

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Thais Jardim Oliveira**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS PARA O BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA***

**Sorocaba/SP  
2021**

**Thais Jardim Oliveira**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA O BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

Coorientador: Profa. Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila

**Sorocaba/SP  
2021**

### Ficha Catalográfica

O52i Oliveira, Thaís Jardim  
Isolamento, caracterização e avaliação *in vitro* de bacteriófagos líticos para o biocontrole de *salmonella enterica* / Thaís Jardim Oliveira. – 2021.  
78 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão.  
Coorientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Farmacologia. 2. Bacteriófagos. 3. Bactérias patogênicas. 4. Salmonella enterica. 5. Alimentos – Indústria. I. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, orient. II. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

**Thais Jardim Oliveira**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA O BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA***

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.  
Aprovado em: 06/ 07 /2021

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão  
Universidade de Sorocaba



Profa. Doutora Renata de Lima  
Universidade de Sorocaba



Profa. Doutora Elaine Berges da Silva  
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosana e Ricardo, e às minhas gatas. Mia, minha companheira; Amora, que hoje vive no céu; e Margot, que me deixou no primeiro semestre do Mestrado, quando descobri o quanto sou forte.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à minha família, principalmente aos meus pais, os melhores do mundo: Ricardo e Rosana, que apoiaram o meu sonho de ser cientista desde pequenininha. Conseguimos, sonho realizado!

Às minhas irmãs de pesquisa, Erica e Bianca, sempre tão disponíveis quando precisei. Foram quase três anos de muito nervosismo, choro e também muita risada... passa até um filme na minha memória! Meu eterno muito obrigada a vocês.

Agradeço aos meus amigos e vizinhos de laboratório, Bruno e Murilo, que sempre acreditaram em mim, se preocuparam e tanto me ajudaram. Vocês são demais!

A toda a equipe do laboratório, Liliam, Rodrigo, Fernanda e Edjane, que colaboraram muito, tanto profissional como pessoalmente. Obrigada por se esforçarem para lidar com todas as minhas personalidades e apoiá-las sempre que precisei. Todas as minhas personalidades são gratas pela amizade vocês!

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, pelo acolhimento lá em 2015 quando me chamou para fazer estágio no PhageLab, na época conhecido como "FaveLab"... aquele convite mudou todo o rumo da minha vida acadêmica. Eu aprendi tanta coisa, cresci, evolui, chorei e vivi a melhor experiência da minha vida, sempre serei muito grata. Obrigada, Professor!

À minha coorientadora, Professora Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila, por me "adotar" durante um ano quando o Professor precisou viajar, pela paciência em ouvir e explicar, pela sabedoria ao dar conselhos e resolver problemas que surgiram durante nossa trajetória e, principalmente, por todo o aprendizado que levarei para a minha vida, tanto acadêmica quanto pessoal. Como mulher e como cientista se tornou uma referência de vida. Obrigada, Professora!

À Universidade de Sorocaba, pela bolsa Auxílio Taxa Escolar do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Superior Particulares (Prosuc-Capes/Uniso).

*“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”*

Carl Sagan (1934 - 1996)

## RESUMO

A maioria das doenças transmitidas por alimentos são causadas por microrganismos, sendo um dos principais agentes patogênicos a bactéria *Salmonella enterica*. Tratamentos como vapor, calor seco e luz UV têm sido avaliados para o controle dos principais agentes causadores de intoxicações alimentares. Entretanto, nem sempre as atuais tecnologias utilizadas para inativar agentes patogênicos nos alimentos são efetivas. Além disso, podem ocasionar problemas de aceitabilidade e deterioração das propriedades organolépticas dos alimentos. Neste contexto, os bacteriófagos (ou fagos) emergiram como potencial ferramenta para o biocontrole de bactérias patogênicas. O trabalho de pesquisa aqui apresentado objetivou isolar e caracterizar fagos líticos para *S. enterica*. Para o isolamento dos fagos, buscou-se águas residuais da indústria de alimentos “AB Brasil - Indústria e Comércio de Alimentos, Ltda”. A caracterização físico-química das partículas bacteriofágicas isoladas incluiu: varredura espectral em UV-Vis, determinação dos coeficientes de extinção molar, análises das proteínas estruturais por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio), caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A caracterização biológica incluiu a avaliação da gama de hospedeiros utilizando diversas culturas bacterianas, determinação da eficiência de plaqueamento (EOP) em cepas bacterianas suscetíveis, determinação dos parâmetros de crescimento das partículas fágicas (período de eclipse, período latente, período de acumulação intracelular, e tamanho de explosão) através das curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), determinação da taxa de adsorção das partículas fágicas às células bacterianas hospedeiras através das de curvas de adsorção, e determinação da atividade lítica na cepa de coleção de *S. enterica*. Foram isoladas e caracterizadas duas partículas fágicas líticas contra *S. entérica*, tendo sido nomeadas como PhL\_UNISO\_SE\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE\_ph0046. Ambos os fagos mostraram atividade contra a bactéria hospedeira, mostrando serem altamente específicos, o que pode indicar uso promissor no controle biológico deste patógeno em alimentos.

**Palavras-chave:** *Salmonella enterica*; Biocontrole; Caracterização físico-química e biológica

## ABSTRACT

The vast majority of foodborne diseases are caused by microorganisms, being one of the main pathogens *Salmonella enterica*. Treatments such as steam, dry heat and UV light have been evaluated for the control of the main foodborne pathogens causing food poisoning. However, the current technologies used to inactivate pathogens in foodstuff are not always effective and, moreover, can cause problems of acceptability and deterioration of the organoleptic properties of foods. In this context, bacteriophages (or phages) have emerged as a potential tool for the biocontrol of pathogenic bacteria. The research work presented herein aimed to isolate and characterize lytic phages for *S. enterica*. For the isolation, effluent waters from the food company "AB Brasil - Indústria e Comércio de Alimentos, Ltda", were used. The physicochemical characterization of the isolated bacteriophage particles included UV-Vis spectral scans for determination of the molar extinction coefficient, analyses of the phage particles structural proteins by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), and morphological characterization by transmission electron microscopy (TEM) analyses. The biological characterization entailed included determination of the host range using several bacterial strains, determination of the efficiency of plating (EOP) in those bacterial strains where spot-testing was positive, determination of the phage growth parameters (eclipse period, latent period, intracellular accumulation period and burst size) via their one-step growth curves, determination of the adsorption rate of the phage particles onto their bacterial host cells, and determination of the lytic activity of the phage particles on their bacterial isolation strain. Two lytic phage particles against *S. enterica* were isolated and duly characterized, being named as PhL\_UNISO\_SE\_ph0036 and PhL\_UNISO\_SE\_ph0046. Both phages showed lytic activity against the host bacteria, with high specificity, which may indicate promising use in the biological control of this pathogen in foodstuff.

**Keywords:** *Salmonella enterica*; Biocontrol; Physicochemical and biological characterization

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de uma partícula fágica prototípica.	27
Figura 2	Classificação de Baltimore dos fagos, de acordo com a morfologia e tipo de material genético.	28
Figura 3	Representação do ciclo lítico de replicação dos fagos.	29
Figura 4	Esquema de marcação nas placas de Petri para aplicação das diluições da suspensão concentrada de fagos.	39
Figura 5	Diagrama de seqüências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa realizado.	48
Figura 6	Curva de crescimento da bactéria <i>Salmonella enterica</i> .	49
Figura 7	Resultados obtidos no ensaio de <i>spot test</i> da amostra ambiental enriquecida, para verificação da presença de fagos.	51
Figura 8	Isolamento e seleção de fagos de acordo com a morfologia das placas fágicas.	52
Figura 9	Varredura espectral na região UV-Vis das suspensões concentradas de partículas fágicas.	53
Figura 10	Curvas de calibração produzidas para a relação entre a concentração de partículas fágicas inteiras em suspensão e a absorção da suspensão a 255 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas ao comprimento de onda de 320 nm, para os fagos isolados PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 e PhL_UNISO_SE-CFR_ph0046, permitindo determinar os seus coeficientes de extinção molar.	55
Figura 11	Electroforetograma corado com Coomassie dos bacteriófagos PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 (lane ph0036) e PhL_UNISO_SE-CFR_ph00346 (lane ph0046), e dos marcadores de peso molecular (lanes M).	56
Figura 12	Fotomicrografias de coloração negativa obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das suspensões concentradas dos bacteriófagos PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 (a, c) e PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 (b, d), a diferentes ampliações.	58
Figura 13	Resultados obtidos no <i>spot test</i> dos fagos PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 (a) e PhL_UNISO_SE-CFR_ph0046 (b) na cepa hospedeira de <i>Salmonella enterica</i> .	60

- Figura 14 Curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 no seu hospedeiro bacteriano (*Salmonella enterica* CCCD-S004). 62
- Figura 15 Curvas de adsorção dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 no seu hospedeiro bacteriano (*Salmonella enterica* CCCD-S004). 64
- Figura 16 Inativação de *S. enterica* pelos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 a valores de MOI de 1 e 1000 durante 24 h. (a) Concentração bacteriana: BC, controle de bactéria; BP, bactéria mais fago; (b) Concentração de fago: PC, controle de fago; BP, bactéria mais fago. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio padrão. 67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados utilizados para preparar relações lineares com o objetivo de determinar os coeficientes de extinção molar das partículas (inteiras) dos fagos ph0036 e ph0046.	54
Tabela 2	Distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais dos bacteriófagos isolados PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 e PhL_UNISO_SE-CFR_ph0046.	57
Tabela 3	Gama de hospedeiros dos bacteriófagos PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036 e PhL_UNISO_SE-CFR_ph0046, determinada em 9 estirpes bacterianas. Zona de lise clara (+) e zona sem lise (-). A eficiência de plaqueamento com a cepa hospedeira foi considerada como EOP = 100%.	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µS	MicroSiemens
Å	Angstrom
cm	Centímetro
δ	Taxa de adsorção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
dsDNA	DNA de fita dupla
dsRNA	RNA de fita dupla
EOP	Eficiência de plaqueamento
ε	Coeficiente de extinção molar
KDa	QuiloDaltons
kV	Quilovolts
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
MTA-TSB	Meio <i>molten top ágar</i> TSB
MW	Peso molecular (do inglês <i>molecular weight</i> )
MΩ•cm	MiliOhm centímetro (resistividade)
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica
ONU	Organização das Nações Unidas
OSGC	Curva de um só ciclo de crescimento síncrono
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PES	Poliétersulfato
pH	Potencial hidrogeniônico
ph	Bacteriófago
PSA	Persulfato de amônio

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletrofore em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SM	Tampão fágico (cloreto de sódio, sulfato de magnésio e gelatina)
ssDNA	DNA de fita simples
ssRNA	RNA de fita simples
t	Tempo
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFP	Unidades formadoras de placas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNISO	Universidade de Sorocaba
UV-Vis	Radiação no espectro UltraVioleta-Visível
W	Watts
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
2.1	Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)	21
2.2	Agente etiológico: <i>Salmonella enterica</i>	21
2.3	Biocontrole em indústrias de alimentos	23
2.4	Bacteriófagos	25
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	32
4.1	Material	32
4.1.1	Preparação de meios de cultura, soluções e materiais	32
4.1.2	Meio líquido Tryptic Soy Broth (TSB)	32
4.1.3	Meio líquido Tryptic Soy Broth (2x TSB)	32
4.1.4	Meio sólido Tryptic Soy Agar	33
4.1.5	Meio semi-sólido Molten Top-Ágar (MTA-TSB)	33
4.1.6	Solução salina a 0.9% (m/m)	33
4.1.7	Preparação do tampão fágico	33
4.1.8	Material biológico	34
4.1.9	Equipamento analítico e outros	34
4.2	Procedimentos experimentais	35
4.2.1	Curva de crescimento da bactéria <i>Salmonella enterica</i>	35
4.2.2	Isolamento, amplificação e determinação do título fágico de suspensões de partículas bacteriofágicas estritamente líticas para <i>Salmonella enterica</i>	36
4.2.2.1	Enriquecimento de bacteriófagos a partir da fonte ambiental coletada	36
4.2.2.2	Preparação de tapete bacteriano de <i>Salmonella enterica</i> pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada	36
4.2.2.3	Verificação da presença de bacteriófagos por <i>spot-test</i> das amostras enriquecidas	36
4.2.2.4	Isolamento de bacteriófagos	37
4.2.2.5	Amplificação dos bacteriófagos isolados	37
4.2.2.6	Precipitação dos fagos com Polietilenoglicol (PEG)	38

4.2.2.7	Determinação do título fágico pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada	38
4.2.2.8	Nomenclatura desenvolvida para os bacteriófagos isolados	40
4.2.3	Caracterização físico-química das partículas bacteriofágicas isoladas	40
4.2.3.1	Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis	40
4.2.3.2	Análise do perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	41
4.2.3.3	Análise das características morfológicas dos fagos isolados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	42
4.2.4	Caracterização biológica das partículas bacteriofágicas isoladas	42
4.2.4.1	Determinação da gama de hospedeiros dos fagos isolados: ensaios de <i>spot test</i> e eficiência de plaqueamento (EOP)	43
4.2.4.2	Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)	44
4.2.4.3	Curva de adsorção	45
4.2.4.4	Ensaio de terapia fágica <i>in vitro</i> (curvas de inativação bacteriana)	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48
5.1	Curva de crescimento da bactéria <i>Salmonella enterica</i>	49
5.2	Isolamento, amplificação e determinação do título fágico de suspensões de partículas bacteriofágicas estritamente líticas para <i>Salmonella enterica</i>	50
5.3	Caracterização físico-química das partículas fágicas isoladas	53
5.3.1	Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis	53
5.3.2	Análise do perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	55
5.3.3	Análise das características morfológicas dos fagos isolados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	57
5.4	Caracterização biológica das partículas bacteriofágicas isoladas	59
5.4.1	Determinação da gama de hospedeiros	59
5.4.2	Determinação da eficiência de plaqueamento (EOP)	60
5.4.3	Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)	62
5.4.4	Curva de adsorção	63
5.4.5	Ensaio de terapia fágica <i>in vitro</i> (curvas de inativação bacteriana)	66

<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	70
<b>7.</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	71
	<b>REFERÊNCIAS</b>	72
	Anexo A - CONGRESSO CIENTÍFICO XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA 2020	76
	Anexo B - INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2020	77

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho de pesquisa aplicada, intitulado “ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA O BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA*”, foi financiado pela Universidade de Sorocaba, com Auxílio/Taxa Escolar do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Superior Particulares (Prosuc-Capes/Uniso), concedido à aluna Thais Jardim Oliveira, tendo sido orientado pelo Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e coorientado pela Profa. Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila, da Universidade de Sorocaba.

As doenças transmitidas por alimentos contaminados com bactérias têm sido uma preocupação mundial nos últimos anos, havendo um aumento nos registros de casos de intoxicações por alimentos contaminados por microrganismos, em muitos países (OMS, 2020). A *Salmonella entérica* é conhecida como um dos principais microrganismos responsáveis pela contaminação na indústria de alimentos e nos próprios alimentos.

As atuais técnicas de descontaminação e controle de patógenos nas indústrias de alimentos podem ser muito dispendiosas, pouco seletivas e até mesmo nefastas, como o uso de antibióticos de amplo espectro, que acabam selecionando bactérias resistentes. Assim, surge a busca por tecnologias alternativas para o controle de patógenos em alimentos. Neste contexto, a terapia bacteriófágica aparece como uma alternativa de biocontrole para as indústrias de alimentos. Bacteriófagos (ou fagos) são partículas virais, que não possuem metabolismo próprio, sendo capazes de infectar apenas células bacterianas específicas e provocar a sua lise. Assim, os fagos têm potencial para poderem ser utilizados no controle de contaminações bacterianas na indústria de alimentos.

Este trabalho de pesquisa visou o isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para *Salmonella entérica*, tendo como objetivo a elaboração um coquetel fágico visando aplicações futuras em alimentos ou na indústria de alimentos. Alguns dos resultados obtidos foram apresentados nos Congressos Científicos “XXXI Congresso Brasileiro de Virologia 2020” (ANEXO A) e “CIFARP - International Congress of Pharmaceutical Sciences 2020” (ANEXO B).

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que apenas as doenças diarreicas (a maioria das quais são causadas por alimentos contaminados por microrganismos patogênicos) matem 1,9 milhões de crianças por ano (RAVI *et al.*, 2017; OMS, 2020).

Doenças transmitidas por alimentos são, segundo a OMS, uma preocupação global de saúde pública. Estima-se que sejam a causa de agravos em uma a cada dez pessoas, podendo ser fatais, principalmente em crianças com idades inferiores a 5 anos de idade, causando cerca de 420 mil mortes somente na América do Sul (ANNANY *et al.*, 2015).

No Brasil, a maioria das doenças transmitidas por alimentos são causadas por microrganismos, principalmente pelas bactérias *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e espécies de *Staphylococcus* (Ministério da Saúde do Brasil, 2019). A contaminação dos alimentos por bactérias pode ocorrer durante o abate, ordenha, fermentação, processamento, armazenamento, envase, entre outras etapas (GABARON *et al.*, 2020).

Dentre as estratégias utilizadas para minimizar a carga microbiana de alguns alimentos, foi explorado o uso de antibióticos (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019). No entanto, o uso de substâncias antibióticas apresenta utilização restrita devido ao impacto negativo causado pela seleção de microrganismos mais resistentes a esses agentes antimicrobianos (DOSS *et al.*, 2017).

Novas tecnologias de controle de microrganismos tais como utilização de radiação por raios-gama, utilização de plasma, processamento a alta pressão, campo elétrico pulsado e ultrassons, podem ser eficientes mas apresentam um custo muito elevado (KAZI; ANNAPURE, 2016). O uso de métodos físicos de esterilização como vapor sobreaquecido, calor seco e luz Ultra Violeta (UV), podem ocasionar problemas de aceitabilidade e deterioração das propriedades organolépticas dos alimentos (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018).

Além disso, algumas abordagens frequentemente utilizadas nos alimentos industrializados para reduzir a contaminação por patógenos de origem alimentar não

podem ser aplicadas diretamente em frutas frescas, vegetais e produtos prontos para consumo (GARCIA *et al.*, 2008). A crescente demanda por produtos alimentícios prontos para consumo, de alta qualidade e com longa vida de prateleira, contribui para a busca de tecnologias de processamento que assegurem que as propriedades naturais e a aparência do produto não sejam significativamente alteradas (NGUYEN *et al.*, 2020).

