

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aline Catarina Santos dos Passos

Uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella enterica*

Passo Fundo

2020

Aline Catarina Santos dos Passos
Tecnóloga em Alimentos

Uso de Bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella enterica*

Dissertação de Mestrado apresentado
como um dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Laura B. Rodrigues

Coorientadora: Dra. Charise D. Bertol

Linha de pesquisa: Qualidade e
propriedades funcionais de alimentos.

Passo Fundo

2020

CIP – Catalogação na Publicação

P289u Passos, Aline Catarina Santos dos
 Uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella enterica* [recurso eletrônico] / Aline Catarina Santos dos Passos. – 2020.
 1.3 MB ; PDF.

 Orientadora: Profª. Dra. Laura B. Rodrigues.
 Coorientadora: Profª. Dra. Charise D. Bertol.
 Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2020.

 1. Salmonela – Controle biológico. 2. Bacteriófago.
 3. Alimentos – Contaminação. I. Rodrigues, Laura B., orientadora. II. Bertol, Charise D., coorientadora.
 III. Título.

CDU: 664:615.9

Catálogo: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella enterica*

Elaborada por

Aline Catarina Santos dos Passos

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora

**Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)**

**Charise Dallazem Bertol, Dra., UPF
(Coorientadora)**

Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF

Viviane Girardi, Dr., Udelar - Uruguay

**Passo Fundo, RS, Brasil
2020**

Dedico à Elaine Passos e a Sílvia Regina
por serem as mulheres da minha vida, e
que nunca deixaram de me apoiar na
realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao universo pela vida, e por me conceder saúde, forças e boas energias para superar os obstáculos e seguir firme aos meus objetivos.

Aos meus pais, Sílvia Regina e JoséIVALDO, pelo incentivo, e por sempre me conceder apoio nas realizações dos meus sonhos, por nunca me deixarem desistir, e por sempre respeitarem as minhas decisões. Obrigada por acreditarem e nunca terem desistido de mim. Amo vocês!

À minha irmã Elaine Passos (minha caçula), por ser minha parceira e amiga fiel, que sempre estava ali de prontidão pra me ouvir nos momentos de surtos, ou nos momentos de felicidades, por sempre ter uma palavra pra me confortar, ou momentos besteiro pra me fazer sorrir, obrigada por ser a minha melhor pessoa, a minha alma gêmea, por todo carinho e amor incondicional. Te amo hoje e sempre.

À família Santos Pereira e a Família Passos, por todo carinho e amor incondicional, vocês são tudo pra mim.

Aos meus amigos Jonatan Mello, Lariane Strack, Rodrigo Carli, Juliana Bogéa e Janayna Monroe. Mais que amigos, se tornaram a minha família, que nos momentos mais difíceis estiveram do meu lado, me concedendo todo suporte necessário para seguir em frente. Porém foi nos momentos de descontração e alegrias que vocês se sobressaíram e se tornaram os meus heróis, por fazer dias alegres muito mais divertidos, e por fazer dias nebulosos mais ensolarados. Guardarei com muito amor e carinho todos os momentos inesquecíveis que vivenciei com vocês. Eu Amo vocês e obrigada hoje e sempre!

À minha querida orientadora, Laura Beatriz Rodrigues, pela dedicação, atenção, e principalmente por acreditar em mim. Sempre lembrarei de você, especialmente do quanto foi prestativa quando cheguei aqui. Serei sempre grata por todo aprendizado, carinho e por ter me apresentado o ser de luz, chamado Ana Clara.

À minha Coorientadora Charise Bertol, por toda dedicação, e por aceitar me coorientar, sempre serei grata por todos os teus ensinamentos.

Aos amigos do laboratório, Adele Stein, Lucas Risson, Thábata Araújo, Ana Bonatto, Jaqueline Rumão, Enzo Mistura, Rafael Levandowski, Ana Luíza Lora, Caroline Peixoto, Bruna Webber, Luciane Manto, Bruna Lopes, e Gabriela Silva por todos os momentos de alegrias, risadas, mates nas horas do intervalo, e principalmente

por toda ajuda concedida com muito carinho e esforço para que eu pudesse realizar este trabalho.

À todo corpo docente do programa de pós graduação em ciência e tecnologia de alimentos, em especial Luciana Ruschel, Telma Elita, Christian Reinher e Jeferson Piccin, pelas colaborações e todo o conhecimento repassado foi de grande valia na minha vida profissional.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Bioexperimentação, em especial os professores Fernando Piloto, Luís Carlos Kreutz, e Rafael Frandoloso, pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho

Ao meu querido professor Elci Dickel, que com a sua grande experiencia de vida profissional, nos repassou um conhecimento inestimável, nos fazendo sempre pensar como profissionais da área, e como agir diante dos obstáculos. Obrigado por ter sido meu professor. Meu mestrado já valeu muito a pena só por ter tido a sorte de ser a tua aluna. Gratidão eternamente.

Aos meus queridos colegas da turma 2018, em especial Viviane Vaz, Daiane Santos, Paola Manfredini, Marieli Rosseto, Bianca Kufner, que nos melhores e piores momentos compartilhavam sempre um sorriso, pra alegrar o dia.

As melhores secretarias que um programa de pós graduação poderia ter, Danieli Gugel e Patrícia Rizzardi (que hoje não é mais a nossa secretária). Pessoas maravilhosas que tive o imenso prazer de conhecer. Obrigada por toda atenção e carinho.

Aos amigos que me incentivaram a estar hoje aqui concluindo este mestrado, os amigos que mesmo de longe mandavam energias positivas para me dar forcas e coragem de enfrentar tudo e todos. Meus “Pombos” serei sempre grata a vocês: Andrea Pereira, Alexsandra Cabral, Claudson Costa, Aldo Costa, Clodoaldo Pereira, Rosiane Araujo, Tamilyes Mendes, Adrianna Chaves, Debora Rocha e Wenderson Lima. Vocês foram essências desde o começo, do medo da mudança, até a finalização deste trabalho. Espero sempre tê-los na minha vida. Amo cada um de vocês, Obrigada!

À minha amiga Camilla Santos, que desde sempre me acompanha, que sempre me encheu de carinho, amor e respeito. Somos mais que amigas, somos irmãs do coração, eu sempre serei grata por todos os teus conselhos e principalmente pelo teu apoio. Te amo king!!

À escola Clube da Dança, por terem sido peça crucial no decorrer deste mestrado, me proporcionado momentos incríveis, me renovando a cada aula, com uma dose de animo, força e coragem, suprimdo o que havia sido perdido nos momentos

cansativos e exaustivos de trabalhos. Obrigada em especial ao Erisson Florão, Sergio da Luz, Tanise Carolina, André Gonçalves, Dominiki Ceolin, Elis Barbosa, Talison Marins, e Felipe Borges, por toda a energia positiva, vocês me salvaram, além de terem salvado este mestrado. A alegria e o profissionalismo de todos me ajudaram a não desistir dos meus sonhos. Minha eterna gratidão!

Aos amigos que a dança me deu, em especial Sheila Barbosa, Renata Cerutti, Alda Dall Agnol, Acácia Coimbra, Gilberto Vedoy, Deise Cristiane, Wagner Silva, que sempre me deram apoio e momentos de muitas risadas. Obrigada!

À todos os amigos e profissionais da minha antiga casa, IFMA – Campus Maracanã, em especial a minha eterna orientadora, Dra Daniela Aguiar Penha Brito, que foi a pessoa que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial, que me ajudou a dar os primeiros passos na vida acadêmica, e me fez abrir os olhos para o mundo. Mas que uma orientadora, uma amiga, mãe e companheira que com o seu profissionalismo e principalmente a sua humildade se tornou o meu grande exemplo. Obrigada por tudo, eu sempre levarei os teus ensinamentos na minha mente e no meu coração.

Ao meu querido Professor Márcio Augusto, que apesar de suas dificuldades, nunca nos deixou mão, sempre deu aula dando show de conhecimento, e de muita humildade. Com as suas experiências, sempre será a fonte de inspiração de qualquer um que passar por ti. Nunca esquecerei de como você, sempre fazia a gente pensar como os melhores profissionais. Obrigada por sempre ter acreditado em mim, e em todos que tiveram a oportunidade de ter aula com você. Gratidão sempre!

À dupla dinâmica Leidiana Lima e Eleclesio Duarte, que foram os primeiros a me incentivarem a seguir este caminho, que estão comigo desde o técnico em agroindústria, e que sempre me propuseram as melhores experiências, inclusive a de me tornar uma Tecnóloga em Alimentos. Também agradeço ao Júlio, que sempre me apoiou com seus conselhos e sua amizade. A cada um de vocês meu carinho especial e gratidão.

Ao meu Batalhão do Boi da Maioba, por todo apoio, amor e carinho. Em especial ao grupo Juntas e Misturadas, que através das chamadas de vídeo me ajudaram a sempre ter por perto a lembrança de umas das maiores riquezas da cultura popular do meu Maranhão. Eu jamais irei esquecer das minhas origens, a vocês dedico todo meu amor e carinho.

E por fim, o meu agradecimento mais que especial vai para as melhores pessoas que eu poderia ter como guia ao longo deste mestrado: Elionio Frota, Lucí Rech, e Viviane Girardi. Vocês foram mais que essenciais, cada um com a sua particularidade, e

no seu momento, me proporcionaram da melhor forma possível o auxílio necessário pra prosseguir e finalizar este trabalho. A vocês não existem palavras, ou adjetivos capazes de externar a tamanha gratidão que eu estou sentindo neste momento. Espero um dia poder retribuir o que vocês fizeram por mim. A vocês minha eterna gratidão.

À todas as pessoas que passaram por mim neste período e que de alguma forma, com gestos, palavras, e conselhos me ajudaram chegar até aqui.

À Colorcon que acreditou no projeto e gentilmente cedeu para nós o polímero para a elaboração dos comprimidos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“Mas se você achar que eu tô derrotado,
saiba que ainda estão rolando os dados,
porque o tempo, o tempo não para”.

(Cazuza)

RESUMO

A *Salmonella* spp. é um dos principais microrganismos envolvidos em doenças veiculadas por alimentos, o que torna necessário tomar medidas para a sua eliminação na indústria de alimentícia. Diante desta abordagem, os bacteriófagos (fagos), que são vírus que infectam procariotos, vêm conquistando espaço em diversas áreas, principalmente nas indústrias de alimentos, pois se apresentam como um vantajoso controle biológico de bactérias, sem deixar resquícios de substâncias químicas, conseqüentemente tornando-se uma excelente alternativa de controle. Quando associados a polímeros, além de proteção, podem proporcionar a sua liberação gradual atuando por períodos maiores, permitindo uma liberação controlada da substância na área de atuação. Pensando nesta tecnologia, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um produto inovador para o controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, através da elaboração de um coquetel de bacteriófagos, formulados em biocomprimidos adesivos de liberação prolongada, no intuito de serem aplicados em água de tanques de resfriamentos do abate de frango. Os biocomprimidos foram preparados com 30% de Polyox WSR-303, de 7.000.000 g/mol, 69% de polióxido de etileno de 100.000 g/mol, e 1% de *pool* de bacteriófagos liofilizados, preparados por compressão direta em máquina de compressão excêntrica. A sua eficiência foi testada mimetizando as condições reais do processo de refrigeração das carcaças de frango, divididos em quatro tratamentos, onde T1 – Controle positivo, T2 – Controle negativo, T3 – Biocomprimidos de fagos com concentração baixa [$2,7 \times 10^3$ UFC/mL] de *Salmonella enterica* e T4 – Biocomprimidos de fagos com concentração alta [$2,7 \times 10^6$ UFC/mL] de *Salmonella enterica*. Os resultados mostraram que houve leve redução de patógenos, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo assim, conclui-se que os biocomprimidos não apresentaram eficácia de forma relevante na liberação dos bacteriófagos para ação contra a *Salmonella enterica*.

Palavras-chave: Fagos. Biocomprimidos. *Salmonella*.

ABSTRACT

A *Salmonella* spp. it is one of the main microorganisms involved in foodborne diseases, which makes it necessary to take measures for its elimination in the food industry. In view of this approach, bacteriophages (phages), which are viruses that infect prokaryotes, are gaining space in several areas, mainly in the food industries, as they present themselves as an advantageous biological control of bacteria, without leaving traces of substances, consequently making them - an excellent control alternative. When associated with polymers, in addition to protection, they can provide a gradual release acting for longer periods, allowing a controlled release of the substance in the area of operation. Thinking about this technology, the objective of the present study was to develop an innovative product for the biological control of different *Salmonella enterica* serovars, through the preparation of a cocktail of bacteriophages, formulated in extended release adhesive biocompressed tablets, in order to be needed in drinking water. cooling tanks for chicken slaughter. The biocompresses were prepared with 30% Polyox WSR-303, 7,000,000 g / mol, 69% ethylene polyoxide, 100,000 g / mol, and 1% pool of lyophilized bacteriophages, prepared by direct direct compression in a eccentric compression. Its efficiency was tested by mimicking the real conditions of the cooling process of chicken carcasses, divided into four treatments, where T1 - positive control, T2 - negative control, T3 - low concentration phage biocompressants [2.7x10³ CFU / mL] *Salmonella enterica* and T4 - Phage biocompressants with high concentration [2.7x10⁶ CFU / mL] of *Salmonella enterica*. The results attenuated that there was a reduction in pathogens, but there was no difference between treatments, thus, it is concluded that biocompresses are not significantly differentiated in the release of bacteriophages for action against *Salmonella enterica*.

Keywords: **Phages.** **Biocompressants.** *Salmonella.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos de replicação dos bacteriófagos	26
Figura 2: Morfologia dos bacteriófagos	26
Figura 3 Aplicação dos Bacteriófagos na cadeia produtiva de alimentos	27
Figura 4: Protocolo de amplificação dos bacteriófagos.....	32
Figura 5: Tratamentos realizados nos experimentos.	35
Figura 6: Teste dos bacteriófagos em caldo BHI para observar presença ou ausência de turvação no meio após a titulação de fagos.	37
Figura 7: Placa que mostra formação de lise em S. Brandenburg	38
Figura 8: Amostra liofilizada.....	39
Figura 9: Biocomprimidos de pool de bacteriófagos de liberação controlada	41
Figura 10: Ação dos biocomprimidos de bacteriófagos no tempo de 12 horas.....	43
Figura 11 Zonas de lises cobertas por <i>Salmonella enterica</i> após a incubação.....	44

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Titulação dos bacteriófagos frente às bactérias hospedeiras antes da liofilização.	38
Tabela 2 Titulação dos bacteriófagos frente às bactérias hospedeiras após a liofilização.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

°C: graus

µL: microlitros

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI: Brain Heart Infusion

CDC: Disease Control and Prevention

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DVA: Doenças Veiculadas Por Alimentos

g: gramas

h: horas

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Min: Minutos

mL: mililitro

OMS: Organização Mundial da Saúde

UFP / PFU: Unidades Formadoras De Placas

RNA: Ácido Ribonucleico

S.: *Salmonella*

TSA: Trypticase Soy Agar

TSB: Trypticase Soy Broth

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UPF: Universidade de Passo Fundo

XLD: Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA <i>SALMONELLA</i> SPP	19
2.2 SALMONELOSES	21
2.3 CONTROLE DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	22
2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	24
2.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BACTERIÓFAGOS	25
2.6 BACTERIÓFAGOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO	27
2.7 POLIMÉROS BIOADESIVOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ISOLAMENTO DOS BACTERIÓFAGOS	31
3.2 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS	31
3.3 TITULAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS	32
3.4 LIOFILIZAÇÃO	33
3.5 FORMULAÇÃO DE BIOCOMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA A PARTIR DOS COQUETÉIS DE BACTERIÓFAGOS	33
3.6 TESTE <i>in vitro</i> DOS BIOCOMPRIMIDOS CONTENDO OS COQUETÉIS DE BACTERIÓFAGOS CONTRA <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	34
3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Teste de esterilidade e titulação dos bacteriófagos	37
4.2 Liofilização	39
4.3 Elaboração dos biocomprimidos de coquetel de bacteriófagos	40
4.4 Teste dos biocomprimidos de bacteriófagos	42
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIA	47

APÊNDICE A – Artigo científico	55
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. está entre os principais patógenos envolvidos nas infecções alimentares no homem, sendo uma das principais causas de doenças veiculadas por alimentos (DVA's) mundialmente. No Brasil, o Ministério da Saúde apontou que entre os anos 2009 à 2018 este patógeno foi o segundo maior causador de DVA's com uma porcentagem de 11,3% de casos registrados no país. Os alimentos mais frequentemente implicados nos surtos relatados pelo sistema de vigilância, foram os alimentos mistos, e água (BRASIL, 2019).

