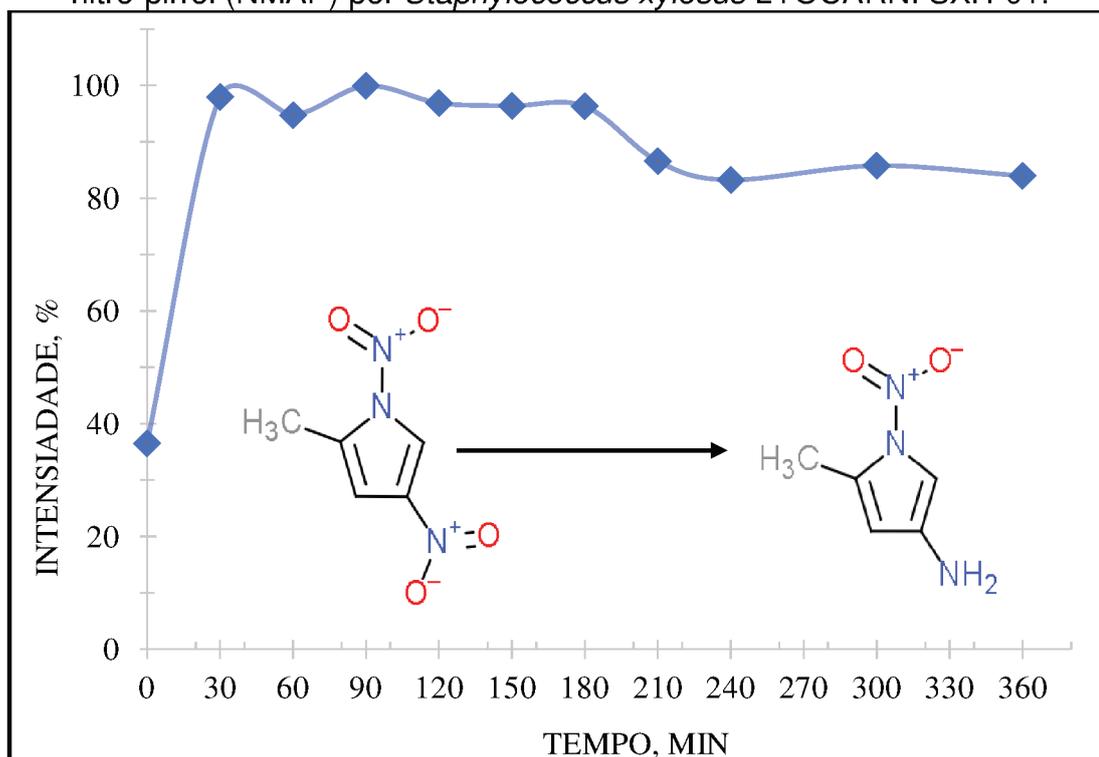
Na segunda etapa experimental, foi possível verificar que o uso de BAL demonstrou ser uma maneira eficaz de converter *in vitro* o composto DNMP em NMAP. É a primeira vez que uma abordagem de seleção bacteriana química-biotecnológica é usada para verificar a bioconversão do DNMP por BAL. O sucesso desse fator ocorreu devido a três condições teóricas e experimentais fundamentais: os critérios de referência e detecção (perfil de íons de fragmentação iguais em MS/MS) eram os mesmos, a razão característica de íons para o precursor e a seletividade na retenção em CN-RP (alteração no tempo de retenção dos compostos) (figura 3).

O valor do fator 1 significa um resultado perfeito. Isso raramente acontece, mesmo sob condições ideais de conversão molecular, porque a pureza das substâncias não é 100% e as reações químicas não são completas. Além disso, outros

produtos são gerados e o modelo matemático propaga incertezas experimentais e teóricas de equipamentos e analistas.

A BAL mais eficiente nessa etapa foi o *S. xylosus* LYOCARNI SXH-01, que apresentou um fator de conversão de 0,62. Essa capacidade de biodegradação foi observada em menos de 30 min como demonstrado na figura 4.

Figura 4 – Conversão de 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) por *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01.

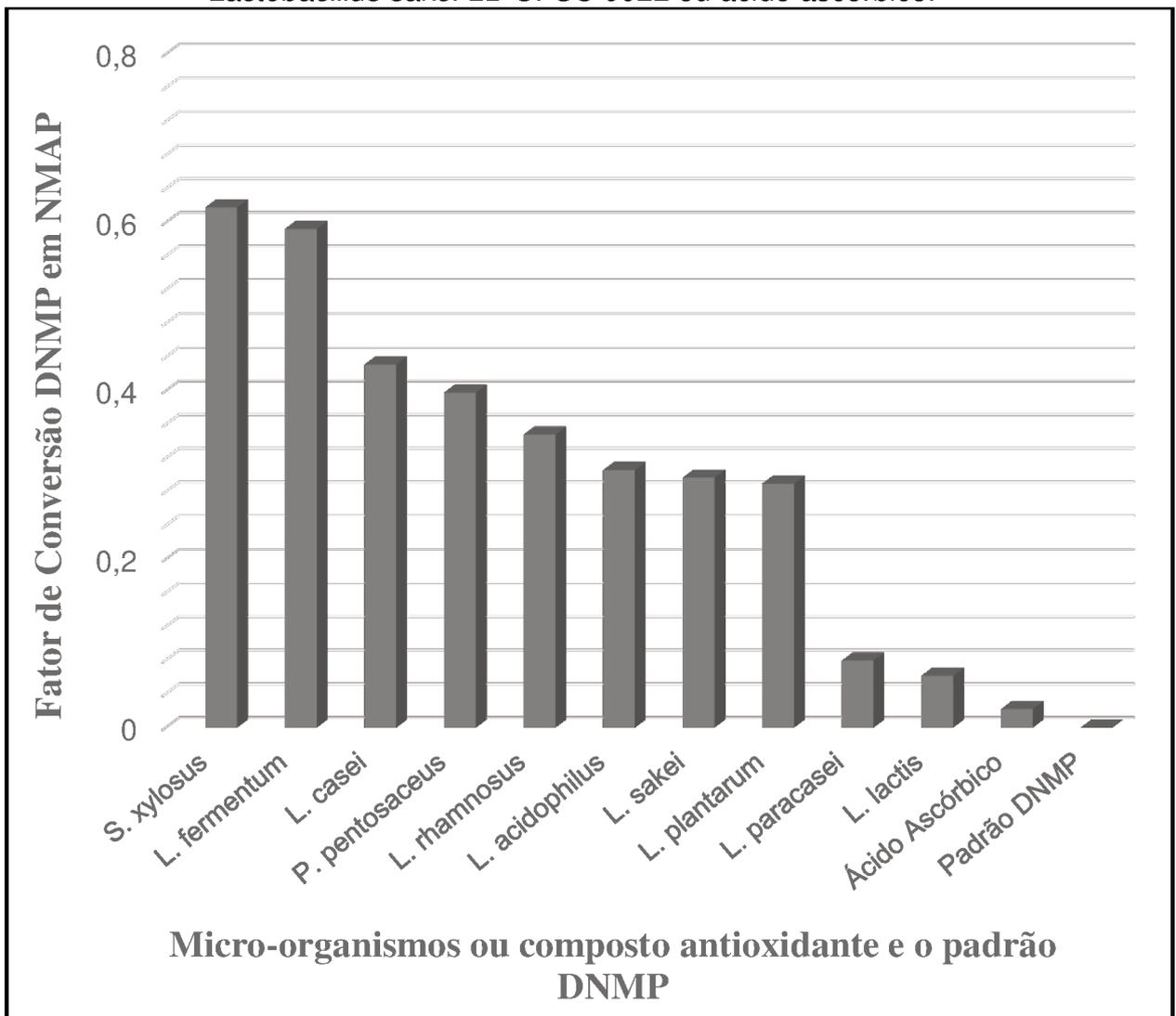


Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

De acordo com a Equação Empírica, as BAL com menores fatores de conversão foram: *Lb. fermentum* (0,60), *Lb. casei* (0,43), *P. pentosaceus* (0,40), *Lb. rhamnosus* (0,34), *Lb. acidophilus* (0,31), *Lb. sakei* (0,30), *Lb. plantarum* (0,29), *Lb. paracasei* (0,08) e *Lc. lactis* (0,06).

