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

Edjane Consorte Cinto

REVESTIMENTO COMESTÍVEL COM BACTERIÓFAGOS PARA BIOCONTROLE EM QUEIJOS MINAS MEIA CURA

Sorocaba/SP
2022

Edjane Consorte Cinto

REVESTIMENTO COMESTÍVEL COM BACTERIÓFAGOS PARA BIOCONTROLE EM QUEIJOS MINAS MEIA CURA

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

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Coorientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

Sorocaba/SP
2022

Ficha Catalográfica

Cinto, Edjane Consorte
C517r Revestimento comestível com bacteriófagos para biocontrole em queijos Minas meia cura / Edjane Consorte Cinto. – 2022.
86 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila.
Coorientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2022.

1. Bacteriófagos. 2. Biopolímeros. 3. *Salmonella enterica*. 4. Alimentos – Conservação. 5. Queijo - Qualidade. I. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, orient. II. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, coorient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Edjane Consorte Cinto

REVESTIMENTO COMESTÍVEL COM BACTERIÓFAGOS PARA BIOCONTROLE EM QUEIJOS MINAS MEIA CURA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.
Aprovada em:___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

_____
Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Universidade de Sorocaba

_____
Profa. Dra. Elaine Berges Silva
Universidade de Sorocaba

_____
Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior
Universidade de Sorocaba

DEDICATÓRIA

À professora Marta por ter acreditado na minha capacidade para o desenvolvimento do tema desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus. Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito (Romanos 8:28).

Agradeço ao meu filho Gabriel pela compreensão nos períodos de ausência e à minha família pelo apoio e palavras de otimismo em muitos momentos.

Agradeço à colega Thais Jardim Oliveira, pelos ensinamentos iniciais necessários às atividades laboratoriais, em especial, para o manuseio dos equipamentos e para a propagação dos bacteriófagos. À minha amiga Erica C. Silva por tudo que me ensinou sobre cálculos e pelo apoio em momentos difíceis. Agradeço ao colega Rodrigo Boscariol por todo o auxílio em diversos cálculos e processos desconhecidos por mim. E a todos os estagiários do Phagelab que contribuíram com a organização e viabilidade de materiais para os ensaios.

Agradeço imensamente à Prof.ª Dr. ª Marta Maria D. C. Vila e ao meu coorientador Prof. Dr. Victor Manuel C. F. Balcão pelos conhecimentos compartilhados, por todo o auxílio no desenvolvimento do tema e pela oportunidade de convivência no laboratório Phagelab.

Ao prof. Dr. José Martins de Oliveira Jr. pelas análises realizadas no Laboratório de Processamento de Imagens e Sinais da Uniso (Lapisus) e no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso (Lafinau). Também agradeço a todos os estagiários do laboratório Lafinau e, em especial, ao colegae técnico Denicezar Baldo, pelo auxílio no desenvolvimento de inúmeros ensaios, gráficos e interpretações. Sem sua ajuda nada poderia ter sido concluído.

À Prof.ª Dr.ª Renata Lima e à Taís Germano pelos ensaios realizados no Laboratório de Avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais (Labiton) e por todo o apoio no desenvolvimento dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcus V. Chaud e ao técnico Fernando Batain pelas análises realizadas no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LaBNUS).

Às colaboradoras Marcia das Mercedes técnica do laboratório de Controle Microbiológico e a Valéria Orsi, responsável pelos laboratórios de Saúde da Uniso pelo auxílio constante. Também agradeço a equipe do Laboratório de Análise de Alimentos, Jessica, Mayra e Carla pela colaboração nos ensaios específicos com os queijos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba por toda contribuição intelectual em minha formação.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de financiamento na forma de bolsa de estudo Capes-Prosup.

A todos o meu muito obrigada!!

“Mais importante do que saber é aprender como usar esse saber”
(Reuven Feuerstein)

RESUMO

INTRODUÇÃO: O emprego de revestimentos e/ou filmes comestíveis obtidos por polímeros naturais tem sido usado para melhorar a segurança e a qualidade dos alimentos. Os revestimentos comestíveis permitem ainda a adição de antimicrobianos, corantes, aromas, nutrientes, especiarias, etc. Neste sentido, a incorporação de bacteriófagos líticos para o biocontrole de patógenos pode ser interessante para a manutenção da qualidade microbiológica de alimentos. Os bacteriófagos são vírus que levam à lise celular podendo ser isolados do solo, da água, de efluentes, entre outros. O queijo Minas meia cura é um dos queijos mais populares do país, podendo ser fonte de microrganismos causadores de toxinfeções alimentares como a *Salmonella enterica*. **OBJETIVOS:** Desenvolver um revestimento comestível com bacteriófagos líticos para *S. enterica* visando biocontrole de queijos tipo Minas meia cura. **MÉTODOS:** As primeiras etapas foram propagação, purificação, titulação fágica e determinação da melhor relação da bactéria e fago ou da multiplicidade da infeção (MOI). A seguir, foi feita a preparação do revestimento por gelificação ionotrópica de alginato de sódio com incorporação das partículas fágicas para *Salmonella enterica.* O revestimento foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), tomografia por transmissão de raios-X (XRT), espectrofotometria de infravermelho (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrofotometria de fluorescência de raios-X (XRF), propriedades mecânicas, determinação da atividade lítica dos fagos; e ensaio de citotoxicidade. **RESULTADOS:** O revestimento apresentou capacidade lítica contra *S. enterica,* adequadas propriedades físico-químicas e nula toxicidade. **CONCLUSÃO:** O revestimento desenvolvido apresentou características promissoras para o fim pretendido.

Palavras-chave: Revestimento edível. Fagos líticos. Queijos. *Salmonella enterica*

ABSTRACT

INTRODUCTION: The use of edible coatings and/or films based on natural polymers has been used to improve food safety and quality. Edible coatings also allow the addition of antimicrobials, dyes, flavors, nutrients, spices, etc. In this sense, the incorporation of lytic bacteriophages for the biocontrol of pathogens can be interesting for the maintenance of the microbiological quality of food. Bacteriophages are viruses that lead to cell lysis and can be isolated from soil, water, effluents, among others. Minas semi-cured cheese is one of the most popular cheeses in the country, and it can be a source of microorganisms that cause toxic food infections such as *Salmonella enterica*. **OBJECTIVES**: Develop an edible coating with lytic bacteriophages for *S. enterica* aiming at biocontrol of half-cured cheeses. **METHODS**: The first steps were propagation, purification, phage titration and determination of the best bacterial-phage ratio or multiplicity of infection (MOI). Next, the coating was prepared by ionotropic gelling of sodium alginate with incorporation of phage particles for *Salmonella enterica*. The coating was characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray transmission tomography (XRT), infrared spectrophotometry (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray fluorescence spectrophotometry (XRF), mechanical properties, determination of phage lytic activity; and cytotoxicity assay. **RESULTS:** The coating showed lytic capacity against *S. enterica*, adequate physicochemical properties and zero toxicity **CONCLUSION:** The developed coating showed promising characteristics for the intended purpose.

Keywords: Edible coating. Lytic Phages. Cheeses. *Salmonella enterica.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µS	MicroSiemens
ABS	Absorbância
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCCD	Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica
DIPOA	Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
GDL	d-glucono-δ-lactona
HaCaT	Queratinócitos Humamos Imortalizados *(Human immortalized keratinocytes)*
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
kgf	Quilograma- força
LaBNUS	Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia
LAFINAU	Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso
LAPISUS	Laboratório de Processamento de Imagens e Sinais da Uniso
MAPA	Ministério da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária
MDR	*Multidrug Resistant*
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidade de Infecção
MTA-TSB	Meio Líquido Molten Top-ágar
MΩ.cm	MiliOhm centímetro (resistividade)
nm	Nanômetro
OD	Densidade Óptica
PA	Para Análise
PHAGELAB	Laboratório de Biofilmes e Bacteriófagos
ppm	Parte por Milhão
Prosup	Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotação por Minuto
SIF	Serviço de Inspeção Federal
t	Tempo
Tris-base	Tris-hidroximetil-aminometano
TSA	*Tryptic Soy Ágar*
TSB	*Tryptic Soy Broth*
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UNISO	Universidade de Sorocaba
UV-Vis	Radiação UltraVioleta-Visível
XRF	Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X
XRT	Tomografia por Transmissão de Raios-X
$\mu S.cm^{-1}$	Condutividade
3T3	Fibroblastos Embrionários de Camundongo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática de uma partícula fágica..... 27

Figura 2. Representação esquemática dos ciclos de reprodução dos bacteriófagos..... 28

Figura 3. Esquema de marcação nas placas de Petri para aplicação das diluições da suspensão concentrada de fagos..... 38

Figura 4. Esquema de marcação nas placas de Petri para aplicação das diluições da suspensão bacteriana..... 39

Figura 5. Imagens das amostras de queijos obtidas por corte de um queijo Minas meia cura..... 44

Figura 6. Amostras de queijos com o revestimento aplicado..... 45

Figura 7. Desenho ilustrativo da aplicação do revestimento em placa de Petri para avaliação da atividade lítica..... 47

Figura 8. Imagens fotográficas de placas de Petri contendo as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. enterica* obtidas na determinação do título bacteriano..... 50

Figura 9. Imagens fotográficas de placas de Petri contendo as Unidades Formadoras de Placas (UFP) do bacteriófago 36 obtidas na determinação do título fágico..... 51

Figura 10. Imagens fotográficas de placas de Petri contendo as Unidades Formadoras de Placas (UFP) do bacteriófago 46 obtidas na determinação do título fágico..... 51

Figura 11. Suspensões fágicas (fagos 36 e 46) obtidas após os processos de amplificação, purificação e filtragem..... 52

Figura 12. Imagem fotográfica de *Spot test* com coquetel fágico (fagos 36 e 46) com a formação de lise bacteriana..... 53

Figura 13. Curvas de morte realizadas para os fagos 36 e 46 com diferentes relações vírus/bactérias (MOIs) (n=3) em comprimento de onda de 600 nm..... 54

Figura 14. Imagens de revestimento alimentício de alginato de cálcio obtido por gelificação ionotrópica: a) sendo retirado de amostra de queijo; b) após retirado do queijo; c) em amostra de queijo..... 56

Figura 15. Micrografias (MEV) do revestimento de alginato de cálcio (x250; x500; x 1000; x 2500)..... 57

Figura 16. Imagens obtidas por tomografia de transmissão por raios-X (XRT) do revestimento de alginato de cálcio..... 58

Figura 17. Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos revestimentos alimentício com fagos (a) e sem fagos (b)..... 59

Figura 18. Termogramas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos revestimentos alimentício sem fagos (a- controle) e com fagos (b-amostra) claro) 62

Figura 19. Representação gráfica da análise de fluorescência de raios-X (XRF) das amostras de revestimento comestível a base de alginato de cálcio com e sem adição do coquetel fágico..... 65

Figura 20. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a relaxação obtidos por texturômetro (n=3)..... 67

Figura 21. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a tração obtidos por texturômetro (n=3). 68

Figura 22. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a resiliência obtidos por texturômetro (n=3)..... 69

Figura 23. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a perfuração obtidos por texturômetro (n=3). 70

Figura 24. Imagens de placas de Petri contendo *Salmonella enterica* com revestimento a) filme com fagos b) filme sem fagos..... 71

Figura 25. Análises de difusão em ágar com células HaCat. Controle negativo (-); controle positivo (+); revestimento comestível com bacteriófagos; revestimento comestível sem bacteriófagos..... 72

Figura 26. Análises de difusão em ágar com células 3T3. Controle negativo (-); controle positivo (+); revestimento comestível com bacteriófagos; revestimento comestível sem bacteriófagos..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e custo dos componentes do revestimento polimérico 43

Tabela 2. Graus de reatividade biológica para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar de acordo com a Norma ISO 10993-5/2009 48

Tabela 3. Eventos térmicos obtidos dos termogramas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos revestimentos alimentício sem fagos (controle) e com fagos (amostra) 61

Tabela 4. Análise por Fluorescência da raios-X (XRF) das amostras de revestimento comestível a base de alginato de cálcio com e sem adição do coquetel fágico 64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 18

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 20

2.1. Doenças transmitidas por alimentos (DTA)..... 20

2.2. *Salmonella enterica*..... 22

2.3. Queijos..... 23

2.4. Bacteriófagos e biocontrole..... 27

2.5. Filmes e revestimentos comestíveis..... 30

3. OBJETIVOS..... 32

3.1.Objetivo geral..... 32

3.2.Objetivos específicos..... 32

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 33

4.1.Material..... 33

4.1.1. Reagentes..... 33

4.1.2. Material biológico..... 33

4.1.3. Equipamentos..... 34

4.2.Métodos..... 35

4.2.1. Preparo de meios de cultura e tampão fágico..... 35

4.2.2. Preparação da suspensão bacteriana de *Salmonella enterica*..... 36

4.2.3. Cultura bacteriana em tapete pela técnica em ágar de dupla camada..... 36

4.2.4. *Spot test*..... 36

4.2.5. Amplificação de bacteriófagos..... 37

4.2.6. Determinação do título fágico..... 37

4.2.7. Determinação do título bacteriano..... 39

4.2.8. Curva de inativação da bactéria hospedeira..... 40

4.2.9. Preparo de revestimento alimentício..... 43

4.2.10. Espessura..... 45

4.2.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 45

4.2.12. Tomográfia por transmissão de raios-X (XRT)..... 45

4.2.13. Espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..... 46

4.2.14. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)..... 46

4.2.15. Fluorescência de raios-X (XRF)..... 46

4.2.16. Propriedades mecânicas..... 46
4.2.17. Atividade lítica..... 46
4.2.18. Citotoxicidade pelo método de difusão em ágar..... 47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49

5.1. Preparo da solução fágica e ativação da bactéria hospedeira..... 49

5.2. Desenvolvimento e caracterização do revestimento comestível..... 54

6. CONCLUSÃO..... 73

REFERÊNCIAS..... 74

ANEXO A – Resumo do 13th Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP)..... 84

ANEXO B - Certificado do XXXI Brazilian Congress of Virology & XV Mercosul Virology Meeting..... 85

ANEXO C – Certificado do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa..... 86

APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa realizado intitulado "Revestimento comestível com bacteriófagos para biocontrole em queijos Minas meia cura" foi financiado pela Universidade de Sorocaba (Uniso). A discente recebeu bolsa integral Capes/Prosup, tendo sido orientada pela Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila e coorientada pelo Prof. Dr. Victor Manuel Figueiredo Cardoso Balcão.