As doenças veiculadas por alimentos têm sido motivo de amplas discussões, levando à procura, em todo o mundo, por estratégias que permitam o seu controle e, conseqüentemente, a garantia da disposição de produtos inócuos no mercado consumidor. Nesse contexto, a bactéria *Salmonella* tem sido uma preocupação, ao longo dos anos, para indústria de produtos de origem avícolas. A partir da crescente ênfase na segurança de produtos cárneos que chegam ao consumidor, tem-se estimulado a identificação de meios para reduzir ou eliminar *Salmonella* spp., uma vez que resulta em aumento na segurança dos produtos avícolas (FUNK et al., 2001).

No abatedouro, as bactérias podem chegar ao alimento por erros de procedimento nos frigoríficos como o excesso de manipulação durante o beneficiamento da carne, erro na temperatura de armazenamento, no contato de carne processada com carne crua, e por superfícies mal higienizadas, estas últimas conhecidas por contaminação cruzada (ROSA et al., 2015). Contudo, o principal ponto crítico de controle no processamento de frango, é o resfriamento da carcaça na água do *chiller*, que ocasiona a contaminação com as bactérias presentes na superfície da carcaça, levando a contaminação cruzada e comprometendo potencialmente a segurança do produto (SOUZA et al., 2012). Por isso os biocontroles vem sendo estudados como alternativas de controlar patógenos no ambiente, e uma dessas abordagens é o uso de vírus bacterianos como agentes eficaz frente as bactérias patogênicas denominados de bacteriófagos ou fagos (KRYLOV, 2019).

Os fagos ainda são pouco explorados como antimicrobianos, e apresentam vantagens únicas se caracterizando como uma alternativa de controle, principalmente para as indústrias de alimentos, com possibilidade de complementar e/ou substituir métodos convencionais, não deixando resíduos químicos, além de evoluírem rapidamente para superar as estratégias de defesa que as bactérias desenvolvem para

sobreviver ao ataque constante dos fagos (ALBINO, 2011). Com isto, o seu uso torna-se uma metodologia de grande importância para o controle de patógenos, podendo ser utilizado em toda a cadeia de produção de alimentos sem afetar as propriedades sensoriais do produto final.

Os polímeros representam uma das classes de matérias-primas mais versáteis, e acessível para aplicações em diversas áreas, sendo geralmente aplicados nas indústrias farmacêuticas, onde auxiliam em formulações de fármacos e produtos estéticos, proporcionam estabilidade física, química e microbiológica, sendo empregados como excipientes em preparações convencionais de medicamentos e cosméticos, além de proteger e estabilizar estruturas proteicas de princípios ativos, como os fagos. Portanto a associação de bacteriófagos aos polímeros de liberação modificada, que são preparações em que a substância ativa vai se liberando aos poucos, tem o objetivo de controlar a liberação, a fim de aumentar o tempo de duração dos vírus bacterianos no ambiente em que foi exposto (MANOHAR, 2019).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um produto inovador para o controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, através da elaboração de um coquetel de bacteriófagos, formulados em biocomprimidos adesivos de liberação prolongada.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *SALMONELLA* SPP

O gênero *Salmonella* recebeu essa denominação em homenagem ao seu descobridor, Daniel Elmer Salmo (1850-1914), que foi o primeiro médico veterinário e microbiologista a visualizar uma bactéria do gênero, a *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis (FERREIRA et al., 2013). Essas bactérias pertencem à família *Enterobacteriaceae* e possuem uma ampla distribuição na natureza, sendo que o trato intestinal dos animais e do homem é seu principal reservatório. Morfologicamente, são bastonetes Gram-negativos, geralmente móveis, capazes de formar ácido e, na maioria das vezes, gás a partir da glicose, com exceção de *Salmonella enterica* sorovares Typhi, Pullorum e Gallinarum. Crescem em temperatura entre 7°C e 45°C, com a temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C. Crescem em pH entre 4,5 e 9,0, sendo o pH ótimo de crescimento entre 6,5 e 7,5. Sobrevivem a longos períodos de congelamento e desidratação, quando em presença de matéria orgânica (VIVIAN, 2014).

Quanto às suas características bioquímicas, o gênero *Salmonella* apresenta reações aos testes de oxidase negativa; catalase positivo; indol, VogesProskauer Vermelho de Metila, malonato e ureia negativa. Produzem gás sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase. Apresentam ainda como características metabólicas a capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, redução de nitrato a nitrito e utilização do citrato como única fonte de carbono, podendo ocorrer variações em função do sorovar e/ou da subespécie. Por exemplo, *Salmonella enterica* sorovar Arizonae não fermenta o dulcitol, mas frequentemente é malonato positivo. *Salmonella enterica* sorovar Pullorum não fermenta o dulcitol e *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum não descarboxila ornitina, sendo ambos imóveis. *Salmonella* sorovares Typhi, Pullorum e Gallinarum não produzem gás a partir da fermentação da glicose (FERREIRA et al., 2013).

O gênero *Salmonella* é constituído de duas espécies a *Salmonella bongori*, e a *Salmonella enterica*, sendo que esta última é de maior importância para saúde pública. As bactérias desse gênero apresentam grande variabilidade antigênica, denominadas sorovares ou sorotipos. São conhecidos mais de 2.500 sorovares pertencentes a esse gênero, sendo que os sorovares isolados com maior frequência em doença humana

pertencem à *Salmonella enterica* subespécie *enterica* com mais de 1500 sorovares conhecidos (SILVA et al., 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). A identificação dos sorovares é definida de acordo com suas características bioquímicas, sorológicas e antigênicas. Sendo a divisão de seus sorovares baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos “O”, flagelares “H” e capsulares “Vi”, estes encontrados somente nos sorovares *Salmonella enterica* sorovar Dublin, *Salmonella enterica* sorovar Typhi e *Salmonella enterica* sorovar Paratyphi. Sua taxonomia é definida conforme proposto pelo esquema Kauffmann-White (SILVA et al., 2007).

A infecção causada por *Salmonella* Enteritidis é denominada de infecção paratifoide (GELLI, 1995), que é uma doença aguda ou crônica não-específica a uma espécie. Animais destinados à produção de carnes para consumo humano podem atuar como hospedeiros assintomáticos de patógenos entéricos importantes que representam risco de infecção para o homem, tornando o seu controle, redução ou eliminação um desafio para a indústria (SHINOHARA, 2008).

Conforme dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (do inglês *Center for Disease Control and Prevention* – CDC), os sorovares mais encontrados em aves são *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, e *S. Senftenberg* (FOLEY & LYNNE, 2008). Já no Brasil, os principais sorovares encontrados em carcaças de frango e aves vivas, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Mbandaka* (BRASIL, 2008).

A preocupação a respeito da presença de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios de origem avícola aumentou em meados dos anos 80, quando *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 foi responsável por diversos surtos de infecção alimentar na Inglaterra devido a ingestão de alimentos contendo ingredientes de origem avícola (CARDOSO et al., 2015).

Em um estudo realizado na região metropolitana de São Luís, Maranhão, os sorovares de *Salmonella* identificados com maior incidência dentre as amostras de carcaça de frango foram *Salmonella enterica* sorovares: Albany, Schwarzengrund e Heidelberg (BOGÉA et al., 2015).

No estado de Goiás, Resende et al., (2005) avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos de corte de agroindústrias goianas foram analisadas 96 carcaças provenientes de abatedouros sob inspeção federal no Estado de Goiás, no

período de março a outubro de 2001. As carcaças foram submetidas à análise bacteriológica convencional e isolaram o microrganismo em 19 amostras. Foram identificados cinco sorovares (*S. Enteritidis*, *S. Livingstone*, *S. Muenster*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*).

Cardoso et al., (2015) investigaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos resfriadas provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo, onde foram analisadas 609 amostras no período 2000 a 2010. A presença de *Salmonella* spp. foi isolada em 89 carcaças de frango, sendo que o sorovar mais prevalente foi *S. Enteritidis* com 49,4%, seguida por *S. Albany* (15,7%), *S. Infantis* (11,2%), *S. Agona* (5,6%), *S. Tennessee* (4,5%), *S. Heidelberg* (3,4%), *S. Kentucky* (2,3%), *S. Enterica* O:4,5 (2,3%), *S. Montevideo* (1,1%) e *S. Newport* (1,1%).

Tessari et al., (2008), analisaram 116 amostras de carcaças de frango prontas para serem distribuídas no comércio e procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo. Das amostras analisadas três foram positivas para *Salmonella*, sendo que duas amostras (1,7%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. e uma (0,8%) por *Salmonella* Enteritidis.

2.2 SALMONELOSES

A salmonelose é uma das principais zoonoses de interesse em todo o mundo, por ter características endêmicas, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medidas para seu controle. A ocorrência das salmoneloses na população humana transmitida por alimentos é subnotificada, já que muitas ocorrências não são registradas aos órgãos competentes, portanto, tomar medidas preventivas torna-se necessário para evitar o risco de infecção na população humana (FERREIRA et al., 2013). Os sintomas característicos desta doença são: diarreia, febre, dores abdominais e vômito e que aparecem, em média, 12 a 36 horas após o contato com o patógeno (ALVES, 2012). Dados do CDC mostram que somente no mês de agosto de 2018, foram registrados 17 casos de surtos, incluindo uma morte em decorrência das DVA'S apenas nos Estados Unidos (CDC, 2018).

A preocupação a respeito da presença de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios de origem avícola aumentou em meados dos anos 80, quando o sorovar Enteritidis fagotipo 4 foi responsável por diversos surtos de infecção alimentar na Inglaterra devido a ingestão de alimentos contendo ingredientes de origem avícola

(CARDOSO et al., 2015 apud WALL; WARD, 1999). Uma pesquisa realizada no Rio Grande Sul mostrou que os ovos de galinha de granja (1.188 ovos analisados) produzidos e comercializados no Estado dentre os anos de 2010 à 2014 e 28 (2,36%) apresentaram resultado positivo para presença de *Salmonella* spp. (WOLSCHICK, 2015).

A maioria dos sorovares de *Salmonella* é patogênica para o homem, ocasionando diferentes sintomas em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, que vai depender do sistema imunológico do paciente. A salmonelose pode ser dividida em três grupos: a febre tifóide (Typhi), a febre entérica (Paratyphi A, B e C) e as infecções entéricas em decorrência de outras Salmonelas. Sendo que os sorovares Typhi, Paratyphi A e C são considerados patógenos exclusivos de humanos (FERREIRA, 2005).

A distribuição de sorovares de *Salmonella* spp. causadores de salmoneloses humanas é diferente nas regiões brasileiras. Loureiro et al. (2010) realizou uma pesquisa para identificar os sorovares de *Salmonella* envolvidos em casos de infecção humana, ocorridos em 43 municípios do Estado do Pará no período de 1991 a 2008. Foram utilizadas 890 amostras de *Salmonella* de coproculturas e hemoculturas. Os casos de infecção por *Salmonella* foram distribuídos em 13 sorogrupos, com destaque para o grupo O:9 (68,1%). Foram identificados 47 sorovares de *Salmonella*, destacando-se os seguintes sorovares: Typhi (58,9%), Enteritidis (5,4%) e Saintpaul (2,5%). Nota-se que o sorovar Typhi teve um resultado expressivo dentre as cepas identificados, mostrando que a febre tifoide representa um sério problema de saúde pública na Região Norte do País.

No Paraná, foram notificados 286 surtos de salmonelose envolvendo 5.641 pessoas entre 1999 e 2008, sendo que 34,8% dos casos estavam associados ao consumo de comida contendo carne e derivados. O sorovar prevalente foi Enteritidis, encontrado em 87,8% das cepas isoladas de pacientes e em 80,6% das cepas provenientes dos alimentos envolvidos nos surtos. Enteritidis PT4 foi o fagotipo predominante, porém foi observada maior prevalência de PT9 a partir de 2003 (KOTTWITZ et al., 2010).

2.3 CONTROLE DE SALMONELLA ENTERICA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A preocupação com os produtos de origem animal para consumo humano no Brasil, levou as autoridades se juntar com as indústrias alimentícias para garantir uma

segurança e qualidade nos produtos finais, principalmente quando se trata da produção avícola (VON RUCKERT, 2009).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, com uma produção média de 13,45 milhões de toneladas. O crescimento foi impulsionado aliado ao fato de ser a carne de frango um produto saudável e de preço acessível para a população e pela expansão das exportações, o volume total de frangos produzidos pelo país em 2019 foi de 68% destinado ao mercado interno e 32% para exportação. Sendo assim, o consumo per capita de carne de frango é de aproximadamente 42,8 quilos. (ABPA, 2020)

A indústria com expansão em potencial e com inúmeras mudanças nas últimas décadas, tornou-se inevitável a adoção de boas práticas de fabricação e implantação do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) na linha de produção de um abatedouro, com o objetivo de adequar os procedimentos conforme a legislação em vigor, além de obter uma descrição detalhada das características do produto e elaboração de fluxograma de processamento, podendo assim observar quais são os possíveis riscos de ocorrência de perigos biológicos, químicos e físicos, que venham futuramente causar danos na saúde do consumidor (SHINOHARA, 2008).

Os programas de segurança alimentar devem proporcionar um controle efetivo em toda a cadeia produtiva para aumentar a segurança e a qualidade dos produtos, evitando a multiplicação de patógenos na linha produtiva, principalmente em produtos vendidos *in natura*, como por exemplo a carne de frango, que se houver uma manipulação insatisfatória nas diversas etapas do processamento, acaba por tornar-se um veículo de transmissão de inúmeros microrganismos patogênicos, dentre eles, destaca-se a *Salmonella* spp., que segundo a legislação a ausência de qualquer sorovar deste patógeno deve ser de 25 gramas da amostra analisada (SANTOS, 2012).

Durante o abate dos frangos e do processamento das carcaças nos abatedouros, existem diversos pontos críticos de contaminações, onde as bactérias podem se propagar, como por exemplo, nas superfícies de equipamentos, corrente de ar do abatedouro, nas mãos dos manipuladores, e na água utilizada no sistema dos tanques de resfriamento (*chiller*), resultando na contaminação cruzada das carcaças. No entanto, neste último caso, a contaminação no *chiller* pode ser controlada, devido à associação de temperatura baixa com água clorada (GEORNARAS et al, 1996).

O controle microbiológico dos tanques de resfriamentos é feito através do controle de pH, temperatura, cloração da água potável e da carga microbiológica inicial das carcaças, estendendo-se a limpeza e desinfecção dos tanques com intervalo de oito em oito horas de trabalho, assim a carcaças de frango mantem-se inócua, sem aumento da carga microbiana (VON RUCKERT, 2009).

2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O problema da resistência aos antimicrobianos começou a ser discutido em meados da década de 70, quando os médicos perceberam que a ampla oferta de agentes antimicrobianos não estava resolvendo todas as infecções bacterianas (LOWY, 2003). Atualmente, este assunto vem sendo amplamente estudado em diversos gêneros bacterianos (RIBEIRO et al., 2006).

Pesquisas no mundo inteiro vem mostrando o aumento do número de resistência aos antimicrobianos, tendo como desafios o uso indiscriminado e incorreto de antibióticos, facilitando o surgimento de resistência em muitos microrganismos (RITTER, 2012).

A ocorrência de linhagens resistentes a desinfetantes também vem sendo relatada, o que pode representar desafios econômicos para a indústria de alimentos e trazer implicações para a saúde pública, especialmente quando se trata de resistência cruzada entre desinfetantes. Alguns estudos apontam resistência da *Salmonella* frente a principais desinfetantes usados na indústria de carne de frango, amônia quaternária, ácido peracético, hipoclorito de sódio, iodofor (MCDONNELL e RUSSELL, 1999; BOROWSKY et al., 2006; KREWER et al., 2012; BOTH, 2013). Essa realidade diminui a eficácia dos produtos de desinfecção, dificultando os programas de higienização e o controle desse patógeno na cadeia produtiva de aves.

A resistência bacteriana à antimicrobianos pode se classificar em dois tipos principais: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é natural, ou seja, quando uma espécie é resistente a um determinado antimicrobiano mesmo antes do seu uso. A resistência adquirida ocorre quando um microrganismo continua a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano ao qual ele já foi sensível (ANVISA, 2008), sendo o principal efeito colateral de seu uso à seleção de bactérias resistentes (SCHWARZ et al., 2010; RAO, 2013).

Existem três principais formas de resistência dos microrganismos aos antibióticos. Um destes mecanismos trata da inativação enzimática do antimicrobiano, decorrente da ação de enzimas bacterianas sobre o princípio ativo; outra forma consiste na alteração da estrutura da molécula-alvo do antimicrobiano; e por fim há os mecanismos que reduzem a concentração intracelular do antimicrobiano, como bombas de efluxo (RAO, 2013).

Com a preocupação alarmante sobre os riscos que a resistência antimicrobiana pode trazer para saúde pública, barreiras estão sendo estudadas para combater essa disseminação, com a exploração de novas terapias alternativas, como o uso de fagos e óleos essenciais como agentes antimicrobianos; e melhorias nos estudos das estratégias da transferência horizontal de genes, com o objetivo de inibir a transferência de resistência (BROWN-JAQUE et al., 2015).