O antioxidante ácido ascórbico foi testado de forma comparativa e apresentou um fator de conversão de 0,02. A comparação dos fatores de conversão do BAL e antioxidante pode ser visualizada na figura 5. Após essa segunda seleção, as BAL que apresentaram fator de conversão superior a 0,40 foram aplicadas no modelo de carne processada.

Figura 5 – Fatores de conversão 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) obtidos pela biodegradação de DNMP por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435, *Pediococcus pentosaceus* isolado do LYOCARNI RHM-33, *Staphylococcus xylosum* isolado do LYOCARNI SXH-01, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LB-UFSC 0014, *Lactobacillus fermentum* LB-UFSC 0017, *Lactobacillus acidophilus* LB-UFSC 0018, *Lactobacillus casei* LB-UFSC 0019 e *Lactobacillus sakei* LB-UFSC 0022 ou ácido ascórbico.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

O ácido ascórbico apresentou fator de conversão ineficiente quando comparado aos fatores obtidos pelas BAL. O uso comparativo foi baseado no trabalho de Binstok, Campos e Gerschenson (1996), em que o antioxidante foi capaz de diminuir a concentração de DNMP para níveis indetectáveis. No entanto, deve-se considerar que o limite de detecção apresentado no trabalho era de 500 µg/kg, uma concentração possivelmente alta, pois, segundo Molognoni *et al.* (2018), a

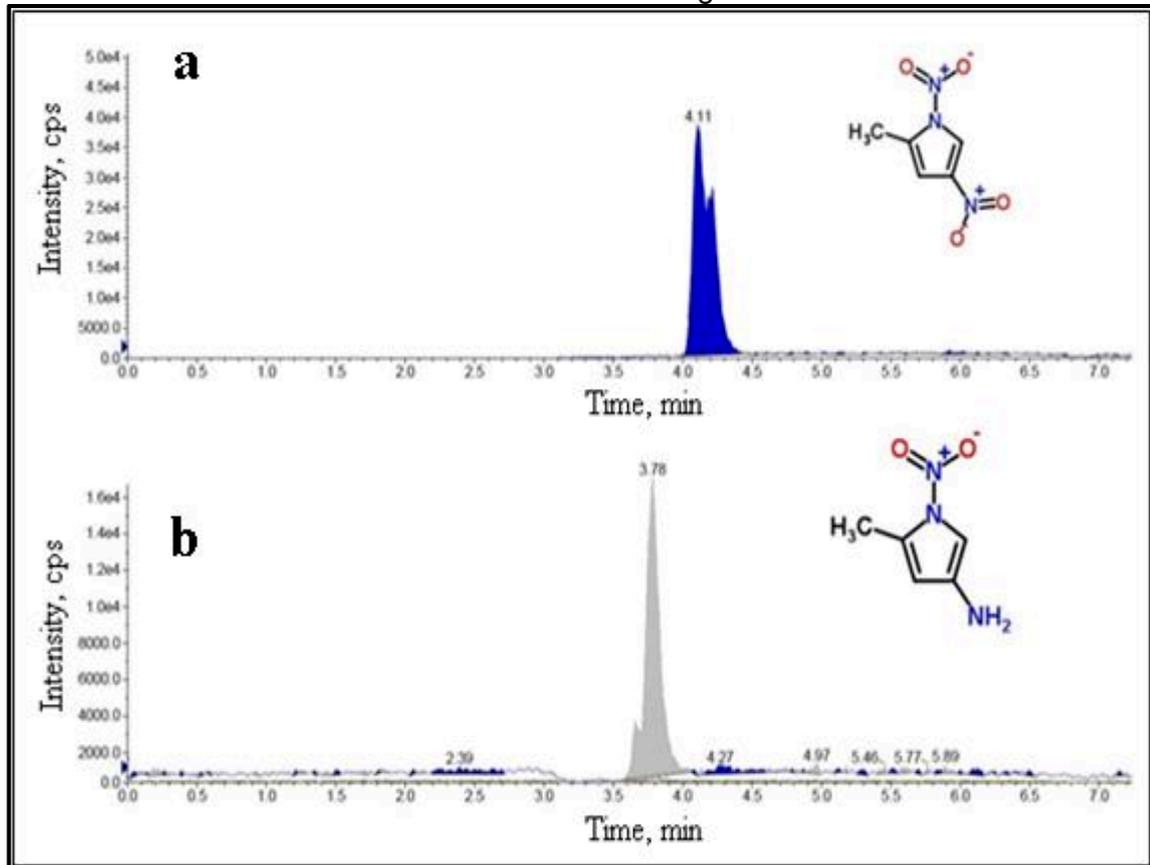
concentração média de DNMP detectada em produtos à base de carne processada foi de aproximadamente 100 µg/kg. Diferentemente do DNMP, o NMAP não mostrou mutagenicidade no teste de Ames, com ou sem um ativador S-9, como demonstrado por Osawa *et al.* (1986), provavelmente devido ao grupo c-nitro ser convertido em um grupo amino.

5.4 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM CAPACIDADE DE REDUZIR O DNMP EM MODELO DE MATRIZ CÁRNEA

O uso de BAL, com aptidão tecnológica, como cultura inicial na fermentação de produtos à base de carne, provoca alterações nas características sensoriais e melhor disponibilidade de nutrientes (DI GIOIA, 2016). As BAL agem na preservação da matriz devido à produção de metabólitos antimicrobianos e à competição com bactérias patogênicas e / ou deteriorantes (efeito Jameson) (CORNU *et al.*, 2011; PILEVAR; HOSSEINI, 2017). Um critério fundamental na escolha da cultura iniciadora de BAL é a robustez da viabilidade celular durante o processamento e armazenamento (DE DEA LINDNER, 2016). Empregando mecanismos moleculares e enzimáticos, as células microbianas podem criar respostas contra os agentes oxidantes da matriz na defesa de suas macromoléculas, na proteção contra a agregação celular e na conservação de energia (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016). Assim, mecanismos de proteção bacteriana podem ser indiretamente utilizados para biodegradar compostos tóxicos para os consumidores em alimentos fermentados (MUKHERJEE; ROKITA, 2015).

Para a aplicação dos microrganismos na etapa do modelo cárneo (mortadela), as três BAL (*S. xylosus* LYOCARNI SXH-01, *Lb. fermentum* e *Lb. casei*) que apresentaram os maiores fatores de conversão *in vitro* de DNMP em NMAP foram utilizados separadamente. Na condição testada, as três espécies converteram todo o DNMP presente na mortadela em NMAP (Figura 6).