O trabalho foi concebido dentro da linha de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso "Avaliação de Substâncias Bioativas e Sistemas de Liberação de Fármacos", sendo realizado no Laboratório de Biofilmes e Bacteriófagos da Uniso (Phagelab). Algumas análises ainda foram realizadas no Lafinau (tomográfia por transmissão de raios-X (XRT) e espectrofotometria de fluorescência de raios-X (XRF)); no Lepisus (microscopia eletrônica de varredura (MEV)); no Labiton (ensaios de citotoxicidade) e no LaBNUS (espectrofotometria de infravermelho (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e propriedades mecânicas.

Os trabalhos desenvolvidos pela equipe de pesquisadores têm tido como foco a aplicação de bacteriófagos para o controle de bactérias patogênicas nas áreas de saúde humana, segurança dos alimentos, agricultura e meio ambiente visando a melhoria da qualidade de vida do ser humano. Os bacteriófagos ou fagos são vírus que atacam exclusivamente bactérias. Nesse sentido, desde que se descobriu que estes vírus destroem os seus hospedeiros enquanto se mantêm inócuos para os seres humanos, diversas pesquisas buscam utilizá-los para combater diversos tipos de infecções ou contaminações bacterianas. O trabalho realizado buscou a obtenção de um revestimento edível com bacteriófagos contra *Salmonella enterica* com o objetivo de garantir a segurança microbiológica de queijos, um produto de significativo consumo nacional. Além disto visou promover a proteção do alimento da influência de fatores externos sem a geração de lixo advindo de embalagens sintéticas.

Durante a realização desta dissertação resultados foram apresentados nos Congressos: i) 13th Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences, em outubro de 2021, tendo como autores: Edjane C. Cinto; Thais J. de Oliveira; Victor M. Balcão; e Marta M. D. C. Vila com o título "Edible coating with bacteriophages for biocontrol of half-cured cheese" (Anexo A); ii) XXXI Brazilian Congress of Virology & XV Mercosul Virology Meeting, em novembro de 2020, tendo como autores: Edjane C. Cinto;Thais Jardim de Oliveira; Erica C. Santos Silva;

Lilin K. Harada; Bianca G. Belline Silva; Fernanda Morelli; Marta M. D. C. Vila; e Victor M. Balcão intitulado “Isolation and characterization of lytic bacteriophages for the biocontrol of S*almonella enterica*: potential for application in the food industry” (Anexo B) e**;** iii) XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa, em outubro de 2021 dos autores: Edjane Consorte Cinto; Thais Jardim de Oliveira; Victor M. Balcão; e Marta M. D.C. Vila, com o título “Edible coating integrating lytic bacteriophage particles for biocontrolling Salmonella enterica in half-cured cheese” (Anexo C).

1. INTRODUÇÃO

Os queijos, produtos lácteos fermentados, são alimentos de alta qualidade nutricional consumidos no mundo todo por bilhões de pessoas (TONG *et al.,* 2017). Entretanto, têm sido implicados em diversos surtos de intoxicações de origem alimentar. Assim como o leite, queijos são alimentos com inúmeros nutrientes, que oferecem circunstâncias ideais para multiplicação ou manutenção da viabilidade de microrganismos desejáveis ou não, que podem trazer modificações sensoriais no queijo e/ou propiciar doenças como intoxicações e toxinfeções alimentares em seus consumidores (FERREIRA; SILVA, 2021).

Os patógenos veiculados em leite e produtos lácteos são originários do ambiente da fazenda e da excreção direta do úbere infectado. Nas plantas de laticínios, os patógenos podem entrar via leite cru contaminado, colonizar o ambiente da fábrica de laticínios e, consequentemente, contaminar os laticínios. Outra fonte importante de contaminação ocorre durante o manuseio e processamento advindo dos trabalhadores (KOUSTA *et al*., 2010).

Salmonella spp., Escherichia coli, Campylobacter spp., Listeria spp., Bacillus cereus, Brucella spp. e Staphylococcus aureus são alguns exemplos de microrganismos patogênicos associados a surtos de intoxicações e toxinfeções alimentares nos quais produtos lácteos, em particular, os queijos, estão frequentemente envolvidos (MARTINS, 2018; SILVA *et al*., 2017).

Uma abordagem que tem sido discutida, mais recentemente, para o controle da qualidade microbiológica de alimentos refere-se à utilização de bacteriófagos. Várias aplicações no controle de patógenos em alimentos utilizando bacteriófagos têm sido propostas, ao longo dos anos, com relativo sucesso (KAZI; ANNAPURE, 2016).

O conceito de combater patógenos em alimentos por meios de fagos pode ser aplicado em todas as fases da produção ao longo de toda a cadeia alimentar. Os bacteriófagos são adequados para: (i) prevenir ou reduzir a colonização e doenças na pecuária via terapia com fagos; (ii) descontaminar carcaças e outros produtos crus, como frutas e vegetais frescos; iii) desinfetar equipamentos e superfícies de contato (biosanidade do fago biocontrole) e (iv) prolongar o prazo de validade de alimentos industrializados perecíveis como um conservante natural (GARCIA *et al.*, 2008).

Além disto, os bacteriófagos apresentam diversas vantagens como agentes de biocontrole em alimentos segundo Sillankorva, Oliveira, e Azeredo (2012), como: i) especificidade para atingir seu hospedeiro permanecendo intacta a microbiota restante, ii) autorreplicação e autolimitação, com multiplicação enquanto o hospedeiro estiver presente; iii)

adaptação aos mecanismos de defesa das bactérias; iv) baixa toxicidade inerente, uma vez que são formados basicamente de ácidos nucleicos e proteínas; v) baixo custo e simplicidade de manipulação; vi) tolerância a diversas condições dos alimentos.

A crescente demanda por produtos alimentícios, prontos para consumo, de alta qualidade e com longa vida de prateleira, tem contribuído para o desenvolvimento de novas tecnologias de processamento que assegurem que as propriedades naturais e a aparência do produto não sejam significativamente alteradas (KOKOSZKA; LENAR, 2007). Neste sentido, filmes ou revestimentos comestíveis, formados por uma camada fina de biopolímeros na superfície dos alimentos, visando estender sua vida útil, representam uma das melhores maneiras de preservar propriedades, funcionalidade e características dos alimentos a um baixo custo (ZAMBRANO-ZARAGOZA *et al*., 2018).

Os filmes e revestimentos comestíveis são obtidos pelo emprego de uma grande variedade de biopolímeros, originários de várias fontes naturais, sendo caracterizados pela sua complexidade estrutural e diversidade funcional (PINHEIRO *et al*., 2010). Estas substâncias são classificadas como polissacarídeos, proteínas e lipídios, sendo completamente biodegradáveis e seguros para o consumo humano (VILLADIEGO *et al.*, 2005). Os filmes ou revestimentos podem colaborar na segurança microbiológica dos alimentos e assegurar proteção contra diferentes fatores externos (vapor de água, oxigênio e umidade) auxiliando na conservação e, consequente, prolongamento da vida útil de alimentos frescos e processados. Somando-se a isto, os filmes ou revestimentos permitem a associação de diversas substâncias que podem colaborar na preservação e qualidade do produto, como os bacteriófagos.

Com estes fatos, justifica-se a importância do desenvolvimento de um revestimento edível com bacteriófagos para o biocontrole de queijos do tipo Minas meia cura, de modo a contribuir para a melhoria de sua qualidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças transmitidas por alimentos (DTA)

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma das principais causas de morbimortalidade no mundo todo. As DTA são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública, atingindo toda população, mas majoritariamente as camadas menos favorecidas, crianças e idosos (SORAGNI; BARBABÉ; MELLO, 2019).

Caracteriza-se como principal critério das DTA, quando duas ou mais pessoas apresentam a mesma doença ao ingerir um alimento ou bebida contaminados da mesma origem com confirmação por evidência clínica, epidemiológica e/ou laboratorial (MAGNONI *et al*., 2016; MELO *et al*., 2018). As DTA são doenças com múltiplos sintomas, decorrentes da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados por microrganismos como bactérias e/ou suas toxinas, vírus e parasitas. A gravidade do quadro infeccioso dependente do patógeno envolvido e, principalmente, da condição de saúde individual. Diarreia, falta de apetite, febre, dor abdominal, vômitos e náuseas são algumas das sintomatologias que os indivíduos podem apresentar quando acometidos e, normalmente, independente do patógeno envolvido. Os sinais e sintomas são recorrentes, o que dificulta o diagnóstico do agente infeccioso (FINGER *et al*., 2019). A diarreia é um dos distúrbios mais prevalente, sendo conceituada como três ou mais evacuações amolecidas ou líquidas em um período de 24 horas (MAGNONI *et al*., 2016).

Os principais fatores que podem contribuir para o aparecimento dessas doenças na população são a urbanização desorganizada, alta produtividade dos alimentos, aumento persistente da população e, a deficiência dos órgãos públicos e privados para a fiscalização da qualidade dos alimentos (DRAEGER *et al.*, 2019). A produção de alimentos para uma população que cresce, de modo vertiginoso, é um dos desafios do século. A produção agrícola em larga escala aumenta os riscos de ataque por pragas e doenças. A epidemiologia demonstra que, sempre que há um acúmulo de indivíduos de uma mesma espécie em contato próximo, há o aumento de chances de transmissão de agentes de doenças e a multiplicação de parasitas (MENDES; RIBEIRO, 2021).

A ingestão de alimentos que não atendem aos padrões sanitários mínimos, seja por representarem perigos físicos, químicos e biológicos, são um sério risco à segurança dos alimentos, sendo a contaminação por agentes biológicos a maior causa dessas doenças (SORAGNI; BARBABÉ; MELLO, 2019).

A bactéria *Salmonella*, de modo geral, é considerada um dos agentes etiológicos de maior prevalência nas infecções alimentares (FINGER *et al*., 2019). As bactérias infecciosas

mais importantes nas DTA, no Brasil, são *Salmonella, Campylobacter* e *Echerichia coli.* As principais intoxicantes são *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* e, no grupo das toxigênicas, *E. coli enterotoxigenica, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (MELO *et al*., 2018).

Um dos graves problemas de saúde pública atual é o surgimento de bacterias resistentes a antibióticos. O aparecimento de cepas de salmonela com resistência a múltiplos antimicrobianos (MDR - do inglês multidrug resistant) já foi descrito em humanos, alimentos e em animais. O abuso de antimicrobianos prescritos na medicina humana e animal tem facilitado a seleção e dispersão de patógenos resistentes e, em um mundo cada vez mais interconectado, sua disseminação não tem encontrado fronteiras (ORTIZ *et al*., 2021). O uso de antibióticos em animais tem contribuído para a magnitude do desafio global das bactérias multiresistentes. Na intensificação da produção alimentar animal e da aquicultura, os antibióticos são administrados não apenas como terapia, mas também como metafiláticos, onde a identificação dos sintomas da doença em um animal leva ao tratamento para todo o rebanho. Também, há o uso de antibióticos como tratamento profilático, onde doses subterapêuticas são administradas para neutralizar o efeito adverso das respostas ao estresse, que geralmente levam a doenças infecciosas (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016).