A importância de *Salmonella* spp. na saúde pública não é devida apenas a sua alta frequência em surtos, mas também devido à grande resistência antimicrobiana que este microrganismo apresenta (TONDO & RITTER, 2012). *Salmonella* resistentes a antimicrobianos representam uma grave ameaça, porque podem comprometer o tratamento. Além disso, pessoas infectadas com cepas resistentes são mais propensas a sofrer um efeito adverso à saúde, como doença prolongada, aumento da gravidade da doença, hospitalização ou morte, em comparação àquelas infectadas com cepas sensíveis (COOK et al., 2009). Com isso se faz necessário o estudo de métodos alternativos de prevenção e controle para esses microrganismos patogênicos.

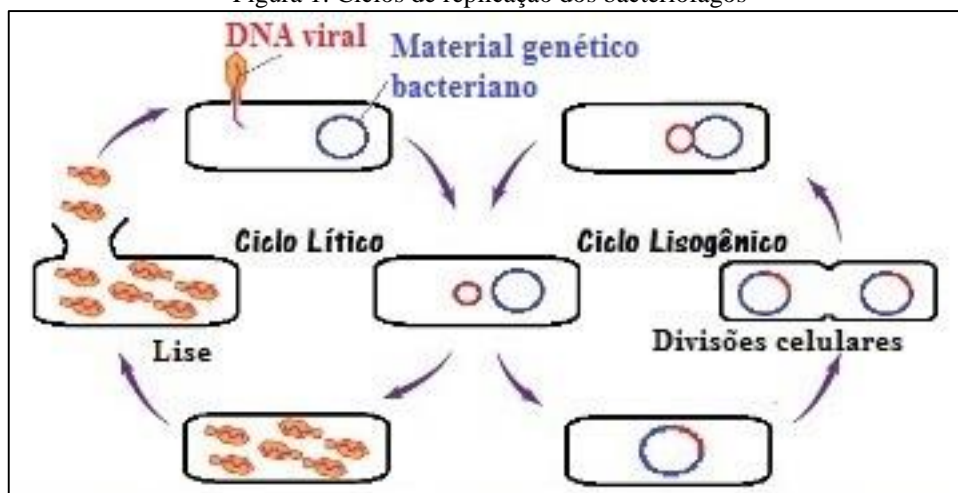
2.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BACTERIÓFAGOS

Os primeiros relatos sobre bacteriófagos foram do britânico Ernest Hankin, em 1896, que observou que as águas dos rios Jumna e Gange, da Índia, podiam inativar o agente da cólera e, dessa forma o pesquisador acreditava que nestas águas havia uma elevada atividade antibacteriana que acometia o *Vibrio cholerae*. Porém, ainda não se sabia quem seria o responsável por esta ação. Depois de duas décadas, Frederick W. Twort, um bacteriologista da Inglaterra e superintendente do Instituto Brown de Londres, caracterizou o fenômeno relacionando-o com ação dos bacteriófagos sobre seus hospedeiros: as bactérias (SOUSA, 2012).

Os bacteriófagos são classificados como líticos e lisogênicos, de acordo com seu ciclo de replicação (Figura 1). Os primeiros são os de maior interesse para o controle

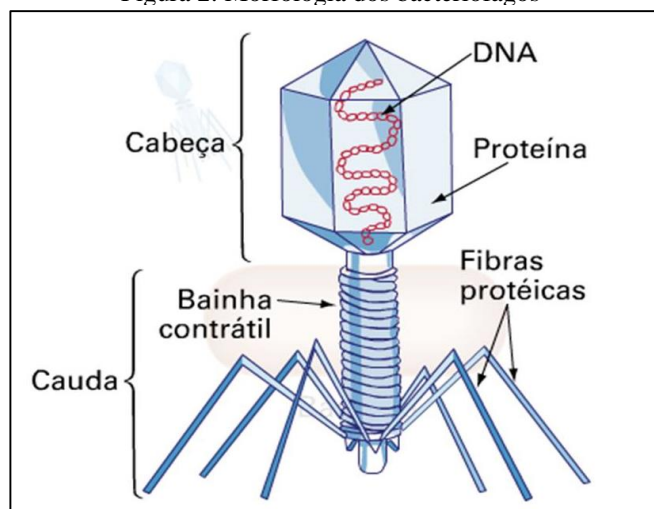
biológico de bactérias, pois lisam a célula hospedeira e, a progênie resultante dá continuidade ao ciclo lítico. No ciclo lisogênico, o ácido nucleico do fago se recombina com o da bactéria formando um prófago, que se reproduz com a célula hospedeira e confere imunidade contra a infecção pelo mesmo tipo de fago (MARTINS, 2014). A sua morfologia pode variar entre as formas cúbica, filamentosa ou pleomórfica e ter composição de DNA ou RNA recobertos por um capsídeo rico em proteína (Figura 2). O ácido nucléico pode ser de fita simples ou dupla e em alguns bacteriófagos o capsídeo é coberto por uma cauda contendo lipídios que desempenham, provavelmente, a função da aderência do bacteriófago à parede das células hospedeiras. Os bacteriófagos atualmente são taxonomicamente organizados em dez famílias com características morfológicas e genomas distintos (ICTV, 2019).

Figura 1: Ciclos de replicação dos bacteriófagos



Fonte: <https://alunosonline.uol.com.br/biologia/multiplicacao-dos-virus.html>, 2020

Figura 2: Morfologia dos bacteriófagos



<http://isaninhacientistaminicentista.blogspot.com/2012/04/virus.html>

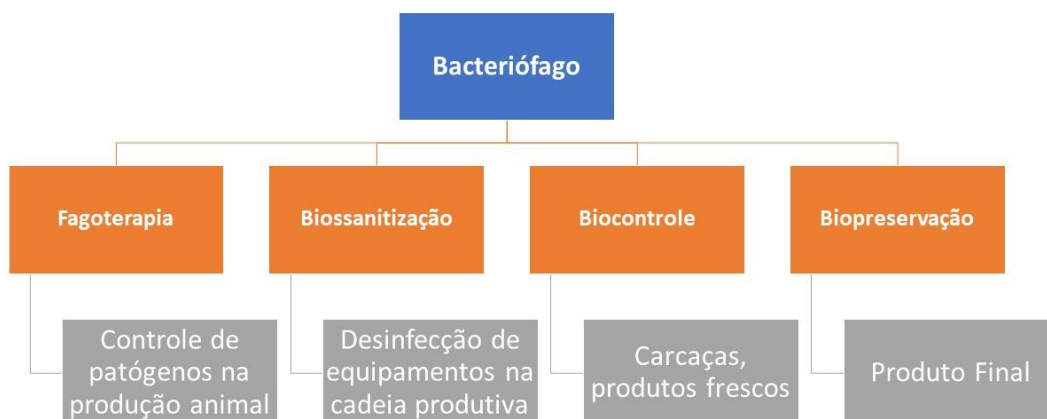
Os fagos são dependentes das células hospedeiras, por isso não possuem metabolismo próprio. Apresentam uma larga faixa de hospedeiros, tendo como alvo principal linhagens específicas. No ciclo de reprodução o primeiro passo é o reconhecimento por um receptor primário da célula hospedeira, seguido pela adsorção em um segundo receptor. A primeira adesão é reversível – a célula pode não estar viva. A segunda adesão é irreversível, e subsequentemente, o DNA fágico circulariza e a bactéria inicia a produção de proteínas fágicas (ROSSI, 2010).

2.6 BACTERIÓFAGOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO

Diversos estudos mostram que a contaminação de alimentos é um problema de saúde pública, pois os relatos descritos anualmente de doenças transmitidas por alimentos está cada vez maior, e a busca por proteção e conservação destes produtos tornou-se um desafio para as indústrias. Para controlar os patógenos presentes na cadeia produtiva, diversas estratégias estão sendo estudadas, e os bacteriófagos têm sido amplamente estudados como alternativa de controle (ENDERSEN, et al, 2014).

Os bacteriófagos podem ser aplicados em todas as fases de produção numa abordagem simples, em quatro etapas diferentes, como a fagoterapia, biossantização, biocontrole, biopreservação, a fim de garantir um produto inócuo ao consumidor (Figura 3) (SÁ, 2015).

Figura 3 Aplicação dos Bacteriófagos na cadeia produtiva de alimentos



Fonte: Adaptado de SÁ, 2015

Os bacteriófagos podem ser utilizados na prevenção ou redução de doenças durante a produção animal. A eficiência de bacteriófagos livres e microencapsulados foi demonstrada no controle de *S. Enteritidis* em poedeiras e em ovos comerciais. O tratamento com bacteriófagos livres ou microencapsulados mostraram uma redução na contaminação e detecção do patógeno na casca, na gema e na clara de ovos experimentalmente infectados. Ovos que foram higienizados, pasteurizados e não tratados com bacteriófagos obtiveram maiores médias de contaminação de *S. Enteritidis* na clara, na gema e na casca em relação aos ovos não higienizados, não pasteurizados e tratados com bacteriófagos (ALBINO, 2016).

Na desinfecção de equipamentos e superfícies de contato utilizadas na indústria de processamento e comercialização de frango de corte e derivados, o estudo sobre a utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp., mostrou que entre 3 a 9 horas o *pool* de bacteriófagos apresentou uma ação satisfatória eliminando a maioria dos patógenos. Desta forma, o uso de bacteriófagos é uma boa alternativa para o controle de biofilmes nas indústrias (GARCIA, 2015). O biocontrole e a biopreservação por fagos consiste respectivamente na descontaminação de carcaças e outros produtos crus, e aumentar a vida de prateleira de alimentos perecíveis, tem como objetivo funcionar como conservantes naturais. No estudo sobre os efeitos de bacteriófagos líticos sobre *S. Enteritidis* (SE) em carcaças e recortes de frangos tratados por imersão, demonstraram que a técnica de imersão de recortes e carcaças de frangos contaminados com SE em uma solução de bacteriófagos é capaz de reduzir a concentração bacteriana, sendo que quanto menor for a área de superfície dos produtos avícolas, maior a eficácia do tratamento (GONÇALVES, 2013).

Os bacteriófagos como biocontrole é um método promissor. Um exemplo disto é o produto comercial à base de bacteriófagos, o Agriphage, produzido pela *OmniLytics Inc.* para tratar doenças por manchas bacterianas nas lavouras, que foi o primeiro produto à base de fagos aprovado pela *US Environmental Protection Agency* para uso na agricultura nos Estados Unidos. Na indústria alimentícia, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou em 2006 a utilização do bacteriófago P100 (*Listex P100*), produto formulado a partir de um *pool* de fagos para o controle de *Listeria monocytogenes* em carnes e queijos. Os vírus bacterianos apresentam benefícios por serem autolimitantes, ou seja, somente se replicam na presença da bactéria com a qual possuem afinidade, por não atuarem na seleção de microrganismos resistentes, podem ser administrados em dose única, e de fácil uso, além de ser facilmente encontrados na

natureza. Além disso, os bacteriófagos não causam alergias e não alteram a estrutura, odor ou sabor dos alimentos (MACHALELA, 2016).

Os fagos utilizados em nosso estudo, demonstraram previamente, em diferentes experimentos, ação lítica contra isolados de *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Bredeney*, *S. Schwarzengrund*, *S. Infantis*, *S. Rissen*, *S. Lexington* e *S. Panama*. Estes sorovares foram isolados de amostras clínicas de aves ou de carne de frango e nossos estudos demonstraram que possuem genes de virulência, multirresistência a antimicrobianos e/ou capacidade de formação de biofilmes (POTTKER, 2016; PEIXOTO, 2019; RIZZO, 2017).

2.7 POLIMÉROS BIOADESIVOS

O polióxido de etileno (PEO) é uma macromolécula linear que é obtido da polimerização por abertura do anel do óxido de etileno. A regularidade da sua unidade estrutural permite um elevado grau de cristalinidade envolvendo 70 a 85 % do polímero. O PEO é compatível com uma vasta gama de plasticizantes, compostos de baixa massa molecular e outros polímeros (VILLANOVA, 2010).

Dependendo de sua composição eles atuam em diversas necessidades específicas de emulsificação, dispersão, detergência, entre outras, das indústrias de lubrificantes, pesticidas, detergentes, alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e petróleo (MANSUR, 2001).

Uma pesquisa sobre o óleo essencial de gengibre (OEG) e a utilização de polímeros a partir de fibras ultrafinas de proteína isolada de soja (PIS), polióxido de etileno (PEO) e zeína teve como objetivo a caracterização destes polímeros, para a encapsulação de diferentes concentrações de OEG, para ser aplicadas em embalagens de queijo minas frescal para o controle de cinco bactérias *Listeria Monocytogenes* (SILVA, 2018).

Em um estudo sobre a influência de polímeros bioadesivos sobre o efeito protetor do flúor no desenvolvimento da erosão dental, foram testados três polímeros Carbopol 980, Carboximetil Celulose e Aristoflex AVC, em concentrações pré-determinadas com base na viscosidade da solução a ser utilizada, que simularam um enxaguatório bucal. Concluíram que o Carbopol, sozinho ou associado ao Fluoreto de

Sódio, apresentou efeito protetor contra a desmineralização do esmalte dentário após o desafio erosivo (AVILA, 2014).

Atualmente, os biopolímeros são investigados e desenvolvidos, com base em sistemas de liberação controlada, melhorando assim a estabilidade de substâncias bioativas, como é o caso dos bacteriófagos, que se associado ao alginato, melhora a sua eficiência e ajuda a permanecer em condições gástricas. Um sistema de entrega oral capaz de fornecer proteção ao bacteriófago S1 durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) com um mês de idade. Os testes foram realizados *in vitro* e *in vivo* e mostraram que a esfera do alginato apresentou maior eficiência no encapsulamento, permitindo liberação do fago S1 a partir de três horas de agitação. Nos testes *in vivo* foi observado a presença de áreas líticas em que as esferas de alginato permitiram a liberação do fago no TGI, e a *Salmonella* Enteritidis foi reduzida 48 horas após a administração do tratamento (GARCIA, 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DOS BACTERIÓFAGOS

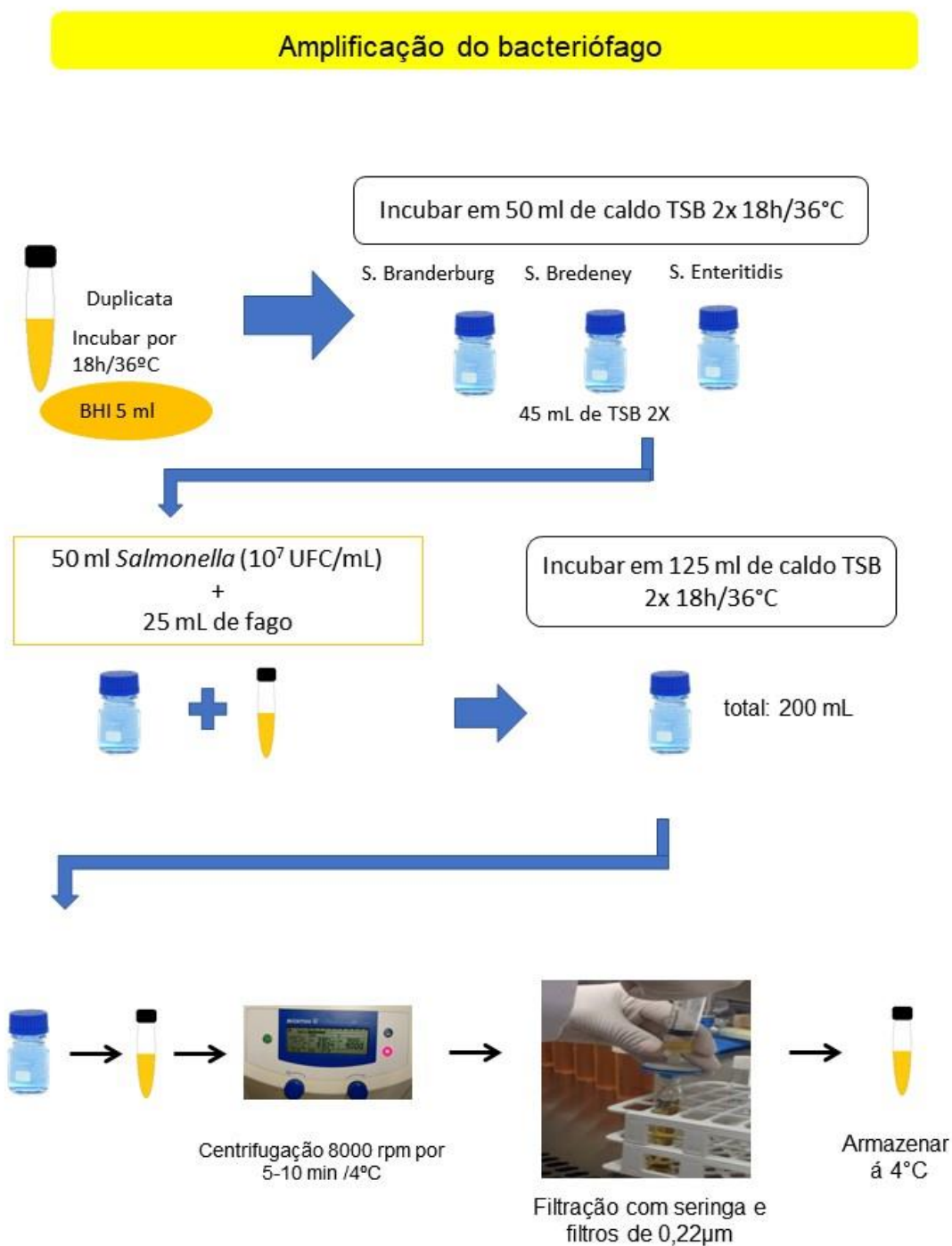
Em nosso estudo, foram utilizados os bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3 que foram isolados no Rio Grande do Sul, a partir de amostras de fezes de aves de criação extensiva e água residual proveniente do abate em frigorífico de aves, conforme Pottker, (2016). O isolamento dos fagos foi realizado de acordo com Sillankorva et al., (2008), baseado na técnica de sobrecamada de meio semissólido, a partir das bactérias hospedeiras sorovares *S. Brandenburg*, *S. Bredeney* e *S. Enteritidis*.