Figura 6 – Conversão do 2-metil-1,4-dinitro-pirrol (DNMP) (a) em 2-metil-4-amino-1-nitro-pirrol (NMAP) (b) na matriz de mortadela inoculada com *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01 com sinal de intensidade de detecção na mesma ordem de magnitude.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Guillén *et al.* (2009) observaram que *Lb. plantarum* quando na presença de compostos oxidantes como 4-benzoato e 2,4-dinitrobenzoato, excretou a enzima PnbA redutase. Essa proteína, que também está presente em outras BAL, reage com diferentes agentes oxidantes, evitando a formação de radicais livres e espécies que interagem com o DNA e outras macromoléculas. Lo Pei-Ren *et al.* (2002) demonstraram que *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium longum* apresentaram atividade contra o composto tóxico benzo[a]pireno. Orrhage *et al.* (1994) demonstraram que algumas bactérias como *Lc. lactis*, *Lactobacillus cremoris*, *Clostridium perfringens*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *B. longum*, *Bacteroides fragilis* e *Escherichia coli* foram capazes de se ligar a HAAs como 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-2) e aos mutagênicos 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx) e 2-amino-1-metil-6-metilimidazo[4,5-f]piridina (PhIP). Bartkiene *et al.* (2017) observaram que *Lb. sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *P.*

pentosaceus, quando aplicados na superfície de embutidos, eram capazes de reduzir a contaminação por benzo[*a*]pireno e criseno, cadaverina, espermidina e putrescina.

5.5 EXTRAÇÃO DO MATERIAL INTRACELULAR BACTERIANO

O extrato intracelular foi produzido com o micro-organismo que apresentou a maior capacidade de conversão de DNMP no modelo cárneo, o *S. xylosus* biótipo LYOCARNI SXH-01. O método da sonicação apresentou uma concentração de $0,95 \pm 0,05$ mg/mL de proteína enquanto que a extração utilizando esferas de vidro e vórtice de mesa apresentou $0,62 \pm 0,03$ mg/mL. Fazendo uso de uma prensa francesa, Shu *et al.* (1991) obteve uma concentração proteica de 1,1 mg/mL no extrato de *Bacteroides thetaiotaomicron*. No trabalho de Sherestha, Holland e Bundy (2012) a concentração proteica do extrato livre de células de *E. coli*, produzido por sonicação, foi de 0,92 mg/mL. Dessa forma, para avaliar a ação da enzima nitrorredutase do extrato decidiu-se utilizar o método que apresentou a maior concentração de proteínas. Deve-se ressaltar que o parâmetro de escolha foi quantitativo e não qualitativo, uma vez que não foram empregadas técnicas eletroforéticas que poderiam indicar a presença da enzima.

5.6 AVALIAÇÃO DE NITRORREDUTASE DO EXTRATO INTRACELULAR

Uma das razões que motivou a investigação quanto a presença da enzima nitrorredutase foi a presença do grupo amino na molécula de NMAP (SHU *et al.*, 1991). A taxa de redução do DNMP foi avaliada, em sistemas aeróbios e anaeróbios, monitorando a diminuição (oxidação) do NADH ou do NADPH e expressa em nmol/mg de proteína/min (tabela 1). As nitrorredutases insensíveis ao oxigênio geralmente contêm mononucleotídeo de flavina (FMN) no sítio ativo e utilizam NADH ou NADPH como substrato redutor (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2011).

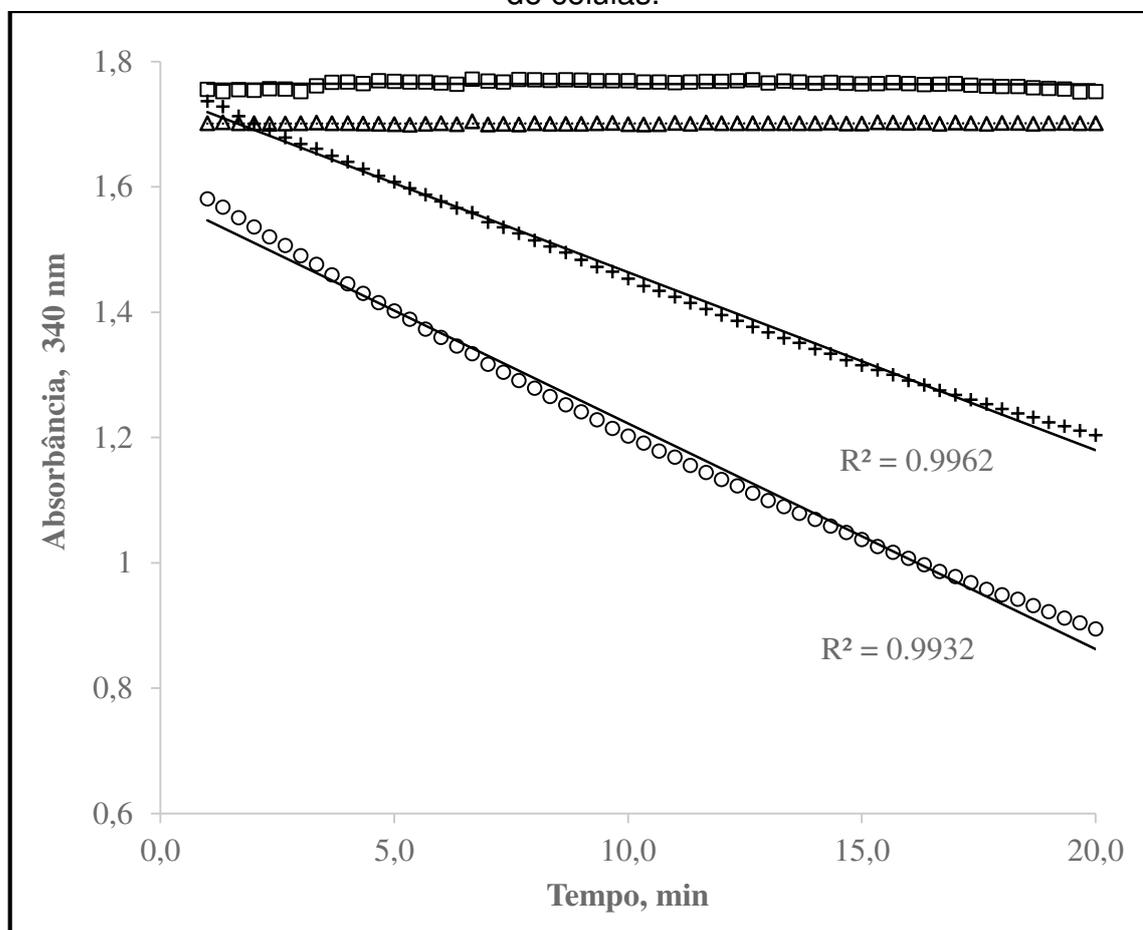
Tabela 1 – Taxa de redução de DNMP em condição aeróbia e anaeróbia pelo extrato livre células da *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01 na presença ou ausência de cofatores.

Cofator	Taxa de redução do DNMP (nmol/mg de proteína/min)
Ausente	0
Aerobiose NADH (0,5 mmol/L)	30,321 ± 3,186 ^a
Aerobiose NADPH (0,5 mmol/L)	22,411 ± 1,684 ^b
Anaerobiose NADH (0,5 mmol/L)	28,770 ± 2,341 ^a
Anaerobiose NADPH (0,5 mmol/L)	20,332 ± 1,600 ^b

Letras diferentes na coluna significam variação significativa ($p < 0,05$);
 Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

A figura 7 demonstra o decaimento da absorbância do NADH e NADPH reduzindo o DNMP utilizando o extrato livre de células da *S. xylosus* LYOCARNI SXH-01, quando o extrato não foi adicionado o decaimento das absorbâncias foi insignificante. A nitrorredução é uma reação necessária para a mutação de bactérias pela quebra do DNA, bem como para a ligação covalente de intermediários de redução de nitro compostos a proteínas e DNA (AKIVA *et al.*, 2017). A preferência por determinado cofator (uso de NADH e/ou NADPH) permite classificar a enzima nitrorredutase insensível ao oxigênio em duas classes (A e B) (DE OLIVEIRA; BONATTO; HENRIQUES, 2011).