Portanto, tem sido uma necessidade crescente o desenvolvimento de estratégias para reduzir os patógenos bacterianos em alimentos, satisfazendo ainda a demanda do consumidor por alimentos minimamente processados e com baixas concentrações de conservantes químicos (RAVI *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os fagos emergiram como uma ferramenta de biocontrole com enorme potencial de utilização na luta pela redução da contaminação dos alimentos por bactérias (ANNANY *et al.*, 2015; KAZI; ANNAPURE, 2016). Os fagos são vírus que infectam única e exclusivamente células bacterianas, não possuindo maquinaria metabólica, sendo por isso parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando de uma célula hospedeira bacteriana viável para se replicarem (HARADA *et al.*, 2018 DOSS *et al.*, 2017; RIOS *et al.*, 2016).

Várias aplicações utilizando fagos no controle de patógenos em alimentos têm sido propostas ao longo dos anos, com relativo sucesso (KAZI; ANNAPURE, 2016). O biocontrole com fagos tem como vantagem envolver um agente natural, que se auto multiplica e é altamente específico para determinado patógeno bacteriano. Outra qualidade interessante é a notável estabilidade dos fagos em matrizes alimentares (TAUXE, 2002).

Adicionalmente, os fagos apresentam diversas outras vantagens como agentes de biocontrole em alimentos, segundo os pesquisadores Harada *et al.* (2018) e Sillankorva, Oliveira e Azeredo (2012), tais como: (i) especificidade para infectar seu hospedeiro alvo, mantendo intacta a microbiota local, (ii) capacidade de autorreplicação e autolimitação, enquanto estiverem presentes células viáveis do seu hospedeiro específico; (iii) rápida adaptação aos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas células bacterianas; (iv) toxicidade inerente praticamente nula, uma vez que são constituídos basicamente por ácidos nucleicos e proteínas; (v) baixo custo de isolamento e simplicidade na sua manipulação; (vi) completa inocuidade para

as células humanas e animais; e (vii) tolerância a diversas condições prevalentes nas matrizes alimentícias.

Assim, desde que se descobriu que estes vírus estritamente bacterianos destroem os seus hospedeiros, enquanto se mantêm completamente inócuos para os seres humanos, pesquisadores buscam utilizar estes agentes ubíquos na biosfera para o tratamento de infecções bacterianas, tanto em humanos e animais, bem como, para aplicações de biocontrole na agropecuária, na indústria de alimentos, entre outras aplicações (HARADA *et al.*, 2018; SHAO; WANG, 2008; JURCZAK- KUREK *et al.*, 2016).

O conceito de combater patógenos em alimentos através da utilização de fagos pode ser abordado em todas as fases da produção ao longo de toda a cadeia alimentar. Os fagos são adequados para (i) prevenir ou reduzir a colonização bacteriana e doenças associadas na pecuária; (ii) descontaminar carcaças de animais para consumo humano e outros produtos crus como frutas, ovos e vegetais frescos; (iii) desinfetar equipamentos e superfícies de contato; e (iv) para prolongar o prazo de validade de alimentos industrializados perecíveis como um conservante natural (GARCIA *et al.*, 2008).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

A América do Sul integra diversos países ainda em desenvolvimento que possuem problemas sérios na área da Saúde Pública. As diarreias causadas por DTAs são exemplos frequentes de problemas de saúde entre a população, sendo a principal causa de desnutrição e a segunda maior causa de mortalidade em crianças nos países em desenvolvimento da América do Sul, causando 420 mil óbitos por ano (ANNANY *et al.*, 2015; SHINOHARA *et al.*, 2008).

Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, ou enterobactérias são os principais responsáveis pelas diarreias bacterianas (NEITZKE; ROZA; WEBER, 2017), com as enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* sendo consideradas os principais agentes relacionados aos surtos de contaminação alimentar (LE *et al.*, 2018). Apesar de colonizarem frequentemente um hospedeiro, as enterobactérias também podem sobreviver no meio ambiente, sendo constantemente encontradas em águas e alimentos contaminados (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

Vários são os fatores que contribuem para a contaminação de humanos por bactérias, dentre eles as DTAs, como visto anteriormente. As DTAs podem ser identificadas pelo desenvolvimento de sintomas que são resultantes do consumo de alimentos contaminados (ENG *et al.*, 2015).

Os sintomas mais frequentes de DTAs são dores de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e, por vezes, febre, podendo variar a duração desses sintomas dependendo do estado físico do paciente, do tipo de microrganismo ou toxina ingerida ou suas quantidades no alimento (TAUXE, 2002). As DTAs podem ser identificadas após a ingestão de alimentos contaminados por agentes patogênicos e seus metabólitos tóxicos, e são consideradas como surtos quando uma ou mais pessoas apresentam sintomas similares (PEREIRA *et al.*, 2016).

### 2.2 Agente etiológico: *Salmonella enterica*

Descoberto e descrito em 1885 por Daniel Salmon, médico veterinário bacteriologista, o bacilo do gênero *Salmonella* é considerado membro do grupo de enterobactérias Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae* (ENG *et al.*, 2015).

O bacilo do gênero *Salmonella* é comumente dividido em duas espécies, *Samonella enterica* e *Salmonella bongori*. Possui mais de 2500 serotipos conhecidos que diferem em sua ampla gama de hospedeiros e capacidade de causar doenças. Mais de 50% dos serotipos identificados a pertencerem à espécie *Salmonella entérica*, responsável pela grande maioria das infecções por salmonela em humanos (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019). Porém, nem todos estes serotipos possuem nome, por isso é comum que o nome científico daqueles que o têm seja encurtado para incluir apenas o gênero e serotipo, como por exemplo: *S. enterica*, subespécie enterica, serotipo *typhi* é conhecido como *Salmonella typhi* (ENG *et al.*, 2015).

A salmonela também pode ser dividida em três classes, com base no tipo de adaptação da serovariedade bacteriana no hospedeiro: (i) *S. typhi* e *S. paratyphi* possuem ótima adaptação e patogenicidade em humanos, sendo responsáveis pela febre tifóide (ou entérica); (ii) *S. dublin* (gado), *S. arizonae* (répteis) e *S. choleraesuis* (suínos) adaptam-se quase que exclusivamente em animais e podem ocasionalmente contaminar humanos; (iii) *S. enteritidis* e *S. typhimurium* apresentam facilidade de adaptação em uma imensa variedade de hospedeiros, sendo responsáveis por 85% de todas as infecções por salmonela nos EUA (Estados Unidos da America). São comumente encontradas no intestino de animais e humanos (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018).

A presença da *Salmonella entérica* em alimentos tem-se mostrado um grave problema de saúde pública, pois os sintomas advindos das DTAs podem ser mal diagnosticados, levando a uma sobrecarga do sistema de saúde do país (ENG *et al.*, 2015). As infecções entéricas causadas por Salmonela, também chamadas de salmoneloses, são uma das principais DTAs em todo o mundo (SHINOHARA *et al.*, 2008). A maioria das serovariedades desse gênero são patogênicas para os seres humanos, provocando diferentes sintomatologias devido a variações no mecanismo de patogenicidade, da idade e do estado de saúde do hospedeiro (RIVERA CALDERÓN *et al.*, 2012).

Nas salmoneloses, a penetração de *Salmonella spp.* fica limitada às células epiteliais. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal (GUTIÉRREZ *et al.*, 2020). Os sintomas das infecções entéricas surgem entre 6 a 48 h após a ingestão do alimento contaminado, podendo durar até 72 h. É considerada a forma mais comum de infecção

por salmonela e, geralmente, é naturalmente resolvida em dois a três dias, sem a necessidade de tratamento com antibióticos (ENG *et al.*, 2015).

Nas febres tifóide ou entérica, outras formas de infecção mais patogênicas da Salmonela, as células bacterianas passam pelo processo de fagocitose pelos monócitos e macrófagos e atravessam a camada de células epiteliais, resultando numa resposta inflamatória decorrente da hiperatividade do sistema mononuclear fagocitário (RIVERA CALDERÓN *et al.*, 2012). Os sintomas da infecção incluem aumento da temperatura corporal, podendo esta chegar aos 40 °C, com fortes dores de cabeça e do abdômen, devendo a infecção ser tratada com antibacterianos assim que diagnosticada pelo médico (SHINOHARA *et al.*, 2008). O tratamento precisa ser mantido durante pelo menos sete dias após a temperatura corporal ter voltado ao normal, para que se possa atingir a salmonela em sua localização intracelular (RIVERA CALDERÓN *et al.*, 2012).

A grande preocupação, atualmente, é o aparecimento de serotipos do gênero salmonela multirresistentes aos antibióticos. Alterações nos serotipos indicam a necessidade de mudanças no modo de criação animal, com a disseminação de novos serotipos a ser causada devido ao grande fluxo do comércio de alimentos a nível mundial e ao uso indiscriminado de antibióticos (ENG *et al.*, 2015).

Com o crescente aumento das DTAs, aumenta também a necessidade de controlar a segurança microbiológica dos produtos alimentícios. Têm-se estudado métodos para reduzir ou eliminar a presença de salmonela (RIVERA CALDERÓN *et al.*, 2012) durante a produção dos alimentos, aumentando assim a qualidade microbiológica dos mesmos (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019). A redução deste agente patogênico no ambiente industrial pode garantir a redução da contaminação dos alimentos até ao destino final (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004).

### **2.3 Biocontrole em indústrias de alimentos**

O desenvolvimento de métodos de higienização dos alimentos possui como objetivo a segurança microbiológica, amparando não só a manipulação dos alimentos e bebidas, como também a utilização de matérias-primas de boa procedência, a implantação de boas práticas de higiene para manipuladores e qualidade higiênico-

sanitária do ambiente e utensílios de preparação (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018).

Falhas no monitoramento da qualidade microbiológica dos alimentos produzidos industrialmente contribuem diretamente para a ocorrência de DTAs (NEITZKE; ROZA; WEBER, 2017).

No entanto, o biocontrole na produção dos alimentos tem-se mostrado um grande desafio para a indústria, uma vez que algumas das técnicas utilizadas atualmente fazem uso de antibióticos, que podem ser eficazes, mas o seu uso intenso tem favorecido o desenvolvimento de mecanismos de resistência das bactérias contaminantes, diminuindo assim a sua própria eficácia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2020).

Algumas tecnologias como a utilização de raios-gama, processamento por alta pressão, campo elétrico pulsado e ultrassons, podem ser eficientes, porém são tecnologias com custo muito elevado (KAZI; ANNAPURE, 2016). Já a utilização de métodos físicos, como calor seco, vapor sobreaquecido e luz UV podem causar problemas de aceitabilidade e deterioração das propriedades organolépticas dos alimentos (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018).

A crescente procura dos consumidores por alimentos prontos para consumo ou com longa vida de prateleira, tem contribuído para o desenvolvimento de tecnologias de processamento que assegurem que a aparência e propriedades naturais do alimento não sejam significativamente alteradas (NGUYEN *et al.*, 2020). Além disso, algumas abordagens frequentemente utilizadas nos alimentos industrializados para reduzir a contaminação através de agentes etiológicos advindos dos alimentos não podem ser aplicadas diretamente em frutas frescas, vegetais e produtos prontos para consumo (GARCIA *et al.*, 2008).

Fagos usados para o biocontrole de microrganismos no cultivo de peixes para consumo humano também mostraram bons resultados, principalmente por não produzirem nenhum resíduo químico e serem altamente específicos para as células bacterianas hospedeiras (PEREIRA *et al.*, 2021).

O biocontrole com fagos líticos para salmonela representa uma intervenção natural sem a necessidade de alterações térmicas ou químicas nos alimentos, que já mostrou controlar o crescimento de salmonela em queijo (MODI *et al.*, 2001), frango e ovos (GOODE *et al.*, 2003), e em frutas frescas (LEVERENT *et al.*, 2003).

A terapia fágica como biocontrole de patógenos bacterianos é aplicada através do uso de coquetéis de fagos líticos em ambientes industriais como uma alternativa para eliminar ou reduzir a carga bacteriana, tanto na produção como diretamente nos alimentos (LIU *et al.*, 2017).

## 2.4 Bacteriófagos

Responsáveis por um desempenho natural no equilíbrio da evolução dos microrganismos pertencentes aos domínios *Bactéria* e *Archaea*, os vírus conhecidos como bacteriófagos (ou fagos) são entidades inertes de natureza essencialmente proteica caracterizadas pela capacidade de infectarem especificamente células procariotas (KUTTER, 2009).

Uma das primeiras observações da existência de fagos foi mencionada em meados dos anos 1900. Após a sua descoberta, iniciaram-se alguns estudos e, mesmo com poucos recursos e escasso conhecimento da sua natureza, os fagos foram utilizados em benefício do ser humano (PEREIRA *et al.*, 2016). Isso, numa época onde a imunologia e a virologia ainda não possuíam bases científicas bem definidas. (SHAO; WANG, 2008).

Félix D'Herelle, em 1917, no Instituto Pasteur em Paris, França, foi um dos principais nomes envolvidos na descoberta dos fagos que, após observar e analisar halos de lise em culturas bacterianas, identificou a natureza viral destas entidades e definiu o termo *bacteriófago* (do latim “comedor de bactérias”) (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004). Félix D'Herelle propôs a aplicação de uso prático dos fagos, desenvolvendo uma ideia sobre “entidades exógenas de cura”, onde os fagos poderiam ser a explicação para a resposta de infecções bacterianas em organismos humanos ou animais (OLIVEIRA, 2012).

Os experimentos e aplicações da terapia fágica logo se expandiram, envolvendo então infecções em animais e humanos, como a peste bubônica, cólera, infecções de pele, entre outras (MEADEN; KOSKELLA, 2013).

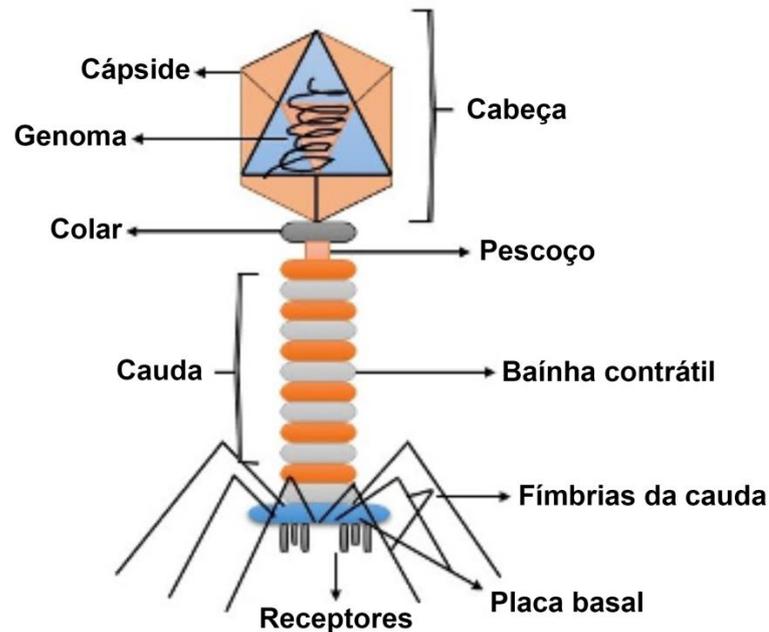
Entretanto, falhas advindas do pouco entendimento sobre essas entidades biológicas resultaram em condições variáveis nos tratamentos e, junto com a descoberta dos antibióticos na década de 40, com aplicabilidade e estabilidade mais fáceis, a terapia fágica acabou caindo no esquecimento (PEREIRA *et al.*, 2017).

A utilização dos antibióticos promoveu a cura rápida de diversas infecções bacterianas e suscitou a teoria de que infecções bacterianas não seriam mais consideradas problemas de saúde pública (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004). No entanto, as bactérias mostraram-se mais perspicazes do que se acreditava e, através de mutações e transferência horizontal de genes, ao longo do tempo desenvolveram diversos mecanismos de resistência aos antibióticos (ABEDON, 2011).

Diferentemente dos antimicrobianos convencionais, que possuem aplicação e distribuição sistêmica e inespecífica, os fagos são altamente específicos para suas células bacterianas alvo (HARADA *et al.*, 2018a; JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016; RIOS *et al.*, 2016). Este fato é consideravelmente importante, dado que a utilização de fagos não interfere na microbiota normal do hospedeiro, mostrando-se aquelas entidades virais completamente inertes para as outras células bacterianas presentes no organismo (SHEN *et al.*, 2012). Embora exista a premissa da possibilidade de neutralização de fagos por células do sistema imunológico, pesquisas demonstraram que a imunogenicidade dos fagos é geralmente muito baixa e a ação completa de eliminar a infecção bacteriana normalmente está finalizada antes da formação de uma resposta imune específica (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004).

A maioria dos fagos possui como material genético DNA de fita dupla (dsDNA) (JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016). Porém, existem também aqueles com fita simples de RNA (ssRNA), com fita dupla segmentada (dsRNA) e com DNA de fita simples (ssDNA) que não apresentam envelopes lipídicos (STORMS; SAUVAGEAU, 2015). As partículas fágicas contendo DNA apresentam os seguintes componentes estruturais: cabeça, cápside, ácido nucleico, colar, pescoço, cauda, bainha contrátil, tubo central, placa basal, fímbrias da cauda, e receptores (COSTA *et al.*, 2019), como representado esquematicamente na Figura 1.

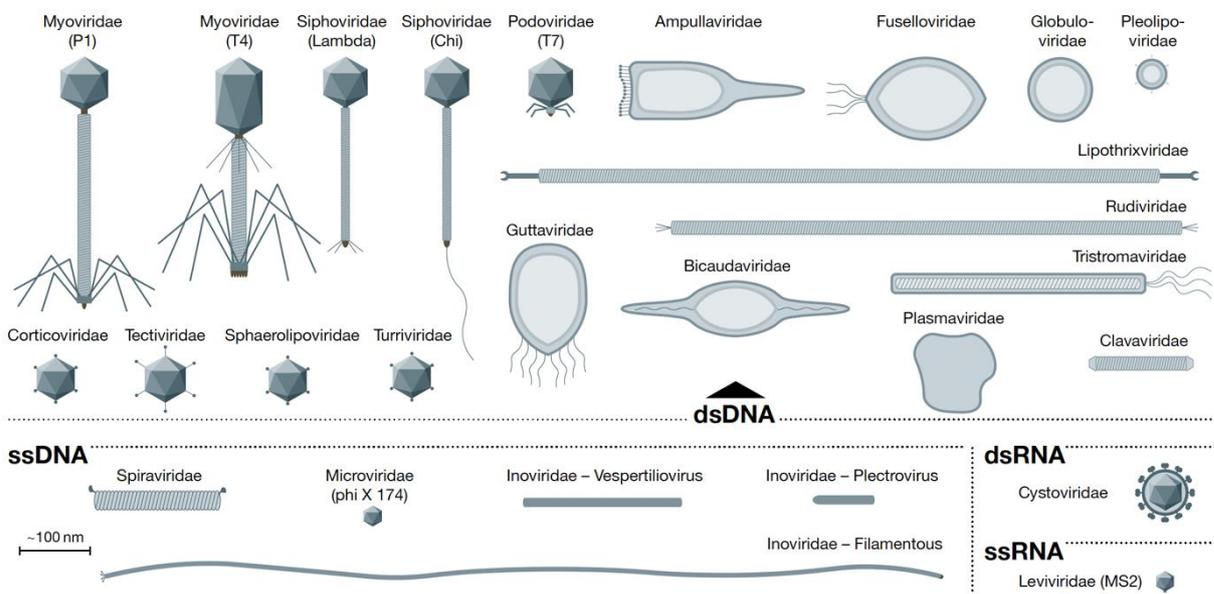
**Figura 1.** Representação esquemática de uma partícula fágica prototípica.