3.2 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Para a amplificação do número de fagos, amostras bacterianas de *S. Brandenburg*, *S. Bredeney* e *S. Enteritidis* que estavam armazenadas em caldo infusão cérebro e coração (BHI) 80% e com 20% de glicerol e conservadas na bacterioteca a -20 °C, foram reativadas. A reativação foi realizada utilizando meio de enriquecimento não seletivo (BHI), inoculação em meio de crescimento seletivo ágar Xylose Lisina Deoxycholate (XLD) por 24 horas e posterior seleção de uma colônia característica. A colônia foi novamente inoculada em caldo BHI, e incubadas a 37°C por 18h.

Em uma solução de 125 mL de TSB (*tryptic soy broth*) concentração dupla, foi inoculado 50 mL da bactéria hospedeira a uma concentração de 10^7 UFC/mL onde foi adicionado 25 mL do fago correspondente, sendo posteriormente incubado por 18 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, adicionou ao tubo 20 mL da solução de clorofórmio P.A e centrifugou sob refrigeração à 4°C em 8000 rpm por 5 a 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em seringa com filtros de 0,22 µm e transferidos para frascos estéreis (Figura 4). Após, foi retirado 20 µL do fago e incubado em 5 mL de BHI e, depois de 24 horas, foi observado se haveria multiplicação bacteriana, e após seguiu-se com o armazenamento a 4°C.

Figura 4: Protocolo de amplificação dos bacteriófagos.



3.3 TITULAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Para a realização da titulação dos bacteriófagos foi necessário realizar a diluição seriada da solução estoque dos fagos isolados. Para isso preparou-se microtubos com

900 µL de solução salina (0,85%) e realizou-se a diluição seriada do estoque de fagos de 10^{-1} até 10^{-10} . Após a diluição, os microtubos permaneceram em repouso por um período de 15 min. a 30 min. para pré adsorção dos fagos.

Para a realização da contagem, foram preparadas placas de Petri contendo uma fina camada de ágar TSA (*tryptic soy agar*) e foi adicionado 100 µL da bactéria hospedeira utilizada no isolamento do fago (previamente cultivada *overnight*) e 100 µL fago diluído. Em seguida foi vertido 5 mL de ágar semissólido e realizado movimentos de 8 para homogeneizar. Após a secagem do ágar, as placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 h. (Sillankorva et al, 2008). Posteriormente foi realizada a contagem de halos ou placas fágicas e determinada a titulação de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Título de bacteriófagos (UFP/mL)} = \frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume da amostra de bacteriófagos (mL)}}$$

3.4 LIOFILIZAÇÃO

Após o resultado da titulação, 100 ml de cada fago foram congelados em ultra freezer (Coldlab) por 24 horas e posteriormente submetidos ao processo de liofilização, em um equipamento de modelo SL-404 (Solab), a uma temperatura de -53°C por 120 horas.

3.5 FORMULAÇÃO DE BIOCOMPRESSOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA A PARTIR DOS COQUETÉIS DE BACTERIÓFAGOS

Biocompressos foram elaborados contendo um coquetel (*pool*) formados pelos três fagos, UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3. Para o preparo dos coquetéis, as amostras foram amplificadas e liofilizadas separadamente e unidas na proporção de 1:1:1. (ANDREATTI FILHO et al., 2007). Os bacteriófagos liofilizados, foram submetidos a titulação para saber em até quantas diluições, os vírus ainda estariam viáveis.

A elaboração do biocomprimido foi realizada com 30% (60 mg) de Polyox WSR-303, de 7.000.000 g/mol (gentilmente cedido pela Colorcon ®) (polímero responsável pela liberação controlada dos componentes), 69% (138 mg) de polióxido de etileno de

100.000 g/mol (Sigma-Aldrich ®), e 1% (2 mg) do *pool* de bacteriófagos, que foram pesados individualmente, para obtenção de uma mistura homogeneizada manualmente. Os comprimidos de massa final de 200 mg foram preparados por compressão direta em máquina de compressão excêntrica, utilizando jogo de punções de 9 mm, planos, sem sulcos e sua eficiência foi testada no controle de contaminação de *Salmonella enterica* (CRUZ, et al. 2008).

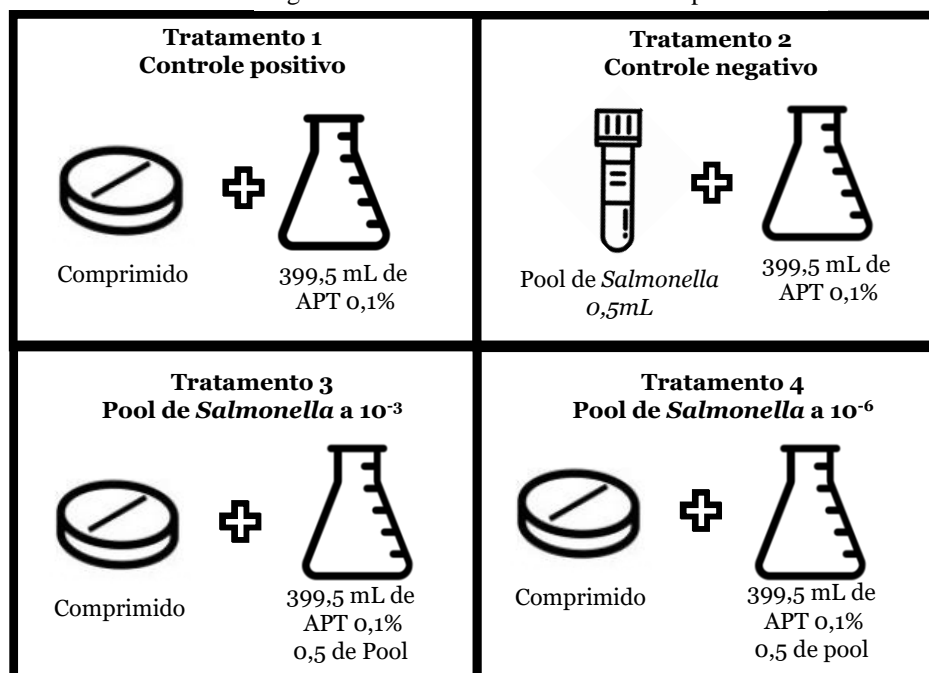
3.6 TESTE *in vitro* DOS BIOCOMPRIMIDOS CONTENDO OS COQUETÉIS DE BACTERIÓFAGOS CONTRA *SALMONELLA ENTERICA*.

A eficácia *in vitro* dos biocomprimidos contra *Salmonella enterica* foi avaliada em uma câmara incubadora refrigerada a uma temperatura de 4° C, com agitação em shaker orbital TE-421 (Tecnal), com intuito de mimetizar as condições reais do processo de refrigeração de carcaças de frango no equipamento industrial denominado *chiller*. As bactérias foram escolhidas de acordo com o grau de importância para saúde pública, sendo utilizados os sorovares *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, e *S. Heidelberg*, que foram isolados em pesquisas realizadas posteriormente em abatedouro de frango. Para isso, foram posicionados 16 erlenmeyers com volume de 399,5 mL de solução de água peptonada 0,1% estéril (APT 0,1%). Em cada erlenmeyer foi adicionado 1 comprimido que foram deixados intumescer para pré liberação dos fagos durante 15 minutos (menos nos erlenmeyers que iriam os controles negativos), para posteriormente ser inoculado 0,5 mL de *pool* de *Salmonella enterica*, deixando a solução final com um total de 400 mL. Amostras de 2 mL foram coletas em diferentes tempos (0, 3, 6, 9 e 12 horas). Os experimentos foram realizados em quatro tratamentos denominados de T1 – Controle positivo, T2 – Controle negativo, T3 – Biocomprimidos de fagos com concentração baixa de *Salmonella enterica* e T4 – Biocomprimidos de fagos com concentração alta de *Salmonella enterica* (Figura 5).

Para T1 foi utilizado somente o biocomprimido com fagos para ser o controle positivo e quantifica-los em Unidades Formadoras de Placas (PFU) no decorrer do tempo de coleta. Já T2 era o tratamento que obtinha uma carga bacteriana baixa de aproximadamente $2,7 \times 10^3$ UFC/mL de *Salmonella enterica* como controle negativo, para a quantificação do patógeno, sem a presença do biocomprimidos de fagos. Em T3 foi utilizado a mesma concentração bacteriana do T2, mas com presença do

biocomprimido de fagos imerso e em T4 a concentração bacteriana foi maior de aproximadamente $2,7 \times 10^6$ UFC/mL, com presença do biocomprimidos.

Figura 5: Tratamentos realizados nos experimentos.



Fonte: do autor, 2020

Em todos os tratamentos, foram realizadas as coletas nos tempos previsto por esta metodologia, para a quantificação de *Salmonella enterica* pela técnica do *drop plate* (técnica do gotejamento) em ágar PCA (ágar padrão para contagem) (APOSTOLIDIS et al., 2008; ERUTEYA; ODUNFA, 2016), e para a quantificação de bacteriófagos em Unidades Formadoras de Placas (PFU) foi empregada a técnica de titulação, conforme descrito anteriormente no item 3.3 de forma adaptada. Os ensaios foram realizados em quadruplicada e os experimentos replicados 2 vezes.

3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

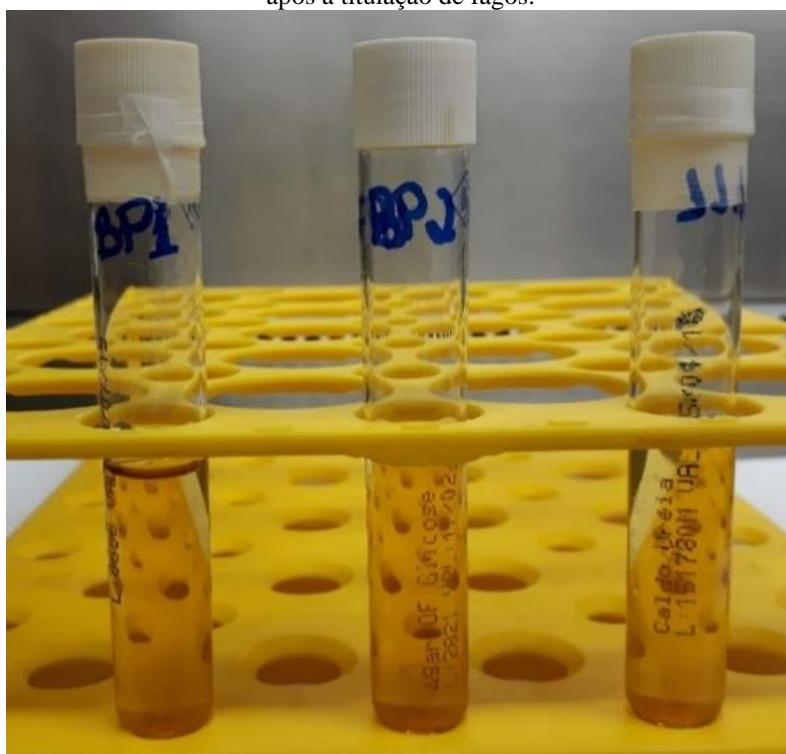
Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos programas Microsoft Excel versão 2016, e Statistica versão 7, por meio da Análise da Variância (ANOVA) e Tukey para a comparação das médias

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de esterilidade e titulação dos bacteriófagos

No caldo BHI, observou-se que não houve multiplicação bacteriana, apresentado resultados negativos no teste de esterilidade. O teste de esterilidade em caldo BHI foi um método empregado para observar se ainda existia multiplicação bacteriana após o processo de amplificação, filtragem e armazenamento dos fagos. Nestes procedimentos deve-se ter a real certeza que a célula hospedeira não tenha permanecido na solução final, para evitar a contaminação. A Figura 6 mostra o caldo BHI sem turvação, portanto, os fagos estão livres de células bacterianas, mostrando-se viáveis e adequados para atender as posteriores demandas.

Figura 6: Teste dos bacteriófagos em caldo BHI para observar presença ou ausência de turvação no meio após a titulação de fagos.



Fonte: do autor.

Na titulação, antes da liofilização, os fagos mostraram ação lítica frente as suas bactérias específicas e o UPF_BP2 agiu em mais de um sorovar além de sua hospedeira, a *S. Bredeney*, e com alta titulação com carga viral de $8,4 \times 10^{11}$ UFP/mL contra *S. Brandenburg* (Tabela 1).

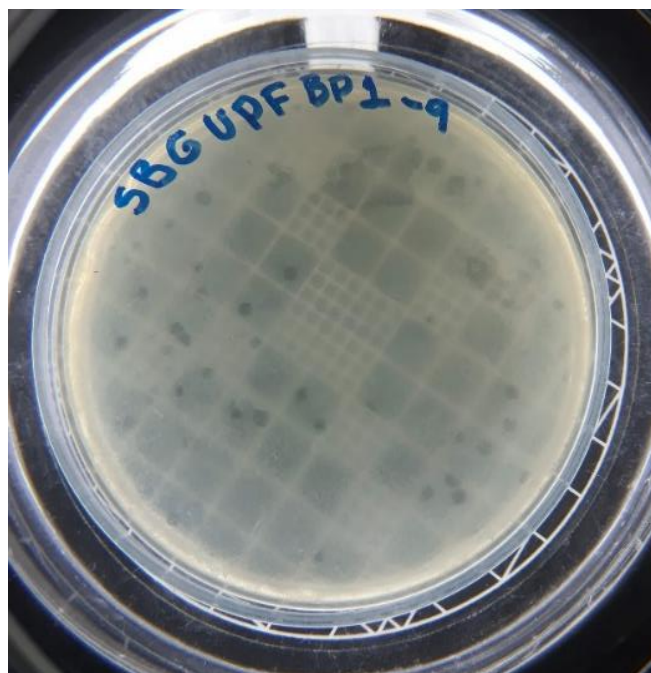
Tabela 1: Titulação dos bacteriófagos frente às bactérias hospedeiras antes da liofilização.

Fagos	Titulação dos Bacteriófagos (UFP/mL)		
	Sorovares		
	<i>S. Brandenburg</i>	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Enteritidis</i>
UPF_BP1	$5,1 \times 10^{11}$	0	0
UPF_BP2	$8,4 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^9$	0
UPF_BP3	0	0	$4,2 \times 10^9$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 7 podemos visualizar as placas de lise do fago UPF_BP2 contra a *S. Brandenburg*, que não é a sua bactéria hospedeira, demonstrando a habilidade de infecção em mais de um sorovar.

Figura 7: Placa que mostra formação de lise em *S. Brandenburg*.



Fonte: do Autor, 2020

Os resultados demonstraram que alguns fagos não apresentaram títulos nas outras bactérias, evidenciando que possíveis fatores físicos - químicos ou temperatura, podem ter afetado a sobrevivência dos vírus, já que estes fatores se não forem controlados podem inativa-los com a perda ou deformações de seus elementos estruturais (cabeça, e cauda), lipídeos ou DNA (SOUSA, 2012).

Em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa PEIXOTO, 2019 constatou que as amostras de *S. Enteritidis* sofreram lise por, pelo menos, um dos fagos citados e que o *pool* desempenhou melhor ação lítica na inibição da formação do biofilme e na remoção do biofilme pré-formado. RIZZO, 2017 avaliou os mesmos fagos, que apresentaram um bom potencial de lise em 38 cepas de *S. Gallinarum*. Em outro estudo, POTTKER, 2016, demonstrou-se que os bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3 foram eficazes contra diversos sorovares de *Salmonella* spp.

4.2 Liofilização

Os fagos apresentaram diferentes rendimentos após o processo de liofilização, apesar de terem o mesmo volume inicial, como pode ser observado no Quadro 1.