Figura 7 – Decaimento na absorbância de NADH (círculos), NADPH (cruzamentos) na presença do extrato livre de células de *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01 e DNMP; NADH (triângulos) e NADPH (quadrados) na ausência do extrato livre de células.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Analisando o trabalho de Shu *et al.* (1991), quando o extrato intracelular de *B. thetaiotaomicron* foi utilizado sem a adição de cofator, não ocorreu reação, o que também foi observado no trabalho atual. No entanto, nesse mesmo trabalho, adicionando NADH ou NADPH, as taxas de redução obtidas foram de 2,209 e 1,945 (nmol/min/mg de proteína), respectivamente. Esses valores apresentaram magnitude 10 vezes menor que os apresentados na tabela 1. Os experimentos foram testados em sistema anaeróbico, mas quando foram conduzidos na condição aeróbica, a taxa de redução apresentou resultados insignificantes, caracterizando a enzima como uma nitrorredutase sensível ao oxigênio (tipo II) (Shu *et al.*, 1991).

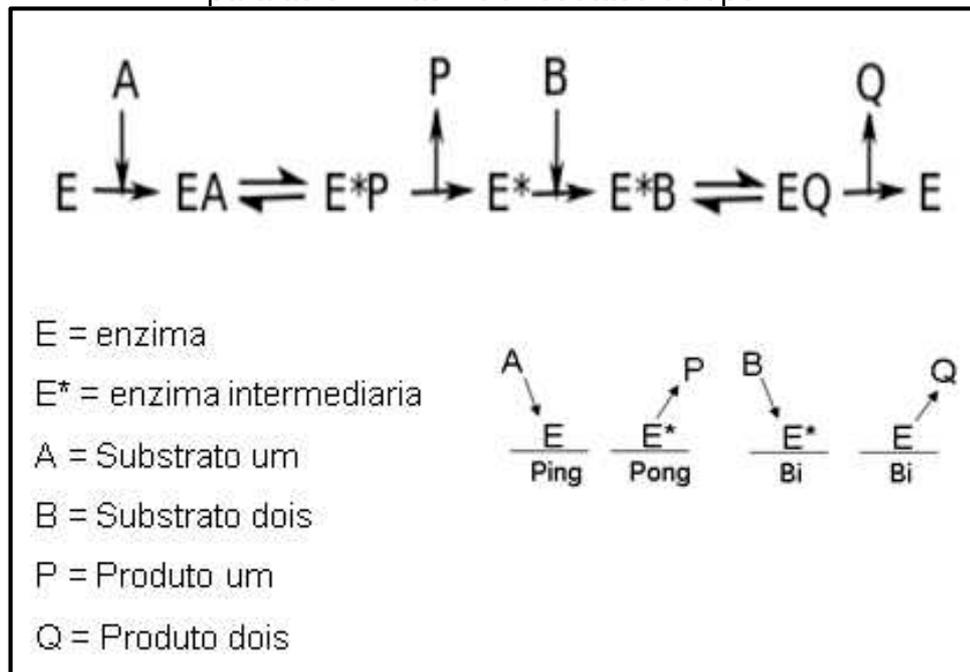
Ao contrário disso, ao observar os resultados obtidos nesse trabalho, verifica-se que ocorreu o consumo de NADH e de NADPH em aerobiose e em anaerobiose, mesmo existindo uma diferença significativa quanto ao uso de cofatores (Tabela 1),

que é menos relevante do que o fato da enzima ter atuado na presença em aerobiose e em anaerobiose. Dessa forma, pode-se inferir que o extrato intracelular apresenta uma potencial ação para enzima nitrorredutase tipo I insensível ao oxigênio classe B.

A redução obrigatória de dois elétrons de compostos nitro aromáticos pelas nitrorredutases é atribuída a uma extrema instabilidade do estado redox do grupamento prostético oxidado (KODER *et al.*, 2002). Em geral, as nitrorredutases do tipo I catalisam duas transferências de elétrons usando um mecanismo cinético Ping Pong Bi Bi (PPBB) (KODER *et al.*, 2002).

No mecanismo PPBB a enzima [E] se liga ao substrato [A], formando um complexo enzima/substrato [E·A]. Essa ligação modifica a enzima, formando uma enzima modificada, [*E·P] e o produto [P]. Essa enzima modificada se liga ao segundo substrato [*E·B] para formar o segundo produto [Q], restaurando a enzima [E] que estava no início da reação (GALENDE *et al.*, 2015) como demonstrado na figura 8.

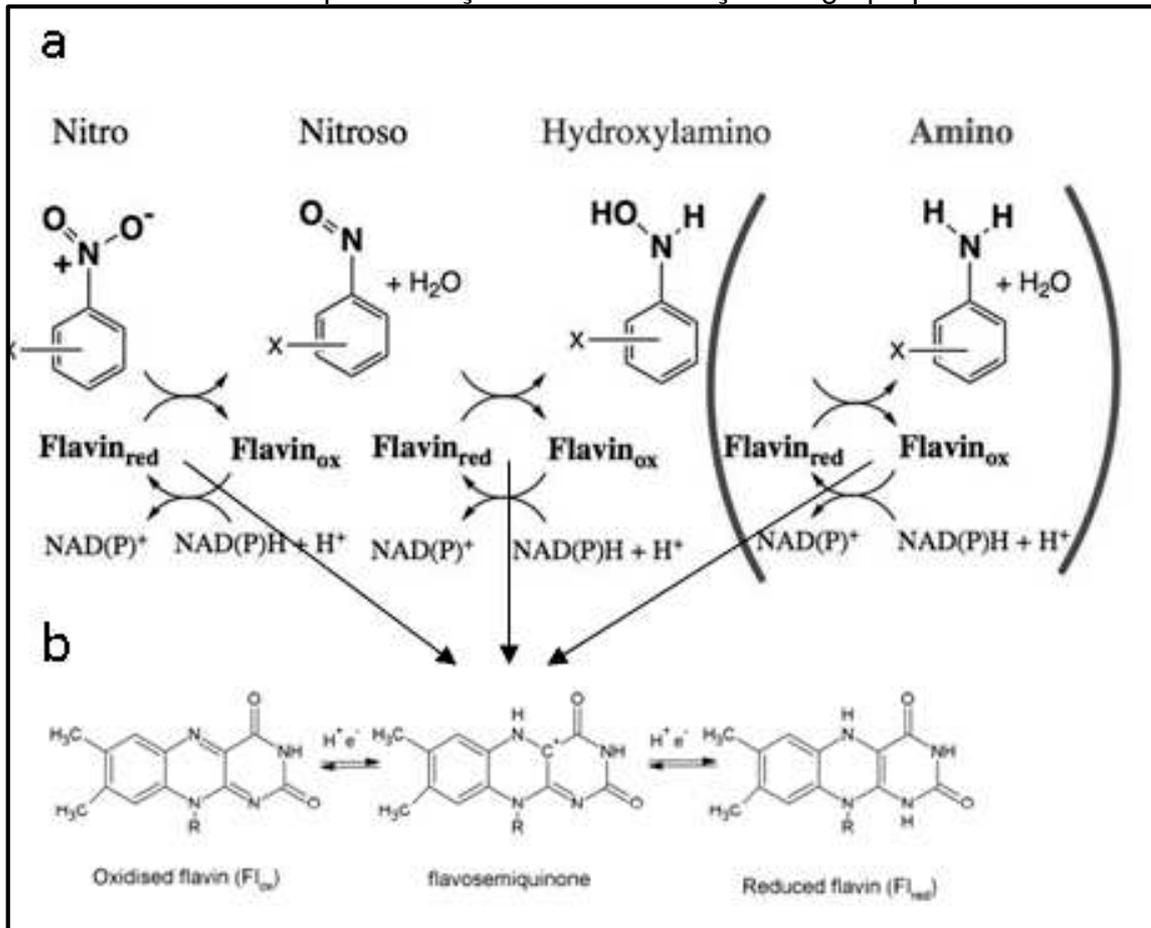
Figura 8 – Mecanismo enzimático Ping Pong Bi Bi; uma das possibilidades de ação para as enzimas nitrorredutase de tipo I.