**Fonte:** Elaboração própria.

Os fagos são classificados em 13 famílias. As partículas fágicas que possuem cauda na sua estrutura pertencem à ordem *Caudovirales* e correspondem a cerca de 96% dos fagos conhecidos. Uma média de cerca de 60% dos fagos que apresentam cauda longa e não contrátil pertencem à família *Siphoviridae*, 25% dos fagos que apresentam cauda *contrátil* pertencem à família *Myoviridae*, e os que possuem cauda curta e não-contrátil pertencem à família *Podoviridae*. Os 4% restantes de fagos distribuí-se pelas outras famílias (HARADA *et al.*, 2018a; JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016) (Figura 2).

**Figura 2.** Classificação de Baltimore dos fagos, de acordo com a morfologia e tipo de material genético.



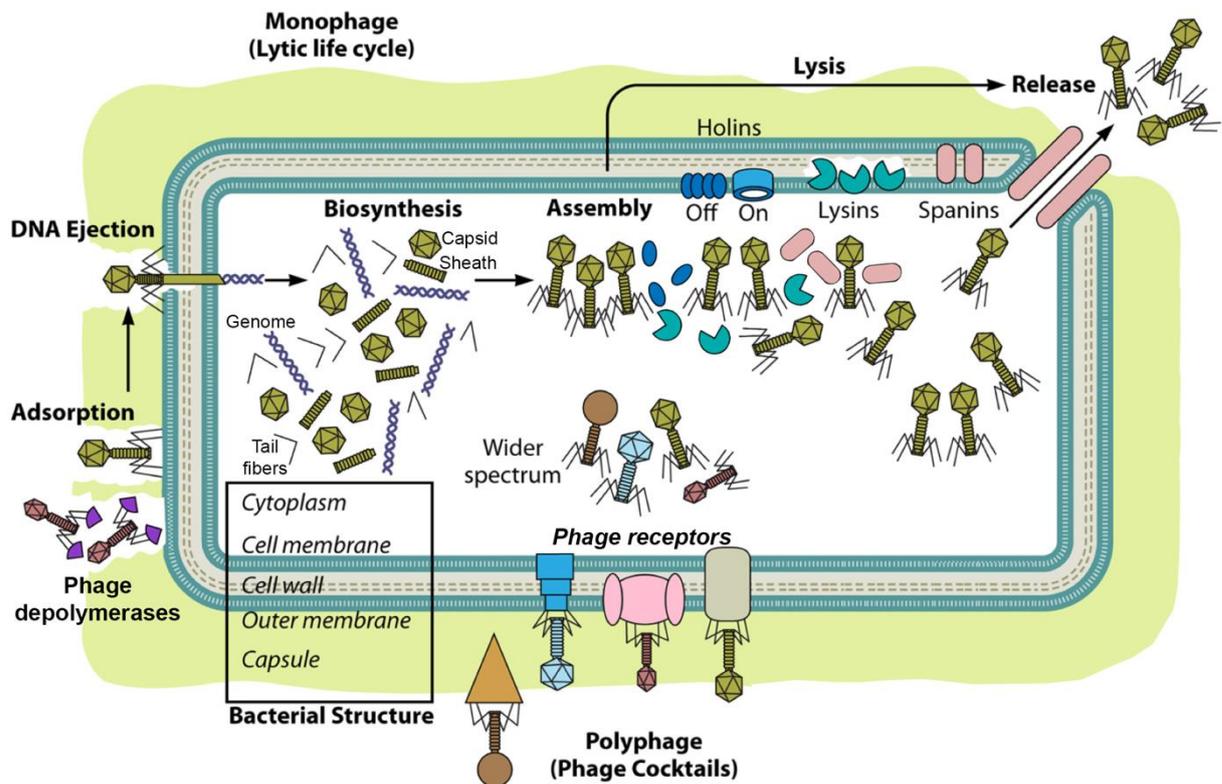
Fonte: HAY; LITHGOW, 2019.

Quando uma partícula fágica infecta uma célula bacteriana hospedeira suscetível, podem ocorrer dois tipos de ciclos de replicação, o ciclo lítico ou o ciclo lisogênico (HARADA *et al.*, 2018; JANSEN *et al.*, 2018). Quando o fago se replica pelo ciclo lítico, a maquinaria metabólica da célula bacteriana é dominada e redirecionada para a síntese de material genômico do vírus e suas proteínas, com o objetivo de produzir novas partículas fágicas (HARADA *et al.*, 2018; JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016). De uma forma geral, a interação entre fago e bactéria ocorre com aquelas células bacterianas que expressam receptores específicos na sua superfície (GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019). Isto pode caracterizar a especificidade das partículas fágicas, uma vez que, a interação só ocorrerá se a célula bacteriana exibir determinados receptores à sua superfície (SILVA *et al.*, 2020; HARADA *et al.*, 2018; RIOS *et al.*, 2016).

Os fagos se ligam à superfície da bactéria através da placa basal, uma estrutura situada na base inferior do fago (Figura 1) que forma espículas responsáveis por ajudarem o vírus a injetar o seu genoma no citoplasma da célula hospedeira suscetível. Após aderir e ligar-se a receptores específicos na superfície da célula bacteriana hospedeira, o fago injeta o seu material genético no citoplasma do hospedeiro e, geralmente, ou redireciona a maquinaria metabólica da célula para a

produção das suas próprias proteínas dando origem à formação de inúmeros virions que, ajudados por holinas, lisinas e spaninas, produzidas pelo fago, levam à lise da célula bacteriana (Figura 3). O fago pode também integrar-se no genoma do hospedeiro formando um profago e aí permanecendo em estado latente, sendo replicado com o genoma do hospedeiro até que algum estímulo leve à sua excisão e se dê início a um ciclo lítico (fagos temperados) (WEI *et al.*, 2017). No ciclo lítico de replicação, quando a célula é lisada e libera novos viriões no ambiente infeccioso, cada um desses novos virions pode reinfetar novas células bacterianas susceptíveis e iniciar um novo ciclo lítico de replicação.

**Figura 3.** Representação do ciclo lítico de replicação dos fagos.



**Fonte:** Adaptado de GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019.

Apesar dos importantes benefícios citados, alguns aspectos na terapia fágica precisam ser analisados com cuidado (JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016). Dentre eles, a imunogenicidade da partícula fágica, identificação e especificidade da bactéria hospedeira, eficácia apresentada e possível liberação de endotoxinas bacterianas (RIOS *et al.*, 2016, 2018).

As bactérias não-susceptíveis a determinado fago permanecem intactas na microbiota do ambiente, contrariamente ao que ocorre com os antimicrobianos

convencionais de amplo espectro de ação, que afetam todas as bactérias pertencentes à mesma classe (JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016).

No geral, os fagos são potenciais ferramentas contra infecções e contaminações bacterianas e, apesar do estreito espectro de ação dos fagos ser considerado uma desvantagem em relação aos antibióticos, essa característica pode ser vantajosa em muitas situações (COSTA *et al.*, 2019; SHINOHARA *et al.*, 2008).

Segundo Kupczok *et al.* (2018), em estudo realizado durante três décadas com 34 isolados de fagos da família *Siphoviridae* líticos para *Lactococcus lactis*, foram observadas mutações neutras na distribuição dos efeitos de aptidão e também através da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) os fagos não mostraram mutações, indicando assim que são relativamente constantes e pouco ou quase nada mutáveis.

A pressão seletiva de predação viral resultou na evolução de uma gama de mecanismos de defesa arquea e bacteriana, que inclui sistemas CRISPR-Cas (repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente intercaladas; associado a CRISPR), argonautas procarióticos, sistemas de modificação de restrição (R–M), modificação de superfície (sm), sistemas toxina-antitoxina e sistemas de infecção abortiva (BRONIEWSKI *et al.*, 2020).

Os fagos podem, por sua vez, superar a imunidade bacteriana baseada em CRISPR adquirindo uma mutação pontual na sequência-alvo em seu genoma (BRONIEWSKI *et al.*, 2020), embora o surgimento e a disseminação de tais mutantes fágicos de "escape" sejam restringidos tanto pela diversidade de alelos de imunidade CRISPR na população bacteriana como pelos custos de adaptação associados às mutações fágicas (BRONIEWSKI *et al.*, 2020).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Isolar, caracterizar físico-química e biologicamente, e avaliar *in vitro* bacteriófagos líticos para *Salmonella enterica*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ⓧ Isolar bacteriófagos líticos para *Salmonella enterica* a partir de águas residuais da indústria de alimentos;
- ⓧ Caracterizar físico-quimicamente as partículas bacteriofágicas através de varreduras espectrais na zona UV-Vis para determinação do seu coeficiente de extinção molar, análises do perfil de proteínas estruturais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), análises morfológicas através de microscopia eletrônica de transmissão;
- ⓧ Caracterizar biologicamente as partículas bacteriofágicas isoladas através da determinação da sua gama de hospedeiros, determinação da eficiência de plaqueamento em cepas bacterianas susceptíveis, determinação dos parâmetros de crescimento através das suas curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), determinação da taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas às suas células bacterianas hospedeiras através das suas curvas de adsorção no hospedeiro bacteriano, e determinação da sua atividade lítica na cepa de coleção de *Salmonella enterica*;
- ⓧ Avaliar a capacidade de inativação bacteriana *in vitro* dos bacteriófagos líticos isolados para *Salmonella entérica*, a dois valores de multiplicidade de infecção (MOI).

## **4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Preparação de meios de cultura, soluções e materiais**

Todos os meios de cultura e soluções destinados aos ensaios microbiológicos e materiais tais como microtubos, tubos de ensaio, tubos Falcon, pinças, ponteiras de micropipetas e fitas de papel, foram esterilizados em autoclave vertical da marca Primatec Indústria e Comércio (modelo CS-A, Manaus/AM, Brasil) durante 30 min à temperatura de 121 °C.

A água utilizada para a preparação de todos os meios e soluções foi previamente ultrapurificada num sistema Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil) para uma resistividade final de cerca de 18,18 MΩ.cm e condutividade de 0,05 µS.cm<sup>-1</sup>.

A manipulação de materiais, meios de cultura e todos os ensaios microbiológicos, foram efetuados usando uma cabine de segurança biológica classe II tipo B2, da marca Filterflux® (Piracicaba/SP, Brasil).

#### **4.1.2 Meio líquido Tryptic Soy Broth (TSB)**

Pesaram-se 24 g de meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) desidratado para um frasco Schott de capacidade 1000 mL, e adicionaram-se 800 mL de água ultrapura. Esterilizou-se a mistura em autoclave e, após arrefecimento até a temperatura de 40 °C, distribuiu-se o meio de cultura por tubos de ensaio estéreis com 5 mL, 10 mL, 25 mL, tendo estes sido armazenados a 4 °C. Este foi o meio de cultura utilizado para a preparação da suspensão bacteriana.

#### **4.1.3 Meio líquido Tryptic Soy Broth (2x TSB)**

Preparou-se o meio pesando 48 g de TSB e adicionando 800 mL de água ultrapura conforme mencionado na seção 4.1.2. Esterilizou-se a mistura em autoclave e, após arrefecimento até à temperatura de 40 °C, distribuíram-se volumes de 25 mL em Erlenmeyers de 125 mL de capacidade. Este meio foi utilizado para as etapas de enriquecimento da fonte ambiental de bacteriófagos.

#### **4.1.4 Meio sólido Tryptic Soy Agar**

Pesaram-se 24 g de meio TSB desidratado e 9,6 g de ágar bacteriológico (marca KASVI, Laboratórios Conda, Madri, Espanha), num Erlenmeyer de capacidade 1000 mL, adicionou-se um pouco de água ultrapura para sua dissolução e completou-se o volume até 800 mL com água ultrapura. Esterilizou-se a mistura em autoclave e, após arrefecimento até a temperatura de 40 °C, sem deixar solidificar, verteu-se para placas de Petri estéreis descartáveis dentro da cabine de segurança biológica. Uma vez o meio solidificado nas placas de Petri, estas foram tampadas e acondicionadas invertidas (para impedir formação de gotículas de água no meio solidificado) a uma temperatura de cerca de 8 °C.

#### **4.1.5 Meio semi-sólido Molten Top-Ágar (MTA-TSB)**

Pesaram-se 7,5 g de meio TSB desidratado e 1,5 g de ágar num frasco Schott de 500 mL de capacidade. Completou-se o volume com água ultrapura até um volume final de 250 mL. O meio foi autoclavado e utilizado como segunda camada sobre meio TSA sólido, para preparar os tapetes bacterianos pelo método de dupla camada de ágar.

#### **4.1.6 Solução salina a 0,9% (m/m)**

A solução salina a 0,9% (m/m) de NaCl, também conhecida como solução fisiológica, foi preparada pesando-se 3,6 g de NaCl (marca SYNTH, Diadema/SP, Brasil) num frasco Schott de 500 mL de capacidade e completando-se com 496,4 mL de água ultrapura. A solução foi autoclavada e depois armazenada em geladeira.

#### **4.1.7 Preparação do tampão fágico**

Pesaram-se 6,06 g de Tris-base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) num Béquer de 100 mL e adicionaram-se 50 mL de água ultrapura. Nessa solução, ajustou-se o pH para 7.5 com HCl, com o auxílio de um agitador magnético (marca Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo/SP, Brasil). Em seguida adicionou-se, num balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, 5,8 g de NaCl (marca SYNTH, Diadema/SP, Brasil), 2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (marca SYNTH, Diadema/SP, Brasil) e os 50 mL de solução de Tris-base a pH 7.5. Completou-se o volume até 1000 mL com

água ultrapura, e a solução de tampão fágico foi transferida para frasco Schott, esterilizada e armazenada a 4 °C.

#### **4.1.8 Material biológico**

Para o isolamento e amplificação de bacteriófagos, foi utilizada uma cepa de coleção da bactéria *Salmonella enterica* adquirida da empresa CEFAR Diagnóstica (São Paulo/SP, Brasil): *Salmonella enterica* ref. CEFAR CCCD-S004.

Os bacteriófagos foram isolados a partir de águas residuais coletadas em abril de 2019 na indústria de alimentos “AB Brasil - Indústria e Comércio de Alimentos Ltda”, localizada em Sorocaba/SP (Brasil). A AB Brasil é uma empresa do grupo ABF (*Associated British Foods*), quarto maior grupo produtor de alimentos da Europa. A empresa trabalha com o processamento e desenvolvimento de vários produtos e ingredientes alimentícios. A filial de Sorocaba-SP de onde foram isolados os fagos, trabalha com pasteurização de ovos de galinha. Por isso foi selecionada como possível fonte de isolamento. Sabendo-se que a *S. enterica* é majoritariamente encontrada em resíduos alimentícios, a empresa AB Brasil foi contactada e disponibilizou amostras de esgoto para os trabalhos de pesquisa.

#### **4.1.9 Equipamento analítico e outros**

Para pesagem dos meios e reagentes, foi utilizada uma balança analítica da marca Marte Científica (modelo OHAUS AS200S, Santa Rita do Sapucaí / MG, Brasil).

Para o isolamento e propagação dos bacteriófagos, os equipamentos utilizados foram: cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIB2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil), autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Primatec, Manaus/AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo/SP, Brasil), centrífuga Eppendorf™ (modelo AG 22331, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

O sistema de filtração esterilizante utilizado (Stericup™-GP, membrana de poliétersulfato (PES) com tamanho de poro de 0,22 µm de diâmetro) foi adquirido da Merck-Milipore (Darmstadt, Alemanha).

Para ultrapurificação da água utilizou-se um equipamento Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil), com a água ultrapurificada a apresentar resistividade de 18,8 M $\Omega$ .cm e condutividade de 0,05  $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>.

O equipamento utilizado para as análises de eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi um sistema Mini-Protean® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-Rad (California CA, EUA), juntamente com uma fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-Rad, Califórnia CA, EUA) e um banho seco digital também da Bio-Rad (California CA, EUA).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas num microscópio eletrônico de transmissão (MET) da marca JEOL (modelo JEM-1011, Tokyo, Japão), operando a 60 kV; o microscópio estava também equipado com uma câmera digital da marca Gatan Microscopy Suite (modelo Digital Inc., Houston TX, EUA) com uma resolução de 11 MegaPixels e uma gama dinâmica de 14 bits (tamanho de pixel de 9  $\mu$ m) para aquisição digital de imagens. O equipamento pertence a Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que fica localizada em Piracicaba – SP.

## **4.2 Procedimentos experimentais**

### **4.2.1 Curva de crescimento da bactéria *Salmonella enterica***

Para realização da curva de crescimento da bactéria hospedeira, preparou-se um inóculo de 125 mL em meio TSB das cepas bacterianas de *Salmonella enterica*. Para padronização da suspensão bacteriana, as leituras de densidade ótica em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) foram realizadas utilizando cubetas descartáveis no comprimento de onda de 610 nm.

As primeiras leituras foram realizadas a cada 30 min durante as primeiras 5 h, período de tempo após o qual as amostras foram coletadas para leitura a cada 60 min até completar um período de 12 h. Os resultados de densidade ótica (OD<sub>600nm</sub>) foram convertidos em concentração de biomassa em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL), utilizando a relação empírica: OD<sub>610nm</sub> = 1.0 [biomassa]  $\approx$  1x10<sup>9</sup>

UFC/mL. Durante todo o período do ensaio, a suspensão bacteriana foi mantida incubada a 37 °C.

#### **4.2.2 Isolamento, amplificação e determinação do título fágico de suspensões de partículas bacteriofágicas estritamente líticas para *Salmonella enterica***

Para o isolamento de bacteriófagos estritamente líticos para cepas de *Salmonella enterica*, coletaram-se amostras de águas residuais da indústria de alimentos “AB Brasil - Indústria e Comércio de Alimentos Ltda”, na cidade de Sorocaba/SP (Brasil).

##### **4.2.2.1 Enriquecimento de bacteriófagos a partir da fonte ambiental coletada**

Inoculou-se a bactéria *Salmonella enterica* em meio de cultura TSB e incubou-se a 37 °C durante 7 h, até início do crescimento exponencial, de acordo com os resultados obtidos na produção da curva de crescimento da bactéria (seção 4.2.1). Em seguida, retiraram-se 50 µL deste inóculo e adicionaram-se a 50 mL de meio TSB 2x num frasco Erlenmeyer estéril de 250 mL de capacidade. Na sequência, adicionou-se, com auxílio de uma proveta, 50 mL da amostra líquida da fonte ambiental coletada.