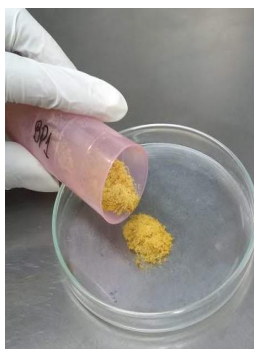
Quadro 1 - Rendimento dos bacteriófagos após liofilização.

Bacteriófagos	Rendimento dos bacteriófagos liofilizados	
	Volume (mL)	Massa (g)
UPF_BP1	100	3,30
UPF_BP2	100	4,12
UPF_BP3	100	2,69

Fonte: do autor, 2020.

Os bacteriófagos, após liofilização (Figuras 8), novamente passaram pela técnica de titulação de fagos, para saber se os vírus ainda estariam viáveis depois do processo, sendo assim, observamos que a contagem de títulos foi mais baixa, como o caso do UPF_BP1, que teve uma redução de 3,4 log, depois da liofilização, mostrando que houve perdas no processo (Tabela 1 e 2).

Figura 8: Amostra liofilizada



Fonte: do autor

Tabela 2 Titulação dos bacteriófagos frente às bactérias hospedeiras após a liofilização.

Bacteriófagos	Sorovares		
	<i>S. Brandenburg</i>	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Enteritidis</i>
UPF_BP1	$1,7 \times 10^9$	0	$3,5 \times 10^3$
UPF_BP2	$2,4 \times 10^3$	$5,9 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$
UPF_BP3	4×10^3	0	$2,7 \times 10^6$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

As possíveis perdas apresentadas neste processo podem ter ligação a fatores físicos, como a temperatura, pois alguns autores não recomendam por exemplo, o congelamento de fagos na temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, pois a formação de cristais de gelo danifica a estrutura do vírus, levando a sua inativação (SOUSA, 2012). Como antes do processo de liofilização, as amostras são congeladas a uma temperatura de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para uma menor criação de cristais de gelo, por 24 horas, assim, fica evidenciado que a redução de log após a liofilização, pode-se justificar que a baixa temperatura tenha causado danos às estruturas dos fagos, levando-os a supressão, mesmo com a presença de triptona que serve como agente crioprotetor (ACKERMANN et al., 2004; MONOHAR, 2019; LIANG, et al., 2020).

Um estudo sobre liofilização de bacteriófagos mostrou que este método é eficiente para secar fagos trazendo pequenas redução nas suas atividades fágicas, o que ajudaria no desenvolvimento de diferentes elaborações e possíveis revestimentos bioativos contendo fagos (PUAPERMPPOONSIRI, 2009). Em uma outra pesquisa sobre condições de liofilização para armazenamento de fagos, foi observado que, a atividade de três bacteriófagos testados tivera perdas de até 4 log na sua viabilidade após o processo de liofilização (MONOHAR, 2019).

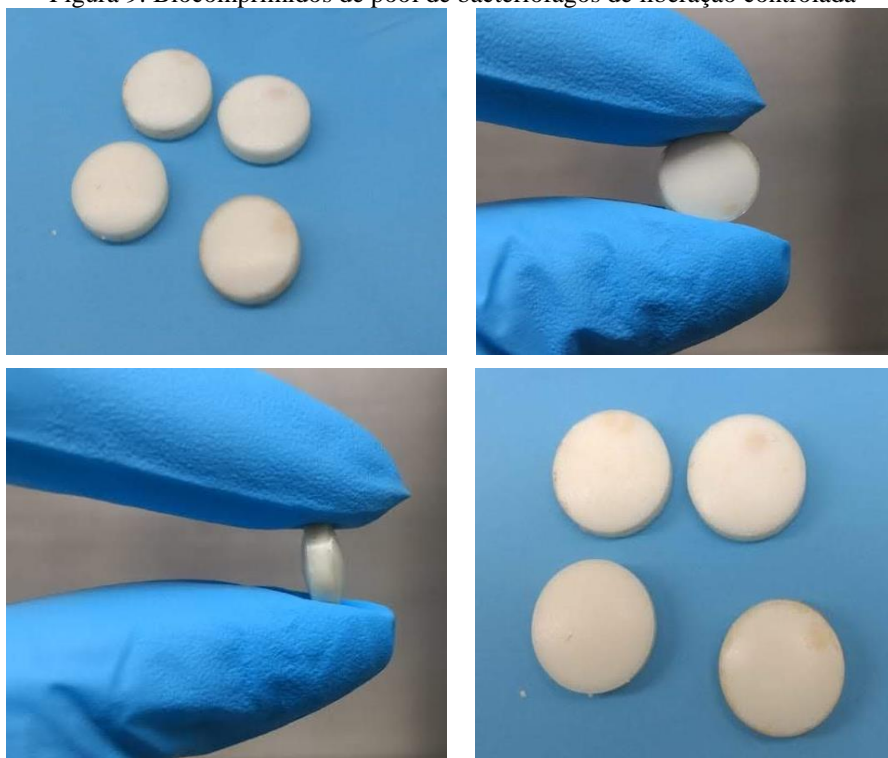
Com os resultados da titulação, prosseguimos os procedimentos, dando início ao processo de elaboração dos comprimidos.

4.3 Elaboração dos biocomprimidos de coquetel de bacteriófagos

Os comprimidos de bacteriófagos foram especificamente elaborados para este estudo, a partir de um *pool* composto por três fagos líticos específicos de *Salmonella*

enterica denominados de UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3. Estes biocomprimidos apresentam possível potencial para ser aplicado em tanques de resfriamento para o controle deste patógeno na cadeia produtiva de frangos. O liofilizado do *pool* de fagos e, os outros componentes foram homogeneizados e comprimidos. Os biocomprimidos visualmente eram todos parecidos, com manchas marrons, oriundas do meio de cultura no qual o fago era armazenado, e tinham aspecto liso, com peso médio de 200 mg (Figura 10)

Figura 9: Biocomprimidos de pool de bacteriófagos de liberação controlada



Fonte: do autor, 2020

Um estudo sobre compressão direta de comprimidos de pós em forma sólida de dosagem oral, observou que os fagos em comprimidos permitiriam a entrega confiável de altos títulos de fagos viáveis no local da infecção no trato gastrointestinal. Essas são vantagens importantes e podem ser alcançadas usando o processo relativamente simples, altamente escalável e de baixo custo avaliado no presente estudo (VINNER, 2019).

Uma pesquisa realizada para avaliar o uso de revestimentos biológicos de sementes à base de bacteriófagos incorporados em polímeros polivinílicos e revestido em sementes de milho contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *Nebraskensis*,

demonstrou que após 24 h de secagem, todos os revestimentos de polímero mostraram retenção semelhante de bacteriófagos ativos, que foi maior que a retenção para bacteriófagos revestidos apenas com tampão, evidenciando que agentes de biocontrole associados aos polímeros também melhoram a adesão ao tratamento, reduzindo possíveis contaminações (KIMMELSHUE, 2019)

4.4 Teste dos biocomprimidos de bacteriófagos

Os resultados para o teste dos biocomprimidos de bacteriófagos mostraram que em até 12 horas, o tratamento T2 mostrou-se estável no decorrer do processo, ficando no tempo 0 com 3,8 log UFC/mL e em 12 horas com 3,5 log UFC/mL. Já no T3 obteve uma leve redução do patógeno de 0,4 log durante os ensaios, apesar de mostrar resultados semelhantes ao do T2. Em T4, o tratamento se iniciou em 7,0 log UFC/mL, chegando no tempo final com 6,5 log UFC/mL (Tabela 3). Os tratamentos não apresentaram diferença significativa no decorrer do tempo pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3: Resultados obtidos no uso dos biocomprimidos contra pool de *Salmonella enterica*.

Tratamentos – log UFC/mL			
Tempos (horas)	T2	T3	T4
0	3,857±0,0 ^a	3,914±0,1 ^a	7,055±0,9 ^b
3	3,795±0,3 ^a	3,819±0,2 ^a	7,560±0,4 ^b
6	3,556±0,0 ^a	3,656±0,2 ^a	7,148±0,2 ^b
9	3,795±0,3 ^a	3,644±0,3 ^a	7,150±0,3 ^b
12	3,556±0,3 ^a	3,525±0,2 ^a	6,562±0,1 ^b

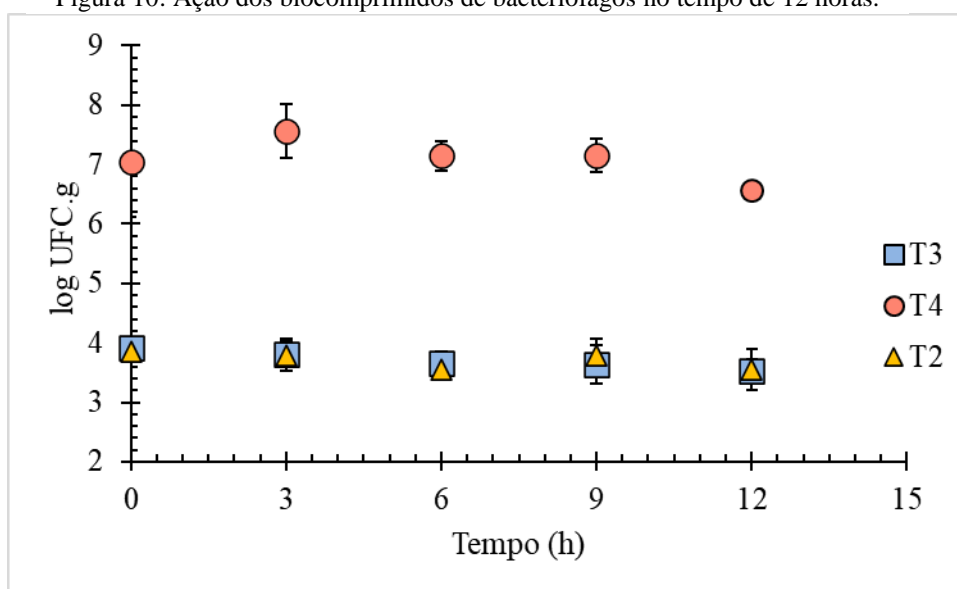
Os resultados estão expressos em \log_{10} UFC/mL como média \pm SD. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: do Autor, 2020.

O T2 era o tratamento que tinha apenas *Salmonella enterica* como controle dos ensaios, sem bacteriófagos. No decorrer do processo, foi observado que não houve multiplicação bacteriana significativa por até 12 horas, demonstrando a eficácia da temperatura de 4°C no controle do crescimento microbiano com esta concentração bacteriana. O T3 mostrou resultados similares ao T2, mesmo com o biocomprimido de fagos sendo aplicado como alternativa de controle de patógenos. Esses resultados mostram que os tanques de resfriamentos, que têm como objetivo atuar na remoção de

calor para controle de patógenos, ao resfriar as carcaças de frango a uma temperatura de no mínimo 4° C, mostra-se eficaz, pois manteve estável a proliferação de *Salmonella enterica*, que pode vir a afetar a inocuidade do produto final (NICOLAU, 2016).

No tratamento T4, foi possível observar uma contagem elevada do patógeno, já que o inoculo inicial era maior do que os demais tratamentos. Porém, a redução bacteriana entre os tempos não foi relevante, como mostra a Figura 11, mostrando que, apesar da redução de 0,5 log do tempo 0 até as 12 horas, não houve diferença estatística. Em nosso experimento não havia presença de cloro, como é empregado nas indústrias alimentícias, como controle de microrganismos patogênicos.

Figura 10: Ação dos biocomprimidos de bacteriófagos no tempo de 12 horas.



T2: tratamento com *Salmonella enterica*, T3: tratamento com baixa concentração de *Salmonella enterica*, mais os biocomprimidos de bacteriófagos, T4: tratamento com alta concentração de *Salmonella enterica*, mais os biocomprimidos de bacteriófagos

Uma pesquisa sobre a avaliação das condições de armazenamento e eficiência *in vitro*, de um novo coquetel de fagos de *Salmonella* microencapsulado para controle de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, apresentaram resultados que diferem dos nossos, pois foi observado por Petsong (2019) que os níveis de carga bacteriana diminuiram 1,79 e 3,63 log₁₀ UFC / mL a 37°C, e 0,43 e 0,76 log₁₀ UFC / mL a 10 ° C. (PETSONG, 2019).

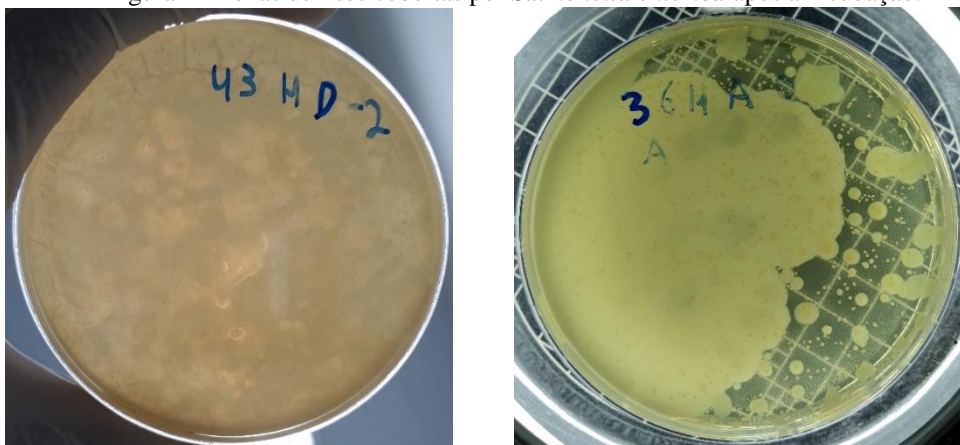
Em uma pesquisa sobre a avaliação da capacidade lítica de amplo espectro de coquetéis de bacteriófagos contra vários sorovares de *Salmonella* spp e seus efeitos *in vivo* em porcos desmamados infectados com *S. Typhimurium* foram preparados quatro

coquetéis utilizando 13 fagos, e a capacidade lítica dos coquetéis foram testados usando cepas de referência de *Salmonella* e isolados de campo. Os coquetéis mostraram 100% de eficiência contra as cepas de referência, e 92,5% de eficácia frente a isolados de campo, evidenciando uma excelente atividade fágica frente aos agentes bacterianos (SEO, 2018).

Para implementar mais estrategicamente um esquema de fagoterapia para o controle de *S. Enteritidis* em frangos de corte, VAZ (2020) elaborou um coquetel contendo três bacteriófagos líticos do tipo selvagem previamente isolados de galinhas, e foi observada uma redução de 1,49, 0,65 e 0,58 log₁₀ UFC / mL no número de *S. Enteritidis* pelo uso dos fagos (VAZ CSL, 2020).

A metodologia utilizada para a quantificação dos bacteriófagos em unidades formadoras de placas (PFU) não foi eficaz em nenhum dos tratamentos, demonstrado na Figura 12.

Figura 11 Zonas de lises cobertas por *Salmonella enterica* após a incubação.



Legenda: na esquerda imagem da placa de petri apresentando Zonas de lises no T4, na direita, placa de petri apresentando lises do T3.

No tratamento T1, era somente o biocomprimidos imerso em APT 0,1%, para a contagem de PFU/ml, nos tempos pré estabelecidos (0, 3, 6, 9, 12 horas), no entanto, não foi possível realizar a contagem de títulos, pois as condições empregadas não foram favoráveis para apresentar zonas de lises nas placas.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados, podemos concluir a metodologia utilizada para amplificação dos bacteriófagos se mostrou eficaz na eliminação das bactérias hospedeiras, não apresentando contaminação bacteriana após enriquecimento em caldo BHI. Antes da liofilização os bacteriófagos demonstraram bom desempenho na ação lítica das bactérias hospedeiras. No entanto, após o processo de liofilização, foi observada uma redução na contagem de títulos, evidenciando que houve perdas no processo.

O teste para verificar a ação do coquetel de bacteriófagos em formulação de biocomprimidos demonstrou pouca eficácia na redução da multiplicação de *Salmonella enterica*, não apresentando diferença significativa entre os tempos e tratamento.

Para trabalhos futuros, sugere-se modificações na metodologia para o teste *in vitro* dos biocomprimidos, como o uso de centrifugação e filtragem das amostras antes da inoculação, para não haver erros de contagens, ou impossibilitar a leitura das lises. Elaboração de formulas com dosagens diferentes de fagos e polímeros, além de testes com água em temperaturas diferentes, para determinação de melhores condições e melhores aplicações para o biocomprimido de fagos.

REFERÊNCIA

ABPA. **Relatório anual da Sociedade Brasileira de Proteína Animal**, em 2020. Disponível em: <https://abpa-br.org>. Disponível em: 28/07/2020

ALBINO, L.A.A. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella Typhimurium***. p. 94, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2011.

ACKERMANN H-W. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, v. 154, n.4. 2003. p. 245-251.

ACKERMANN, H.W. Bacteriophage Taxonomy. **Microbiology Australia**, p. 90-94. 2011.

ALVES, A.R. de F. **Doenças Alimentares de Origem Bacteriana**. p. 87, Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, 2012.