Fonte: Adaptado de Garrett e Grisham (2010).

Para que a reação ocorra, o grupo prostético (FMN) alterna entre o estado oxidado e reduzido (Figura 9a), porém, entre esses estados ocorre a formação de uma molécula muito instável, a semiquinona, como demonstrado na figura 9b (MILLER *et al.*, 2018).

Figura 9 – Reação de redução de nitro compostos a grupos amina utilizando enzima nitrorredutase tipo I e reação de oxido redução do grupo prostético.



Fonte: Adaptado de Mayhew, 1999 e Miller *et al.*, (2018).

Uma das características principais da reação redox das nitrorredutases é a incapacidade da enzima em estabilizar a forma semiquinona reduzida de um elétron da flavina (KODER; MILLER, 1998). A falta de um estado reduzido eletronicamente é relativamente rara entre as enzimas que utilizam grupos flavina, que geralmente agem para estabilizar a semiquinona (HAYNES *et al.*, 2002).

Assim, a ampla especificidade do substrato da nitrorredutase pode permitir reduzir completamente um grande número de compostos celulares que, de alguma forma, poderiam contribuir para gerar estresse oxidativo por meio da redução do elétron do grupo prostético (KODER; MILLER, 1998; HAYNES *et al.*, 2002; PITSAWONG; HOBEN; MILLER, 2014).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, utilizando potenciais culturas iniciadoras de BAL para fermentação de produto cárneo, pode-se inferir que 92,31% das cepas testadas interagiram com o DNMP. Nos estudos *in vitro*, nove cepas reduziram mais de 98,00% da concentração inicial do composto. No modelo cárneo, três bactérias diferentes degradaram completamente o DNMP mutagênico e citotóxico em NMAP, composto não mutagênico. O *S. xylosus* LYOCARNI RM-33 degradou o DNMP em menos de 30 min e seu extrato intracelular demonstrou potencial para nitrorredutase tipo I classe B.

De maneira pioneira na área da Ciência dos Alimentos, pode-se inferir que o *S. xylosus* LYOCARNI RM- 33, o *Lb. fermentum* LB-UFSC 0017 e o *Lb. casei* LB-UFSC 0019 são potenciais conversores biológicos do composto mutagênico e citotóxico DNMP em NMAP *in vitro* e em matriz cárnea. Estudos futuros deverão ser realizados em outras condições e o isolamento e caracterização das nitrorredutases poderá esclarecer mecanismos envolvidos nesta bioconversão.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar experimentos em anaerobiose para verificar se existe ação metabólica das bactérias que não exerceram função em aerobiose;
- Purificar o extrato celular para potencializar e melhor avaliar a funcionalidade enzimática;
- Isolar e identificar as possíveis nitrorredutases;
- Testar a nitrorredutase em outros substratos nitrogenados;
- Desenvolver um produto enzimático biotecnológico com estabilidade e aptidão tecnológica para aplicação na indústria cárnea.

REFERÊNCIAS

ABERLE, E. D. *et al.* **Principles of Meat Science**. 4. ed. [s.l.]: Kendall Hunt Publishing, 2001.

ADEYEYE, S. A. O. **Effect of smoking methods on the quality and safety of traditional smoked fish**. 2016. 188 f. Tese (Doutorado) - Food Science and Technology, Federal University Of Agriculture, Abeokuta, Nigeria, 2016.

ADEYEYE, Samuel Ayofemi Olalekan. Smoking of fish: a critical review. **Journal of Culinary Science and Technology**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.559-575, 15 ago. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15428052.2018.1495590>.

AKBAR, A.; ALI, I.; ANAL, A. K.. Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety. **Journal of Animal and Plant Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 26, p.938-948, ago. 2016.

AKIVA, Eyal *et al.* Evolutionary and molecular foundations of multiple contemporary functions of the nitroreductase superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 45, p.549-558, 24 out. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1706849114>.

ALMEIDA, Gabriela Mattevi. **Estudo *in vitro* do potencial antitumoral de novos derivados de imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas**. 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

ARMERO, E. *et al.* LIPID COMPOSITION OF PORK MUSCLE AS AFFECTED BY SIRE GENETIC TYPE. **Journal of Food Biochemistry**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.91-102, 23 fev. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00867.x>.

ATTERBURY, R. J.. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.601-612, nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00089.x>.

BARTKIENE, Elena *et al.* The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. **Food Control**, [s.l.], v. 71, p.285-292, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.010>.

BEGOT, Claire *et al.* Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.225-232, jun. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00090-9](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(95)00090-9).

BEN SLIMA, S. *et al.* Effect of partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 on color, physico-chemical, texture and microbiological properties of beef sausages. **Lwt**, [s.l.], v. 86, p.219-226, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.058>.

BINKERD, E.F; KOLARI, O. E. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. **Food And Cosmetics Toxicology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.655-661, jan. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0015-6264\(75\)90157-1](http://dx.doi.org/10.1016/0015-6264(75)90157-1).

BINSTOK, Guillermo; CAMPOS, Carmen A.; GERSCHENSON, Lía N.. Determination of nitrites in meat systems: An improved procedure. **Meat Science**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.401-405, abr. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(95\)00052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(95)00052-6).

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 20. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresentado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto**, Brasília, DF: D.O.U, ano 03/08/2000, n. 149, seção 1, p. 7-12, 31 jul. 2000a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 21. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Patê, de Bacon ou Barriga Defumada e de Lombo Suíno**, Brasília, DF: D.O.U, ano 03/08/2000, v. 149, n. 1, p. 12-15, 31 jul. 2000b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 22. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni**, Brasília, DF: D.O.U, ano 03/08/2000, v. 149, n. 1, p. 15-28, 31 jul. 2000c.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Paleta Cozida, de Produtos Cárneos Salgados, de Empanados, de Presunto tipo Serrano e de Prato Elaborado Pronto ou Semipronto Contendo Produtos de Origem Animal**, Brasília, DF: D.O.U, ano 19/02/2001, n. 35, seção 1, p. 60-64, 15 fev. 2001

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51. **REGULAMENTO TÉCNICO DE ATRIBUIÇÃO DE ADITIVOS, E SEUS LIMITES** : CATEGORIA 8: CARNE E PRODUTOS CÁRNEOS, Brasília, DF: D.O.U, ano 04/01/2007, v. 3, n. 1, p. 14-18, 29 dez. 2006.

BRYANT, Christopher; MCELROY, William D.. NITROREDUCTASES. In: MILLER, Franz (Ed.). **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes Volume II**. Boca Raton: Crc Press, 1991. p. 292-303.

BRYANT, D. W. *et al.* Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.81-86, 1 jan. 1981. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m81-013>.

BUAZZI, Mahmoud M.; MARTH, Elmer H.. Mechanisms in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.249-256, set. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0740-0020\(91\)90057-9](http://dx.doi.org/10.1016/0740-0020(91)90057-9).

CAMMACK, Richard *et al.* Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1411, n. 2-3, p.475-488, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00033-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00033-x).

COMI, G., URSO, R., IACUMIN, L., *et al.* "Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy", **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 381–392, mar. 2005. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.08.007.

CORNU, M. *et al.* Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.639-647, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.007>.

DE DEA LINDNER, J. *et al.* Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science And Technology**, [s.l.], v. 88, n. 4-5, p.511-523, jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/dst:2008019>.

DE DEA LINDNER, J.; PENNA, A. L. B.; DEMIATE, I. M.; YAMAGUISHI, C. T.; PRADO, M. R. M.; PARADA, J. L. Fermented Foods and Human Health Benefits of Fermented Functional Foods. In: Carlos Ricardo Soccol, Ashok Pandey, Christian Larroche. (Org.). **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**. 1ed.Bosa Roca: Taylor & Francis Inc, 2013, v. 1, p. 263-297.