A suspensão contendo o inóculo bacteriano e a amostra da fonte coletada foi incubada durante a noite a 37 °C. Após esse período de tempo, retiraram-se 15 mL da suspensão em enriquecimento e centrifugou-se a 2500 rpm durante 20 min em tubos Falcon de 15 mL. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com auxílio de uma seringa de 5 mL, e filtrado através de filtro descartável da marca Millipore® com tamanho de poro de 0,45 µm e, posteriormente, através de filtro com tamanho de poro de 0.22 µm, para microtubos Eppendorf® estéreis de 2 mL de capacidade.

##### **4.2.2.2 Preparação de tapete bacteriano de *Salmonella enterica* pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada**

Foi adicionada uma alíquota de 100 µL de suspensão bacteriana de *Salmonella enterica* ( $OD_{600nm} = 1.0$ ) a 5 mL de meio MTA-TSB mantido previamente a 47 °C, em tubo de ensaio de 15 mL de capacidade. A suspensão resultante foi suavemente homogeneizada por agitação orbital e imediatamente vertida em placas de Petri contendo meio TSA sólido, as quais foram de seguida incubadas a 37 °C por 12h.

#### 4.2.2.3 Verificação da presença de bacteriófagos por *spot-test* das amostras enriquecidas

Para a verificação da presença de bacteriófagos, realizou-se o teste da gota (*spot-test*) pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Com uma micropipeta semi-automática introduziu-se um volume de 10 µL da suspensão de enriquecimento em placa de Petri preparada com uma camada de tapete bacteriano formado previamente (seção 4.2.2.2). Na sequência, as placas foram incubadas por 12h em estufa a 37 °C. A formação de halo de inibição de crescimento bacteriano foi indicativa da presença de bacteriófagos líticos para *Salmonella enterica* existentes na amostra ambiental coletada.

#### 4.2.2.4 Isolamento de bacteriófagos

Utilizaram-se tiras de papel de filtro de 1 cm de largura, estéreis. Uma fita foi umedecida na solução fágica filtrada armazenada no microtubo. Foi utilizada uma placa com um tapete da bactéria *S. enterica* previamente formado pela técnica de dupla camada em ágar e a fita umedecida foi deslizada sobre o tapete esgotando todo o conteúdo em uma fileira. Novamente, outra fita foi utilizada para cada fileira abaixo, mas sem ser umedecida apenas arrastando-se metade da camada de cima para baixo. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C durante a noite. Após o período de incubação, observou-se a presença de placas bacteriofágicas diferentes, isoladas, em relação a diferentes tamanhos de halos de inibição.

Dessa forma, foi escolhida e selecionada uma única placa bacteriofágica isolada, sendo esta perfurada com o auxílio de um palito de madeira estéril. Esse palito foi depois usado para perfurar várias vezes, em pontos diferentes, um novo tapete bacteriano de *S. enterica* numa nova placa de Petri, formando uma linha. Este procedimento foi repetido para outras placas fágicas isoladas com tamanho diferente.

Utilizando outra fita de papel estéril, esta foi passada nos pontos perfurados e em camadas com o intuito de diluir e espalhar as novas placas bacteriofágicas. Essa placa foi incubada a 37 °C durante a noite. Este procedimento foi repetido várias vezes até que as placas fágicas apresentassem a mesma morfologia e tamanho.

#### **4.2.2.5 Amplificação dos bacteriófagos isolados**

Com um palito, perfurou-se uma placa fágica isolada no tapete bacteriano numa das placas de Petri do procedimento anterior (seção 4.2.2.4). Em seguida, perfurou-se o tapete bacteriano em outras dez placas de Petri com esse mesmo palito. Uma fita de papel foi passada por cada placa de Petri, cobrindo toda a superfície do tapete bacteriano. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite. Após o período de incubação, com o auxílio de uma pipeta, adicionaram-se 5 mL de tampão fágico a cada placa de Petri.

As placas de Petri foram então seladas com Parafilm™ e armazenadas a 4 °C para que o tampão fágico extraísse os fagos do meio. Com a ajuda de uma micropipeta de 5 mL, removeu-se o sobrenadante e as placas de Petri foram descartadas. Adicionou-se 10% do volume final do sobrenadante de clorofórmio, em tubos Falcon de 50 mL. A nova mistura foi centrifugada a 2500 rpm durante 20 min para separar bactérias e debris celulares.

O sobrenadante formado foi recolhido com auxílio de uma micropipeta de 5 mL e filtrado em Stericup® com membrana polietersulfônica (PES) de 0,22 µm de tamanho de poro, para novos tubos Falcon de 50 mL. A suspensão fágica assim obtida foi armazenada a 4 °C.

#### **4.2.2.6 Precipitação dos fagos com Polietilenoglicol (PEG)**

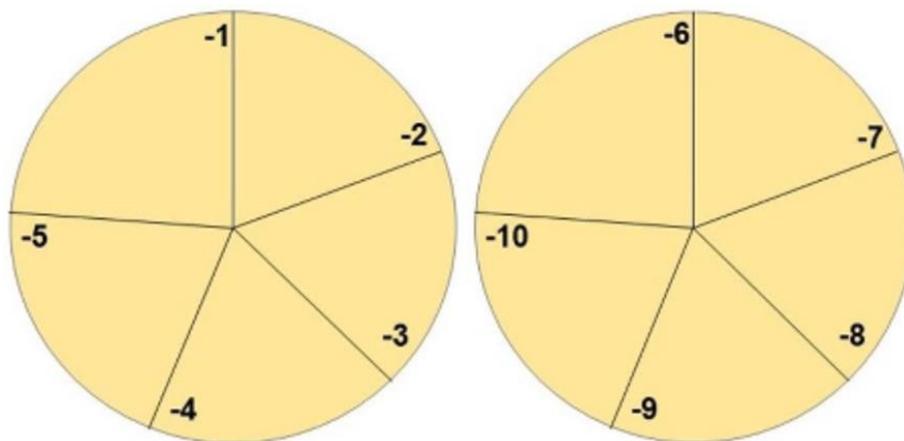
As suspensões de fagos ( $10^{10}$  UFP/mL) foram adicionadas com uma mistura esterilizada de polietileno glicol (PEG) 8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) (10%, m/m) e NaCl (1 M) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), numa proporção volumétrica de 2:1, respetivamente. As suspensões resultantes foram incubadas durante a noite a 4 °C e depois centrifugadas a 11000 rpm (4 °C, 45 min). O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido e homogeneizado em MgSO<sub>4</sub> 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA).

#### 4.2.2.7 Determinação do título fágico pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada

Da suspensão fágica obtida (seção 4.2.2.5) prepararam-se diluições seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  –  $1 \times 10^{-10}$ ) em tubos Eppendorf®. Retiraram-se 50  $\mu\text{L}$  da suspensão estoque de fagos (seção 4.2.2.5) e transferiram-se para um tubo Eppendorf® contendo 450  $\mu\text{L}$  de tampão fágico. Repetiu-se este procedimento em série até se obter uma diluição de  $1 \times 10^{-10}$ .

Seguidamente, 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram pipetados em gota para placas de Petri com tapete bacteriano, demarcadas anteriormente com divisões para cada diluição, conforme ilustrado na Figura 4, e deixou-se secar, tendo as placas de Petri sido incubadas em estufa a 37 °C durante a noite. Após o período de incubação, as placas de Petri foram inspecionadas visualmente e, naquelas que apresentavam placas fágicas (UFP, unidades formadoras de placas), procedeu-se à contagem das mesmas, considerando apenas números de UFP entre 20 e 200.

**Figura 4.** Esquema de marcação nas placas de Petri para aplicação das diluições da suspensão concentrada de fagos.



**Legenda:** -1 =  $[1 \times 10^{-1}]$ ; -2 =  $[1 \times 10^{-2}]$ ; -3 =  $[1 \times 10^{-3}]$ ; -4 =  $[1 \times 10^{-4}]$ ; -5 =  $[1 \times 10^{-5}]$ ; -6 =  $[1 \times 10^{-6}]$ ; -7 =  $[1 \times 10^{-7}]$ ; -8 =  $[1 \times 10^{-8}]$ ; -9 =  $[1 \times 10^{-9}]$ ; -10 =  $[1 \times 10^{-10}]$ .

**Fonte:** Elaboração própria.

O título fágico da suspensão estoque concentrada de fagos foi calculado utilizando a Equação (1), onde UFP representa o número de unidades formadoras de placas e V é o volume de inóculo da suspensão concentrada de fagos (mL).

$$\text{Título fágico (UFP/mL)} = n^{\circ} \text{ de placas fágicas} \times \left( \frac{1}{\text{diluição}} \right) \times \left( \frac{1}{V_{\text{inóculo de fago (mL)}}} \right) \quad (1)$$

#### 4.2.2.8 Nomenclatura desenvolvida para os bacteriófagos isolados

De acordo com a nomenclatura desenvolvida no PhageLab para atribuição de nomes às partículas fágicas isoladas, os fagos isolados passam a tomar a designação PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 a partir deste ponto.

Na nomenclatura desenvolvida para os novos fagos isolados, seguiram-se as regras definidas no laboratório PhageLab:

- PhL - PhageLab;
- SE-CFR - *Salmonella enterica* proveniente da CEFAR
- ph - fago;
- 00ij representa a combinação tamanho de placa fágica x fonte ambiental de isolamento, onde i=1 é o maior tamanho da placa fágica, i=2 é o tamanho médio da placa fágica, i=3 é o tamanho intermediário da placa fágica e i=4 é o menor tamanho da placa fágica; j=6 representa a fonte água de esgoto de indústria de alimentos.

#### 4.2.3 Caracterização físico-química das partículas bacteriofágicas isoladas

##### 4.2.3.1 Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis

Foi realizada uma varredura espectral UV-Vis das suspensões concentradas de fagos (200  $\mu$ L de suspensão concentrada de fago diluída com 2800  $\mu$ L de tampão fágico SM) com o objetivo de determinar o comprimento de onda que produz a máxima absorvância das partículas fágicas. Com o intuito de determinar o coeficiente de extinção molar dos fagos isolados, seguiu-se o procedimento descrito por Silva *et al.*, (2021) e Rios *et al.* (2018).

Partindo do título fágico calculado com base nos procedimentos microbiológicos descritos anteriormente na seção 4.2.2.6, foram preparadas cinco diluições da suspensão fágica em tampão SM (até um volume total de 2000  $\mu$ L) usando diferentes volumes de suspensão concentrada de fago. A absorvância das várias diluições resultantes foi determinada a 255 nm (comprimento de onda que produziu a máxima absorvância das partículas fágicas) e a 320 nm (comprimento de

onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos fagos), usando cubetas de quartzo.

#### **4.2.3.2 Análise do perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais dos fagos isolados PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 foi investigada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), usando um sistema Mini- PROTEAN® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-Rad (Califórnia CA, EUA), integrado com uma unidade de fornecimento de energia PowerPac™ HC (Bio-Rad, Califórnia CA, EUA) e um bloco de aquecimento digital também da Bio-Rad.

Para determinar o perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas e a sua distribuição de pesos moleculares, 500 µL da suspensão concentrada (purificada) de fago contendo títulos fágicos superiores a  $1 \times 10^{10}$  UFP foram adicionados a um volume (500 µL) de tampão de disrupção (1.51% (m/v) Tris-Base, 0,5% (v/v) β-mercaptoetanol, 4% (m/v) dodecilsulfato de sódio, 10% (v/v) glicerol, e 0,012% (m/v) azul de bromofenol) num tubo Eppendorf® (com a sua tampa previamente perfurada por uma agulha aquecida) e aquecido a 100 °C durante 10 min.

Em seguida, realizou-se a análise eletroforética do sobrenadante da amostra (20 µL) e de marcadores de peso molecular (5 µL de *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-Rad, com padrões de proteínas com pesos moleculares entre 10 kDa e 250 kDa), com os géis (gel de concentração com 5% acrilamida-bisacrilamida / gel de separação com 12% acrilamida-bisacrilamida) corridos a uma voltagem de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 60 min, após o que os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e fotografados em alta resolução para análise posterior.

#### **4.2.3.3 Análise das características morfológicas dos fagos isolados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A preparação das grades de carbono para as análises de MET foi realizada utilizando amostras concentradas das suspensões de fagos para uma melhor observação das estruturas. Para a coloração negativa as amostras foram preparadas em grades de cobre de 3 nm de diâmetro (*Ultrathin Formvar/Carbon on a 200 mesh copper grid*, Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, EUA).

As grades de cobre (naturalmente hidrofóbicas) foram aplicadas com 10 µL das amostras por 20 min. Após secagem, as grades foram lavadas três vezes com 10 µL de água ultrapura e deixadas suspensas em solução de acetato de uranila a 1% (m/m) durante 10 min. Posteriormente, o excesso de solução foi removido das grades com a ajuda de papel de filtro convencional, e deixou-se secar durante 5 min.

As amostras foram então analisadas por microscopia eletrônica de transmissão num microscópio eletrônico de transmissão (MET) da marca JEOL (modelo JEM-1011, Tokyo, Japão), operando a 60 kV. Imagens digitais das partículas fágicas foram obtidas com uma câmera digital da marca Gatan Microscopy Suite (modelo Digital Inc., Houston TX, EUA) com uma resolução de 11 MegaPixels e uma gama dinâmica de 14 bits (tamanho de pixel de 9 µm). As análises de MET foram realizadas no Laboratório de Microscopia da Universidade de São Paulo, campus ESALQ-Piracicaba, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia.

#### **4.2.4 Caracterização biológica das partículas bacteriofágicas isoladas**

Para avaliação do potencial infeccioso das partículas fágicas isoladas, foram realizados ensaios de caracterização biológica tais como avaliação da sua gama de hospedeiros, determinação da eficiência de plaqueamento (EOP) em cepas susceptíveis, determinação dos parâmetros de crescimento (período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão) através da obtenção das curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), determinação da taxa de adsorção das partículas fágicas isoladas nas células bacterianas hospedeiras através da obtenção das suas curvas de adsorção, e ensaios de inativação bacteriana in vitro a dois valores de multiplicidade de infecção (MOI).

#### 4.2.4.1 Determinação da gama de hospedeiros dos fagos isolados: ensaios de *spot test* e eficiência de plaqueamento (EOP)

Para determinação da gama de hospedeiros dos fagos PhL\_UNISO\_SE\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE\_ph0046 foram utilizadas outras estirpes de diferentes coleções bacterianas. Foram preparados tapetes bacterianos de cada estirpe através da técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Para este fim, 100 µL de cada suspensão bacteriana individual em fase de crescimento exponencial ( $OD_{600nm} \approx 0.5$ ) foram adicionados a 5 mL de meio MTA-TSB (mantido a 47 °C).

As suspensões resultantes foram vertidas em placas de Petri contendo meio TSA sólido e, após solidificação da camada de top-ágar, pipetaram-se 10 µL em gota de cada diluição decimal previamente preparada dos fagos isolados para cada placa de Petri inoculada com as cepas de coleção e também para uma placa de Petri inoculada com a bactéria hospedeira natural *Salmonella enterica*.

As placas de Petri foram incubadas de um dia para o outro a 37 °C e, após o período de incubação, cada placa foi observada quanto à presença de quaisquer zonas claras de lise bacteriana. Para além da cepa hospedeira, *Salmonella enterica* CCCD-S004, as outras cepas que foram utilizadas para a determinação da gama de hospedeiros foram: *Escherichia coli* CCD-E003, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, *Proteus mirabilis* CCCD-P001, *Enterococcus faecalis* CCCD-E002, *Bacillus subtilis* CCCD-B010, *Staphylococcus epidermidis* CCCD-S010, *Staphylococcus aureus* CCCD-S009, *Klebsiella pneumoniae* CCCDK001 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. As bactérias testadas foram diferenciadas de acordo com a translucidez da zona no local de aplicação da gota de suspensão fágica como (+) (zona de lise translúcida) ou (-) (zona sem lise).

A eficiência do plaqueamento (EOP) foi determinada para aquelas cepas bacterianas onde existiu ocorrência de zona clara de lise no local de aplicação do inóculo de fago, através da técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Para cada hospedeiro bacteriano, a EOP foi calculada (PINHEIRO *et al.*, 2019) por comparação com a eficiência para *S. enterica* (hospedeiro de isolamento, EOP=100%), através da utilização da Equação (2).

$$EOP = \frac{\text{Média de UFP na bactéria alvo}}{\text{Média de UFP na bactéria hospedeira}} \times 100 \quad (2)$$

O valor da EOP obtido com a cepa hospedeira foi considerado como EOP = 100%. Os valores apresentados para a EOP são a média de três ensaios independentes.

#### 4.2.4.2 Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

Para obtenção da curva OSGC foi preparado um inóculo de *S. enterica* em 25 mL de meio TSB num Erlenmeyer de 100 mL e incubado durante 7 h para atingir a fase exponencial de crescimento da bactéria ( $OD_{600nm} = 0.5$ ).

Em seguida, 10 mL da suspensão bacteriana foram centrifugados a 2500 rpm durante 20 min num tubo Falcon de 15mL esterilizado. O sobrenadante foi então descartado e o pellet resultante resuspendido em 5 mL de meio TSB fresco esterilizado. A partir da suspensão concentrada de fagos com título fágico conhecido, foram preparadas diluições a fim de obter uma concentração de  $8 \times 10^5$  UFP/mL em 5mL de tampão SM. Foi considerada uma  $MOI \leq 0.001$  (número de partículas fágicas / número de células bacterianas).

A solução fágica preparada foi adicionada ao tubo Falcon de 15 mL contendo a suspensão bacteriana, e este incubado a 37 °C durante 5 min. Posteriormente, o tubo Falcon foi centrifugado novamente a 2500 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e 10 mL de meio TSB fresco foram adicionados ao pellet.

A partir desse momento ( $t = 0$ ), foi retirado um volume de 50  $\mu$ L e realizadas diluições em série com 450  $\mu$ L de tampão SM até à quinta diluição. Posteriormente, a suspensão foi incubada a 37 °C e, a cada 5 min durante 30 min, foi retirada uma alíquota de 50  $\mu$ L e efetuadas diluições até à quinta diluição.

Este procedimento foi espaçado após os primeiros 30 min, repetindo os passos anteriores a cada 10 min durante 150 min. De cada diluição foram inoculadas três gotas de 5  $\mu$ L em placa de Petri, usando o esquema ilustrado na Figura 4, contendo um tapete bacteriano preparado com 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana em 5 mL de TSA-TSB sobre meio TSA sólido. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante a noite para a contagem posterior das placas fágicas de lise.