ANDREATTI FILHO, R.L.; HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. **Poult. Sci.** v. 86, p. 1904–1909, 2007.

APOSTOLIDIS, E. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 317–324, 2008.

ÁVILA, D.M.S. **Influence of polymers bioadhesive on the protective effect of fluoride over enamel erosion development**. Dissertação de Mestrado. Institute of Science and Technology, UNESP – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos - SP, 2014.

BOGÉA, J.S.; PASSOS, A.C.S.dos; LIMA, L.de S.; LIMA, R.M.S.; BRITO, D.A.P. Ocorrência de *Salmonella* spp. e seus sorotipos em Carcaças de Frangos Abatidos em Mercados da Região Metropolitana de São Luís-Maranhão. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 29, p. 3673-3676, 2015.

BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M.. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural** v. 36, p.1474-1479, 2006.

BOTH, J.M.C. **Atividade antibacteriana de desinfetantes convencionais e de extrações de *Achyrocline satureioides* (lam.) dc. (asteraceae) (“macela”) sobre *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (mrsa)**. p.103. Tese, Doutorado - UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2018. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2017.pdf>> Acesso em: 18 mai. 2018.

Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2019. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>> Acesso em: 09 ago. 2019.

BRASIL. Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa**. p.167, 2008.

BRASIL. Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa**. p.167, 2008.

BROWN-JAQUE, M.; CALERO-CACERES. W.; MUNIESA. M. Transfer of antibioticresistance genes via phage-related mobile elements. **Plasmid**, v.79, p.1–7, 2015.

CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F. Z.; CASTRO, A.G.M. de; LUCIANO, R.L.; TESSARI, E.N.C. Ocorrência de Salmonella spp. Em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, 1679-7353, p. 1-13, 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Salmonella. <<https://www.cdc.gov/features/salmonella-food/index.html>>, 2019.

COLLIGNON, P. Antibiotic resistance in human Salmonella isolates are related to animal strains. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 279, p. 2922–2923, 2012.

COOK, A.; REID-SMITH, R.; IRWIN, R.; MCEWEN, S.A.; VALDIVIESO-GARCÍA, A.; RIBBLE, C. Antimicrobial resistance in Campylobacter, Salmonella, and Escherichia coli isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canadá. **Journal of Food Protection**. v.72, p. 473–481, 2009.

CRUZ, A.P.; BERTOL, C.D.; STULZER, H.K.; MURAKAMI, F.S.; COSTELLA, F.T.; ROCHA, H.V.A.; SILVA, M.A.S. Swelling, erosion, and release behavior of PEO/primaquine matrix tablets. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 7, p. 413-418, 2008.

ERUTEYA, O.; ODUNFA, S. Effects of ethanol and aqueous extracts of six indigenous spices on Listeria Monocytogenes in Meat. **British Microbiology Research Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2016.

ENDERSEN, L.; O'MAHONY, J.; HILL, C.; ROOS, R.P.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. Phage Therapy in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5:327-49, 2014.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.

FERREIRA, F.B. **Salmonelose**. 2005, p. 83, Graduação, Monografia, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2005.

FERREIRA, P.daS. **Características genéticas e de patogenicidade das salmonelas com ênfase na Salmonella enterica serovar schwarzengrund**. Trabalho apresentado no Seminário aplicado do programa de pós-graduação em ciência animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, v.86, n.14, p.173-187, 2008.

FUNK, J.A.; DAVIES, P.R.; NICHOLS, M. A. The effect of fecal sample weight on detection of Salmonella enterica in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, n. 5, p. 412-418, 2000.

GARCIA, K.C.O.D. **Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de Salmonella spp. em superfícies (aço inoxidável, polivinil cloreto e vidro) na indústria de processamento e comercialização de carcaças de frango de corte e derivados**. Dissertação, Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP).p.98, 2015.

GELLI, S. D. Surtos humanos por Salmonella em alimentos. **Aves e Ovos**, São Paulo, SP. 1995.

GEORNARAS, I. et al. Bacterial populations associated with poultry processing in a south African abattoir. *Food Microbiology*, v.13, p.457-465, 1996.

GONG, C.; JIANG, X. Application of bacteriophages to reduce Salmonella attachment and biofilms on hard surfaces. *Poultry Science* 0:1–11, 2016.

GONÇALVES, G. A. M. **Utilização De Bacteriófagos Ambientais Em Associação Com O Bacteriófago P22 Na Redução De Salmonella Enteritidis Em Ovos, Frangos, Carcaças E Recortes**. Tese, Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. p. 74, 2013.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; CAMPOS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, François-Xavier. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor. *Research in microbiology*, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HANGENS, S.; LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.76, n.3, p 513 – 519, 2007.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses
<<https://talk.ictvonline.org/information/>>2019

KIMMELSHUE, C.; GOGGI, A.S.; CADEMARTIRI, R. The use of biological seed coatings based on bacteriophages and polymers against *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in maize seeds. **Scientific Reports.**, 2019;9(1):17950. doi:10.1038/s41598-019-54068-3.

KOTTWITZ, L.B.M; OLIVEIRA, T.C.R.M; ALCOCER, I; FARAH, S.M.S.S; I ABRAHÃO, W.S.M; RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmoneloses ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.32, p.9-15, 2010.

KREWER, C.C.; GRESSLER, L.T.; COSTA, M.M.; KREWER, C.C.; VARGAS, A.C. Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2012, 32(11):1116-1120, p. 1116 – 1120, Nov. 2012.

KRYLOV, V.N.; BOURKALTSEVA, M.V.; PLETENEVA, E.A. Bacteriophage's Dualism in Therapy. **Trends Microbiol.**, 27(7):p. 566-567. 2019. doi:10.1016/j.tim.2019.05.001

LIANG, L.; CARRIGY, N.B.; KARIUKI, S. Development of a Lyophilization Process for *Campylobacter* Bacteriophage Storage and Transport. **Microorganisms**. 2020;8(2):282. doi:10.3390/microorganisms8020282

LOUREIRO, E.C.B.; MARQUES, N.D.B.; RAMOS, F.L. de P.; REIS, E.M.F. dos R.; RODRIGUES, D. dos P.; HOFER, E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 93-100, 2010.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. Division of Infectious Diseases, Departments of Medicine and Pathology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, New York, USA. **J. Clin. Invest.**, v.111, p.1265–1273, 2003.

MACHALELA, A.A. **Uso de bacteriófagos como alternativa de conservação de leite em Moçambique**. Mestrado, Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. P.76. 2016.

MARTINS, M.F. **Avaliação da eficácia de desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies usados em restaurantes em Portugal em biofilmes de *Salmonella enterica***. p. 86. Dissertação, Mestrado – Universidade de Coimbra, Portugal, 2014.

MATSUZAKI, S. et al. The age of the phage. **Nature. May**, v. 509, p. 9, 2015.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MANOHAR, P.; RAMESH, N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. **Scientific reports** vol. 9,1 15242. 23 Out. 2019.

MANSUR, C.R.E.; Lucas, E.F. Interação tensoativo/hidrotropo em sistemas aquosos, utilizando ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C **Química Nova**. vol.24 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2001.

NICOLAU, J. P. **Controle De Salmonella Sp. Em Carcaças De Frango Pelo Uso De Descontaminantes Químicos Durante O Processo De Abate E As Consequências Na Qualidade Da Carne**. Tese, doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, p. 75, 2016.

PEIXOTO, C.S. **Biocontrole de Salmonella Enteritidis por Bacteriófagos**. Dissertação, Mestrado. Universidade de Passo Fundo (UPF), p. 104. Passo Fundo, RS, 2019.

POTTKER, E S. **Genômica e Caracterização Fenotípica De Bacteriófagos Líticos Para Biocontrole De Salmonella Enterica**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, 2016.

PETSONG, K; BENJAKUL, S; VONGKAMJAN, K. Evaluation of storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated Salmonella phage cocktail for controlling *S. enteritidis* and *S. typhimurium* in-vitro and in fresh foods. **Food Microbiol**. 2019;83:167-174. doi:10.1016/j.fm.2019.05.008

PUAPERMPOONSIRI, U; FORD, S.J.; VAN DER WALLE, C.F. Stabilization of bacteriophage during freeze drying. **Int J Pharm**. 2010; 389(1-2), p.168-175.

PUAPERMPOONSIRI, U; SPENCER, J; VAN DER WALLE, C.F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. **Eur J Pharm Biopharm**. 2009; 72(1):26-33.

RAO, S. **Antibiotic Susceptibility Testing**. Disponível em: <<http://www.microrao.com>>. Acesso em 03 de julho de 2017.

REARDON, S. Resistance to last-ditch antibiotic has spread farther than anticipated. **Nature**. doi:10.1038/nature.2017.22140. 2017a.

REZENDE, C.S.M.; MESQUITA, A.J. de; ANDRADE, M.A.; LINHARES, G.F.C.; MESQUITA, A.Q. de; MINAFRA, C.S.. Sorovares de Salmonella isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Rev Port Cienc Vet**, v. 100, n. 555-556, p. 199-203, 2005.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; DOS SANTOS, L.R.; FITTÉL, A.P.; DO NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v.73, n.3, p.357-360, 2006.

RITTER, A. C. **Envolvimento dos genes rpos e dps na resistência ao hipoclorito de sódio e do gene ompr na resistência térmica de Salmonella Enteritidis SE86.** Tese, Doutorado, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, p. 95. 2012.

RIZZO, N.N. **Salmonella Gallinarum Multirresistentes e Formadoras de Biofilmes em Cascas de Ovos são Sensíveis a Bacteriófagos.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, 2017.

ROSA, G. da; SPOSITO, P. H.; GONÇALVES, A. P. P.; HAFEMANN, D. C. M.; MERLINI, L. S. Pesquisa de Salmonella sp. em carne de suíno e frango comercializadas na região noroeste do estado do Paraná – Brasil, **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, v.11 n.21, p. 1493 – 1498, Goiânia, 2015.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: **Atheneu**; 2005.

SÁ, M. J. F. **Aplicação de bacteriófagos em biocontrole.** Dissertação, Mestrado. Universidade do Minho, Braga. p.111. 2015.

SANTOS, JOSÉ RODOLFO DOS; MEZA, SHARON KARLA LÜDERS; MARTINI, KELLI CRISTINA; VIANNA, RICARDO. A importância do controle da Salmonella na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientia Agraria Paranaensis – SAP**, v. 12, n. 3, jul./set., p.167-174, 2013.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNS ON, A.P.; GAASTRA, W. Multi-resistance. **DTU Food, National Food Institute -Newsletter to the National Reference Laboratories for Antimicrobial Resistance**, n.4, p.1-4, 2010.

SEO, B.J.; SONG, E.T.; LEE, K. Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various Salmonella serovars and their effects on weaned pigs infected with Salmonella Typhimurium. **J Vet Med Sci.** 2018;80(6), p.851-860. doi:10.1292/jvms.17-0501

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Revista Ciências e saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.13 n.5, p. 1675-1683, 2008.

SILLANKORVA, S.; PLETENEVA, E.; SHABUROVA, S. S.; CARVALHO, C.; AZEREDO, J.; KRYLOV, V. Salmonella Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. **Journal of Applied Microbiology.** ISSN 1364-5072, p 1175-1186, 2010.

SILVA, F. T. **Ação do óleo essencial de gengibre (Zingiber officinale) encapsulado em fibras ultrafinas de proteína isolada de soja, poli (óxido de etileno) e zeína no controle antimicrobiano in situ.** 66p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA N.F.A; TANIWAKI, M.H. SANTOS. R.F.S.; GOMES, R.A.R. Salmonella in: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. cap.19, p.253-285.

SOUSA, A. M. **Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas**. Monografia, pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. p. 61. 2012.

VINNER, G.K; REZAIIE-YAZDI, Z; LEPPANEN, M; STAPLEY, A.G.F.; LEAPER, M.C.; MALIK, D.J. Microencapsulation of *Salmonella*-Specific Bacteriophage Felix O1 Using Spray-Drying in a pH-Responsive Formulation and Direct Compression Tableting of Powders into a Solid Oral Dosage Form. **Pharmaceuticals (Basel)**. 2019;12(1):43.

VON RUCKERT, D. A. S. et al. Pontos críticos de controle de Salmonella spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, 2009.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A.G.M. de. Ocorrência de Salmonella spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p.2557-2560, 2008.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C. “Salmonella and Salmonellosis in Southern Brasil: a review of the last decade” “Salmonella: classificação, genetics and disease Outbreaks”. **Science Publishers, Inc**, Nova York, USA. ISBN: 978-161-942-928-4, 2012.

VAZ, C.S.L.; VOSS-RECH, D; ALVES, L; COLDEBELLA, A; BRENTANO, L; TREVISOL, I.M. Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of Salmonella Enteritidis in broiler chickens. **Vet Microbiol**. 2020; 240:108527. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108527

VILLANOVA, J.C.O; ORÉFICE, R, L. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 20, nº 1, p. 51-64. Belo Horizonte - MG, 2010

VIVIAN, R.C. **Avaliação da formação de biofilmes e sensibilidade ao ácido peracético por Salmonella spp. Isolados de abatedoures avícolas**. Dissertação, Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Zootecnia, 2014.

WANG, C; CHEN,Q; ZHANG; C; YANG, J; LU,Z; LU,F; BIE, X. Characterization of a broad host-spectrum virulent Salmonella bacteriophage fmb-p1 and its application on duck meat. **Virus Res**, v. 15, n. 236, p. 14-23, 2017.

WOLSCHICK, J; DAL BOSCO, S. M. Prevalência de Salmonella spp. em ovos de galinha de granja em casca produzidos e comercializados no Rio Grande do Sul. **Revista destaques acadêmicos**, vol. 7, n. 3, 2015 - ccbs/univates.

ZHOU, W; FENG, Y; ZONG, Z. Two new lytic bacteriophages of the Myoviridae family against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Front. Microbiol.** 9:850, 2018.

APÊNDICE A – Artigo científico

Uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella enterica*

Aline Catarina Santos dos PASSOS¹, Viviane GIRARDI², Laura Beatriz RODRIGUES², Charise Dallazen BERTOL³

¹ Mestranda em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Passo Fundo-UPF

² Docente no programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Passo Fundo-UPF

alinepassos1009@gmail.com

Resumo

O presente estudo tem como objetivo desenvolver um produto inovador para o controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, através da elaboração de um coquetel de bacteriófagos, formulados em biocomprimidos de liberação prolongada, para ser aplicados, em água de tanques de resfriamentos do abate de frango. A formulação dos biocomprimidos foi realizada com 60 mg de polyox, 138 mg de polióxido de etileno, e 2 mg de *pool* de bacteriófagos, preparados por compressão direta em máquina de compressão excêntrica. Porém testes ainda devem ser realizados para aplicação de seu possível uso na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Salmonella*. Fagos. Alternativas.

Abstract

The present study aims to develop an innovative product for the biological control of different *Salmonella enterica* serovars, through the elaboration of a cocktail of bacteriophages, formulated in biocompressions of prolonged release, to be applied in water from cooling tanks for slaughtering chicken. The formulation of the biocompresses was carried out with 60 mg of polyox, 138 mg of polyoxide of ethylene, and 2 mg of pool of bacteriophages, prepared by direct compression in an eccentric compression machine. However tests must still be carried out to apply its possible use in the food industry

Key words: *Salmonella*. Phages. Alternatives.

1. INTRODUÇÃO

A *Salmonella* spp. é um dos principais microrganismos envolvidos em doenças veiculadas por alimentos, tornando-se necessário tomar medidas para sua eliminação na indústria alimentícia. Este patógeno vem sendo apontado em diversas pesquisas por apresentarem resistência a bactericidas disponíveis no mercado, ocasionado por seu uso descontrolado e inadequado de bactericidas, assim os sorovares não só deram origem a várias cepas de resistência a múltiplas drogas, mas também aumentou a incidência de

manifestação e tratamento de doenças, além de diminuir a eficácia dos produtos, por consequência dificultando seu controle (PRADHAN, 2019).

A ocorrência de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos pode causar sérios problemas econômicos, além de representar grandes implicações na saúde pública, com impactos às indústrias de alimentos. Os biocontroles vem sendo estudados como alternativas de controlar patógenos no ambiente, e uma dessas abordagens é o uso de vírus bacterianos como agentes eficaz frente as bactérias patogênicas chamados ou denominados bacteriófagos (KRYLOV, 2019).

Os fagos ainda são pouco explorados como antimicrobianos, por possuírem vantagens únicas se caracterizando como uma alternativa de controle principalmente para as indústrias de alimentos, com possibilidade de complementar e/ou substituir métodos convencionais, não deixando resíduos químicos, além de terem a capacidade de evoluir com o hospedeiro, apresentando pouca susceptibilidade de aparecimento de resistência. Com isto, o seu uso torna-se um método de grande importância para o controle de patógenos, podendo ser utilizado em toda a cadeia de produção de alimentos sem afetar as propriedades sensoriais do produto final (RICHTER, 2019; ALBINO, 2011).