Os alimentos podem sofrer contaminações durante todas as etapas de elaboração e, até mesmo, após o seu processamento. Dentre os principais alimentos envolvidos em surtos estão os ovos (e produtos que os utilizem como base), doces e sobremesas, leite e derivados, carnes de aves, suínos e bovinos *in natura*, cereais, hortaliças e pescados (MELO *et al*., 2018).

Doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos são um sério fator de segurança dos alimentos em todo o mundo. Além de ser de significativa importância para a saúde pública, o impacto econômico das infecções bacterianas de origem alimentar é considerável (VIKRAM; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2021).

Visando o controle de qualidade microbiológico de alimentos, várias abordagens tem sido discutidas ao longo dos anos e, muitas tecnologias foram desenvolvidas para combater bactérias, como uso do calor, uso de substâncias químicas (desinfetantes e conservantes químicos), radiação, etc. Muitas destas estratégias, algumas vezes, à custa da qualidade dos alimentos ou a valores elevados. Portanto, há uma necessidade de novas opções que atendam à demanda do consumidor por alimentos seguros do ponto de vista microbiológico, minimamente processados e, com menos conservantes químicos. Uma destas abordagens é o uso de antagonista natural para bactérias para controlar a contaminação bacteriana em alimentos em

um processo chamado “biocontrole”. Neste sentido, o uso de bacteriófagos emerge como uma alternativa a ser estudada (KAZI; ANNAPURE, 2016).

2.2. *Salmonella enterica*

A *Salmonella enterica* é um patógeno de origem alimentar e agente etiológico de surtos alimentares com grande impacto na saúde humana (ORTIZ *et al*., 2021; SHINOHARA *et al*., 2008).

As salmonelas são bacilos Gram-negativos, geralmente móveis, anaeróbios facultativos e que não esporulam. O gênero *Salmonella* é o mais importante da família *Enterobacterieaceae*, sendo formado pelas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta subdividida em seis subespécies (*enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica*). (ANDINO; HANNING, 2015; MELO *et al*., 2018). Atualmente são reconhecidos cerca de 2500 sorovares diferentes, incluídos nas duas espécies (MENDES; RIBEIRO, 2021). O potencial patogênico para o ser humano está representado por membros da subespécie enterica. A manifestação clínica mais característica da salmonelose em humanos é a gastroenterite, que geralmente se apresenta com sintomas leves e autolimitados. Contudo, condições invasivas extraintestinais como bacteremia e infecções localizadas, também podem ser observadas (ORTIZ *et al*., 2021). A salmonelose apresenta sintomas característicos, como náuseas, vômitos, febre, calafrios, dor abdominal, desidratação, dores de cabeça e diarreias. A dose mínima infectante para os humanos varia de 10^5 a 10^8 células, porém em indivíduos imunossuprimidos doses menores que 10^3 já podem ser perigosas. A severidade da intoxicação por *Salmonella spp* depende do estado imunológico do hospedeiro, do sorovar envolvido, da concentração do inóculo e dos genes de virulência expressos pelo agente (FAGANELLO, 2018).

O principal reservatório de *Salmonella* é o trato gastrintestinal de humanos e animais, sendo que, a principal via infecciosa é exatamente o consumo de alimentos e/ou água contaminados por fezes contendo a bactéria. Essa contaminação normalmente ocorre devido à falta de higienização adequada das mãos, cozimento incorreto dos alimentos, além de consumo de alimentos crus contaminados (ANDINO; HANNING, 2015). A existência de portadores assintomáticos e a persistência de S*almonella* em alimentos e utensílios contribuem para que este microrganismo assuma relevante importância em saúde pública (SILVEIRA *et al.*, 2019). A maioria dos casos de salmonelose ocorre pela ingestão de alimentos preparados e armazenados inadequadamente, o que contribui para a multiplicação do patógeno e,

consequente, aumento da dose ingerida. Os alimentos mais envolvidos com contaminações de salmonelas são carnes bovina, suína e de aves, ovos, leite e seus derivados (MELO *et al*., 2018).

2.3. Queijos

O queijo é uma das formas mais antigas de alimentos industrializados. Em tempos remotos, o queijo era, principalmente, uma forma concentrada de leite com o benefício de uma vida útil prolongada. Os queijos, produtos lácteos fermentados, são alimentos de alta qualidade nutricional, sendo uma fonte rica em nutrientes essenciais, em particular, proteínas, peptídeos bioativos, aminoácidos, gordura, ácidos graxos, vitaminas e minerais (TONG *et al.,* 2017; WALTHER *et al.,* 2008). Segundo o Ministério da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária (MAPA) entende-se por queijo:

> [...] o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL,1996).

Atualmente, existem inúmeras variedades de queijos em função do tipo de leite utilizado; da consistência; do teor de gordura; do tipo de fermentação; do processo de fabricação envolvido, etc. Além disso, eles diferem no sabor, bem como em alguns componentes bioativos, que são criados principalmente durante os diferentes estágios de amadurecimento, quando os principais ingredientes lactose, proteína e gordura são decompostos por fermentação, proteólise e lipólise (WALTHER *et al.,* 2008).

O setor de lácteos brasileiro, composto pelos segmentos produtores de leite e seus derivados (como creme de leite, leite em pó, iogurte, manteiga e queijos), apresenta-se como o 4º maior do mundo. O segmento de queijos responde por 25,4% do setor (FGV, 2017). No entanto, em 2019, o consumo de queijos brasileiros foi estimado em 5,5 quilos por pessoa / ano, abaixo do volume de 9 kg / ano recomendado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). O setor de queijos no Brasil é dominado por fabricantes

nacionais e, também incluem a produção de queijo informal, os denominados queijos artesanais (USDA, 2020). Os queijos mais consumidos no país são mozzarella, queijo prato, requeijão e queijo Minas, sendo assim, os mais produzidos pela indústria nacional (TRINDADE *et al*., 2019). No entanto, existem muitas variedades de queijos, sendo algumas de expressão regional.

A história da produção de queijos artesanais no Brasil iniciou-se no século XVIII após a chegada dos europeus, que trouxeram gado para o estado da Bahia. Rapidamente, houve a domesticação e expansão até o estado de Minas Gerais, atualmente, um dos estados brasileiros com maior produção de queijos artesanais do país. As regiões Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país também contam com a produção de queijos artesanais possuindo, em cada uma delas, exemplares únicos com características próprias. O aumento da demanda por produtos diferenciados, menos processados e valorizados pela cultura local, tem impulsionado a produção de queijos artesanais no Brasil (PINEDA *et al*., 2021). Um outro fator que também incentiva a produção e o interesse sobre os queijos artesanais, diz respeito às características organolépticas ímpares adquiridas com o processo artesanal. Normalmente, a matéria prima diferenciada no processo produtivo artesanal é a utilização de leite cru e não o pasteurizado. O leite cru possui enzimas naturais, que além da atividade de proteólise e lipólise ocorridas naturalmente da microflora, favorecem o perfil sensorial dos queijos. Os queijos artesanais apresentam características particulares relacionadas aos atributos sensoriais dos produtos que são conferidos pelos microrganismos originais que fazem parte da microbiota natural do leite e promovem diferentes características de sabor, textura e aroma (COSTANZO *et al.,* 2020). O queijo artesanal tem um importante papel no consumo de queijos pela população brasileira e, o interesse em aumentar a qualidade do produto comercializado tem crescido nos últimos anos. O estado de Santa Catarina juntamente com o estado de Minas Gerais são os maiores produtores de leite e derivados, representando 8,4% do total produzido no país (ROSSI *et al.*, 2018).

O queijo Minas meia cura é um queijo maturado que pode ser produzido artesanalmente ou não e, juntamente com o queijo Minas frescal, foi um dos primeiros queijos produzidos no país. Quando o queijo Minas meia cura é feito de modo artesanal emprega-se o leite cru (QUEIJO MINAS ARTESANAL, 2009), quando é elaborado de forma industrial utiliza-se leite pasteurizado (BRASIL, 2020). O queijo Minas meia cura artesanal tem denominação de origem sendo reconhecido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio nacional brasileiro (SERNA, 2015). O queijo Minas meia cura é um produto com boa aceitação entre os brasileiros, sendo consumido entre pessoas de todas as faixas etárias. É um queijo curado, de massa semicozida, prensada e salgada, sendo classificado como queijo

semigordo (25,0 e 44,9%) a gordo (45,0 e 59,9%) e de umidade média (36,0 e 45,9%) (BRASIL, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2020). Segundo a legislação brasileira definiu-se queijo Minas meia cura como:

> ... o produto obtido por coagulação do leite pasteurizado, por meio de coalho, outras enzimas coagulantes apropriadas, ou com ambos, complementada pela ação de bactérias láticas isoladas ou em combinação.... É um queijo maturado, de massa semi-cozida, prensada e salgada, podendo ser defumado ou não..... O queijo Minas meia cura classifica-se, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, como um queijo semi-gordo a gordo e de média umidade.... O queijo Minas meia cura deve ter formato cilíndrico e apresentar casca fina, levemente amarelada e sem trincas (BRASIL, 2020).

As informações sobre os dados físico-químicos do queijo Minas curado são escassas, provavelmente, devido à dificuldade de padronização, por se tratar de um produto que apresenta variações na técnica de fabricação. Além disto, poucas informações são disponíveis sobre a real qualidade microbiológica destes produtos. Embora haja conhecimento teórico sobre o risco potencial de que estes queijos, à base de leite cru, representam para o consumidor, não há fiscalização específica suficiente no local que atenda às suas especificações (ARAÚJO *et al.*, 2020).

O controle higiênico sanitário no preparo de queijos, no Brasil, sempre foi difícil. Como exemplo pode-se citar um estudo realizado por ROSSI e colaboradores (2018) em fazendas produtoras de leite no Brasil. Nesta pesquisa, verificou-se que, em 51,6% das amostras de leite cru originados das fazendas avaliadas apresentaram contagem de bactérias maiores dos que as estabelecidas pela legislação e, 66,6% das amostras de água utilizada para diversas finalidades apresentaram contagem de coliformes superiores aos limites aceitáveis. Além disto, constatou-se procedimentos incorretos durante a ordenha, armazenamento e limpeza em geral por parte dos colaboradores.

Os queijos, de modo geral, são alimentos seguros para consumo, no entanto, têm sido implicados em diversos surtos de intoxicação de origem alimentar. Os patógenos veiculados em leite e produtos lácteos são originários do ambiente da fazenda e da excreção direta do úbere infectado. Nas plantas de laticínios, os patógenos podem entrar via leite cru contaminado, colonizar o ambiente da fábrica de laticínios e, consequentemente, contaminar os laticínios. Outra fonte importante de contaminação ocorre durante o manuseio e processamento advindo

dos trabalhadores (KOUSTA *et al.,* 2010). Queijos fabricados artesanalmente são mais propensos às contaminações por patógenos de origem alimentar quando a qualidade do leite cru é insatisfatória (PINEDA *et al*., 2021), uma vez que, o leite é muito suscetível à contaminação por microrganismos patogênicos. A segurança microbiana dos alimentos ao longo da cadeia de laticínios, seja numa produção industrial ou artesanal, é um tema que merece atenção do ponto de vista da saúde pública e da produção (LINDNER *et al*., 2021).

Vários organismos são responsáveis por contaminações em queijos, destacando-se a classe de *Escherichia coli* (SILVA *et al.,* 2017), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes e Campylobacter jejuni* (JORQUERA *et al*., 2015). Estudos avaliaram ainda a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva *e Brucella* spp. em queijos artesanais fabricados no Brasil (PINEDA *et al*., 2021).

Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são as principais medidas de controle microbiológico e, se mostram eficazes (NEITZKE; ROZA; WEBER, 2017). Outras medidas também são utilizadas pela indústria alimentícia de acordo com a característica e objetivos de conservação de cada alimento como: pasteurização, irradiação, processamento de alta pressão, sendo descritas como seguras e eficazes. Entretanto, esses métodos podem ser desfavoráveis em alguns casos na preservação das características organolépticas, aceitabilidade pelos consumidores e perdas nutricionais dos alimentos (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018). Neste sentido, diversas propostas têm sido avaliadas para o controle dos principais agentes patogênicos causadores de problemas de intoxicações alimentar e ainda, satisfazer a demanda do consumidor por alimentos minimamente processados com baixas concentrações de conservantes químicos (RAVI; POOJA; YADAV, 2017).

Nesta perspectiva, tem surgido opções alternativas para o controle microbiológico de alimento, como o controle biológico, ou biocontrole, ou ainda, biopreservação, que são métodos que usam organismos antagonistas e/ou seus metabólitos para controlar ou prevenir o crescimento de outros organismos indesejáveis. Como muitos queijos são produtos de fermentação microbiológica e, já possuem um microbioma grande e diverso, eles são um bom candidato para o uso de métodos de controle microbiológico contra microrganismos patogênicos. Entre os métodos de biocontrole discutidos tem-se o uso de bacteriocinas ou de espécies produtoras de bacteriocinas e inoculação com bacteriófagos líticos específicos (FALARDEAU; TRMCIC; WANG, 2021).