DE DEA LINDNER, J. Characteristics and Production of Microbial Cultures. In: PENNA, A. L. B.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. (Org.). **Fermented Foods of Latin**

America: From Traditional Knowledge to Innovative Applications. 1ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2016, v. 1, p. 267-294.

De OLIVEIRA, I. M.; BONATTO, D; HENRIQUES, J. A. P.. Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance. In A. Méndez-Vilas. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.** 2ed. Badajoz: Fromatex, 2011, v. 2, p. 1008-1019.

DI GIOIA D. Safety of Fermented Meat. In: PRAKASH, V. *et al.* **Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods.** [s.l.]: Academic Press, 2016. p. 125-148.

DOYLE, M. E.; GLASS, K. A. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. **Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.44-56, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x>.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. **Efsa Journal.** [s.l.], v. 13, n. 6, p.4144-4235, jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4144>.

ELLIS, D. F.. Meat smoke technology. In: HUI, Y. H. *et al.* **Meat Science and Applications.** New York: Marcel Dekker Inc, 2001. p. 509-519.
EL-SHENAWY, Moustafa A.; MARTH, Elmer H.. Inhibition and Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Sorbic Acid. *Journal Of Food Protection*, [s.l.], v. 51, n. 11, p.842-847, nov. 1988. **International Association for Food Protection.**
<http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-51.11.842>.

FEINER, Gerhard. Raw fermented salami: Selection of additives and starter cultures. In: FEINER, Gerhard. **Meat Products Handbook: practical science and technology.** Practical Science and Technology. Cambridge, Londres: Woodhead Publishing Limited, 2006. Cap. 16. p. 327-331.

FLORES, J.; TOLDRÁ, F.. Curing: Processes and applications. In: MACRAE, R. *et al.* **Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition.** London: Academic Press, 1993. p. 1277-1282.

Food and Drug Administration (FDA). (2003). *Listeria monocytogenes* risk assessment: **Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selective categories of ready-to-eat foods.** Disponível em:
<<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/risksafetyassessment/ucm183966.htm>> Acesso em: 6 de set. 2018.

FREUND, HUGO A. CLINICAL MANIFESTATIONS AND STUDIES IN PARENCHYMATOUS HEPATITIS. **Annals of Internal Medicine** v. 10, n. 8, p. 1144-1155, 1937.

GALENDE, Patricia Pérez *et al.* Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi–Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 81, p.1005-1011, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.042>.

GARRETT, Reginald; GRISHAM, Charles M.. Enzymes-Kinetics and Specificity. In: GARRETT, Reginald; GRISHAM, Charles M.. **Biochemistry**. 4. ed. [s.l.]: Cengage Learning, 2010. p. 406-407.

GHALFI, Hakim *et al.* Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. **Food Research International**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.33-39, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.009>.

GILL, C. O. The control of microbial spoilage in fresh meats. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Advances in Meat Research: Meat and Poultry Microbiology**. 2. ed. Westport, Connecticut: Avi Publishing Co., 1981. p. 49-88.

GRAM, Lone *et al.* Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 78, n. 1-2, p.79-97, set. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00233-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00233-7).

GRAU, F.H. Microbial ecology of meat and poultry. In **Advances in Meat Research, Volume 2**. Meat and Poultry Microbiology, ed. A. M Pearson and T.R. Dutson. AVI Publishing Co., Westport, Conn. 1986, pp. 1-47.

GRAY, J.I.; PEARSON, A.M. Rancidity and warmed-over flavor. In: PEARSON, A.m.; T.R., Dutson. **Advances in Meat Research: Restructured Meat and Poultry Products**. New York: van Nostrand Reinhold Co.1987. p. 221-269.

GRAY, J. I.; RANDALL, C. J.. The Nitrite/N-Nitrosamine Problem in Meats: An Update. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.168-179, fev. 1979. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-42.2.168>.

GUILLÉN, Hugo *et al.* Characterization of a Nitroreductase with Selective Nitroreduction Properties in the Food and Intestinal Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 21, p.10457-10465, 11 nov. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf9024135>.

HANNAN, Roland S.; CROOK, Kenneth C.. Food group (meat panel) water in meat and meat products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.1018-1022, set. 1983. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740340920>.

HAYNES, Chad A. *et al.* Structures of Nitroreductase in Three States. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 13, p.11513-11520, 22 jan. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111334200>.

HERRMANN, S.s. *et al.* Dietary exposure to volatile and non-volatile N-nitrosamines from processed meat products in Denmark. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 80, p.137-143, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.008>.

HOSPITAL, Xavier F. *et al.* Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. **Food Control**, [S.l.], v. 57, p.275-281, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.024>.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Volume 92. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Lyon, France: IARC; 2010 Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/110>> Acesso em 10 jan. 2020.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Volume 94. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. Lyon, France: IARC; 2010 Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono94.pdf>> Acesso em 10 jan. 2020.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat**. Volume 114, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon, France: Who Press, 2018. 511p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono114.pdf>>. Acesso em 10 jan. 2020.

JAY, J. M.. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Gaithersburg, Maryland: An Aspen, 2000. 635 p.

KADA, Tsuneo. ANNUAL REPORT OF NATIONAL INSTITUTE OF GENETICS: DNA-damaging Products from Reaction between Sodium Nitrite and Sorbic Acid. 24. ed. Misima, Japão: **The National Institute Of Genetics**, 1974. 84 p.

KEMP, J. D.. Nitrates and nitrites in country cured products. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 35., 1982, Blacksburg, Virginia. **PROCEEDINGS 35th Annual Reciprocal Meat Conference of the**

American Meat Science Association in cooperation with the National Live Stock and Meat Board. Chicago: National Live Stock And Meat Board, 1982. p. 53 - 55.

KERR, Robert H. *et al.* The use of sodium nitrite in the curing of meat. **Journal of Agricultural Research**, Washington, D. C., v. 33, n. 6, p.541-551, 15 set. 1926.

KHALID, Khalisanni. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences (ijb)**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.1-13, maio 2011

KITO, Yukio; NAMIKI, Mitsuo; TSUJI, Keiichi. A new n-nitropyrrole: 1,4-DINITRO-2-METHYLPYRROLE, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite.. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.505-508, jan. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)80043-x](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(78)80043-x).

KODER, Ronald L. *et al.* Flavin Thermodynamics Explain the Oxygen Insensitivity of Enteric Nitroreductases. **Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 48, p.14197-14205, dez. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi025805t>.

KODER, Ronald L.; MILLER, Anne-frances. Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1387, n. 1-2, p.395-405, set. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00151-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00151-4).

KUMAR, C.ganesh; ANAND, S.k. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 1-2, p.9-27, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00060-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00060-9).

LEWIS, W. Lee; VOSE, R. S.; LOWRY, C. D. Use of Sodium Nitrite in Curing Meats. **Industrial and Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.1243-1245, dez. 1925. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ie50192a015>.

LIJINSKY, William. N-Nitroso compounds in the diet. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 443, n. 1-2, p.129-138, jul. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5742\(99\)00015-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5742(99)00015-0).

LIJINSKY, William; EPSTEIN, Samuel S.. Nitrosamines as Environmental Carcinogens. **Nature**, [s.l.], v. 225, n. 5227, p.21-23, jan. 1970. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/225021a0>.

LO PEI-REN, *et al.* Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against Benzo[a]pyrene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s.l.], v. 94, n. 2, p.148-153, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80135-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80135-9).

MADIGAN, Michael *et al.* **Brock biology of microorganisms**. 14. ed. Boston: Pearson, 2015. 296-297 p.