Os polímeros representam uma das classes de matéria prima mais versáteis, e acessível para aplicações em diversas áreas, incluindo as indústrias de alimentos. Os polímeros possuem também a função de proteger e estabilizar estruturas proteicas de princípios ativos, como é o caso dos fagos, que se associados aos polímeros de liberação modificada, que são preparações em que a substância ativa vai se liberando aos poucos, tem o objetivo de controlar a liberação, a fim de aumentar o tempo de duração dos vírus bacterianos no ambiente em que foi exposto (MANOHARE, 2019)

Nesse contexto, o objetivo deste estudo é desenvolver um produto inovador para o controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, através da elaboração de um coquetel de bacteriófagos, formulados em biocomprimidos de liberação prolongada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENO DOS BACTERIÓFAGOS

Em nosso estudo, foram utilizados os bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3 que foram isolados no Rio Grande do Sul, a partir de amostras de fezes de

aves de criação extensiva e água residual proveniente do abate em frigorífico de aves, conforme Pottker, (2016). O isolamento dos fagos foi realizado de acordo com Sillankorva et al., (2008), baseado na técnica de sobrecamada de meio semissólido, a partir das bactérias hospedeiras sorovares *S. Brandenburg*, *S. Bredeney* e *S. Enteritidis*.

2.2 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Para a amplificação do número de fagos, amostras bacterianas de *S. Brandenburg*, *S. Bredeney* e *S. Enteritidis* que estavam armazenadas em caldo infusão cérebro e coração (BHI) 80% e com 20% de glicerol e conservadas na bacterioteca a -20 °C, foram reativadas. A reativação foi realizada utilizando meio de enriquecimento não seletivo (BHI), inoculação em meio de crescimento seletivo ágar Xylose Lisina Deoxycholate (XLD) por 24 horas e posterior seleção de uma colônia característica. A colônia foi novamente inoculada em caldo BHI, e incubadas a 37°C por 18h.

Em uma solução de 125 mL de TSB (*tryptic soy broth*) concentração dupla, foi inoculado 50 mL da bactéria hospedeira a uma concentração de 10^7 UFC/mL onde foi adicionado 25 mL do fago correspondente, sendo posteriormente incubado por 18 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, adicionou ao tubo 20 mL da solução de clorofórmio P.A e centrifugou sob refrigeração à 4°C em 8000 rpm por 5 a 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em seringa com filtros de 0,22 µm e transferidos para frascos estéreis (Figura 4). Após, foi retirado 20 µL do fago e incubado em 5 mL de BHI e, depois de 24 horas, foi observado se haveria multiplicação bacteriana, e após seguiu-se com o armazenamento a 4°C.

2.3 TITULAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Para a realização da titulação dos bacteriófagos foi necessário realizar a diluição seriada da solução estoque dos fagos isolados. Para isso preparou-se microtubos com 900 µL de solução salina (0,85%) e realizou-se a diluição seriada do estoque de fagos de 10^{-1} até 10^{-10} . Após a diluição, os microtubos permaneceram em repouso por um período de 15 min. a 30 min. para pré adsorção dos fagos.

Para a realização da contagem, foram preparadas placas de Petri contendo uma fina camada de ágar TSA (*tryptic soy agar*) e foi adicionado 100 µL da bactéria hospedeira utilizada no isolamento do fago (previamente cultivada *overnight*) e 100 µL

fago diluído. Em seguida foi vertido 5 mL de ágar semissólido e realizado movimentos de 8 para homogeneizar. Após a secagem do ágar, as placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 h. (Sillankorva et al, 2008). Posteriormente foi realizada a contagem de halos ou placas fágicas e determinada a titulação de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Título de bacteriófagos (UFP/mL)} = \frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{Fator de}}{\text{Volume da amostra de bacteriófagos (mL)}}$$

2.4 LIOFILIZAÇÃO

Após o resultado da titulação, 100 ml de cada fago foram congelados em ultra freezer (Coldlab) por 24 horas e posteriormente submetidos ao processo de liofilização, em um equipamento de modelo SL-404 (Solab), a uma temperatura de -53°C por 120 horas.

2.5 FORMULAÇÃO DE BIOCOMPRESSOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA A PARTIR DOS COQUETÉIS DE BACTERIÓFAGOS

Biocompressos foram elaborados contendo um coquetel (*pool*) formados pelos três fagos, UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3. Para o preparo dos coquetéis, as amostras foram amplificadas e liofilizadas separadamente e unidas na proporção de 1:1:1. (ANDREATTI FILHO et al., 2007). Os bacteriófagos liofilizados, foram submetidos a titulação para saber em até quantas diluições, os vírus ainda estariam viáveis.

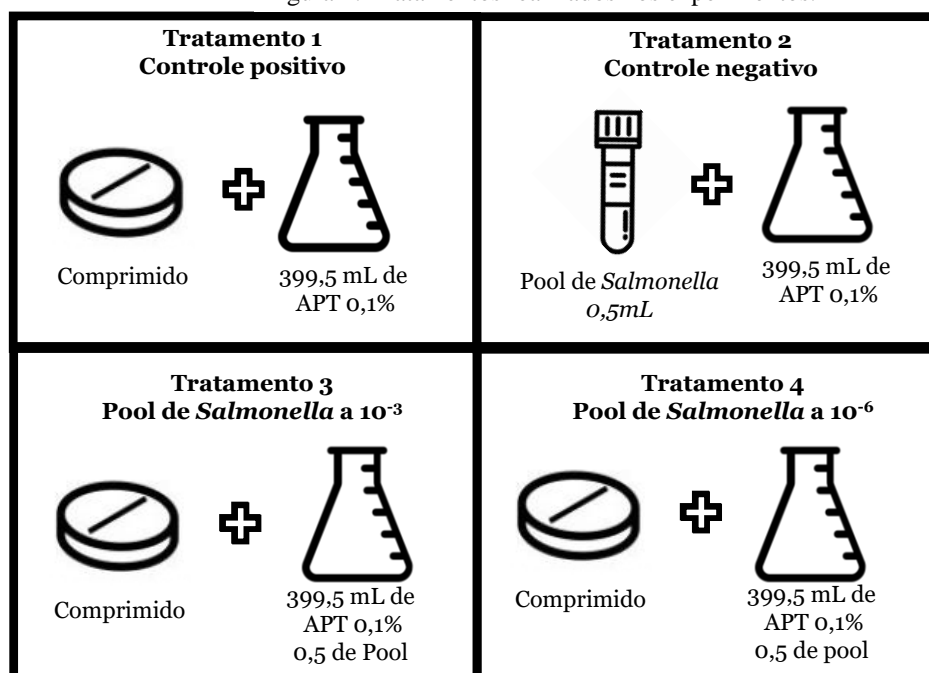
A elaboração do biocomprimido foi realizada com 30% (60 mg) de Polyox WSR-303, de 7.000.000 g/mol (gentilmente cedido pela Colorcon ®) (polímero responsável pela liberação controlada dos componentes), 69% (138 mg) de polióxido de etileno de 100.000 g/mol (Sigma-Aldrich ®), e 1% (2 mg) do *pool* de bacteriófagos, que foram pesados individualmente, para obtenção de uma mistura homogeneizada manualmente. Os comprimidos de massa final de 200 mg foram preparados por compressão direta em máquina de compressão excêntrica, utilizando jogo de punções de 9 mm, planos, sem sulcos e sua eficiência foi testada no controle de contaminação de *Salmonella enterica* (CRUZ, et al. 2008).

2.6 TESTE *in vitro* DOS BIOCOMPRESSOS CONTENDO OS COQUETÉIS DE BACTERIÓFAGOS CONTRA *SALMONELLA ENTERICA*.

A eficácia *in vitro* dos biocompressos contra *Salmonella enterica* foi avaliada em uma câmara incubadora refrigerada a uma temperatura de 4° C, com agitação em shaker orbital TE-421 (Tecnal), com intuito de mimetizar as condições reais do processo de refrigeração de carcaças de frango no equipamento industrial denominado *chiller*. As bactérias foram escolhidas de acordo com o grau de importância para saúde pública, sendo utilizados isolados dos sorovares *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, e *S. Heidelberg*. Para isso, foram posicionados 16 erlenmeyers com volume de 399,5 mL de solução de água peptonada 0,1% estéril (APT 0,1%). Em cada erlenmeyer foi adicionado 1 comprimido que foram deixados intumescer para pré liberação dos fagos durante 15 minutos (menos nos erlenmeyers que iriam os controles negativos), para posteriormente ser inoculado 0,5 mL de *Salmonella enterica*, deixando a solução final com um total de 400 mL. Amostras de 2 mL foram coletas em diferentes tempos (0, 3, 6, 9 e 12 horas). Os experimentos foram realizados em quatro tratamentos denominados de T1 – Controle positivo, T2 – Controle negativo, T3 – Biocompressos de fagos com concentração baixa de *Salmonella enterica* e T4 – Biocompressos de fagos com concentração alta de *Salmonella enterica* (Figura 1).

Para T1 foi utilizado somente o biocomprimido com fagos para ser o controle positivo e quantifica-los em Unidades Formadoras de Placas (PFU) no decorrer do tempo de coleta. Já T2 era o tratamento que obtinha uma carga bacteriana baixa de aproximadamente $2,7 \times 10^3$ UFC/mL de *Salmonella enterica* como controle negativo, para a quantificação do patógeno, sem a presença do biocompressos de fagos. Em T3 foi utilizado a mesma concentração bacteriana do T2, mas com presença do biocomprimido de fagos imerso e em T4 a concentração bacteriana foi maior de aproximadamente $2,7 \times 10^6$ UFC/mL, com presença do biocompressos.

Figura 1: Tratamentos realizados nos experimentos.



Fonte: do autor, 2020

Em ambos os tratamentos T3 e T4, foram realizadas as coletas nos tempos previsto por esta metodologia, para a quantificação de *Salmonella enterica* pela técnica do *drop plate* (técnica do gotejamento) em ágar PCA (ágar padrão para contagem) (APOSTOLIDIS et al., 2008; ERUTEYA; ODUNFA, 2016), e para a quantificação de bacteriófagos em Unidades Formadoras de Placas (PFU) foi empregada a técnica de titulação, conforme descrito anteriormente no item 3.3 de forma adaptada. Os ensaios foram realizados em quadruplicada e os experimentos replicados 2 vezes.

2.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos programas Microsoft Excel versão 2016, e Statistica versão 7, por meio da Análise da Variância (ANOVA) e Tukey para a comparação das médias.

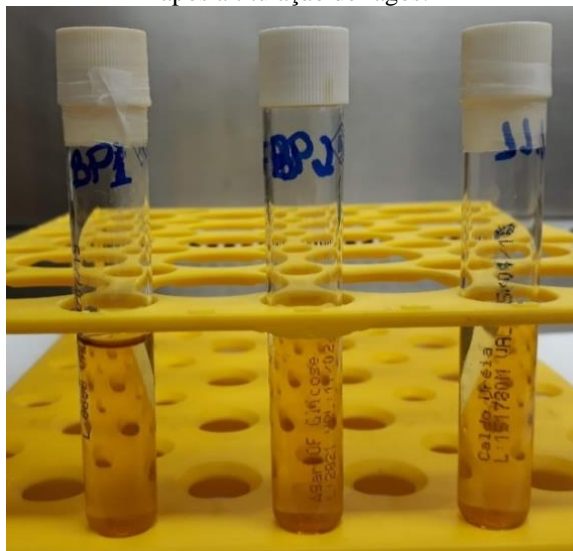
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de esterilidade e titulação dos bacteriófagos

No caldo BHI, observou-se que não houve multiplicação bacteriana, apresentado resultados negativos no teste de esterilidade. O teste de esterilidade em caldo BHI foi um método empregado para observar se ainda existia multiplicação bacteriana após o

processo de amplificação, filtragem e armazenamento dos fagos. Nestes procedimentos deve-se ter a real certeza que a célula hospedeira não tenha permanecido na solução final, para evitar a contaminação. A Figura 2 mostra o caldo BHI sem turvação, portanto, os fagos estão livres de células bacterianas, mostrando-se viáveis e adequados para atender as posteriores demandas.

Figura 2: Teste dos bacteriófagos em caldo BHI para observar presença ou ausência de turvação no meio após a titulação de fagos.



Fonte: do autor.

Na titulação, antes da liofilização, os fagos mostraram ação lítica frente às suas bactérias específicas e o UPF_BP2 agiu em mais de um sorovar além de sua hospedeira, a *S. Bredeney*, e com alta titulação com carga viral de $8,4 \times 10^{11}$ UFP/mL contra *S. Brandenburg* (Tabela 1).

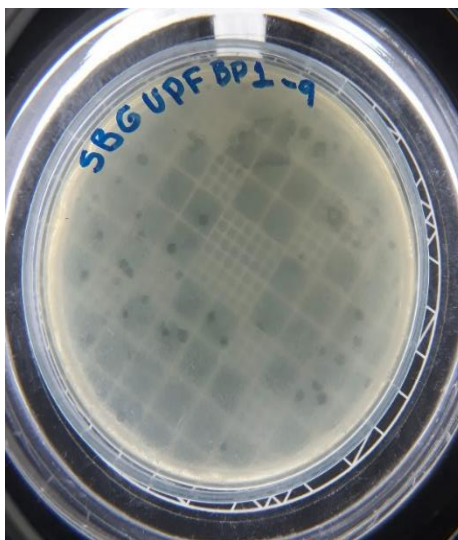
Tabela 3: Titulação dos bacteriófagos frente às bactérias hospedeiras antes da liofilização.

Fagos	Titulação dos Bacteriófagos (UFP/mL)		
	Sorovares		
	<i>S. Brandenburg</i>	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Enteritidis</i>
UPF_BP1	$5,1 \times 10^{11}$	0	0
UPF_BP2	$8,4 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^9$	0
UPF_BP3	0	0	$4,2 \times 10^9$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 3 podemos visualizar as placas de lise do fago UPF_BP2 contra a *S. Brandenburg*, que não é a sua bactéria hospedeira, demonstrando a habilidade de infecção em mais de um sorovar.

Figura3: Placa que mostra formação de lise em *S. Brandenburg*.



Fonte: do Autor, 2020

Os resultados demonstraram que alguns fagos não apresentaram títulos nas outras bactérias, evidenciando que possíveis fatores físicos - químicos ou temperatura, podem ter afetado a sobrevivência dos vírus, já que estes fatores se não forem controlados podem inativa-los com a perda ou deformações de seus elementos estruturais (cabeça, e cauda), lipídeos ou DNA (SOUSA, 2012).

Em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa PEIXOTO, 2019 constatou que as amostras de *S. Enteritidis* sofreram lise por, pelo menos, um dos fagos citados e que o *pool* desempenhou melhor ação lítica na inibição da formação do biofilme e na remoção do biofilme pré-formado. RIZZO, 2017 avaliou os mesmos fagos, que apresentaram um bom potencial de lise em 38 cepas de *S. Gallinarum*. Em outro estudo, POTTKER, 2016, demonstrou-se que os bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3 foram eficazes contra diversos sorovares de *Salmonella* spp.

3.2 Liofilização

Os fagos apresentaram diferentes rendimentos após o processo de liofilização, apesar de terem o mesmo volume inicial, como pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 2 - Rendimento dos bacteriófagos após liofilização.

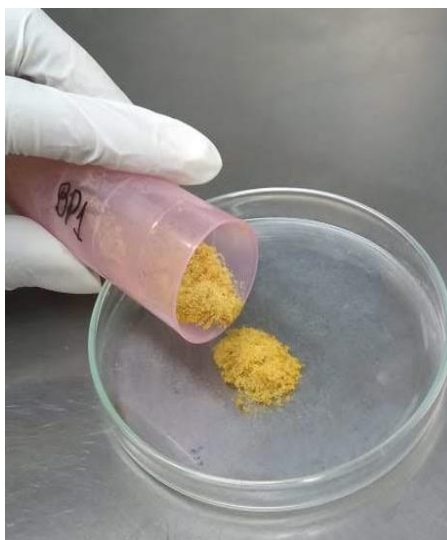
Bacteriófagos	Rendimento dos bacteriófagos liofilizados	
	Volume (mL)	Massa (g)
UPF_BP1	100	3,30
UPF_BP2	100	4,12
UPF_BP3	100	2,69

Fonte: do autor, 2020.

Os bacteriófagos, após liofilização (Figuras 4), novamente passaram pela técnica de titulação de fagos, para saber se os vírus ainda estariam viáveis depois do processo, sendo assim, observamos que a contagem de títulos foi mais baixa, como o caso do UPF_BP1, que teve uma redução de 3,4 log, depois da liofilização, mostrando que houve perdas no processo (Tabela 1 e 2).

As possíveis perdas demonstradas neste processo podem ter ligação a fatores físicos, como a temperatura, pois alguns autores não recomendam por exemplo, o congelamento de fagos na temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pois a formação de cristais de gelo danifica a estrutura do vírus, levando a sua inativação (SOUSA, 2012).