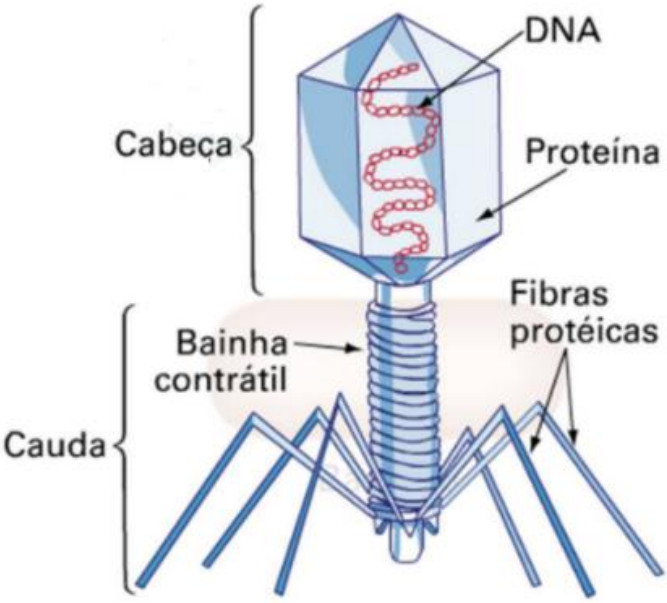
2.4. Bacteriófagos e biocontrole

Bacteriófagos são vírus que têm a capacidade de infectar e se multiplicar apenas em células bacterianas, são abundantes em todo o planeta e são detectáveis em quase todos os lugares onde existem bactérias vivas, hospedeiros obrigatórios (KAKASIS: PANITSA, 2019). Os fagos já foram isolados de todos ambientes e nichos ecológicos, como em águas de esgoto, rios, mares, solo, etc. (WEBER-DĄBROWSKA *et al.,* 2016). Além disto, os fagos são dez vezes mais numerosos no ambiente do que bactérias, com um número estimado de 10^{32} (THUNG *et al*., 2018).

Os bacteriófagos foram descobertos há um século por Frederick Twort e Félix d'Hérelle, de modo independente (DOMINGO-CALAP; DELGADO-MARTÍNEZ, 2018). Twort não seguiu sua inovação, enquanto d'Hérelle explorou sua capacidade de utilizá-los com o propósito de tratamento contra infecções bacterianas (QADIR, 2015).

Os bacteriófagos apresentam estruturas bem definidas como a cápside, bainha contrátil, base de ancoragem e injeção do material genético, e fímbrias (HARADA *et al*., 2018), como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática de uma partícula fágica

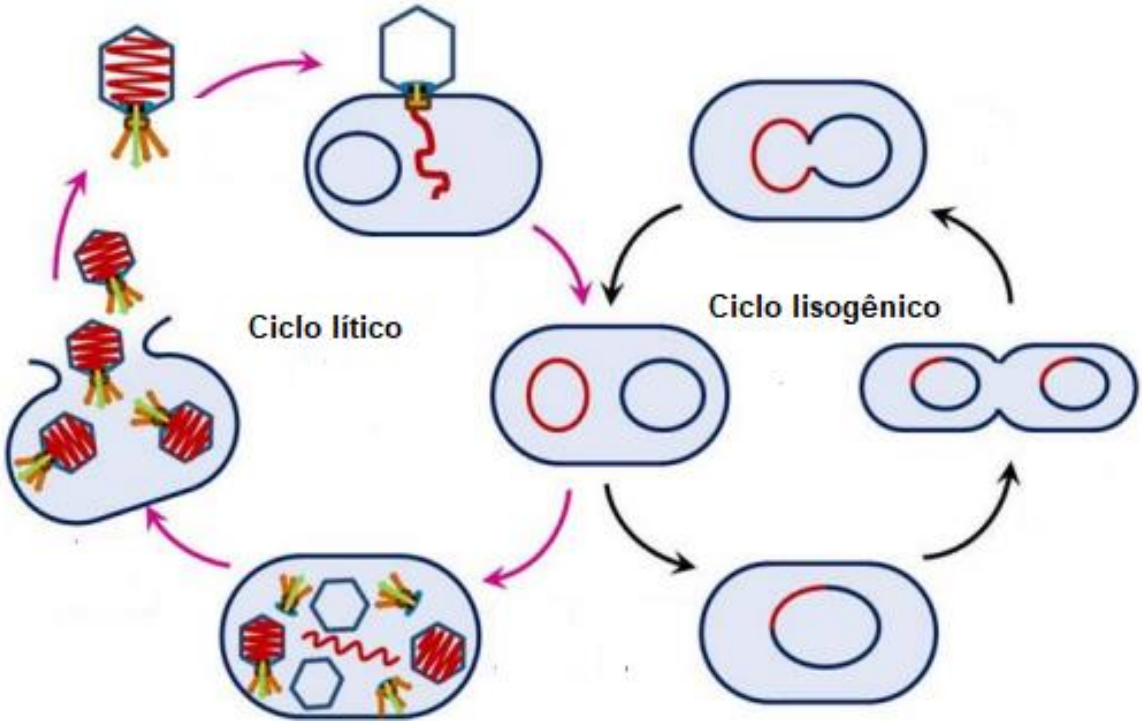


Fonte: https://webportefoliobio.weebly.com/blogue/bacteriofagos

Os fagos, como parasitas bacterianos obrigatórios, necessitam do hospedeiro para reprodução. De acordo com seu clico de reprodução são denominados líticos ou lisogênicos. No ciclo lisogênico, o material genético viral (ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido

ribonucleico (RNA)) é integrado ao DNA bacteriano, formando um prófago. O prófago permanece em estado latente, sendo replicado com o genoma do hospedeiro até o ciclo lítico ser induzido levando para a ativação do ciclo de vida lítico. No ciclo lítico, novos fagos são gerados utilizando o metabolismo do hospedeiro, sendo os fagos liberados durante a lise da célula bacteriana (JAMAL *et al.*, 2018). A Figura 2 ilustra os ciclos de reprodução dos bacteriófagos.

Figura 2. Representação esquemática dos ciclos de reprodução dos bacteriófagos



Fonte: file:///C:/Users/User/Downloads/Chapter_on_bacteriophages_EV_0rlova2.pdf.

Hoje em dia, verifica-se o uso dos bacteriófagos em diversas aplicações, como no controle de agentes infecciosos na agricultura e veterinária; no combate às infecções bacterianas humanas; como biosensores; na segurança dos alimentos; entre outras (THUNG *et al*., 2018). O interesse do uso de bacteriófagos em várias formas práticas tem ganhado força recentemente, como seu uso para melhorar a segurança dos alimentos (biocontrole). O conceito de biocontrole com fago é aplicar bacteriófagos líticos, com forte potência contra um ou mais patógenos bacterianos de origem alimentar, nos alimentos em risco de contaminação. Os fagos podem lisar o contaminante direcionado bactérias e reduzir significativamente (ou erradicar) o(s) patógeno(s) de origem alimentar, assim tornando os alimentos seguros para consumo. O

biocontrole de fagos está cada vez mais sendo aceito como uma tecnologia natural e verde, eficaz na segmentação específica contra patógenos bacterianos em vários alimentos (VIKRAM; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2021).

A proposta de combater patógenos em alimentos por meios de fagos podem ser efetiva em todas as fases da produção (GARCIA *et al.,* 2008). Contudo, a maioria das pesquisas sobre biocontrole de fagos foi feita em líquidos e, geralmente, com alta concentração de bactérias alvo puras. Em ambientes líquidos, a difusão e a mistura de partículas impulsionadas pelo fluxo de fluídos ou pela motilidade bacteriana aumentam a probabilidade de fagos encontrarem e infectarem bactérias hospedeiras suscetíveis. Quando se trata de aplicações em alimentos, existem dois grandes obstáculos. Primeiro, uma porção significativa de alimentos direcionados é de natureza sólida e não líquida. Em segundo lugar, a contaminação bacteriana provavelmente ocorreria em números mais baixos devido aos padrões de higiene esperados e exigidos pela legislação em vigor (KAZI; ANNAPURE, 2016).

Além disto, o uso de fagos em alimentos para biocontrole apresenta ainda vários desafios e limitações. As preparações de fago requerem, algumas vezes, controle de temperatura (normalmente entre 2 - 8 ºC). Caso as preparações com fagos forem usadas em conjunto com desinfetantes químicos, pode ser necessário aplicações distintas, pois produtos químicos também podem inativar as partículas de fago e tornar o biocontrole menos eficaz. Em função da sua alta especificidade natural, as preparações de fago podem tratar eficazmente os patógenos presentes nos alimentos. Mas, se acontecer dos produtos alimentares estarem contaminados com dois ou mais patógenos bacterianos, uma preparação de fago direcionada contra um único patógeno não será eficaz na remoção de outras bactérias patogênicas dos alimentos. Deve-se tomar cuidado ainda, de se usar fagos líticos e excluir fagos temperados ou lisogênicos de preparações de bacteriófagos (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018). O biocontrole de fago, muitas vezes, reduz significativamente os níveis do patógeno alvo, porém nem sempre o elimina completamente dos alimentos (VIKRAM; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2021). Os fagos também, devem ser eficazes contra uma ampla gama de hospedeiros, porém essa limitação pode ser mitigada usando uma "mistura" ou coquetéis de fagos (KAZI; ANNAPURE, 2016). Por fim, a forma de veiculação dos fagos deve ser avaliada individualmente para cada produto e/ou processo.

A redução da colonização em alimentos durante o processamento industrial de alimentos pode ser realizada pela aplicação de fagos diretamente nas superfícies dos alimentos, por exemplo, no caso de carnes, produtos frescos e alimentos processados ou mesmo misturados ao leite cru (SILLANKORVA; OLIVEIRA; AZEREDO, 2012; VIKRAM; WOOLSTON;

SULAKVELIDZE, 2021). Outra alternativa é a veiculação de fagos através do uso de filmes ou revestimentos comestíveis incorporados com fagos (ALVES *et al.,* 2020).

2.5. Revestimentos e filmes comestíveis

Embora os termos revestimento e filme alimentícios ou comestíveis sejam utilizados, muitas vezes, de forma sinônima, são produtos diferentes. O revestimento é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que filme é o produto pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto (FAKHOURI *et al.,* 2007).

O uso de filmes e revestimentos comestíveis em produtos alimentícios parece uma técnica de emprego recente, contudo, o uso de ceras em frutas cítricas foi utilizado desde os séculos XII e XIII na China, para retardar a desidratação e melhorar a aparência das mesmas (FAKHOURI *et al.,* 2007).

O uso de filmes/revestimentos alimentícios baseados em polímeros naturais, reconhecidos como seguros, tem aumentado na indústria alimentar (FRATARI *et al.,* 2021). Isto tem ocorrido em função da demanda de alimentos com alta qualidade, pela crescente preocupação ambiental sobre descarte de materiais não renováveis e também pela oportunidade de novos mercados (FAKHOURI *et al.,* 2007; PINHEIRO *et al.,* 2010; FRATARI *et al.,* 2021). Além disto, estes produtos podem colaborar na segurança dos alimentos em relação a contaminação microbiana e, assegurar proteção contra diferentes fatores externos (vapor de água, oxigênio e umidade), auxiliando na conservação e consequente prolongamento da vida útil de alimentos frescos e processados. Também podem ser incorporados com compostos ativos como antioxidantes, antimicrobianos, corantes, aromas, nutrientes e especiarias, melhorando as propriedades funcionais (PINHEIRO *et al.,* 2010). Recentemente, os filmes/revestimentos edíveis contendo substâncias antimicrobianas como extratos naturais, óleos essenciais, bacteriocinas, metais ou sistemas enzimáticos têm sido avaliados como uma alternativa de embalagem visando melhorar a segurança de produtos alimentícios com redução da contaminação e decomposição de produtos alimentícios perecíveis, principalmente peixes, carnes, frutas e legumes (VALDÉS *et al.*, 2017).

Os filmes/revestimentos comestíveis são obtidos pelo emprego de uma grande variedade de biopolímeros, originários de várias fontes naturais, sendo caracterizados pela sua complexidade estrutural e diversidade funcional (PINHEIRO *et al.,* 2010). Estes biopolímeros são classificados como polissacarídeos, proteínas e lipídeos, sendo completamente biodegradáveis e considerados seguros para o consumo humano (VILLADIEGO *et al.*, 2005).