Os resultados obtidos foram então analisados para determinar o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão (*burst size*) de cada fago na sua bactéria hospedeira. Os dados da curva de

um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) produzida foram melhor descritos por ajuste não-linear dos dados a uma curva sigmoideal típica (ou modelo de regressão logística de 4-parâmetros, 4-PL) (Equação (3))

$$\text{Log (UFP/mL)} = m_2 + \frac{m_1 - m_2}{1 + \left(\frac{t}{A}\right)^B} \quad (3)$$

onde  $m_1$  é a resposta a  $t = 0$ ,  $m_2$  é a resposta a  $t = \infty$ ,  $A$  é o ponto de inflexão da curva,  $B$  é o declive de Hill da curva (declive que define a inclinação da curva), e  $t$  é o tempo (min). O ajuste não-linear dos dados de crescimento dos bacteriófagos ao modelo na Equação (3) foi realizado utilizando o software Microsoft Excel.

#### 4.2.4.3 Curva de adsorção

Foi preparada uma suspensão bacteriana de *Salmonella enterica* em 25 mL de meio TSB e incubada a 37 °C até ao crescimento exponencial de 7 h ( $OD_{600nm} = 0,5$ ), para as células serem infectadas e se obter uma MOI de 0.001, garantindo que cada célula bacteriana fosse infectada por uma partícula de fago.

Assim, foi preparada uma solução de fago de  $8 \times 10^5$  UFP/mL e adicionada a 2 mL da suspensão bacteriana num tubo Falcon de 15mL. A suspensão resultante foi homogeneizada suavemente com uma micropipeta. Após 30 s, foi recolhida uma alíquota de 50  $\mu$ L da amostra ( $t = 0$ ) e foram realizadas diluições em série até  $10^{-5}$ . Depois, a mistura foi incubada e, a intervalos de 5 min até se completarem 30 min, e depois a intervalos de 10 min até se completarem 150 min, recolheram-se alíquotas de 50  $\mu$ L que foram imediatamente misturadas com 425  $\mu$ L de meio TSB complementado com 25  $\mu$ L de clorofórmio para inativar as células bacterianas das diluições  $10^{-1}$ . Nas diluições seguintes, de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ , o clorofórmio não foi adicionado.

Foram adicionadas três gotas de 5  $\mu$ L de cada diluição em placas de Petri que já continham tapete bacteriano preparado com 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana em 5mL de MTA-TSB usando o esquema de aplicação indicado na Figura 4. As placas de Petri foram incubadas invertidas a 37 °C durante a noite, para a contagem posterior das placas fágicas.

A adsorção de virions às células hospedeiras foi expressa como a diminuição (%) do título de fagos no sobrenadante em relação a  $t = 0$ . A taxa de adsorção do fago

ao hospedeiro foi estimada por ajuste não-linear do modelo na Equação (4) (SANTOS *et al.*, 2014; SHAO; WANG, 2008) ao conjunto de dados experimentais.

$$\text{Ln} \left( \frac{P_t}{P_0} \right) = -\delta \left( \frac{X_0}{\mu(t)} \right) (e^{\mu(t) \cdot t} - 1) \quad (4)$$

onde  $P_t$  e  $P_0$  são as concentrações de fago nos tempos  $t$  e  $0$ , respectivamente,  $\delta$  representa a taxa de adsorção a ser estimada,  $X_0$  representa a concentração de células bacterianas susceptíveis (não-infectadas) no tempo  $0$ ,  $\mu(t)$  representa a taxa de multiplicação da bactéria e  $t$  representa o tempo de infecção. O ajuste não-linear dos dados de adsorção do bacteriófago ao modelo na Equação (4) foi realizado utilizando o software Microsoft Excel.

#### 4.2.4.4 Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de inativação bacteriana)

Foram utilizados valores de MOI 1 e 1000. Para obter uma MOI de 1, foram incubados uma cultura bacteriana em fase exponencial (concentração final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL) e suspensão de fago (concentração final de  $1 \times 10^5$  UFP/mL) em 10 mL de meio TSB e incubados a 37 °C sem agitação, esse tratamento foi designado como BF1 (bactéria mais fago em MOI 1).

Para a MOI 1000, uma cultura em fase exponencial da bactéria (concentração final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL) e suspensão de fago (concentração final de  $1 \times 10^8$  UFP/mL) foram inoculadas em tubo de ensaio esterilizado contendo 10 mL de meio TSB e incubado a 37 °C sem agitação (BF1000).

Para cada ensaio, foram preparadas também duas amostras de controle: um controle de bactéria (CB) e um controle de fago (CF). Os controles de bactéria foram inoculados apenas com *Salmonella enterica* e os controles de fago foram inoculados apenas com fago. Os controles (CB e CF) e os tratamentos (BF1) e (BF1000) foram incubados exatamente nas mesmas condições.

Foram retiradas alíquotas de 50 µL dos tratamentos e controles nos tempos 0 (imediatamente após o início do ensaio) e após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h de incubação, diluídas em série em 450 µL de tampão PBS em tubos Eppendorf®, até oito diluições decimais consecutivas.

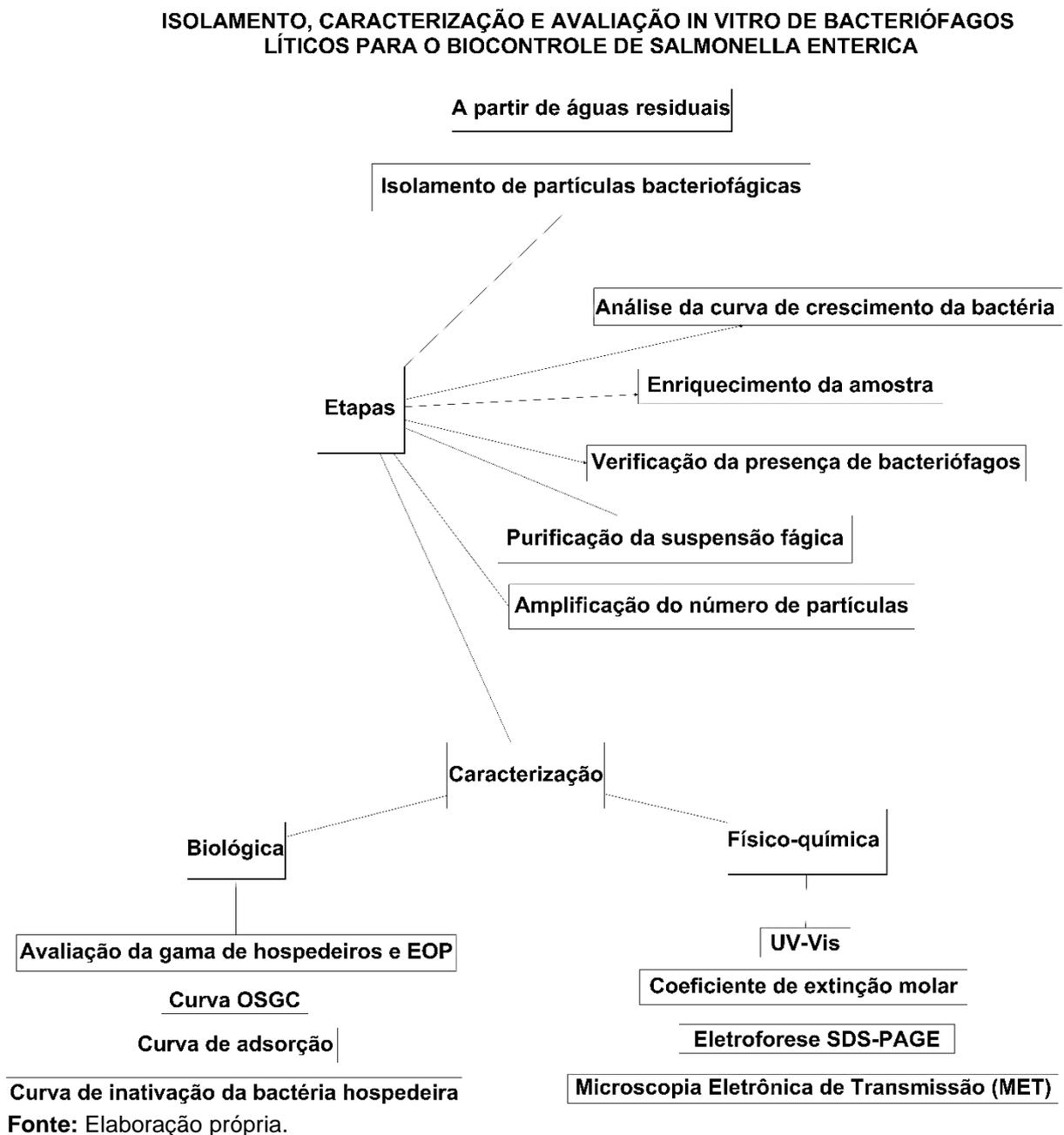
Em todos os ensaios, a atividade fágica foi determinada em triplicata pelo método de plaqueamento de gota (10 µL) em ágar de dupla camada contendo tapete bacteriano de *Salmonella enterica* (cultura em fase exponencial,  $OD_{600nm} \approx 0.5$ ).

A concentração de bactéria foi determinada em triplicata em meio sólido TSA pelo método de plaqueamento por gota (10 µL) após um período de incubação de 12 h a 37 °C. Foram realizados três ensaios independentes para cada tratamento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo a produção de um coquetel fágico com potencial de aplicação na indústria alimentícia, a partir do seu isolamento e caracterização físicoquímica e biológica. Neste sentido, avaliou-se em diversas etapas as características físico-químicas e biológicas das partículas fágicas isoladas, como esquematizado na Figura 5.

Figura 5. Diagrama de seqüências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa realizado.

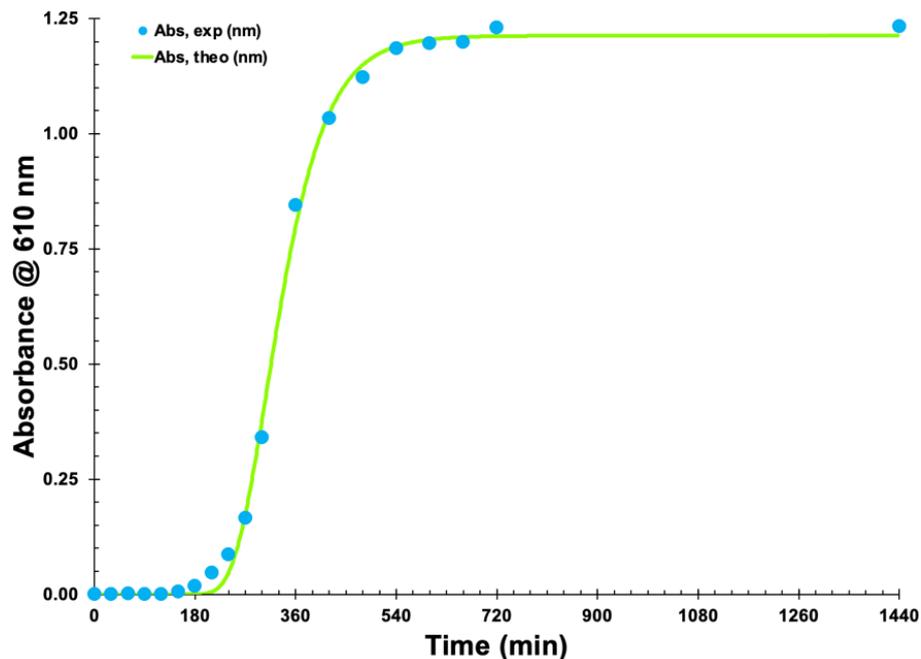


### 5.1 Curva de crescimento da bactéria *Salmonella enterica*

A curva de crescimento da bactéria *S. enterica* permitiu estabelecer os períodos de crescimento da bactéria. A fase exponencial de crescimento da bactéria é o período que favorece a propagação das partículas fágicas por infecção das células bacterianas hospedeiras, uma vez que as mesmas estão se multiplicando, logo ocorrendo, naturalmente, a replicação e amplificação das partículas fágicas.

A Figura 6 apresenta os resultados da curva de crescimento da bactéria *S. enterica*, podendo observar-se que, após 3 h de crescimento a bactéria passou pelo período de latência e a concentração de biomassa aumentou exponencialmente. Após 7 h de crescimento é possível observar uma forte ascendência da curva indicando então a fase exponencial do crescimento.

**Figura 6.** Curva de crescimento da bactéria *Salmonella enterica*.



**Fonte:** Elaboração própria.

O ajuste não-linear do modelo sigmoide 4-PL (Equação (3)) aos dados experimentais permitiu estimar como  $Abs_{m\acute{a}x, 610nm}$  a  $t = \infty$  o valor de 1,213, e um período de adaptação (lag) de 195,4 min.

Após 12h de crescimento, a bactéria entrou na fase estacionária de crescimento. Estes resultados foram muito importantes para os trabalhos de pesquisa,

uma vez que é necessário conhecer o comportamento da bactéria e, especialmente, o período de tempo que demora a atingir a fase exponencial, pois é nessa fase do crescimento bacteriano que o fago melhor infecta e se propaga na célula bacteriana hospedeira.

## **5.2 Isolamento, amplificação e determinação do título fágico de suspensões de partículas bacteriofágicas estritamente líticas para *Salmonella enterica***

O isolamento de partículas fágicas é, frequentemente, apresentado como a etapa inicial na terapia fágica, onde se misturam uma amostra (neste caso, água do esgoto de uma indústria de alimentos) com uma cultura de células bacterianas hospedeiras, seguido da remoção de detritos bacterianos através de centrifugação e filtração (HYMAN, 2019).

A etapa de enriquecimento possui a finalidade de aumentar o número de partículas fágicas na amostra, uma vez que para o estudo é necessária uma concentração elevada destas partículas.

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos no *spot test* após enriquecimento da amostra de efluente da indústria de alimentos, onde é possível observar zonas claras de lise.

O método utilizado aumentou a probabilidade de detectar e isolar fagos presentes na amostra. As zonas de lise fágica mostraram que a amostra de água de efluente da indústria de alimentos testada foi positiva para partículas fágicas líticas para o hospedeiro do grupo *S. enterica* escolhido, comprovando assim que as águas residuais ou de esgoto são fontes interessantes para terapia fágica (HARADA *et al.*, 2018).

**Figura 7.** Resultado obtido no ensaio de *spot test* da amostra ambiental enriquecida, para verificação da presença de fagos.



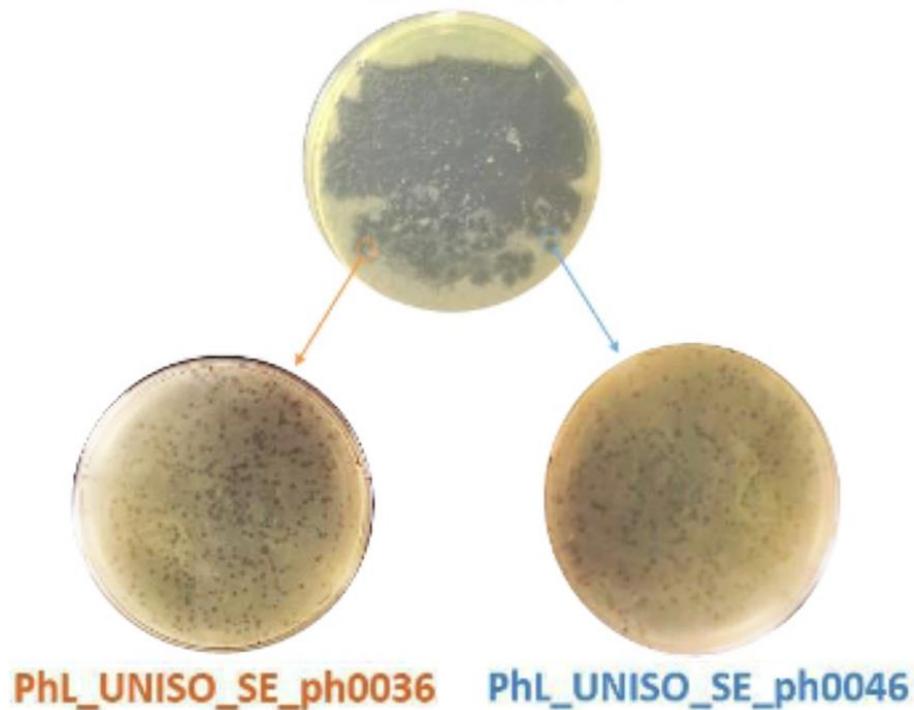
**Fonte:** Elaboração própria.

Considerando a confirmação da presença de partículas fágicas líticas para *S. enterica* na amostra de efluente industrial testada (Figura 7), seguiu-se para o isolamento de partículas fágicas presentes na amostra.

Através das características morfológicas das placas fágicas observadas no isolado, tais como tamanho, presença de halo secundário, coloração límpida e translúcida ou turva, foi possível o isolamento de tipos diferentes de partículas fágicas.

Um método de caracterização inicial é a observação de características morfológicas das placas fágicas (STRANGE *et al.*, 2021). Na Figura 8 pode observar-se a presença de placas fágicas com características morfológicas diferentes, indicando assim a presença de diferentes tipos de partículas líticas para a bactéria *S. entérica*. Os fagos foram nomeados como PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046.

**Figura 8.** Isolamento e seleção de fagos de acordo com a morfologia das placas fágicas.



**Fonte:** Elaboração própria.

Após o isolamento das partículas fágicas foi iniciada a etapa de amplificação e purificação. Sendo os fagos parasitas intracelulares obrigatórios, a amplificação das partículas fágicas ocorre no interior das células hospedeiras específicas. Portanto, existe a produção não só de partículas fágicas como também de debris celulares resultantes da lise das células bacterianas hospedeiras, metabólitos secundários bacterianos e compostos não desejáveis durante o processo lítico de amplificação dos fagos, por isso a etapa de purificação das partículas fágicas é de extrema importância (LIU *et al.*, 2017).

A recuperação das partículas fágicas pode ser realizada através da indução de lise de eventuais células hospedeiras não-infectadas, recorrendo-se ao uso de solventes orgânicos como o clorofórmio para onde os debris celulares e outros contaminantes particionam.

O processo de purificação dos fagos isolados neste trabalho de pesquisa consistiu numa filtração esterilizante do sobrenadante após adição de clorofórmio ao tampão SM utilizado para extração das partículas fágicas na fase final do processo de

amplificação, utilizando um sistema filtrante SteriCup™ com membrana poliétersulfônica de 0,20 µm de tamanho de poro. Este é um processo considerado de simples realização, contudo, não impede que endotoxinas bacterianas possam permanecer presentes na suspensão microfiltrada.