MASTANJEVIĆ, K., KOVAČEVIĆ, D., FRECE, J., *et al.* "The Effect of an Autochthonous Starter Culture, Sugars and Different Temperatures on the Fermentation of Slavonian Kulen", **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, 2017. DOI: 10.17113/ftb.55.01.17.4688

MASTOVSKA, Katerina. **FOOD SAFETY MAGAZINE: Modern Analysis of Chemical Contaminants in Food**. 2013. Disponível em: <https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2013/modern-analysis-of-chemical-contaminants-in-food/>. Acesso em: 17 set. 2018.

MAYHEW, Stephen G.. The effects of pH and semiquinone formation on the oxidation-reduction potentials of flavin mononucleotide. A reappraisal. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 265, n. 2, p.698-702, out. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00767.x>.

MILLER, Anne-frances *et al.* Informing Efforts to Develop Nitroreductase for Amine Production. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.211-233, 24 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23020211>.

MOLOGNONI, Luciano *et al.* Development of a new analytical tool for assessing the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in meat products by LC-ESI-MS/MS. **Talanta**, [s.l.], v. 185, p.151-159, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.035>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MUKHERJEE, Arnab; ROKITA, Steven E.. Single Amino Acid Switch between a Flavin-Dependent Dehalogenase and Nitroreductase. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 137, n. 49, p.15342-15345, 4 dez. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.5b07540>.

NAMIKI, Mitsuo *et al.* Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 29, n. 2, p.407-411, mar. 1981. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf00104a046>.

NAMIKI, Mitsuo *et al.* Formation of mutagens by sorbic acid-nitrite reaction: effects of reaction conditions on biological activities. **Mutation Research/fundamental and**

Molecular Mechanisms of Mutagenesis, [s.l.], v. 73, n. 1, p.21-28, nov. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90132-3](http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107(80)90132-3).

NAMIKI, Mitsuo; KADA, Tsuneo. Formation of Ethylnitrolic Acid by the Reaction of Sorbic Acid with Sodium Nitrite. **Agricultural And Biological Chemistry**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.1335-1336, jun. 1975. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1975.10861781>.

NATIONAL ARCHIVES AND RECORDS ADMINISTRATION. Constituição (1978). **43 nº 20947, de 1978**. . Washington, DC, 16 maio 1978. Disponível em: <www.loc.gov/item/fr043095/>. Acesso em: 18 set. 2018.

NOWAK, Adriana; LIBUDZISZ, Zdzisława. Ability of probiotic *Lactobacillus casei* DN 114001 to bind or/and metabolise heterocyclic aromatic amines in vitro. **European Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 48, n. 7, p.419-427, 16 maio 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-009-0030-1>.

O'SHEA, Eileen F. *et al.* Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.130-134, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.12.003>.

ORRHAGE, K. *et al.* Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s.l.], v. 311, n. 2, p.239-248, dez. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90182-1](http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107(94)90182-1).

OSAWA, Toshihiko *et al.* Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrole mutagen formed by the reaction between food additives; Sorbic acid and sodium nitrite. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.835-841, jul. 1980. Elsevier BV. doi: 10.1016/0006-291x(80)90863-3.

OSAWA, Toshihiko *et al.* Desmutagenic Action of Food Components on Mutagens Formed by the Sorbic Acid/Nitrite Reaction. **Agricultural And Biological Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.1971-1977, ago. 1986. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1986.10867693>.

PAPADIMITRIOU, Konstantinos *et al.* Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.837-890, 27 jul. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.00076-15>.

PAZ, A. P. S. da, NASCIMENTO, E. C. P., MARCONDES, H. C., *et al.* "Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento", **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 17 ago. 2017. DOI: 10.1590/1981-6723.10216.

PEARSON, A.M.; GILLET, T.A. **Processed Meats**. 3. ed. [S.l.]: Springer Us, 1999. 448 p.

PEGG, Ronald B.; SHAHIDI, Fereidoon. MEAT MICROBIOLOGY. In: PEGG, Ronald B.; SHAHIDI, Fereidoon. **Nitrite Curing of Meat: the N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives**. [s.l.]: Trumbull: Food & Nutrition Press, 2000a. p. 133-151.

PEGG, Ronald B.; SHAHIDI, Fereidoon. POTENTIAL HEALTH CONCERNS ABOUT NITRITE. In: PEGG, Ronald B.; SHAHIDI, Fereidoon. **Nitrite Curing of Meat: the N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives**. [s.l.]: Trumbull: Food & Nutrition Press, 2000b. p. 175-208.

PÉREZ-CHABELA, María de Lourdes; TOTOSAUS, Alfonso; GUERRERO, Isabel. Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.132-138, mar. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612008000100019>.

PÉREZ-PRIOR, M. Teresa *et al.* Reactivity of Some Products Formed by the Reaction of Sorbic Acid with Sodium Nitrite: Decomposition of 1,4-Dinitro-2-methylpyrrole and Ethylnitrolic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 24, p.11824-11829, 24 dez. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf802822y>.

PÉREZ-PRIOR, M. Teresa *et al.* Sorbate–Nitrite Interactions: Acetonitrile Oxide as an Alkylating Agent. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 22, n. 7, p.1320-1324, 20 jul. 2009. **American Chemical Society (ACS)**. <http://dx.doi.org/10.1021/tx9001226>.

PETERSON, Francis J. *et al.* Oxygen-sensitive and -insensitive Nitroreduction by *Escherichia coli* and Rat Hepatic Microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Minneapolis, v. 254, n. 10, p.4009-4014, 25 maio 1979.

PILEVAR, Zahra; HOSSEINI, Hedayat. Effects of Starter Cultures on the Properties of Meat Products: A Review. **Annual Research and Review in Biology**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.1-17, 10 jan. 2017. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/arrb/2017/36330>.

PINEDA, J.M. Influencia de la materia prima en la calidad del jamón curado. In J. FLORES, S. BERMELL and F. TOLDRI V. (Org.). **Avances en la Tecnología del Jamón Curado**. 1 ed. Valencia, Spain: Taroncher, 1989, p. 11-27.

PITSAWONG, Warintra; HOBEN, John P.; MILLER, Anne-frances. Understanding the Broad Substrate Repertoire of Nitroreductase Based on Its Kinetic

Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 22, p.15203-15214, 4 abr. 2014. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m113.547117>.

PREUSSMANN, R.; STEWART, B. W.. N-Nitroso carcinogens. In: SEARLE, C. E.. **Chemical Carcinogens (Vol 2)**. Washington, D.C: Acs Monograph, 1984. p. 643-828. (182).

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. **Meat Science**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.145-169, jan. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90046-k](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(93)90046-k).

RAU, J.; STOLZ, A.. Oxygen-Insensitive Nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* Function under Anaerobic Conditions as Lawsone-Dependent Azo Reductases. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 6, p.3448-3455, 1 jun. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.6.3448-3455.2003>.

RANKEN, M. D.. The water holding capacity of meat and its control. **Chem. and Ind.**, London, v. 18, p.1052-1057, 1976.

ROLDÁN, María Dolores *et al.* Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.474-500, maio 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x>.

ROWLAND, I.. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.281-285, 1 fev. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/19.2.281>.

RUST, R. E.. Sausage products. In: PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S.. **The Science of Meat and Meat Products**. Westport, Connecticut,: Food And Nutrition Press, 1987. p. 457-485.

RUST, P.; EKMEKCIOGLU, C. Impact of Salt Intake on the Pathogenesis and Treatment of Hypertension. In: ISLAM, M. **Hypertension: from basic research to clinical practice**. 1. ed. [S.l.]: Springer, Cham, 2016. p. 61-84.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E.. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.531-541, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016>.

SASSE, A.; COLINDRES, P.; BREWER, M.S.. Effect of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Cooked, Frozen Pork Patties. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 74, n. 1, p.30-35, jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00979.x>.