Os polímeros naturais podem ser uma fonte alternativa para o desenvolvimento de embalagens devido à ausência de sabor e biodegradabilidade. Os polímeros comestíveis surgiram como substitutos do plástico sintético para aplicações em alimentos e, têm recebido atenção significativa nos últimos anos por causa de suas vantagens em relação ao polímero sintético. (SHI; SHAH, 2014). As vantagens do uso de embalagens comestíveis são diversas, como redução do desperdício alimentar, através da utilização de subprodutos; melhoraria da estabilidade, qualidade e segurança; e conveniência dos produtos embalados, diminuindo consequentemente as perdas de alimento ao longo da cadeia alimentar (FONTE; MACHADO; REAL, 2021).

Filmes/revestimentos comestíveis, a base de polissacarídeos, são preparados, principalmente, empregando-se celulose e seus derivados, como éteres e ésteres, amidos, pectinas e gomas. Os produtos à base de celulose têm sido aplicados para retardar a perda de qualidade em frutas frescas, como tomates, cerejas, morango, manga e banana. A quitosana, derivada de exoesqueletos de crustáceos, é outro polissacarídeo muito utilizado no controle da deterioração pós-colheita de frutas e vegetais frescos. Polissacarídeos capazes de formar géis como as pectinas, alginatos e gomas (carragena, xantana, gelana, etc.) também são empregados de forma consistente (KAMAL, 2020).

Resumidamente pode-se dizer que o uso de embalagens comestíveis apresenta vantagens significativas como: i) possibilidade de consumo com ou como parte do produto alimentar; ii) atuação como portadoras de aditivos alimentares específicos (antimicrobianos, agentes antioxidantes, aromatizantes, etc.); iii) uso para inibição de umidade, migração de oxigênio ou dióxido de carbono; iv) aprimoramento da integridade mecânica; iv) serem biodegradáveis; v) simplicidade de produção e baixo custo; e vii) proteção contra contaminação externa por microrganismos (SUPUT *et al.,* 2015; CARRASCO; GANDRA; CHIM, 2019; FONTE; MACHADO; REAL, 2021). Nesta perspectiva, pode-se considerar que usar este tipo de embalagem é uma tendência promissora, com sucesso em alimentos diversos como frutas e vegetais (RAGHAV; ÁGARWAL; SAINI, 2016; FRATARI *et al*., 2021), carne e aves (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al*., 2014); queijos (COSTA *et al*., 2018a; GOULART *et al.*, 2019), entre outros.

Com estes fatos em mente, justifica-se a importância do desenvolvimento de um revestimento comestível com bacteriófagos para o biocontrole de queijos Minas meia cura, de modo a contribuir para a melhoria de sua qualidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver revestimento comestível incorporado com bacteriófagos líticos para biocontrole *de Salmonella enterica* em queijos tipo Minas meia cura.

3.2. Objetivos específicos

- Propagar e purificar e determinar a concentração efetiva de fagos líticos contra *Salmonella enterica* para uso em revestimento comestível;

- Desenvolver e caracterizar o revestimento comestível para uso em queijos Minas meia cura para combater a contaminação microbiológica superficial de *S. enterica*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

A água empregada nas preparações foi purificada em ultrapurificador (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil) com resistividade final de 18,2 $M\Omega.cm^{-1}$ e condutividade de 0,05 $\mu S.cm^{-1}$.

Especificamente, para o preparo do filme edível, foram usados alginato de sódio de baixa viscosidade (300-400 cps) da Vetec (Duque de Caxias/ RJ, Brasil), d-glucono-δ-lactona (GDL) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$), ambos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

Para os ensaios microbiológicos, os meios de cultura empregados foram meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) e ágar marca Kasvi Produtos para Laboratório (São José dos Pinhais/ PR, Brasil). Para o preparo do tampão fágico foram utilizados NaCl marca Synth (Diadema, SP, Brasil), Tris-base (Tris-hidroximetil aminometano) marca Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA), ácido clorídrico (HCl) e sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4$. 7 H_2O), ambos da marca Synth (Diadema/ SP, Brasil).

O queijo Minas tipo meia cura escolhido foi da microrregião do cerrado do estado Minas Gerais, Brasil, da marca Nata de Ouro, da Fábrica de Laticínios Comercial Reis & Melo do Município de Cruzeiro da Fortaleza/MG com registro no Ministério da Agricultura SIF/DIPOA (Serviço de Inspeção Federal/ Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal) sob número 0002/1624. Os queijos foram adquiridos no comércio local da cidade de Sorocaba/SP em casas especializadas.

4.1.2. Material Biológico

A linhagem de *Salmonela enterica* Cefar CCCD-S004 (Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica) foi graciosamente doada pela Cefar (São Paulo/SP, Brasil), e reativada seguindo as indicações do fornecedor.

Os bacteriófagos utilizados foram isolados de águas de descarte da indústria de alimentos "AB Brasil - Indústria e Comércio de Alimentos Ltda", localizada em Sorocaba/SP (Brasil), em trabalho de pesquisa desenvolvido no laboratório Phagelab (OLIVEIRA, 2021) e gentilmente cedidos. Foram isolados dois bacteriófagos diferentes, sendo nomeados PhL_UNISO_AB-ATC_ph0036 e PhL_UNISO_AB-ATC_ph0046. Para facilidade, definiu-se utilizar as denominações fago 36 e fago 46 ao longo desta dissertação.

4.1.3. Equipamentos

Para a reativação da bactéria *Salmonela enterica* e a propagação e purificação dos bacteriófagos os equipamentos empregados foram:

- cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil);
- cabine de segurança biológica classe II B2 (Filterflux, Piracicaba/ SP, Brasil);
- autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Prismatec, Manaus/AM, Brasil);
- estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo/SP, Brasil);
- Stericup® com membrana de poliétersulfato (PES) com diâmetro de poro de 0,22 µm (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemanha);
- centrífuga Eppendorf® (modelo AG 22331, Hamburgo, Alemanha).

Para a purificação da água utilizada nos ensaios empregou-se:

- Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil).

Para o preparo do filme comestível e demais ensaios foram utilizados:

- agitador mecânico com aquecimento (modelo TE 0181, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasil);
- agitador magnético (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo/SP, Brasil);
- balança analítica (Marte Científica, modelo OHAUS AS200S, Santa Rita do Sapucaí / MG, Brasil);
- microscópio eletrônico de transmissão (JEOL modelo JEM-1011, Tokio, Japão) equipado com câmera digital (Gatan Microscopy Suite, modelo Digital Inc., Houston TX, EUA);
- espectrofotômetro UV- Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA);
- texturômetro TA XT plus Texture Analyser da Stable Micro Systems (Godalming, Reino Unido);
- calorímetro tipo diferencial de varredura (modelo DSC-60 Marca Shimadzu (Kioto, Japão);

- espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo IRAffinity da Shimadzu (Kioto, Japão);
- banho de ultrassom (modelo USC-3380A, UNIQUE, Indaiatuba/SP, Brasil);
- espectrofotômetro de fluorescência de raios-X com dispersão de energia (XRF) da marca Amptek (Bedford, Massachusetts, EUA);
- tomógrafo por transmissão de raios-X marca SKYSCAN/Bruker modelo 1176, empregando *software* para o processamento das imagens tomográficas CTVox™ (versão 2.6.0 r908-64bit, da Bruker microCT) e CTan™ (versão 1.13.5.1-64bit, da Bruker microCT) e CTvol (versão 2.2.3.0-64 bits, da Bruker microCT);
- paquímetro com resolução de 0,001 mm (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda, São Pulo, Brasil).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo de meios de cultura e tampão fágico

Os meios de cultura foram preparados de acordo com os procedimentos abaixo descritos, sendo:

Caldo Tryptic Soy Broth (TSB): pesou-se 24g do meio e dissolveu- se em cerca de 300 mL de água ultrapura. Na sequência, completou-se o volume para 800 mL com água ultrapura e o meio foi esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121°C. Após arrefecimento até à temperatura de 40 °C, distribuiu-se assepticamente o meio de cultura em tubos de ensaio estéreis com 5 mL, 10 mL, 25 mL, os quais foram armazenados em refrigerador (2 - 8 °C) até o momento de uso. Este meio de cultura foi utilizado para a preparação da suspensão bacteriana.

Meio sólido Tryptic Soy Ágar (TSA): Foi pesado 24g de meio TSB e 9,6g de ágar e adicionado água ultrapura até o volume de 800 mL. Em seguida, o meio foi autoclavado por 30 minutos a 121 ºC. Após autoclavado o meio foi vertido em placas de Petri estéreis descartáveis, as quais foram armazenadas em refrigerador (2 - 8 ºC).

Meio líquido Molten Top-Ágar (MTA-TSB): Pesou- se 15g de TSB e 3g de ágar e dissolveu-se em água ultrapura para um volume de 500 mL. O meio foi autoclavado (30 minutos a 121 ºC) e, posteriormente armazenado, até o momento de uso, em estufa a 40 ± 2 ºC para mantê-lo na

fase líquida. Esse meio foi empregado como meio de cobertura para fazer o tapete bacteriano pelo método de *Pour plate.*

Tampão fágico: Pesou-se 6,06 g de Tris-base (Sigma-Aldrich / lote SLBV9067) e dissolveu-se em 50 mL de água purificada. A essa solução, ajustou- se o pH para 7,5 com ácido clorídrico (HCl). Depois foram pesados 5,8g de cloreto de sódio (NaCl) e 2g de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4$. 7 H_2O), que foram adicionados aos 50 mL de solução preparada de Tris-base à pH 7,5. Completou-se com água ultrapura para 1000 mL. O tampão foi esterilizado em autoclave (30 minutos a 121 ºC) e estocado em refrigerador (2- 8ºC).

4.2.2. Preparação da suspensão bacteriana de *Salmonella enterica*

As cepas de *S. enterica* foram reativadas conforme orientações do fornecedor. O conteúdo liofilizado foi diluído com 1,0 mL de soro salino e depois em 5 mL de caldo TSB estéril. O tubo contendo o inóculo foi incubado a 37 °C por 24 horas. Após esse período retirou-se 50 µL dessa suspensão e, novamente foi adicionado em 5mL de caldo TSB estéril e, novamente, incubado a 37 °C por 24 horas.

Para a manutenção das cepas, da última suspensão, uma alíquota foi passada em uma placa de Petri, com o auxílio de um *swab*, a qual continha meio TSA e incubada a 37°C. Repetidas vezes foram realizados esses processos durante todo o desenvolvimento do projeto para a manutenção da viabilidade da bactéria.

4.2.3. Cultura bacteriana em tapete pela técnica em ágar de dupla camada

Foi adicionada uma alíquota de 100 µL de suspensão bacteriana de *S. enterica* (OD_{600nm} = 1,0) em 5 mL de meio MTA-TSB mantido previamente a 40 ± 2 °C, em tubo de ensaio de 15 mL. A suspensão resultante foi suavemente homogeneizada por agitação orbital e imediatamente vertida em placa de Petri contendo meio TSA sólido, a qual foi incubada a 37 °C por 12h obtendo-se um crescimento uniforme da cepa.

4.2.4. *Spot test*

Com uma micropipeta semiautomática introduziu-se um volume de 10 µL da suspensão da solução concentrada de fago em placa de Petri contendo bactérias *S. enterica* preparada pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Na sequência, a placa foi incubada por 12h em estufa a 37 °C. A formação de halo de inibição de crescimento bacteriano foi indicativa da presença e viabilidade de bacteriófagos líticos para *S. enterica* oriundos da solução concentrada

de fagos obtida previamente em pesquisa anterior (OLIVEIRA, 2021). Este ensaio foi realizado para os fagos 36 e 46.

4.2.5. Amplificação de bacteriófagos

Em cinco (5) Erlenmeyers com 25mL de meio de cultura TSB estéril adicionou-se, com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota da suspensão de *S. enterica.* Os Erlenmeyers foram levados à estufa sob temperatura de 37ºC por 12 horas. Os inóculos bacterianos utilizados foram preparados de modo a apresentarem densidade ótica de 0,4 (OD-600nm).

No dia seguinte, foram feitas diluições da suspensão bacteriofágica. A primeira diluição foi feita colocando-se 450 µL de tampão fágico em um tubo de vidro estéril com 50 µL da solução bacteriofágica, obtendo-se a primeira diluição (1. 10^{-1}). Na sequência, uma alíquota de 50 µL foi retirada do tubo de diluição 1. 10^{-1} e colocada em outro tubo de vidro estéril com 450 µL de tampão fágico (diluição 1.10^{-2}). O processo foi repetido mais uma vez (diluição1. 10^{-3}). Desta última diluição foram retiradas alíquotas de 10 µL e colocadas nos Erlenmeyers que continham meio de cultura e *S. enterica.* Os Erlenmeyers (contendo fagos mais cepa bacteriana) foram levadas à estufa a 37ºC por 12 horas.