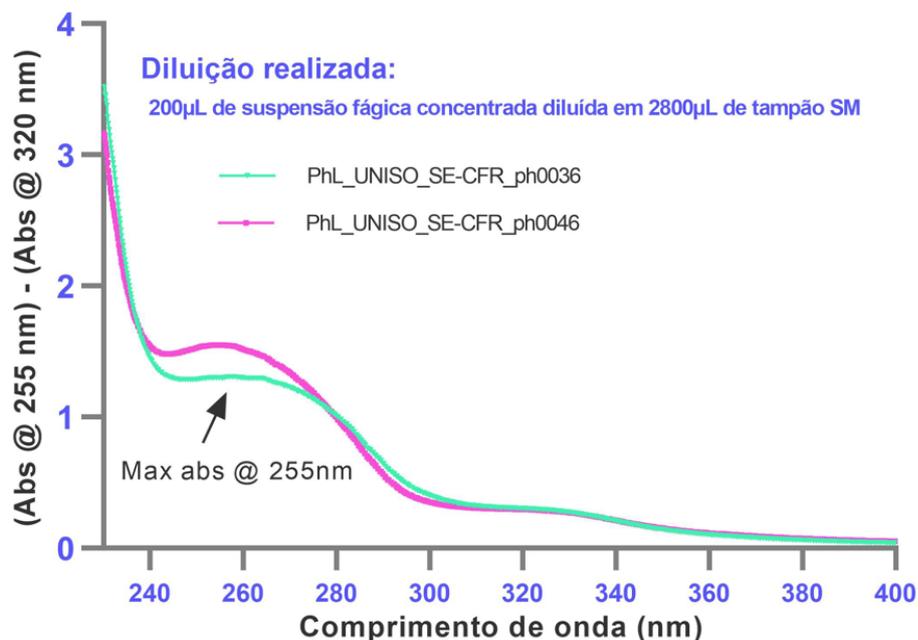
### 5.3 Caracterização físico-química das partículas fágicas isoladas

A caracterização físico-química das partículas fágicas isoladas foi realizada através de varreduras espectrais na zona UV-Vis com o objetivo de determinar o seu coeficiente de extinção molar, análises do perfil de proteínas estruturais e sua distribuição de tamanhos moleculares por eletroforese SDS-PAGE, e análise por microscopia eletrônica de transmissão com o objetivo de observar as características morfológicas estruturais das partículas fágicas.

#### 5.3.1 Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis

Os resultados obtidos a partir das varreduras espectrais na região UV-Vis realizadas às suspensões concentradas de fagos, estão exibidos na Figura 9. Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotômetro UV-Vis da marca Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

**Figura 9.** Varredura espectral na região UV-Vis das suspensões concentradas de partículas fágicas.



Fonte: Elaboração própria.

Por inspeção dos resultados exibidos na Figura 9, é possível observar um máximo de absorção em torno de 255 nm e um mínimo de absorção em torno de 245 nm. Quando este mínimo está ausente do espectro, muito provavelmente estão presentes contaminantes na suspensão provenientes das células bacterianas lisadas (debris celulares e proteínas citoplasmáticas liberadas por lise celular bacteriana), o que normalmente ocorre quando estas contêm poucos viriões. Ainda que não muito pronunciado, este não foi o caso.

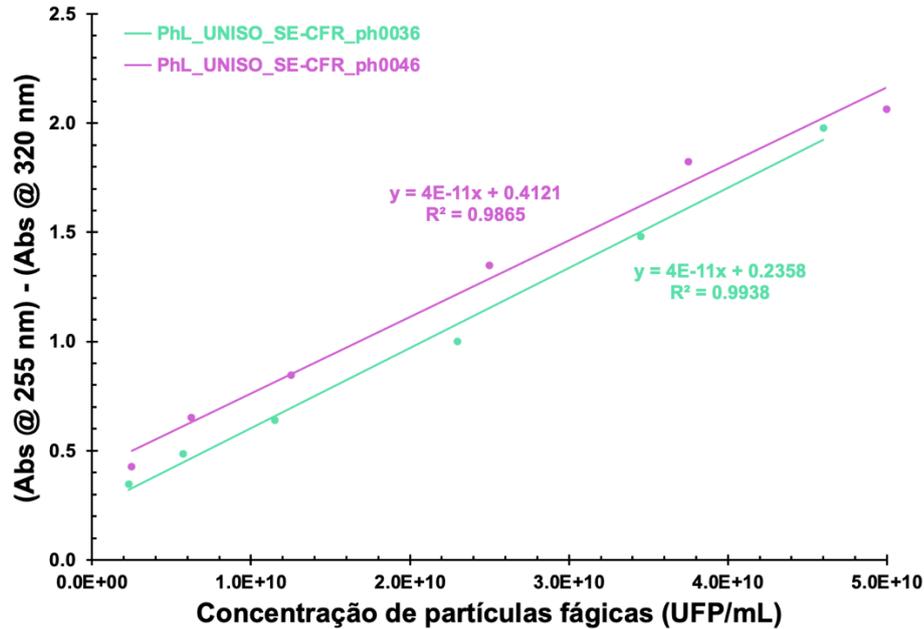
Foi obtida uma concentração média de partículas fágicas nas suspensões concentradas de fagos de  $1.9 \times 10^{10}$  virions/mL e  $6.6 \times 10^{11}$  virions/mL para os fagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046, respectivamente. Os dados utilizados para preparar a curva de calibração relacionando a concentração de partículas fágicas com a sua absorvância corrigida, tiveram como objetivo determinar os coeficientes de extinção molar das partículas inteiras dos fagos isolados. Pode observar-se na Tabela 1 os valores utilizados para a determinação dos coeficientes de extinção molar dos fagos isolados, enquanto que a curva de calibração produzida está exibida na Figura 10.

**Tabela 1.** Dados utilizados para preparar relações lineares com o objetivo de determinar os coeficientes de extinção molar das partículas (inteiras) dos fagos ph0036 e ph0046.

Suspensão fágica concentrada (SFC, $\mu\text{L}$ )	Volume fina da diluição ( $\mu\text{L}$ )	Fago	Nº de UFP's na SFC	Concentração de partículas fágicas (UFP/mL)	Abs <sub>255 nm</sub>	Abs <sub>320 nm</sub>	Abs <sub>255nm</sub> - Abs <sub>320nm</sub>
10	2000	ph0036	$4,600 \times 10^{09}$	$2.000 \times 10^{09}$	0.4663	0.1198	0.3465
		ph0046	$5.000 \times 10^{09}$	$2.500 \times 10^{09}$	0.4681	0.0426	0.4255
25	2000	ph0036	$1.150 \times 10^{10}$	$5.750 \times 10^{09}$	0.7125	0.2269	0.4856
		ph0046	$1.250 \times 10^{10}$	$6.200 \times 10^{09}$	0.7158	0.0631	0.6527
50	2000	ph0036	$2.300 \times 10^{10}$	$1.150 \times 10^{10}$	0.9987	0.3585	0.6402
		ph0046	$2.500 \times 10^{10}$	$1.250 \times 10^{10}$	0.9413	0.0958	0.8455
100	2000	ph0036	$4.600 \times 10^{10}$	$2.300 \times 10^{10}$	1.6381	0.6384	0.9997
		ph0046	$5.000 \times 10^{10}$	$2.500 \times 10^{10}$	1.4554	0.1060	1.3494
150	2000	ph0036	$6.900 \times 10^{10}$	$3.450 \times 10^{10}$	2.4960	1.0145	1.4815
		ph0046	$7.500 \times 10^{10}$	$3.750 \times 10^{10}$	2.1517	0.3291	1.8226
200	2000	ph0036	$9.200 \times 10^{10}$	$4.600 \times 10^{10}$	2.4960	1.4827	1.9789
		ph0046	$1.000 \times 10^{11}$	$5.000 \times 10^{10}$	2.6024	0.5396	2.0628

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 10.** Curvas de calibração produzidas para a relação entre a concentração de partículas fágicas inteiras em suspensão e a absorção da suspensão a 255 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas ao comprimento de onda de 320 nm, para os fagos isolados PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046, permitindo determinar os seus coeficientes de extinção molar.



Fonte: Elaboração própria.

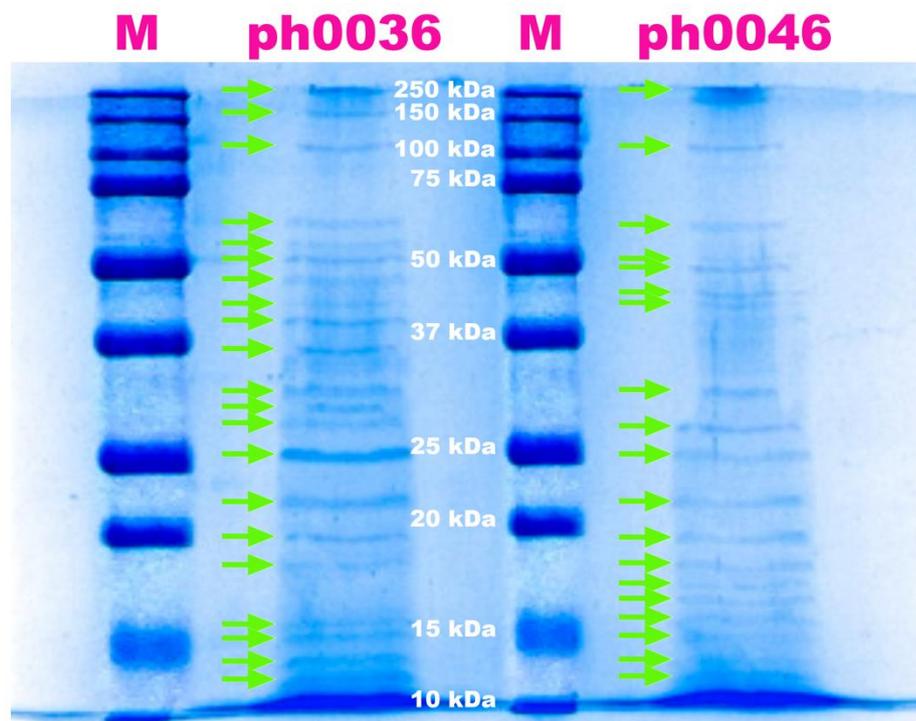
A subtração da absorbância a 320nm, um comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos bacteriófagos, teve como objetivo corrigir grosseiramente o espalhamento de luz causado pelas partículas de fago e contaminantes particulados não-bacteriofágicos (RIOS *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2019).

### 5.3.2 Análise do perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

O tratamento térmico das suspensões de fagos em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol afeta as ligações dissulfeto da estrutura secundária e terciária das proteínas estruturais dos bacteriófagos, como pode ser observado na Figura 11, que exhibe os resultados da análise eletroforética por SDS-PAGE dos sobrenadantes obtidos após aquecimento a 100 °C de 500  $\mu$ L das suspensões concentradas dos fagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046.

O electroforetograma corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 permitiu produzir uma curva de calibração para as proteínas na lane de marcadores de peso molecular (lane M), resultando na equação linear  $\text{Log}_{10}(\text{MW, kDa}) = -1.2894 \times R_f + 2.2884$  ( $r^2 = 0.9280$ ). As suspensões bacteriofágicas concentradas e purificadas exibiram uma variedade de bandas de proteínas (setas inseridas na Figura 11) com ampla gama de pesos moleculares.

**Figura 11.** Electroforetograma corado com Coomassie dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 (lane ph0036) e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph00346 (lane ph0046), e dos marcadores de peso molecular (lanes M).



**Fonte:** Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 11, a análise eletroforética das proteínas estruturais das partículas fágicas isoladas PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 revelou uma gama extensa de bandas proteicas. Através dos cálculos de mobilidade relativa das respectivas bandas e por aplicação da curva de calibração resultante da distribuição de pesos moleculares das bandas das proteínas dos marcadores de peso molecular (lane M), obtiveram-se os pesos moleculares para as proteínas estruturais dos dois bacteriófagos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais dos bacteriófagos isolados PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046.

Fago PhL_UNISO_SE-CFR_ph0036		Fago PhL_UNISO_SE-CFR_ph0046	
Rf (Fator de migração Relativa)	MW (kDa)	Rf	MW (kDa)
0,07	157,81	0,07	157,81
0,08	153,20	0,08	153,20
0,21	104,14	0,15	124,45
0,30	79,72	0,20	107,28
0,38	62,87	0,27	87,15
0,40	59,24	0,34	70,80
0,43	54,20	0,37	64,76
0,45	51,07	0,42	55,83
0,52	41,49	0,46	49,58
0,62	30,83	0,52	41,49
0,70	24,31	0,57	35,76
0,75	20,96	0,67	26,58
0,80	18,07	0,92	12,65
0,83	16,53	0,97	10,91
0,87	14,68	0,98	10,59

**Fonte:** Elaboração própria.

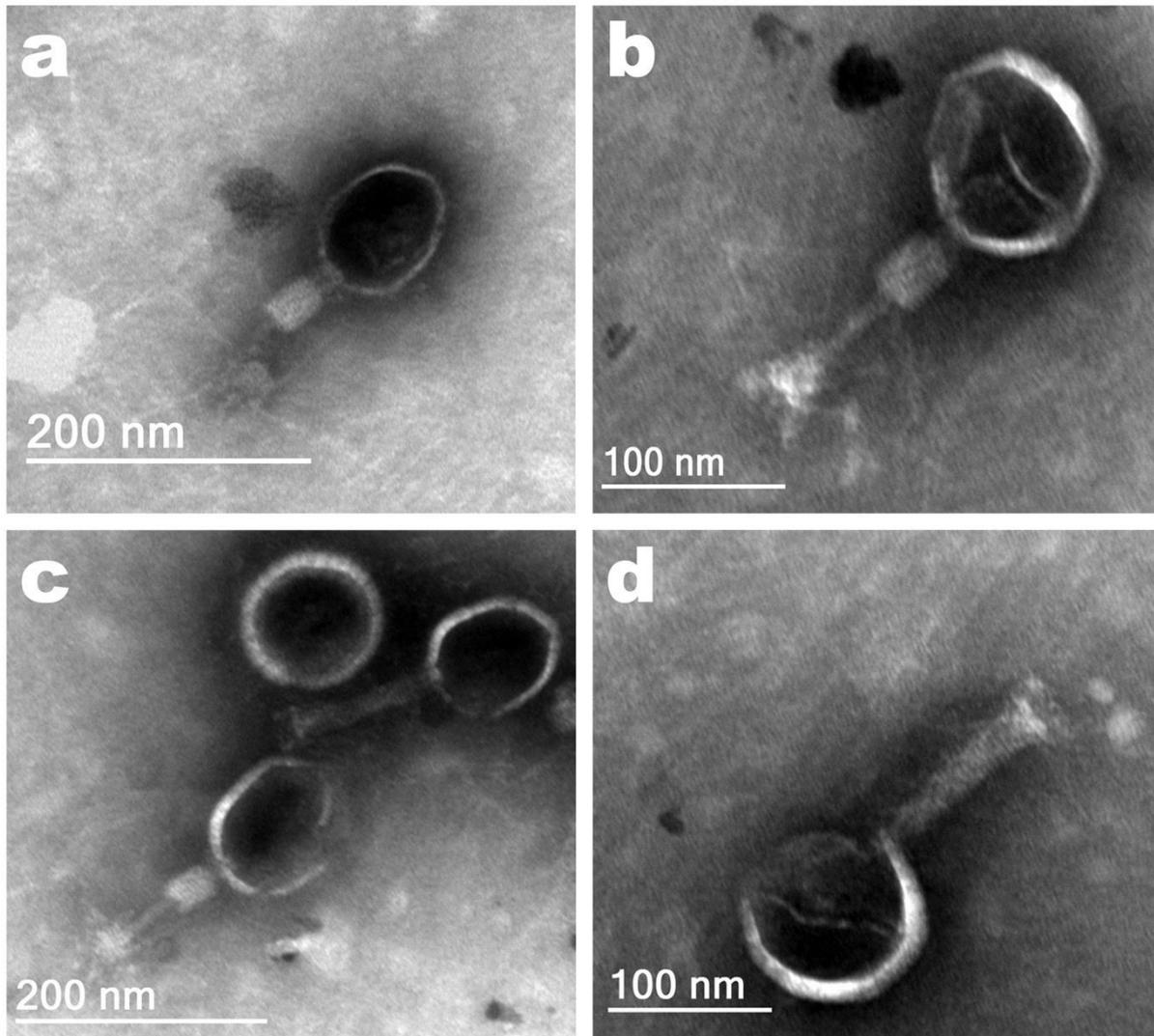
Os resultados obtidos permitem claramente concluir que as partículas fágicas isoladas são diferentes, uma conclusão também suportada pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão realizadas nas mesmas partículas fágicas.

### **5.3.3 Análise das características morfológicas dos fagos isolados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A preparação das grades de carbono foi realizada com suspensões concentradas de bacteriófagos, almejando uma melhor visualização das estruturas fágicas. A coloração das partículas fágicas foi realizada com acetato de uranila a 1% (m/m) o que permitiu uma coloração negativa e possibilitou a observação com um bom contraste das partículas bacteriofágicas. O processo de coloração das partículas envolve uma secagem suave das amostras ao ar após a aplicação do acetato de uranila a 1% (m/m) sobre a grade de carbono contendo a amostra. Ainda que muito suave, essa secagem é suficiente para promover uma ligeira deformação das partículas fágicas, e isto pode de fato ser claramente observado nas fotomicrografias

da Figura 12. Não obstante este fato, as análises de MET após a coloração negativa das amostras permitiu a observação das partículas fágicas com um bom contraste (Figura 12).

**Figura 12.** Fotomicrografias de coloração negativa obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das suspensões concentradas dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 (**a, c**) e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 (**b, d**), a diferentes ampliações.



**Fonte:** Elaboração própria.

Uma inspeção cuidadosa das fotomicrografias exibidas na Figura 12 permite concluir que ambas as partículas fágicas isoladas têm cauda e, portanto, pertencem à ordem Caudovirales e muito provavelmente à família *Myoviridae* de bacteriófagos com dsDNA. É possível observar nas Figuras 12a e 12b a bainha contraída na estrutura dos dois fagos, permitindo observar o tubo central através do qual o genoma

fágico é injetado nas células bacterianas hospedeiras após o processo de adsorção do fago a receptores específicos à superfície do hospedeiro. Já nas Figuras 12c e 12d, é possível observar a bainha distendida com todas as suas estrias e a placa basal.

#### **5.4 Caracterização biológica das partículas bacteriofágicas isoladas**

Para avaliar o potencial de infecção das partículas fágicas isoladas, foi estudada a sua gama de hospedeiros, com determinação da eficiência de plaqueamento (EOP) naquelas cepas susceptíveis, obtidas as curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) para determinação dos parâmetros de crescimento dos bacteriófagos, tais como o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão, e foram ainda produzidas as suas curvas de adsorção no hospedeiro bacteriano.