Figura 4: Amostra liofilizada



Fonte: do autor

Como antes do processo de liofilização, as amostras são congeladas a uma temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uma menor criação de cristais de gelo, por 24 horas, assim, fica evidenciado que a redução de log após a liofilização, pode-se justificar que a baixa

temperatura tenha causado danos às estruturas dos fagos, levando-os a supressão, mesmo com a presença de triptona que serve como agente crioprotetor (ACKERMANN et al., 2004; MONOHAR, 2019; LIANG, et al., 2020).

Um estudo sobre liofilização de bacteriófagos mostrou que este método é eficiente para secar fagos trazendo pequena redução nas suas atividades fágicas, o que ajudaria no desenvolvimento de diferentes elaborações e possíveis revestimentos bioativos contendo fagos (PUAPERMPOONSIRI, 2009). Em uma outra pesquisa sobre condições de liofilização para armazenamento de fagos, foi observado que, a atividade de três bacteriófagos testados tivera perdas de até 4 log na sua viabilidade após o processo de liofilização (MONOHAR, 2019).

Tabela 4 Titulação dos bacteriófagos frente às bactérias hospedeiras após a liofilização.

Bacteriófagos	Sorovares		
	<i>S. Brandenburg</i>	<i>S. Bredeney</i>	<i>S. Enteritidis</i>
UPF_BP1	$1,7 \times 10^9$	0	$3,5 \times 10^3$
UPF_BP2	$2,4 \times 10^3$	$5,9 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$
UPF_BP3	4×10^3	0	$2,7 \times 10^6$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Com os resultados da titulação, prosseguimos os procedimentos, dando início ao processo de elaboração dos comprimidos.

3.3 Elaboração dos biocomprimidos de coquetel de bacteriófagos

Os comprimidos de bacteriófagos foram especificamente elaborados para este estudo, a partir de um *pool* composto por três fagos líticos específicos de *Salmonella enterica* denominados de UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3. Estes biocomprimidos apresentam possível potencial para ser aplicado em tanques de resfriamento para o controle deste patógeno na cadeia produtiva de frangos. O liofilizado do *pool* de fagos e, os outros componentes foram homogeneizados e comprimidos. Os biocomprimidos visualmente eram todos parecidos, com manchas marrons, oriundas do meio de cultura no qual o fago era armazenado, e tinham aspecto liso, com peso médio de 200 mg (Figura 5)

Figura 5: Biocomprimidos de pool de bacteriófagos de liberação controlada



Fonte: do autor, 2020

Um estudo sobre compressão direta de comprimidos de pós em forma sólida de dosagem oral, observou que os fagos em comprimidos permitiriam a entrega confiável de altos títulos de fagos viáveis no local da infecção no trato gastrointestinal. Essas são vantagens importantes e podem ser alcançadas usando o processo relativamente simples, altamente escalável e de baixo custo avaliado no presente estudo (VINNER, 2019).

Uma pesquisa realizada para avaliar o uso de revestimentos biológicos de sementes à base de bacteriófagos incorporados em polímeros polivinílicos e revestido em sementes de milho contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *Nebraskensis*, demonstrou que após 24 h de secagem, todos os revestimentos de polímero mostraram retenção semelhante de bacteriófagos ativos, que foi maior que a retenção para bacteriófagos revestidos apenas com tampão, evidenciando que agentes de biocontrole associados aos polímeros também melhoram a adesão ao tratamento, reduzindo possíveis contaminações (KIMMELSHUE, 2019).

3.4 Teste dos biocomprimidos de bacteriófagos

Os resultados para o teste dos biocomprimidos de bacteriófagos mostraram que em até 12 horas, o tratamento T2 mostrou-se estável no decorrer do processo, ficando no tempo 0 com 3,8 log UFC/g e em 12 horas com 3,5 log UFC/g. Já no T3 obteve uma leve redução do patógeno de 0,4 log durante os ensaios, apesar de mostrar resultados semelhantes ao do T2. Em T4, o tratamento se iniciou em 7,0 log UFC/g, chegando no

tempo final com 6,5 log UFC/g (Tabela 3). Os tratamentos não apresentaram diferença significativa no decorrer do tempo pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3: Resultados obtidos no uso dos biocomprimidos contra pool de *Salmonella enterica*.

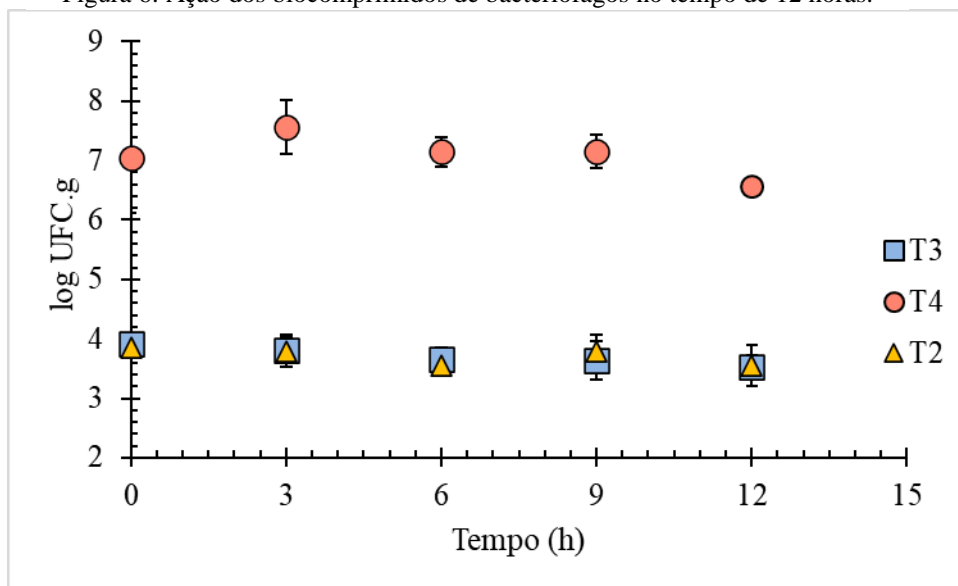
Tratamentos – log UFC/g			
Tempos (horas)	T2	T3	T4
0	3,857±0,0 ^a	3,914±0,1 ^a	7,055±0,9 ^b
3	3,795±0,3 ^a	3,819±0,2 ^a	7,560±0,4 ^b
6	3,556±0,0 ^a	3,656±0,2 ^a	7,148±0,2 ^b
9	3,795±0,3 ^a	3,644±0,3 ^a	7,150±0,3 ^b
12	3,556±0,3 ^a	3,525±0,2 ^a	6,562±0,1 ^b

Os resultados estão expressos em \log_{10} UFC/g como média \pm SD. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de ($p < 0,05$). Fonte: do Autor, 2020.

O T2 era o tratamento que tinha apenas *Salmonella enterica* como controle dos ensaios, sem bacteriófagos. No decorrer do processo, foi observado que não houve multiplicação bacteriana significativa por até 12 horas, demonstrando a eficácia da temperatura de 4°C no controle do crescimento microbiano com esta concentração bacteriana. O T3 mostrou resultados similares ao T2, mesmo com o biocomprimido de fagos sendo aplicado como alternativa de controle de patógenos. Esses resultados mostram que os tanques de resfriamentos, que têm como objetivo atuar na remoção de calor para controle de patógenos, ao resfriar as carcaças de frango a uma temperatura de no mínimo 4° C, mostra-se eficaz, pois manteve estável a proliferação de *Salmonella enterica*, que pode vir a afetar a inocuidade do produto final (NICOLAU, 2016).

No tratamento T4, foi possível observar uma contagem elevada do patógeno, já que o inóculo inicial era maior do que os demais tratamentos. Porém, a redução bacteriana entre os tempos não foi tão significativa, como mostra a Figura 6, mostrando que, apesar da redução de 0,5 log do tempo 0 até as 12 horas, não houve diferença estatística. Em nosso experimento não havia presença de cloro, como é empregado nas indústrias alimentícias, como controle de microrganismos patogênicos.

Figura 6: Ação dos biocomprimidos de bacteriófagos no tempo de 12 horas.



T2: tratamento com *Salmonella enterica*, T3: tratamento com baixa concentração de *Salmonella enterica*, mais os biocomprimidos de bacteriófagos, T4: tratamento com alta concentração de *Salmonella enterica*, mais os biocomprimidos de bacteriófagos

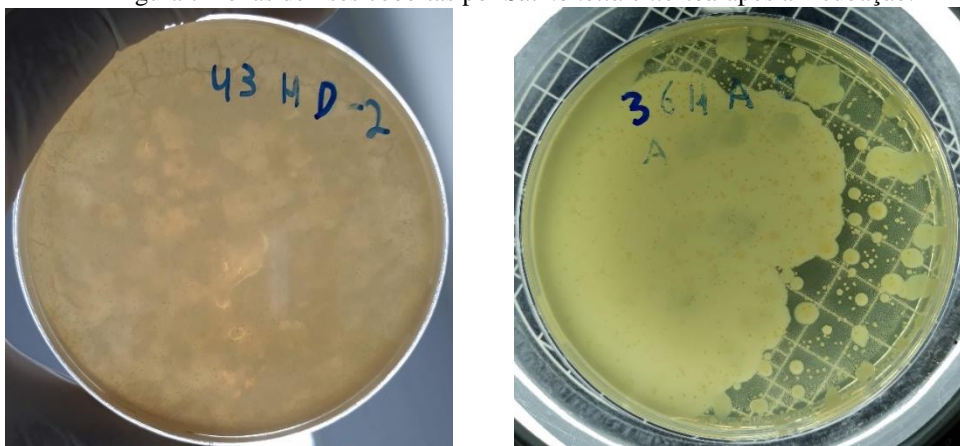
Uma pesquisa sobre a avaliação das condições de armazenamento e eficiência *in vitro*, de um novo coquetel de fagos de *Salmonella* microencapsulado para controle de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, apresentaram resultados que diferem dos nossos, pois foi observado por Petsong (2019) que os níveis de carga bacteriana diminuiriam 1,79 e 3,63 \log_{10} UFC / mL a 37°C, e 0,43 e 0,76 \log_{10} UFC / mL a 10 ° C. (PETSONG, 2019).

Em uma pesquisa sobre a avaliação da capacidade lítica de amplo espectro de coquetéis de bacteriófagos contra vários sorovares de *Salmonella* spp e seus efeitos *in vivo* em porcos desmamados infectados com *S. Typhimurium* foram preparados quatro coquetéis utilizando 13 fagos, e a capacidade lítica dos coquetéis foram testados usando cepas de referência de *Salmonella* e isolados de campo. Os coquetéis mostraram 100% de eficiência contra as cepas de referência, e 92,5% de eficácia frente a isolados de campo, evidenciando uma excelente atividade fágica frente aos agentes bacterianos (SEO, 2018).

Para implementar mais estrategicamente um esquema de fagoterapia para o controle de *S. Enteritidis* em frangos de corte, VAZ (2020) elaborou um coquetel contendo três bacteriófagos líticos do tipo selvagem previamente isolados de galinhas, e foi observada uma redução de 1,49, 0,65 e 0,58 \log_{10} UFC / mL no número de *S. Enteritidis* pelo uso dos fagos (VAZ CSL, 2020).

A metodologia utilizada para a quantificação dos bacteriófagos em unidades formadoras de placas (PFU) não foi eficaz em nenhum dos tratamentos, demonstrado na Figura 7.

Figura 7 Zonas de lises cobertas por *Salmonella enterica* após a incubação.



Legenda: na esquerda imagem da placa de petri apresentando Zonas de lises no T4, na direita, placa de petri apresentando lises do T3.

No tratamento T1, era somente o biocomprimidos imerso em APT 0,1%, para a contagem de PFU/ml, nos tempos pré estabelecidos (0, 3, 6, 9, 12 horas), no entanto, não foi possível realizar a contagem de títulos, pois as condições empregadas não foram favoráveis para apresentar zonas de lises nas placas.

Para trabalhos futuros, sugere-se modificações na metodologia, como o uso de centrifugação e filtragem das amostras antes da inoculação.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados, podemos concluir a metodologia utilizada para amplificação dos bacteriófagos se mostrou eficaz na eliminação das bactérias hospedeiras, não apresentando contaminação bacteriana após enriquecimento em caldo BHI. Antes da liofilização os bacteriófagos demonstraram bom desempenho na ação lítica das bactérias hospedeiras. No entanto, após o processo de liofilização, foi observada uma redução na contagem de títulos, evidenciando que houve perdas no processo.

O teste para verificar a ação do coquetel de bacteriófagos em formulação de biocomprimidos demonstrou pouca eficácia na redução da multiplicação de *Salmonella enterica*, não apresentando diferença significativa entre os tempos e tratamento.

Referências

- ACKERMANN, H.W. "Bacteriophage Taxonomy," **Microbiology Australia**, p. 90-94. 2011.
- ALBINO, Luiz Augusto Aguiar. **Utilização de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella* sp.** Tese, Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- BOGÉA, Juliana Sousa; PASSOS, Aline Catarina Santos dos; LIMA, Leidiana de Sousa; LIMA, Rejeana Márcia Santos; BRITO, Daniela Aguiar Penha. Ocorrência de *Salmonella* spp. e seus sorotipos em Carcaças de Frangos Abatidos em Mercados da Região Metropolitana de São Luís-Maranhão. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 29, p. 3673-3676, abril, 2015.
- CARDOSO, Ana Lúcia Sicchiroli Paschoal; KANASHIRO, Ana Maria I.; STOPPA Greice F. Z.; CASTRO, Antonio Guilherme M. de; LUCIANO, Renato L.; TESSARI, Eliana N. C. Ocorrência de *Salmonella* spp. Em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, 1679-7353, semestral, p. 1-13, Jan. 2015.
- FERREIRA, Pollyana da Silva. **Características genéticas e de patogenicidade das salmonelas com ênfase na *Salmonella enterica* serovar schwarzengrund.** Trabalho apresentado no Seminário aplicado do programa de pós-graduação em ciência animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, 2013.
- FUNK, Julie A.; DAVIES, Peter R.; NICHOLS, Monica A. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 412-418, 2000.
- GARCIA, Keila Carolina De Ornellas Dutka. **Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies utilizadas na indústria de processamento e comercialização de frango de corte e derivados.** 2015, p. 44.

Dissertação, Mestrado – Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia, 2015.

GUIBOURDENCHE, Martine et al. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. *Research in microbiology*, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HANGENS, S.; LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.76, n.3, p 513 – 519, 2007.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 01 set, 2019

KRYLOV V.N., BOURKALTSEVA M.V., PLETENEVA E.A. Bacteriophage's Dualism in Therapy. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 7, July 2019.

MARTINS, Marisa Ferreira. **Avaliação da eficácia de desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies usados em restaurantes em Portugal em biofilmes de *Salmonella enterica***. 2013, p. 86. Dissertação, Mestrado – Universidade de Coimbra, Portugal, 2014.

PRADHAN, D., NEGI, V, D,. Stress-induced adaptations in *Salmonella*: A ground for shaping its pathogenesis. **Microbiological Research**. v. 229, n. 126311, 2019.

REZENDE, Cíntia Silva Minafra e; MESQUITA, Albenones José de, ANDRADE, Maria Auxiliadora, LINHARES, Guido Fontgalland Coelho; Mesquita, Adriano Queiroz de; MINAFRA, Cibele Silva. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Rev Port Cienc Vet**, v. 100, n. 555-556, p. 199-203, 2005.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: **Atheneu**; 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA N.F.A; TANIWAKI, M.H. SANTOS. R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Salmonella* in: Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 3. ed. São Paulo: **Varela**, 2007. cap.19, p.253-285.

TESSARI, Eliana Neire Castiglioni; CARDOSO, Ana Lucia Sicchiroli Paschoal; KANASHIRO, Ana Maria Iba; STOPPA, Greice Filomena Zanatta; LUCIANO, Renato Luís; CASTRO, Antonio Guilherme Machado de. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p.2557-2560, dez, 2008.

THOMPSON, D.W., CASJENS, S. R., SHARMA, R., GROSE, J. H. Genomic comparison of 60 completely sequenced bacteriophages that infect *Erwinia* and/or *Pantoea* bactéria. **Virology**, v. 535, p. 59-73, 2019.

VIVIAN, Ricardo Campos. **Avaliação da formação de biofilmes e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. Isolados de abatedoures avícolas**. 2014, p. 66, Dissertação, Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Zootecnia, 2014.

MACHALELA, Angélica Agostinho. **Uso De Bacteriófagos Como Alternativa De Conservação De Leite em Moçambique**. 2016, p. 79. Dissertação, Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, 2016.

SÁ, Maria José Ferreira de. **Relatório de atividade profissional**. 2015, p. 111. Relatório, Mestrado – Universidade do Minho, 2015.

WOLSCHICK, J., BOSCO, S.M.D. Prevalência de *Salmonella* spp. em ovos de galinha de granja em casca produzidos e comercializados no rio grande do sul. **Revista destaques acadêmicos**, vol. 7, n. 3, 2015