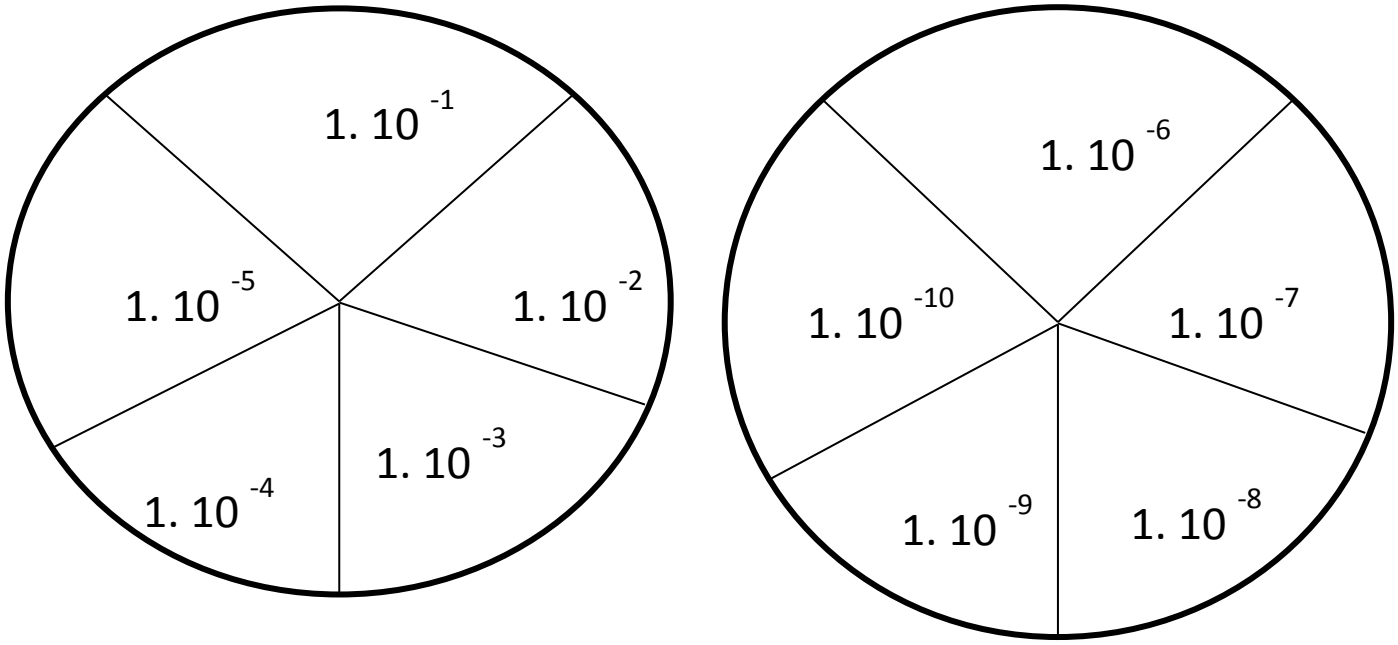
No dia seguinte os conteúdos dos Erlenmeyers foram divididos em tubos Falcon de 15 mL, padronizando-se a quantidade de 10 mL em cada um. Colocou-se 10% de clorofórmio (1mL) em cada tubo e os mesmos foram levados para a centrífuga refrigerada a uma rotação de 2500 rpm por 20 minutos. Após esse procedimento todos os volumes foram filtrados em S*tericup* para purificação da solução, obtendo cerca de 90 mL de solução bacteriofágica para utilização em todos os demais experimentos. Este ensaio foi realizado para os fagos 36 e 46.

4.2.6. Determinação do título fágico

Da suspensão concentrada fágica obtida (após amplificação) foram preparadas diluições seriadas ($1x10^{-1}$ - $1x10^{-10}$). Devido à grande variação do número de microrganismos em uma amostra, a sua contagem torna-se muitas vezes difícil. Assim, para reduzir o número de células na amostra e, possibilitar a contagem são usadas técnicas de diluição e contagem de um número estabelecido, normalmente, entre 20 a 200 Unidades Formadoras de Placas (UFP) (VIEIRA; FERNANDES, 2012). Inicialmente foram retirados 50 µL da suspensão estoque de fagos e transferidos para um tubo Eppendorf® contendo 450 µL de tampão fágico (diluição$1x10^{-1}$). Este processo foi repetido em série até obtenção das diluições desejadas. Na sequência 5 µL 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 3, e deixou-se secar por cerca de 5 min. As placas de Petri foram incubadas a seguir em estufa a 37 °C durante a noite.

Figura 3. Esquema de marcação nas placas de Petri para aplicação das diluições da suspensão concentrada de fagos



Fonte: Elaboração própria

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 a apuração das mesmas, dentro do intervalo de UFP entre 20 e 200 para garantia da precisão na contagem. O número de UFP foi registrado para cada diluição e o título fágico foi obtido empregando-se a Equação 1. Este ensaio foi realizado para os fagos 36 e 46.

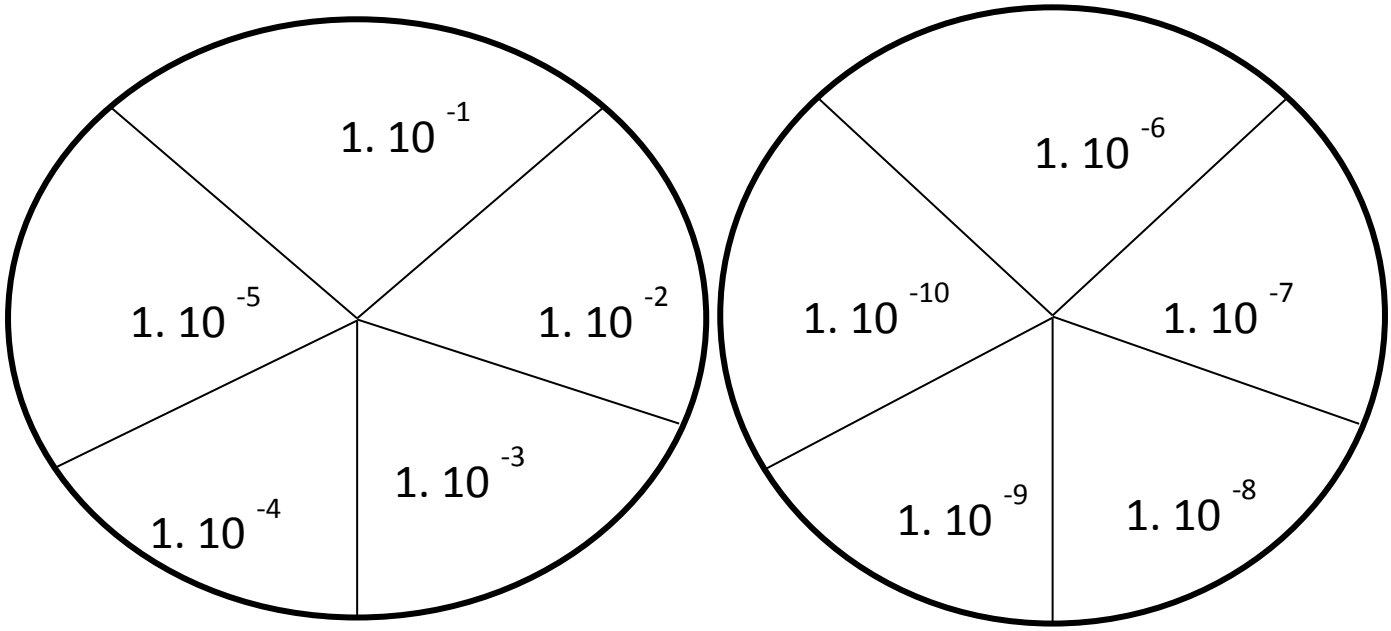
$$\text{Título fágico (UFP)} = \text{número de UFP} \times \frac{1}{\text{diluição}} \times \frac{1}{V} \quad \textbf{(Equação 1)}$$

Onde: UFP = Unidade Formadora de Placas Fágicas; V= volume em mL das diluições fágicas

4.2.7. Determinação do título bacteriano

Da suspensão bacteriana (4.2.2) foram preparadas diluições seriadas ($1x10^{-1}$- $1x10^{-10}$). A diluição tem o objetivo de reduzir o número de células na amostra e possibilitar a contagem (VIEIRA; FERNANDES, 2012). Inicialmente, foram retirados 50 µL da suspensão bacteriana estoque e transferidos para um tubo Eppendorf® contendo 450 µL de meio de cultura TSA ($1x10^{-1}$). Este processo foi repetido em série até obtenção das diluições desejadas. Duas (2) placas de Petri preparadas com meio de cultura TSA foram demarcadas conforme Figura 4.

Figura 4. Esquema de marcação nas placas de Petri para aplicação das diluições da suspensão bacteriana



Fonte: Elaboração própria

Três (3) gotas de cada diluição das bactérias foram colocadas nas identificações correspondentes e as placas foram incubadas a 37ºC por 12 horas. Após o período de incubação, as placas de Petri foram inspecionadas visualmente e, naquelas que apresentavam placas bacterianas (UFC, Unidades Formadoras de Colônias) entre 20 e 200 procedeu-se a contagem. A faixa entre 20 a 200 UFC visa a garantia da precisão (repetibilidade) na apuração. O número de UFC foi registrado para cada diluição e o título bacteriano foi calculado (Equação 2).

$$\text{Título bacteriano } \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}\right) = \text{número de UFC x } \frac{1}{\text{diluição}} \text{ x } \frac{1}{\text{V}} \qquad \textbf{(Equação 2)}$$

Onde: UFC= Unidade Formadora de Colônias; V= volume em mL das suspensões de bactérias inoculadas

4.2.8. Curva de inativação da bactéria hospedeira

Para avaliação da efetividade da ação dos bacteriófagos na presença da bactéria *S. enterica*, foi feito acompanhamento da curva de crescimento ou da inativação do crescimento, por análise espectrofotométrica da densidade ótica (OD-600 nm) de uma suspensão contendo a bactéria (curva controle) e da bactéria na presença dos fagos em duas diferentes proporções. Foram avaliadas as relações entre fago e bactéria através do MOI (do inglês *Multiplicity of Infection*, ou seja, razão vírus/bactérias) de 0,1; 10 e 1000 para o fago 36 e de 0,1; 10; 1000 e 10000 para o fago 46. Foram feitas três replicadas para cada MOI de cada fago.

As curvas de controle foram feitas somente com a bactéria na concentração de $1x10^5$ UFC mL^{-1}. Para a realização da curva controle, primeiro foi feita a reativação da bactéria *S. enterica*. Para isto, foi retirada uma UFC de uma placa de Petri contendo *S. enterica* e colocanda em 5mL de meio de cultura TSB. Incubou-se por cerca de 7 horas (tempo adequado para bactéria entrar em fase exponencial segundo Oliveira (2021)). Na sequência, retirou-se 50 µL da solução bacteriana e adicionou-se em 450 µL de meio TSB em um tubo de vidro estéril. Desde tubo, foram feitas duas diluições subsequentes pelo mesmo procedimento. Desta terceira diluição foram retirados 25µL e adicionados em um Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura TSB, obtendo-se a concentração final desejada ($1x10^5$ UFC mL^{-1}). Deste inóculo, durante doze horas foram retiradas alíquotas de 3 mL e feitas leituras em espectrofotômetro em 600 nm. Nas primeiras 6 horas, a cada 10 minutos e nas demais 6 horas seguintes a cada 30 min. Este experimento foi denominado controle. O mesmo procedimento de leitura das mostras foi feito, acrescentando-se os fagos à solução bacteriana.