Através das curvas de adsorção ao hospedeiro bacteriano, foi possível avaliar e determinar a taxa de ligação de cada partícula fágica à sua célula bacteriana hospedeira (que é uma combinação de difusão física, interações bioquímicas de superfície e alterações conformacionais nas proteínas receptoras induzidas por reação). Através das curvas de inativação bacteriana a valores de multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e 1000, foi estudada a eficácia dos fagos isolados para inativar o seu hospedeiro, através de ensaios de terapia fágica *in vitro*.

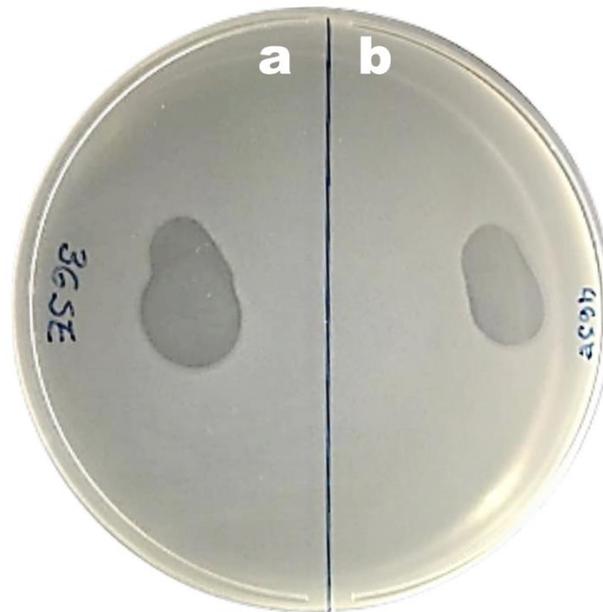
Por aplicação da Equação (1), a concentração média de partículas fágicas nas suspensões produzidas para os fagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 foi de  $4.6 \times 10^{10}$  e  $1.9 \times 10^{11}$  virions/mL, respectivamente.

##### **5.4.1 Determinação da gama de hospedeiros**

Os espectros líticos dos dois bacteriófagos foram analisados por inspeção visual de zonas claras de lise após plaqueamento (*spot test* com gotas de 10  $\mu$ L) em tapetes bacterianos produzidos com cepas bacterianas de coleção. Os resultados dos *spot test* indicaram a especificidade dos bacteriófagos isolados ao não infectarem outras células bacterianas para além das células hospedeiras.

As partículas fágicas PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 foram capazes de produzir zonas de lise claras apenas na sua bactéria hospedeira, *Salmonella enterica*, como pode ser observado na Figura 13.

**Figura 13.** Resultados obtidos no *spot test* dos fagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 (a) e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 (b) na cepa hospedeira de *Salmonella enterica*.



**Fonte:** Elaboração própria.

Nenhuma das partículas fágicas produziu halos secundários. Pode considerar-se, então, que não são produtoras de despolimerases bacteriofágicas. Adicionalmente, não promoveram zonas de lise em nenhuma outra cepa testada para além do seu hospedeiro natural. Os resultados obtidos na avaliação da gama de hospedeiros podem ser encontrados na Figura 13 e na Tabela 3.

#### 5.4.2 Determinação da eficiência de plaqueamento (EOP)

O número relativo de placas fágicas que a suspensão estoque de um bacteriófago é capaz de produzir em uma cepa bacteriana que não seja seu hospedeiro natural é chamado de Eficiência de Plaqueamento (EOP). Este parâmetro permite analisar o potencial das partículas bacteriofágicas de infectarem e lisarem outras bactérias para além das suas células hospedeiras específicas (HYMAN, 2019).

Os resultados obtidos na determinação da eficiência de plaqueamento dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 nas cepas bacterianas para as quais o *spot test* deu resultado positivo podem ser encontrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Gama de hospedeiros dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046, determinada em 9 estirpes bacterianas. Zona de lise clara (+) e zona sem lise (-). A eficiência de plaqueamento (EOP) com a cepa hospedeira foi considerada como (EOP = 100%).

	Cepa bacteriana	Spot test		EOP (%)	
		ph0036	ph0046	ph0036	ph0046
1	<i>Salmonella enterica</i> CCCD-S004	+	+	100.00	100.00
2	<i>Escherichi coli</i> CCCD-E003	-	-	-	-
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCCD-P004	-	-	-	-
4	<i>Proteus mirabilis</i> CCCD-P001	-	-	-	-
5	<i>Enterococcus faecalis</i> CCCD-E002	-	-	-	-
6	<i>Bacillus subtilis</i> CCCD-B010	-	-	-	-
7	<i>Staphylococcus epidermis</i> CCCD-S010	-	-	-	-
8	<i>Staphylococcus aureus</i> CCCD-S009	-	-	-	-
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCCD-K001	-	-	-	-

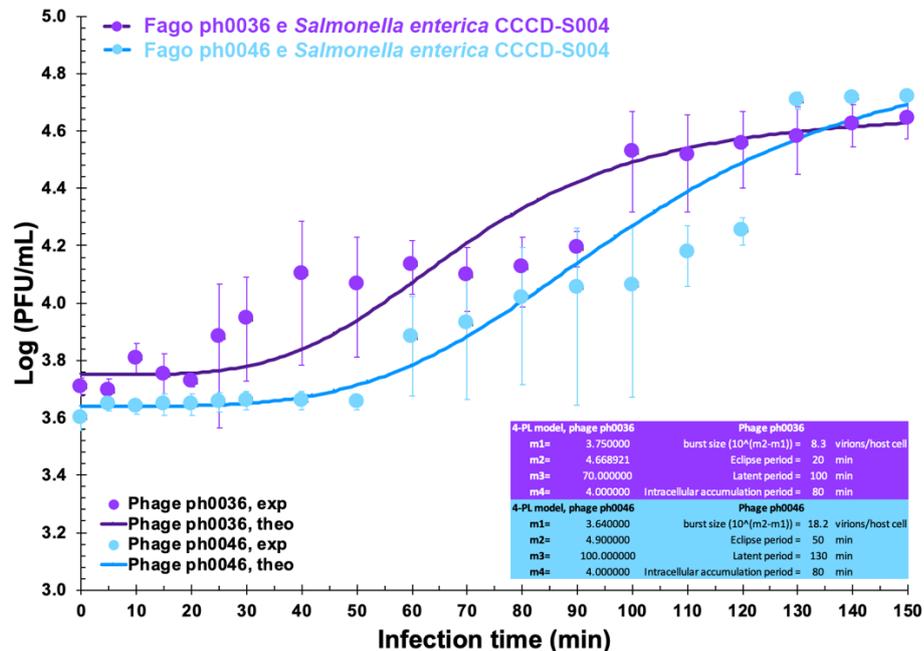
Fonte: Elaboração própria

A gama de hospedeiros é uma propriedade importante para decidir a utilidade de um determinado fago na terapia fágica. Idealmente, uma partícula fágica não infecta outras espécies de bactérias, além do seu hospedeiro natural e específico, até porque isso implicaria na microbiota natural inativando microrganismos não-patogênicos ou até diminuindo a ação efetiva do fago em relação às células bacterianas específicas. No entanto, a susceptibilidade do hospedeiro pode ser considerada uma questão de estarem presentes receptores corretos na superfície das células bacterianas alvo (HYMAN, 2019).

### 5.4.3 Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

As curvas OSGC das partículas fágicas PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 encontram-se representadas na Figura 14. Utilizaram-se células bacterianas hospedeiras de *Salmonella enterica* CCCD-S004 na fase exponencial de crescimento ( $OD_{600nm} \approx 0.5$ , correspondendo a  $\approx 1 \times 10^8$  UFC/mL) e suspensão das partículas fágicas PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 com o título calculado a  $8 \times 10^5$  UFP (produzindo assim uma  $MOI \leq 0,001$ ).

**Figura 14.** Curvas de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 no seu hospedeiro bacteriano (*Salmonella enterica* CCCD-S004).



Fonte: Elaboração própria.

Nas curvas OSGC, o período de eclipse representa o tempo após a injeção do DNA fágico nas células bacterianas hospedeiras, biossíntese e montagem de viriões maduros; o período de latência representa o tempo após a injeção do DNA fágico nas células bacterianas hospedeiras através da libertação de viriões maduros, com lise concomitante da célula bacteriana; o número de viriões recém-formados liberados por célula infectada é o rendimento viral, ou tamanho de explosão. A diferença entre os

períodos de latência e eclipse representa a fase de acumulação intracelular (PEREIRA *et al.*, 2017).

Para o fago ph0036, estimou-se um período de eclipse de 20 min, período de latência de 100 min, período de acumulação intracelular de 80 min e tamanho de explosão de 8.3 UFP/célula hospedeira, enquanto que para o fago ph0046 estimou-se um período de eclipse de 50 min, período de latência de 130 min, período de acumulação intracelular de 80 min e tamanho de explosão de 18,2 UFP/célula hospedeira, demonstrando tratar-se de fagos replicantes com longos períodos de latência e produção baixa de progenia vírica.

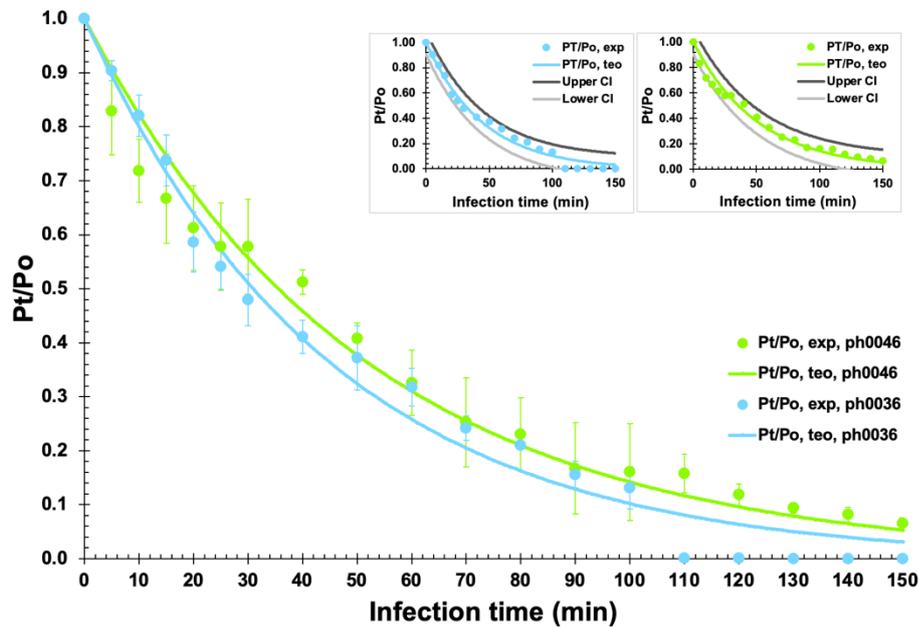
#### **5.4.4 Curva de adsorção**

O primeiro passo para a infecção de uma célula bacteriana susceptível por uma partícula fágica é a ligação/ancoragem do fago à superfície da célula bacteriana hospedeira (HARADA *et al.*, 2018; HAMDÍ *et al.*, 2017; RIOS *et al.*, 2016).

O processo de ligação do fago ao hospedeiro envolve uma combinação de difusão física, interações bioquímicas de superfície e indução de mudanças conformacionais em proteínas receptoras à superfície da célula hospedeira (HARADA *et al.* (2018).

Os resultados obtidos para as curvas de adsorção dos dois bacteriófagos isolados PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 ao seu hospedeiro bacteriano encontram-se exibidos na Figura 15.

**Figura 15.** Curvas de adsorção dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 no seu hospedeiro bacteriano (*Salmonella enterica* CCCD-S004).



Fonte: Elaboração própria

A taxa de adsorção dos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 nas células de *S. enterica* foi estimada por ajuste não-linear dos dados experimentais ao modelo representado na Equação (4), produzindo um valor para a taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas igual a  $\delta = 2.780 \times 10^{-11} \text{ UFP}^{-1} \text{ UFC}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  e uma taxa de multiplicação de bactéria igual a  $\mu(t) = 5.00 \times 10^{-4} \text{ hr}^{-1}$  para o bacteriófago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 ( $X_0 = 8.00 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ ; ( $r_{\text{ajuste não-linear}} = 0.94057$ )), e um valor para a taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas igual a  $\delta = 1.950 \times 10^{-10} \text{ UFP}^{-1} \text{ UFC}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  e uma taxa de multiplicação de bactéria igual a  $\mu(t) = 5.00 \times 10^{-6} \text{ hr}^{-1}$  para o bacteriófago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 ( $X_0 = 1.00 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ ; ( $r_{\text{ajuste não-linear}} = 0.83117$ )).

Entre 30-40 min do ensaio é possível observar que, para ambos os fagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046, cerca de 50% das partículas tinham sido adsorvidas pelo hospedeiro e após 90 minutos de análise observou-se que mais de 80% das partículas fágicas foram adsorvidas.

O tamanho e/ou fisiologia das células bacterianas exercem uma influência importante no processo de adsorção do fago. A curva de adsorção de fago começa quando novos viriões crescem, o que torna difícil calcular a taxa de adsorção de fago

e, além disso, nem todas as bactérias expressam os receptores de fago constitutivamente ou em níveis constantes (WEI *et al.*, 2017).

Quando os virions de fagos recém-formados são liberados de células hospedeiras bacterianas que rebentam, interferem na determinação da fracção não adsorvida das partículas fágicas (HAMDÍ *et al.*, 2017).

Outro fator que afeta as taxas de adsorção dos fagos às células bacterianas é o movimento de entrada ou saída do meio de adsorção onde há muita luz: movimento simples (isto é, falta de mistura ou agitação) ou muito movimento, resulta em taxas de adsorção reduzidas (RIOS *et al.*, 2016).

A premissa para determinar a taxa de adsorção do fago em função da taxa de infecção pelo fago é que a adsorção de cada partícula fágica fornece o valor de um centro infeccioso, uma entidade capaz de dar origem a uma única placa fágica (HYMAN, 2019). A adsorção de fago consiste geralmente em três etapas: contato inicial, ligação reversível, e ligação irreversível (HARADA *et al.*, 2018; STORMS; SAUVAGEAU, 2015).

Já fora observado que o processo de adsorção de um bacteriófago à sua célula bacteriana hospedeira depende fortemente da concentração de  $\text{MgSO}_4$  de uma forma altamente não linear (MOLDOVAN; CHAPMAN-MCQUISTON; WU, 2007). Para concentrações de  $\text{MgSO}_4$  inferiores a  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  não há quase nenhuma adsorção. A adsorção do bacteriófago aumenta até atingir um máximo global com uma concentração de  $\text{MgSO}_4$  de cerca de  $3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ . Para concentrações mais elevadas de  $\text{MgSO}_4$  ( $> 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), a adsorção decresce rapidamente. No trabalho de pesquisa aqui descrito, a concentração de  $\text{MgSO}_4$  foi mantida a  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Os resultados obtidos por Moldovan, Chapman-Mcquiston e Wu (2007) sugerem que a afinidade de ligação de uma partícula de bacteriófago ao receptor na superfície da sua célula hospedeira é a força motriz do processo de infecção, que é mais crítico em habitats naturais onde a taxa de colisão entre bactérias e bacteriófagos é bastante baixa.

Assim, para assegurar uma infecção bem-sucedida da sua célula hospedeira, a capacidade de se ligar fortemente ao receptor torna-se um atributo significativo (MOLDOVAN; CHAPMAN-MCQUISTON; WU, 2007).

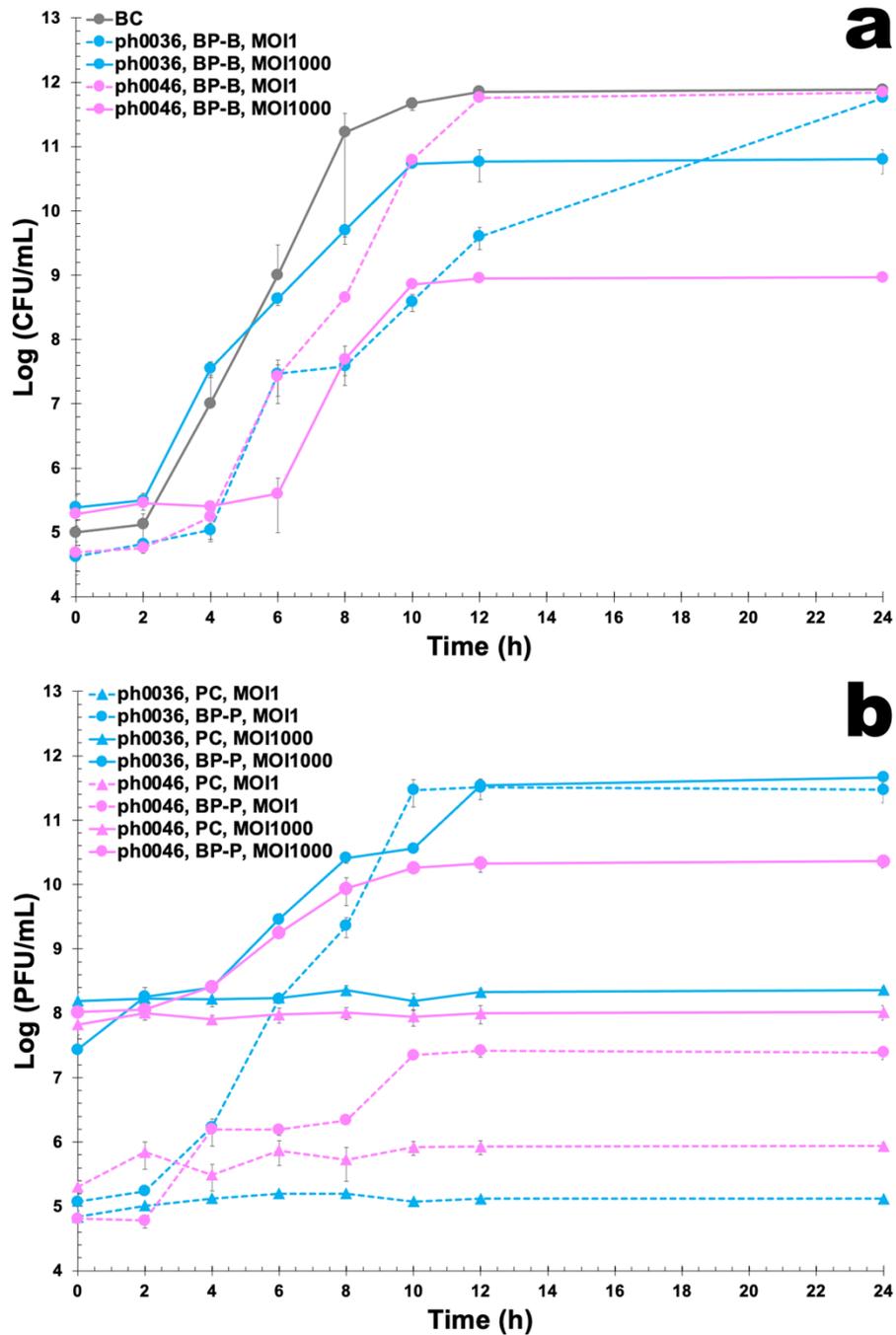
#### 5.4.5 Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de inativação bacteriana)

Em relação ao crescimento de *Salmonella enterica* utilizada como hospedeiro para o isolamento dos dois fagos, observou-se crescimento esperado de acordo com a curva que havia sido previamente estudada neste trabalho (Figura 16a).