SHAFIT, H. Mohammed; WILLIAMS, S.K.. Sodium diacetate and sodium lactate affect microbiology and sensory and objective characteristics of a restructured turkey breast product formulated with a fibrin cold-set binding system. **Poultry Science**, [s.l.], v. 89, n. 3, p.594-602, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2009-00412>.

SHAH, N. P.. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 83, n. 4, p.894-907, abr. 2000. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(00\)74953-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(00)74953-8).

SHRESTHA, Prashanta; HOLLAND, Troy Michael; BUNDY, Bradley Charles. Streamlined extract preparation for Escherichia coli-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. **Biotechniques**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.163-174, set. 2012. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/0000113924>.

SHU, Yue-zhong *et al.* Metabolism of 1,4-dinitro-2-methylpyrrole, a mutagen formed by a sorbic acid-nitrite reaction, by intestinal bacteria. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.181-187, 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/em.2850170307>.

SOFOS, John N.. Nitrite, Sorbate and pH Interaction in Cured Meat Products. In: 34TH RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 34., 1981, Corvallis. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**. Corvallis: American Meat Science Association, 1981. p. 104 - 120.

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F.. Antimicrobial Activity of Sorbate. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v. 44, n. 8, p.614-622, ago. 1981. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-44.8.614>.

SOFOS, J. N. *et al.* SODIUM NITRITE AND SORBIC ACID EFFECTS ON Clostridium botulinum TOXIN FORMATION IN CHICKEN FRANKFURTER-TYPE EMULSIONS. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.668-675, maio 1979a. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08471.x>.

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F.; ALLEN, C. E.. Clostridium botulinum: CONTROL BY SODIUM NITRITE AND SORBIC ACID IN VARIOUS MEAT AND SOY PROTEIN FORMULATIONS. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.1662-1667, nov. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb09111.x>.
SOLDERA, Susi; SEBASTIANUTTO, Nerina; BORTOLOMEAZZI, Renzo. Composition of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Commercial

Aqueous Smoke Flavorings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 8, p.2727-2734, abr. 2008. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/jf072117d>.

SONG, Peng; WU, Lei; GUAN, Wenxian. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. **Nutrients**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.9872-9895, 1 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu7125505>.

SOOMRO, A.H.; MASUD, T.; KIRAN, Anwaar. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, Rawalpindi, Pakistan, v. 1, n. 1, p.20-24, jan. 2002.

SPERBER, W. H. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria — A Review. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.142-150, fev. 1983. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-46.2.142>.

STIDL, Reinhard *et al.* Binding of heterocyclic aromatic amines by lactic acid bacteria: Results of a comprehensive screening trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.322-329, mar. 2008. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700034>.

STOPFORTH, J.d. *et al.* Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L.. **Antimicrobials in Food**. [s.l.]: Crc Press - Taylor & Francis Inc, 2005. p. 49-90.

SULLIVAN, Gary Anthony. **Naturally cured meats**: Quality, safety, and chemistry. 2011. 130 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Iowa State University, Ames, Iowa, 2011.

SWAMINATHAN, B.. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology**: Fundamentals and Frontiers. Washington, D.c: Asm Press, 2001. p. 383-409.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O.. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, [s.l.], v. 21, n. 9, p.1199-1218, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>.

TAKIGAMI, H. *et al.* The *Bacillus subtilis* rec-assay: a powerful tool for the detection of genotoxic substances in the water environment. Prospect for assessing potential impact of pollutants from stabilized wastes. **Waste Management**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.209-213, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0956-053x\(01\)00071-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-053x(01)00071-x).

TAORMINA, Peter J.. Implications of Salt and Sodium Reduction on Microbial Food Safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.209-227, 8 mar. 2010. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408391003626207>.

TARR, H. L. A.. Bacteriostatic Action of Nitrates. **Nature**, [s.l.], v. 147, n. 3727, p.417-418, abr. 1941. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/147417b0>.

THERON, Maria M.; LUES, Jan F.R.. Organic Acids and Meat Preservation: A Review. **Food Reviews International**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.141-158, 16 mar. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/87559120701224964>.

THOMAS, L.; DELVES-BROUGHTON, J.. Nisin. In: NAIDU, A. S.. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Boca Raton: Crc Press - Taylor & Francis Inc, 2001. p. 463-521.

TEJS, Sebastian. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, Olsztyn, Poland, v. 1, n. 4, p.7-14, abr. 2008.

TIWARI, B. K. *et al.* Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 14, p.5987-6000, 22 jul. 2009. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/jf900668n>.

TOLDRÁ, Fidel. DESCRIPTION OF MAIN MUSCLE CHARACTERISTICS. In: TOLDRÁ, Fidel. **DRY-CURED MEAT PRODUCTS**. Trumbull: Food & Nutrition Press, 2002a. p. 7-26.

TOLDRÁ, Fidel. INTRODUCTION: A HISTORICAL PERSPECTIVE. In: TOLDRÁ, Fidel. **DRY-CURED MEAT PRODUCTS**. Trumbull: Food & Nutrition Press, 2002b. p. 1-5.

TOLDRÁ, Fidel. CHARACTERIZATION OF PROTEOLYSIS: PROTEOLYSIS IN DRY-CURED HAM. In: TOLDRÁ, Fidel. **DRY-CURED MEAT PRODUCTS**. Trumbull: Food & Nutrition Press, 2002c. p. 113-134.

TOWNSEND, W. E; OLSON, D. G.. Cured and cured meat products processing. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S.. **The Science of Meat and Meat Products**. Westport, Connecticut: Food And Nutrition Press, 1987. p. 431-456.

TRICKER, A. R., PREUSSMANN, R. (1991). CARCINOGENIC N-NITROSAMINES IN THE DIET - OCCURRENCE, FORMATION, MECHANISMS AND CARCINOGENIC POTENTIAL. [Review]. **Mutation Research**, 259(3-4), 277-289. doi: 10.1016/0165-1218(91)90123-4.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Interpretation and statement of labeling policy for cured products; special labeling requirements concerning nitrate and nitrite, 2010. **CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 9 CFR 317.17**

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Order nº 211, de 27 de abril de 1926. BUREAU OF ANIMAL INDUSTRY. **BUREAU OF ANIMAL INDUSTRY ORDER 211**: Amendment 4, Washington D. C., v. 48, p. 431-456, 1936.

URBAIN, W. M.; CAMPBELL, J. F.. Meat preservation. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S.. **The Science of Meat and Meat Products**. Westport, Connecticut: Food And Nutrition Press, 1987. p. 371-412.

VELASCO, Valeria; WILLIAMS, Pamela. Improving meat quality through natural antioxidants. **Chilean Journal of Agricultural Research**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.313-322, jun. 2011. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT). <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-58392011000200017>.

WALKER, R.. The metabolism of dietary nitrites and nitrates. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.780-785, 1 ago. 1996. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0240780>.

WILCOCK, A.; BALL, B.. Consumer Perceptions and Practices. In: GÓMEZ-LÓPEZ, V.; BHAT, R.. **Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2014. Cap. 2. p. 11-29.

WILLIAMS, Elsie m. *et al.* Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 471, n. 2, p.131-153, 2 out. 2015. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20150650>.

WHO (World Health Organization). **Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases WHO Technical Report Series**. Geneva: World Health Organization, 2003. Disponível em: <
<https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/>>. Acesso em 03 nov. 2019.

ZALDIVAR, R., ROBINSON, H. (1973). Epidemiological investigation on stomach cancer mortality in Chileans: association with nitrate fertilizer. **Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol**, 80(4), 289-295.

ZAROOUR, Kenza *et al.* Food Ingredients Synthesized by Lactic Acid Bacteria. **Microbial Production of Food Ingredients and Additives**, [s.l.], p.89-124, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811520-6.00004-0>.

ZHAI, Hengxiao *et al.* Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.179-186, jun. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>.