Para as curvas de inativação de crescimento foram associados os fagos e bactéria. Para obtenção do volume da suspensão bacteriana e dos volumes das suspensões concentradas de fagos foram empregadas as equações 3 (concentração bacteriana); 4, 5 e 6 (concentração do fago 36) e equações 7, 8, 9 e 10 (concentração do fago 46). Como o volume da suspensão bacteriana obtido foi inadequado para a pipetagem (0,01 µL) foi necessário diluições de uma cultura bacteriana em fase de crescimento exponencial. Assim foram feitas mais duas diluições utilizando 50 µL da suspensão bacteriana e 450 µL de meio TSB.

$$[\,Volume\ da\ suspensão\ bacteriana] = \frac{250 \text{ x } 1.10^{5}}{2{,}29 \text{ x } 1.10^{12}} \text{ x } 1000 \quad \textbf{(Equação 3)}$$

Onde: [Volume da suspensão bacteriana] = Volume da suspensão bacteriana a ser utilizado em mL; 250 = volume final em mL; 1.10^5 = concentração final bacteriana; 2,29 $.10^{12}$ = título bacteriano (4.2.6); x 1000 = conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 36] = \frac{250\ x\ 1.10^{4}}{4{,}6\ x 1.10^{11}}\ x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 4)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 36] = Volume da suspensão de fago 36 a ser utilizado em mL para obtenção de MOI 0,1; 250 = volume final em mL; 1.10^8 = concentração final do bacteriófago 36; 4,6 $.10^{11}$ = título fágico (4.2.6); x 1000 = conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 36] = \frac{250\ x\ 1.10^{6}}{4{,}6\ x 1.10^{11}}\ x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 5)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 36] = Volume da suspensão de fago 36 a ser utilizado em mL para obtenção de MOI 10; 250 = volume final em mL; 1.10^8 = concentração final do bacteriófago 36; 4,6 $.10^{11}$ = título fágico (4.2.6); x 1000 = conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 36] = \frac{250\ x\ 1.10^{8}}{4{,}6\ x 1.10^{11}}\ x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 6)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 36] = Volume da suspensão de fago 36 a ser utilizado em mL para obtenção de MOI 1000; 250 = volume final em mL; 1.10^8 = concentração final do bacteriófago 36; 4,6 $.10^{11}$ = título fágico (4.2.6); x 1000 = conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 46] = \frac{250\ x\ 1.10^{4}}{5{,}0x\ 1.10^{11}} x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 7)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 46] = volume da suspensão de fago 46 a ser utilizado para obtenção de MOI 0,1; 250 = volume em mL final; 1.10^{8} = concentração final do bacteriófago 46; 5,0 $.10^{11}$ = título fágico (4.2.6); x 1000= conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 46] = \frac{250\ x\ 1.10^{6}}{5{,}0x\ 1.10^{11}} x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 8)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 46] = volume da suspensão de fago 46 a ser utilizado para obtenção de MOI 10; 250 = volume em mL final; 1.10^{8} = concentração final do bacteriófago 46; 5,0 $.10^{11}$ = título fágico(4.2.5); x 1000 = conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 46] = \frac{250\ x\ 1.10^{8}}{5{,}0x\ 1.10^{11}} x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 9)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 46] = volume da suspensão de fago 46 a ser utilizado para obtenção de MOI 1000; 250 = volume em mL final; 1.10^{9} = concentração final do bacteriófago 46; 5,0 $.10^{11}$ = título fágico (4.2.6); x 1000 = conversão mL em µL.

$$[Volume\ da\ suspensão\ de\ fago\ 46] = \frac{250\ x\ 1.10^{9}}{5{,}0x\ 1.10^{11}} x\ 1000 \quad \textbf{(Equação 10)}$$

Onde: [Volume da suspensão de fago 46] = volume da suspensão de fago 46 a ser utilizado para obtenção de MOI 10000; 250 = volume em mL final; 1.10^{9} = concentração final do bacteriófago 46; 5,0 $.10^{11}$ = título fágico (4.2.6); x 1000 = conversão mL em µL.

4.2.9. Preparo do revestimento alimentício

O revestimento foi preparado de acordo com as determinações de Harada e colaboradores (2021), pelo método de gelificação interna, com pequenas alterações. A composição e custos estão descritos na Tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Composição e custo dos componentes do revestimento polimérico

Componente	**Quantidade** % (m/m)	**Custo (R$)**
Alginato de sódio	1,500	1,26[a]
d-glucono-δ-lactona (GDL)	0,860	1,46 [a]
Carbonato de cálcio	0,040	0,0012[a]
Suspensão fago 46 (MOI 10000)	0,500 (500 µL)	**
Suspensão fago 36 (MOI 1000)	0,055 (55 µL)	**
Água ultrapura	97,045	**
Total	100,000 %	2,72

MOI = multiplicidade da infeção ou razão vírus/ bactérias

[a] = valores dos reagentes obtidos em https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt na data de 10/2/2022. Valores expressos em Real – Brasil.

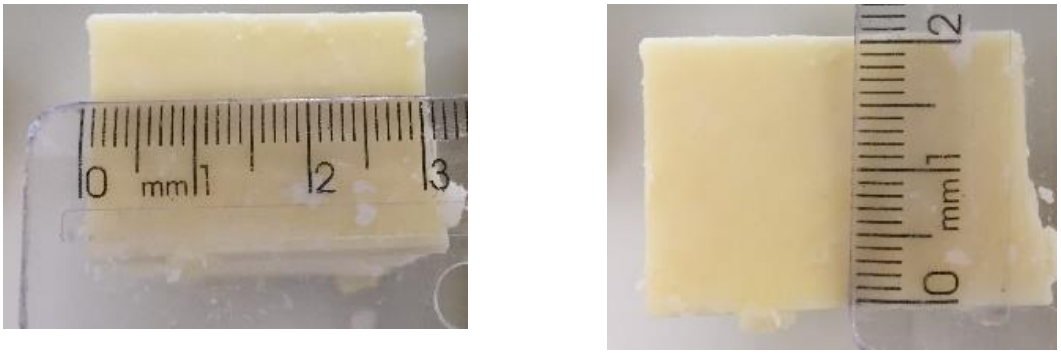
Fonte: Elaboração própria

Para o preparo do revestimento edível foi pesado 1,5 g de alginato de sódio e dissolvido em cerca de 90 mL de água ultrapura. O alginato de sódio foi homogeneizado em agitador magnético (≅500 rpm) com aquecimento (60 ± 5ºC) por 30 min. Após esse período, acrescentou-se 0,86 g de GDL e, sem aquecimento, agitou-se por mais 30 min. Na sequência, a mistura foi levada ao ultrassom para a retirada das bolhas formadas. Paralelamente, pesou-se 1g de carbonato de cálcio e dissolveu-se em 5 mL de água ultrapura com agitação manual. Desta solução, retirou-se 200 µL e adicionou-se à solução de alginato de sódio e GDL e homogeneizou-se manualmente. Na sequência, incorporou-se suavemente volumes das suspensões concentradas dos bacteriófagos 36 e 46, de modo a obter uma concentração de 10^8 para o fago 36 (MOI 1000); e de 10^9 para o fago 46 (MOI 10000), considerando os títulos de cada fago e completou-se o volume para 100 mL. Os MOIs utilizados foram aqueles que obtiveram a melhor resposta na inativação da bactéria hospedeira (item 2.4.8), considerando

uma concentração bacteriana de 1.10^5 UFC mL^{-1}. Para a determinação da quantidade de fagos (volume das suspensões bacterianas) a serem incorporados no filme, estabeleceu-se uma "possível" contaminação de 1.10^5 UFC no queijo. Foram determinados os volumes das suspensões fágicas considerando-se o título das suspensões e a relação entre fagos e bactérias (MOI) de 1000 para o fago 36 e 10.000 para o fago 46. A contaminação estimada é superior ao estabelecido em legislação para que o filme pudesse ser capaz de garantir eficácia em relação a salmonela. A legislação nacional estabelece ausência de salmonelas em queijos de média umidade (igual ou acima de 46%) como os queijos curados (BRASIL, 2019a e 2019b).

O revestimento preparado foi colocado em um recipiente e as amostras de queijos mergulhadas. Aproximadamente 500g de queijo foram submersos na formulação citada. As amostras foram feitas cortando-se os queijos em pedaços de aproximadamente 3cm x 2cm conforme imagens da Figura 5.

Figura 5. Imagens das amostras de queijos obtidas por corte de um queijo Minas meia cura



Fonte: Elaboração própria

Os pedaços de queijos foram deixados em contato com a formulação filmogênica por cerca de 30 segundos. A seguir, os pedaços foram retirados e colocados em uma grade para escorrer o excesso (Figura 6). As amostras de queijo foram mantidas em temperatura ambiente por 12 horas até a completa polimerização do revestimento. Depois, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente (15 ºC a 30 ºC) até a realização das análises.

Figura 6. Amostras de queijos com o revestimento aplicado

Fonte: Elaboração própria

4.2.10. Espessura

A espessura dos revestimentos foi determinada utilizando-se um paquímetro com resolução de 0,001 mm. A espessura foi calculada pela média aritmética de 5 medidas aleatórias sobre a área de cada filme revestimento (FAKHOURI *et al*., 2007).

4.2.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica foram feitas utilizando microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro (200 Å de espessura) por pulverização catódica sobre uma camada de carbono produzida por evaporação em um dispositivo de metalização.

4.2.12. Tomografia por transmissão de raios-X (XRT)

As imagens da análise tomográfica por transmissão de raios-X foram obtidas usando tomógrafo com tensão de operação ajustada a 35 kV e corrente elétrica com 800 μA com filtro de alumínio de espessura de 0,54mm e resolução espacial de 10 um.

4.2.13. Espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram coletados na região de número de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1}.

4.2.14. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 30 mL min^{-1}, razão ou velocidade de aquecimento de 10 ºC min^{-1}, faixa de aquecimento de 25 ºC a 250 ºC. Empregou-se cadinho de alumínio e massa de amostra em torno de 2 mg.

4.2.15. Fluorescência de raios-X (XRF)

A composição elementar do revestimento polimérico foi determinada utilizando um espectrofotômetro de fluorescência de raios-X com dispersão de energia (XRF) composto por um ânodo de prata (Ag) e um detector de raios X de 25 mm^2 de diâmetro do tipo SDD (Silicon-Drift Detector) com uma resolução média em energia de 128 eV na linha Mn-Kα. A tensão aplicada ao tubo de raios X variou foi 10 kV a 50 kV, dependendo do conjunto de elementos químicos analisados e com corrente variável regulada automaticamente pelo *software* do equipamento.

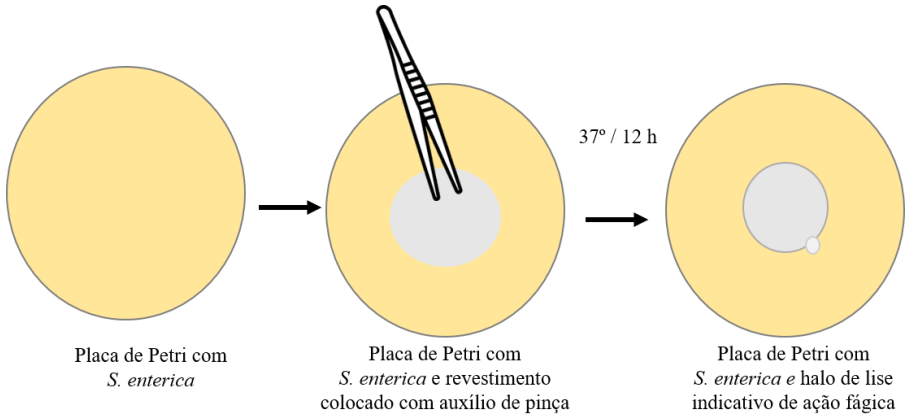
4.2.16. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas do revestimento foram avaliadas através dos ensaios de perfuração, relaxação, tração e resiliência, utilizando-se amostras livres de imperfeições físicas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os parâmetros utilizados foram de 5 mm de distância para o ensaio de perfuração e de 2 mm para os ensaios de resiliência e relaxação com calibração utilizando força máxima de 5kgf (quilograma-força) para todos os ensaios.

4.2.17. Atividade lítica

A determinação da atividade lítica do revestimento foi realizada colocando-se uma amostra do revestimento polimerizado sobre uma placa de Petri contendo a *S. enterica* cultivada na forma de tapete. Após colocação do revestimento, incubou-se a 37ºC por 12 horas e observou-se a formação de halos de lise indicativo de atividade fágica. A Figura 7 ilustra o procedimento.

Figura 7. Desenho ilustrativo da aplicação do revestimento em placa de Petri para avaliação da atividade lítica



Fonte: Elaboração própria

4.2.18. Citotoxicidade pelo método de difusão em ágar

As linhagens de células HaCat (Queratinócitos Humanos Imortalizados do inglês *Human immortalized keratinocytes)* e 3T3 (Fibroblastos Embrionários de Camundongo), foram colocadas em placas de Petri de 60 mm (separadamente), na concentração de 1,5 x 10^5 células mL^{-1} empregando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro fetal bovino a 10% (m/m), por um período de 48 horas a 37 ºC, em uma câmara de incubação com 5% de CO_2. Posteriormente, o meio líquido foi descartado e meio sólido *overlay* (meio Eagle 2x concentrado, ágar a 1,8% (m/m) contendo 0,01% (m/m) de vermelho neutro como corante vital) foi adicionado sobre a cultura de células bacterianas. Após solidificação, as amostras foram colocadas no centro da placa e incubadas por 24 horas a 37 ºC, em ambiente com 5% de CO_2. As leituras das placas foram feitas macroscopicamente, onde a presença de citotoxicidade era observada pela formação (ou não) de um halo claro em torno da amostra, correspondendo às células mortas. O grau de citotoxicidade é indicado de acordo com a Tabela 2 (ISO, 2009).