A forma como o fago interferiu no crescimento da bactéria pode ser observada na Figura 16a. A um valor de MOI de 1 e 1000, o máximo de inativação de *Salmonella enterica* com o bacteriófago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 foi de 2.0 e 1.0 log UFC/mL, respectivamente (Figura 16a, ANOVA,  $p < 0,05$ ), atingido após 12 h de incubação, quando comparado com o controle bacteriano (BC). Durante as primeiras 4 h de incubação, o fator de inativação foi similar para valores de MOI de 1 e 1000 (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Durante as primeiras 8 h de incubação, o fator de inativação foi ainda maior para a MOI 1000 (ANOVA,  $p < 0,05$ ). As taxas de redução bacteriana com o bacteriófago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 no final do período de incubação (i.e., 24 h) foram estatisticamente similares (ANOVA,  $p > 0,05$ ) para os dois valores de MOI (Figura 16a).

A densidade bacteriana no controle (BC) aumentou em 6,5 log UFC/mL (ANOVA,  $p < 0,05$ ) durante as 24 h de incubação (Figura 16a). Durante o período de 24 h dos experimentos, a concentração de fago nos controles (PC) manteve-se constante tanto para a MOI 1 como para a MOI 1000 (Figura 16b). Quando o fago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 foi incubado na presença do seu hospedeiro, observou-se um aumento significativo na concentração de partículas fágicas (6.0 e 4.0 log UFP/mL, ANOVA,  $p < 0,05$ ) para a MOI de 1 e 1000, respectivamente (Figura 16b).

**Figura 16.** Inativação de *S. enterica* pelos bacteriófagos PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036 e PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 a valores de MOI de 1 e 1000 durante 24 h. **(a)** Concentração bacteriana: BC, controle de bactéria; BP, bactéria mais fago; **(b)** Concentração de fago: PC, controle de fago; BP, bactéria mais fago. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio padrão.



Fonte: Elaboração própria.

Após 12 h, a diferença para o controle diminuiu, indicando uma possível resistência da bactéria ao fago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0036. A MOI 1000 houve uma diferença de crescimento após 8 h de tratamento de cerca de 2 log UC/mL em relação ao controle. Após 10 h, a bactéria mostrou uma diminuição de 1 log UFC/mL que se manteve até às 24 h, indicando que não houve resistência ao fago como observado em MOI 1.

A um valor de MOI de 1 e 1000, o máximo de inativação de *Salmonella enterica* com o bacteriófago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 foi de 0.1 e 3.0 log UFC/mL, respectivamente (Figura 16a, ANOVA,  $p < 0,05$ ), atingido após 12 h de incubação, quando comparado com o controle bacteriano (BC). Durante as primeiras 4 h de incubação, o fator de inativação foi similar para valores de MOI de 1 e 1000 (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Durante as primeiras 8 h de incubação, o fator de inativação foi ainda maior para a MOI 1000 (ANOVA,  $p < 0,05$ ). As taxas de redução bacteriana com o bacteriófago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 no final do período de incubação (i.e., 24 h) foram estatisticamente similares (ANOVA,  $p > 0,05$ ) àquelas a 12 h (Figura 16a).

Durante o período de 24 h dos experimentos, a concentração de fago nos controles (PC) manteve-se constante tanto para a MOI 1 como para a MOI 1000 (Figura 16b). Quando o fago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 foi incubado na presença do seu hospedeiro, observou-se um aumento pouco expressivo na concentração de partículas fágicas (2.5 e 2.5 log UFP/mL, ANOVA,  $p > 0,05$ ) para a MOI de 1 e 1000, respectivamente (Figura 16b).

No tratamento da bactéria com o fago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 em MOI 1, a *S. enterica* mostrou um crescimento de cerca de 2.9 log UFC/mL em relação ao controle com 8 h de tratamento. Após 10 h mostrou um aumento contínuo, indicando também uma possível resistência ao fago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 a MOI 1. Enquanto a MOI 1000, com 6 h de tratamento a bactéria mostrou uma diferença de cerca de 3.9 log UFC/mL. Entre 12 h e 24 h, o tratamento com o fago PhL\_UNISO\_SE-CFR\_ph0046 levou a uma redução de carga bacteriana de 3 log UFC/mL em relação ao controle, indicando que não houve resistência significativa em MOI 1000.

A aplicação da terapia fágica para inativação bacteriana requer uma compreensão profundada da cinética do envolvimento bactéria-fago (CAMPOS *et al.*, 2020). É necessário conhecer a bactéria-alvo para escolher o melhor bacteriófago e

melhor valor de MOI. A espécie bacteriana e a quantidade de contaminação inicial também afetam o processo de replicação dos bacteriófagos (PEREIRA *et al.*, 2021).

A um valor de MOI 1, os controles de ambos os fagos permaneceram em 5.0 log UFP/mL durante todo o tratamento, assim como em MOI 1000 os controles de ambos os fagos permaneceram em 8.0 log UFP/mL durante todo o tratamento, como expectável (Figura 16b).

Ambos os fagos indicaram resistência da bactéria em MOI 1 (Figura 16a), isso quando há a mesma concentração de partículas bacteriofágicas para cada bactéria na suspensão. Enquanto em MOI 1000, os dois fagos conseguiram conter relativamente a bactéria. Ensaios com concentrações maiores de fago podem ser realizados no futuro.

De acordo com vários autores (COSTA *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2017), o desenvolvimento da resistência dos fagos pode ser superado com a utilização de um coquetel de várias partículas bacteriofágicas líticas para a mesma espécie bacteriana.

## 6 CONCLUSÃO

O trabalho de pesquisa objeto da presente dissertação almejou a produção de um coquetel de partículas bacteriofágicas com possível potencial de aplicação na indústria de alimentos. Ambos os fagos mostraram atividade contra a bactéria hospedeira *Salmonella entérica*, um dos principais patógenos envolvidos nas doenças transmitidas por alimentos. Os bacteriófagos testados para biocontrole de *S. entérica* mostraram ser altamente específicos, o que pode indicar uso promissor no controle deste patógeno.

Na avaliação da inativação bacteriana *in vitro* ambos os fagos mostraram atividade contra a bactéria hospedeira em MOI 1000, enquanto que no MOI 1 indicaram uma possível resistência da bactéria, o que pode ser corrigido com aumento do número de partículas no coquetel fágico.

As duas partículas foram isoladas e caracterizadas biológica e fisicoquimicamente, ambas pertencentes à ordem Caudovirales e provavelmente à mesma família de bacteriófagos de dsDNA, *Myoviridae*.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para contornar o problema da aquisição de resistência bacteriana às partículas fágicas já isoladas, o isolamento e caracterização de outros bacteriófagos estritamente líticos para outras subespécies do grupo *Salmonella enterica*, permitiria produzir um coquetel fágico com um espectro lítico mais abrangente.

As partículas bacteriofágicas poderão também ser melhor caracterizadas, através de sequenciação do seu material genético e respectiva montagem de genomas e anotação genômica, com construção dos seus mapas genômicos através de ferramentas de bioinformática, para elucidação daqueles genes integrantes no seu genoma que possam codificar para endolisinas. A produção de endolisinas induzida pelos bacteriófagos poderia também levar a caracterização das mesmas, visando potenciais aplicações na área da indústria de alimentos. Adicionalmente, poderiam ser realizados estudos de estabilidade dos fagos a fatores abióticos (pH, temperatura, radiação UVB, radiação solar), análises de microscopia eletrônica de transmissão com crio-congelamento em etano líquido dos fagos para melhor observação da sua microestrutura e classificação.

A realização de ensaios de terapia fágica *in vitro*, utilizando os diferentes fagos isolados de forma independente e com diferentes valores (intermédios) de MOI (0, 10, 100), assim como utilizando coquetéis dos fagos isolados, permitiria obter a concentração ideal de fagos para biocontrole de *Salmonella enterica*.

Será também fundamental avaliar o potencial de desenvolvimento de mutantes resistentes de *Salmonella enterica* usando suspensões de um único fago e coquetéis de diferentes fagos.

A realização de ensaios de inativação (terapia fágica *in vitro*) adicionando sequencialmente os fagos isolados, permitiria verificar se evitaria o desenvolvimento de resistências bacterianas aos mesmos.

Por fim, testar o coquetel de fagos em matrizes alimentícias, sem contaminação bacteriana e deliberadamente contaminadas com concentrações conhecidas do patógeno, poderia permitir um maior conhecimento da eficácia dos fagos no biocontrole de *Salmonella enterica*.

## REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T. Lysis from without. **Bacteriophage**. v. 1, n. 1, p. 46–49, 2011.

ANNANY, H. *et al.* **Bacteriophages as antimicrobials in food products: History, biology and application Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**. Cambridge: Woodhead Publishing, ed. 1, cap.4, 2015.

Broniewski, J. M.; Meaden, S.; Paterson, S.; Buckling, A.; Westra, E. R. The effect of phage genetic diversity on bacterial resistance evolution. **The ISME Journal**. v. 14, p. 828-836, 2020.

CAMPOS, W. F. *et al.* Transdermal permeation of bacteriophage particles by choline oleate: Potential for treatment of soft-tissue infections. **Future Microbiology**, v. 15, no. 10, p. 881–896, 2020.

CHIBANI-CHENNOUFI, S. *et al.* Phage-host interaction: an ecological perspective. **Journal of Bacteriology** v. 186, n. 12, p. 3677–3686, 2004.

COSTA, P. *et al.* Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: An in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 94, 2019.

DOSS, J. *et al.* A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. **Viruses**. v.9, n.50, p. 1-9, 2017.

DUARTE, J. *et al.* New insights on phage efficacy to control *Aeromonas salmonicida* in aquaculture systems: An in vitro preliminary study. **Aquaculture**, v.495, p.970–982, 2018.

ENG, S. K. *et al.* Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284–293, 2015.

GABARON, D. A. *et al.* Microrganismos indicadores de contaminação de um abatedouro de frangos coloniais situado na região noroeste do estado do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 60998–61007, 2020.

GARCIA, P. *et al.* Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, p 479-485, 2008.

GOODE, D. *et al.* Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. **Applied and environmental microbiology** v. 69. p. 5032-5036. 2003.

GORDILLO ALTAMIRANO, F. L.; BARR, J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. **Clinical Microbiology. Reviews.**, v. 32, e00066-18, p. 1-25, 2019.

GUTIÉRREZ, F., *et al.* Bacteriófagos y endolisinas en la industria alimentaria. **Arbor**. v. 196, n. 795, 2020.

HAMDI, S. *et al.* Characterization of two polyvalent phages infecting Enterobacteriaceae. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–12, 2017.

HARADA, L. K.; *et al.* Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38-58, 2018.

HAY, I. D.; LITHGOW, T. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. **EMBO reports** v. 20, e47427, p. 1-24, 2019.

HYMAN. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 35-36, 2019.

JANSEN, M. *et al.* Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 14140, 2018.

JURCZAK-KUREK *et al.* Biodiversity of bacteriophages: Morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**. v. 6, n. september, p. 1–17. 2016.

KAZI, M.; ANNAPURE, U.S. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. **Journal of Food Science and Technology**. v.53, n.3, p. 1355–1362, 2016.

KUTTER, E. Phage host range and efficiency of plating. *Bacteriophage: Methods and protocols*. **Humana Press**. p. 141–149, 2009.

LE, T. S. *et al.* Bacteriophages as biological control agents of enteric bacteria contaminating edible oysters. **Current Microbiology**, v. 75, n. 5, p. 611–619, 2018.

LEVERENT, B. *et al.* Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69 p. 4519–4526. 2003.

LIU, W., *et al.* Development of a novel and highly efficient method of isolating bacteriophages from water. **Journal of Microbiological Methods**. vol. 139, p. 143–149, 2017.

MEADEN, S.; KOSKELLA, B. Exploring the risks of phage application in the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 358-359. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças transmitidas por alimentos. **Portal do Governo Brasileiro**. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>> Acesso em: 17 de outubro de 2020.

MODI, R. *et al.* Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**. v. 64 p. 927–933, 2001.

MOLDOVAN, R.; CHAPMAN-MCQUISTON, E.; WU, X. L. On kinetics of phage adsorption. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 1, 303–315. 2007.

MOYE, Z. D.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage applications for food production and processing. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2018.

NEITZKE, D. C.; ROZA, C. R.; WEBER, F. H. Food safety: *Salmonella* sp. contamination in swine slaughter. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 20, p. 1-7, 2017.

NGUYEN, M. *et al.* Accurate and sensitive detection of *Salmonella* in foods by engineered bacteriophages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

OMS Organização Mundial da Saúde. *Salmonella*. Problemas de Saúde. Disponível em: <[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 14 de dezembro de 2020.

PEREIRA, C. *et al.* Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella Typhimurium*: Use of single phage suspensions and phage cocktails. **Virus Research**, v. 220, p. 179–192, 2016.

PEREIRA, C. *et al.* Characterization and in vitro evaluation of new bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli*. **Virus Research**, v. 227, p. 171–182, 2017.

PEREIRA, C., *et al.* Phage therapy as a potential approach in the biocontrol of pathogenic bacteria associated with shellfish consumption. **International Journal of Food Microbiology**. v. 338, n. 11, 2021.

PINHEIRO, L. A. M. *et al.* Efficiency of Phage  $\phi 6$  for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An In Vitro Preliminary Study. **Microorganisms**, v.7 n.9. p. 286. 2019.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. Food safety - *Salmonella* update in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 53–58, 2019.

RAKHUBA, D.V. *et al.* Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 145-155, 2010.

RAVI, Y. *et al.* Bacteriophages in food preservation. **International Journal Pure Applied Bioscience**. v.5, n.3, p. 197-205, 2017.

RIOS, A.C. *et al.* Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. **Microbiological Research**. v. 191, p. 51-80, 2016.

RIOS, A.C. *et al.* Structural and functional stabilization of bacteriophage particles within the aqueous core of a W/O/W multiple emulsion: a potential biotherapeutic system for the inhalational treatment of bacterial pneumonia. **Process Biochemistry**. v. 64, p.177-192, 2018.

RIVERA CALDERÓN *et al.* Resistencia de la *Salmonella* a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia** v. 7, n. 1, p. 115-127, 2012.

SANTOS, S. B. *et al.* Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: implications of the host bacterial growth rate in modelling, **PLoS ONE**, v.9, p. 1-15, 2014.

SHAO, Y.; WANG, I.-N. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. **Genetics**. v. 180, n. 1, p. 471–482, 2008.

SHEN, G. H. *et al.* isolation and characterization of  $\phi$ km18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.

SHINOHARA, N. *et al.* *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008.

SILLANKORVA, S. M.; OLIVEIRA, H.; AZEREDO, J. Bacteriophages and their role in food safety. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 863-945, 2012.

SILVA, E. C. *et al.* Newly isolated lytic bacteriophages for *Staphylococcus intermedius*, structurally and functionally stabilized in a hydroxyethylcellulose gel containing choline geranate: Potential for transdermal permeation in veterinary phage therapy. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 42-58, 2021.

STORMS, Z. J.; SAUVAGEAU, D. Modeling tailed bacteriophage adsorption: insight into mechanisms. **Virology**, United States, v. 485, p. 355–362, 2015.

STRANGE, J. *et al.* Metagenomics analysis of bacteriophages and antimicrobial resistance from global urban sewage. **Scientific Reports**, v. 11, no. 1, p. 1–11, 2021.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 78, p. 31–41, 2002.

WEI, C. *et al.* Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 476–484, 2017.

KUPCZOK, A. *et al.* Rates of mutation and recombination in siphoviridae phage genome evolution over three decades. **Molecular Biology and Evolution**. v. 35. n. 5, p. 1147–1159, 2018

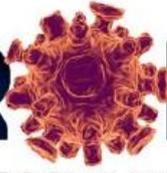
**ANEXO A - Congresso Científico XXXI Congresso Brasileiro de Virologia  
2020**

**CERTIFICATE**



Verifique o código de autenticidade 2865301.0167715.054932.8.89673535944563101728 em <https://www.event3.com.br/documentos>

**XXXI BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY**

**VIR  LOGY**



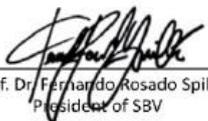
**& XV MERCOSUR VIROLOGY MEETING**

NOVEMBER 23 to 28, 2020

Certificate of Resumo presentation

This certifies that the work entitled ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES FOR THE BIOCONTROL OF SALMONELLA ENTERICA: POTENTIAL FOR APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY, authored by Thais Jardim Oliveira, Erica CRISTINA SANTOS SILVA, Liliam Katsue Harada, Bianca Gianola Belline Silva, Edjane Consorte Cinto, Fernanda de Campos Moreli, Marta Maria Duarte Carvalho Vila and Victor Manuel Balcão was presented by during the Resumo session of the XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul held online, between 11-23-2020 - 11-28-2020.

November 29, 2020.

  
Prof. Dr. Fernando Rosado Spiilki  
President of SBV

  
Prof. Dr. Prof. Jônatas Santos Abrahão  
First Secretary of SBV



## ANEXO B - International Congress of Pharmaceutical Sciences 2020



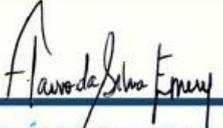
### CERTIFICADO

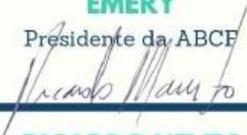
CERTIFICAMOS QUE

**Thais Oliveira**

realizou uma apresentação do trabalho "Isolamento e breve caracterização de bacteriófagos líticos para potencial aplicação na indústria de alimentos no biocontrole de *Salmonella enterica*", exposta no V congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas que ocorreu entre 1 a 3 de outubro de 2020, digitalmente, e gerou este certificado no total de 1 horas.

Outros autores: Erica Cristina Santos Silva, Liliam Katsue Harada, Fernanda De Campos Morell, Bianca Gianola Belline Silva, Rodrigo Boscardiol, Edjane Consorte Cinto, Marta Maria Duarte Carvalho Vila, Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão.

  
**FLÁVIO DA SILVA  
EMERY**  
 Presidente da ABCF

  
**RICARDO NEVES  
MARRETO**  
 Presidente do V  
Congresso ABCF