Tabela 2. Graus de reatividade biológica para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar de acordo com a Norma ISO 10993-5/2009

Grau	Reatividade	Aparência da zona de reatividade	Efeito citotóxico
0	Nenhuma	Zona não detectável sob ou ao redor da amostra.	Negativo
1	Leve	Algumas células malformadas ou degeneradas sob a amostra.	Negativo
2	Branda	Zona limitada a área sob a amostra.	Negativo
3	Moderada	Zona estendendo-se até 1 cm da amostra.	Positivo
4	Grave	Zona estendendo-se por mais de 1 cm da amostra.	Positivo

Fonte: ISO, 2009

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

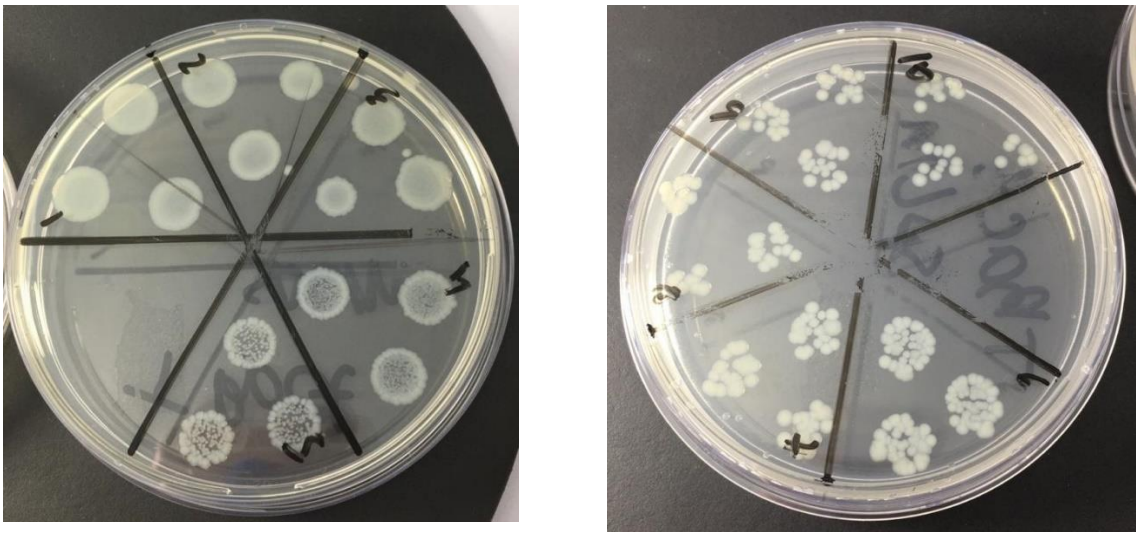
5.1. Preparo da solução fágica e ativação da bactéria hospedeira

O objetivo desta pesquisa foi a elaboração de um revestimento comestível incorporado com bacteriófagos líticos para o biocontrole da *Salmonela enterica* em queijos Minas tipo meia cura. Neste sentido, a primeira etapa foi o preparo da solução fágica e ativação da bactéria hospedeira, uma vez que os bacteriófagos são parasitas obrigatórios (LOBA, 2014).

Foram feitas a reativação da bactéria *S. enterica*, sua manutenção e a determinação de sua concentração ou título bacteriano. Como relatado, a cultura foi reativada conforme determinações do fabricante e periodicamente repicada. A técnica de repique contínuo, subcultivo ou repicagem periódica é um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratório, que foi empregada pela facilidade laboratorial apresentada (SOLA *et al*., 2012).

Na sequência determinou-se o título bacteriano, ou seja, a concentração bacteriana. O método envolveu plaqueamento de volumes de várias diluições de amostra em uma única placa, incubação e contagem de colônias ou placas. Este método (*spot-titer*) tem várias vantagens sobre outros métodos (técnica de espalhamento ou técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada) exigindo menos tempo e menos materiais. Além disto, como a amostra é distribuída em pontos distintos, a contagem de colônias / placas é mais rápida e menos trabalhosa (BECK *et al*., 2009). O resultado foi uma concentração bacteriana de 2,29. 10^{12} UFC mL^{-1}, indicando que a reativação, bem como a manutenção das cepas foram realizadas adequadamente. A Figura 8 apresenta as placas de Petri com as UFC obtidas no ensaio. O título bacteriano foi utilizado para a fazer as curvas de morte e determinar a melhor concentração de fagos a ser utilizada no preparo dos filmes.

Figura 8. Imagens fotográficas de placas de Petri contendo as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. enterica* obtidas na determinação do título bacteriano



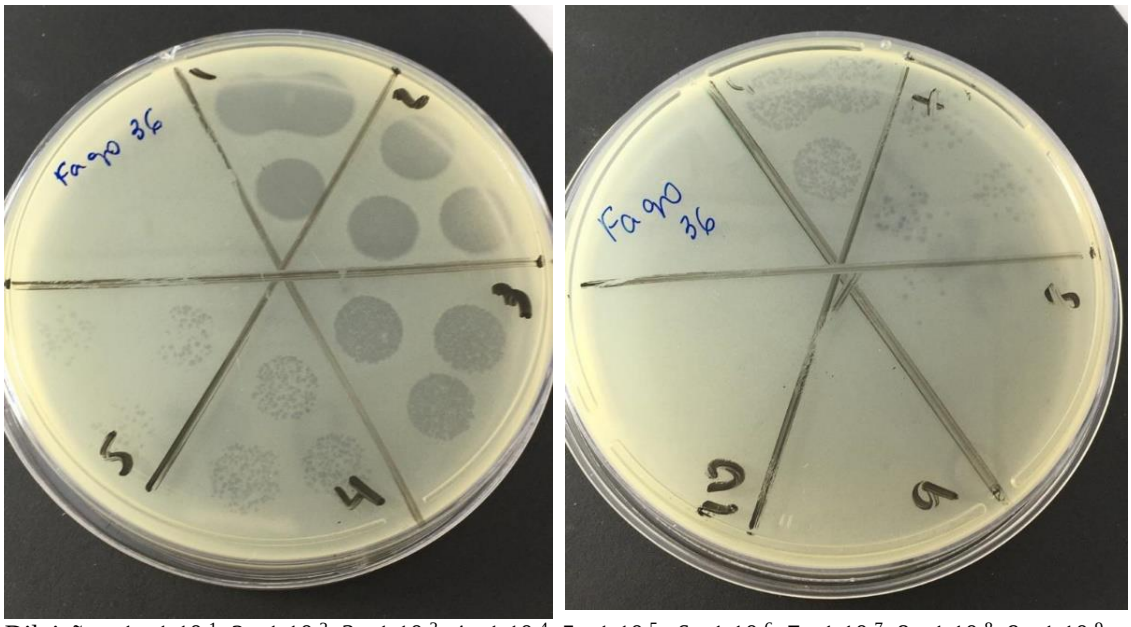
Diluições: 1= 1.10^{-1}; 2= 1.10^{-2}; 3= 1.10^{-3}; 4= 1.10^{-4}; 5= 1.10^{-5}; 6= 1.10^{-6}; 7= 1.10^{-7}; 8= 1.10^{-8}; 9= 1.10^{-9}; 10= 1.10^{-10}

Fonte: Elaboração própria

Na sequência foram realizadas amplificação e purificação de bacteriófagos, anteriormente já isolados de águas residuais. Foram utilizados dois diferentes bacteriófagos, uma vez que, o uso de uma associação de fagos, ou seja, um coquetel de fagos aumenta a eficácia de ação dos fagos contra as bactérias e pode reduzir a indução da resistência bacteriana (FAZZINO *et al*., 2020).

Os processos de amplificação e purificação foram realizados na presença de células hospedeiras específicas (*S. enterica*), envolvendo metodologias já consagradas para o propósito (CARVALHO *et al*., 2017; SKARADZÍNSKA *et al.,* 2020). Vikram, Woolston e Sulakvelidze (2021) analisando diferentes trabalhos empregando fagos para biocontrole bacteriano em alimentos relataram que, para uma redução efetiva da concentração bacteriana, é necessária uma concentração adequada de bacteriófagos. Contudo, a concentração pode variar dependo de fatores como o patógeno envolvido, temperatura e tempo de contato. Zuber e colaboradores (2008) conseguiram esterilizar efetivamente um caldo contaminado com patógenos entre 10^6 e 10^2 UFC ml^{-1} utilizando com concentração de bacteriófagos na ordem de 10^8 UFP mL^{-1}. Os títulos encontrados do fago 36 e do fago 46 foram de $5{,}00.10^{11}$ UFP mL^{-1} e $4{,}60.10^{11}$ UFP mL^{-1}, respectivamente. Estes valores indicaram que a amplificação foi realizada com sucesso conseguindo concentrações adequadas de fagos para o uso desejado. As Figuras 9 e 10 apresentam imagens de placas de Petri com UFP dos bacteriófagos 36 e 46, respectivamente.

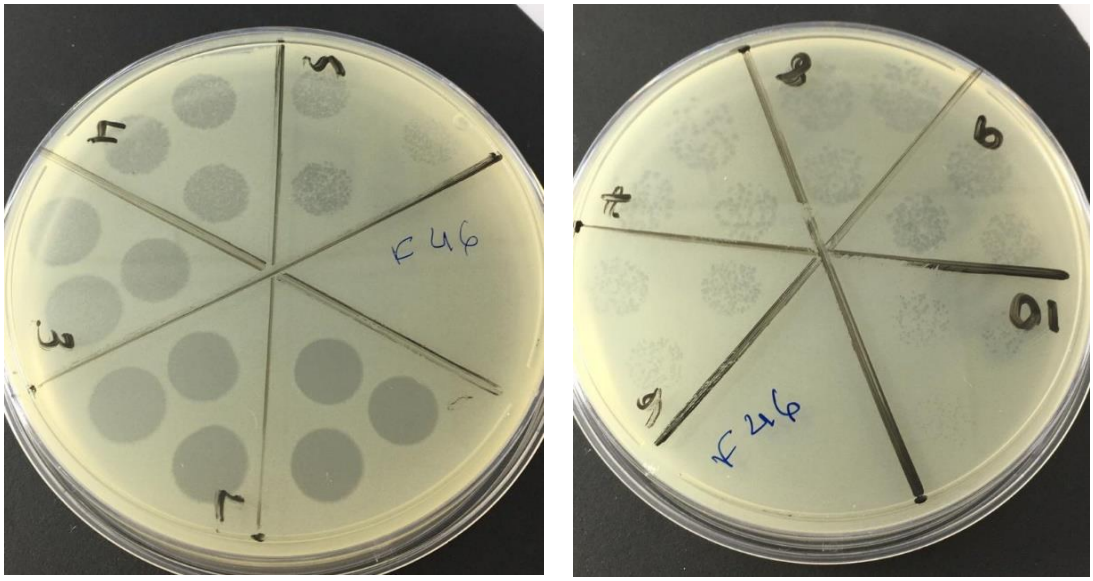
Figura 9. Imagens fotográficas de placas de Petri contendo as Unidades Formadoras de Placas (UFP) do bacteriófago 36 obtidas na determinação do título fágico.



Diluições: 1= 1.10^{-1}; 2= 1.10^{-2}; 3= 1.10^{-3}; 4= 1.10^{-4}; 5= 1.10^{-5} ; 6= 1.10^{-6}; 7= 1.10^{-7}; 8= 1.10^{-8}; 9= 1.10^{-9}; 10= 1.10^{-10}

Fonte: Elaboração própria

Figura 10. Imagens fotográficas de placas de Petri contendo as Unidades Formadoras de Placas (UFP) do bacteriófago 46 obtidas na determinação do título fágico.

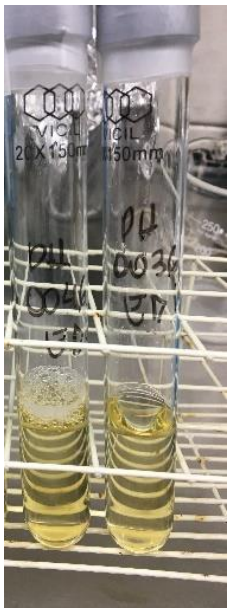


Diluições: 1= 1.10^{-1}; 2= 1.10^{-2}; 3= 1.10^{-3}; 4= 1.10^{-4}; 5= 1.10^{-5}; 6= 1.10^{-6}; 7= 1.10^{-7}; 8= 1.10^{-8}; 9= 1.10^{-9}; 10= 1.10^{-10}

Fonte: Elaboração própria

As etapas de purificação e filtragem posteriores são cruciais para garantir um mínimo de debris celulares bacterianos, partículas fágicas incompletas, entre outros compostos. No entanto, endotoxinas podem ainda estar presentes na suspensão final (LOBA, 2014). A Figura 11 apresenta as suspensões fágicas obtidas ao final dos processos de amplificação, purificação e filtração. As suspensões mostraram-se límpidas, o que pode ser um indicativo positivo de usa pureza. As suspensões fágicas foram armazenadas em Eppendorfs® em refrigerador (2 - 8 °C) até o momento de uso.

Figura 11. Suspensões fágicas (fagos 36 e 46) obtidas após os processos de amplificação, purificação e filtragem

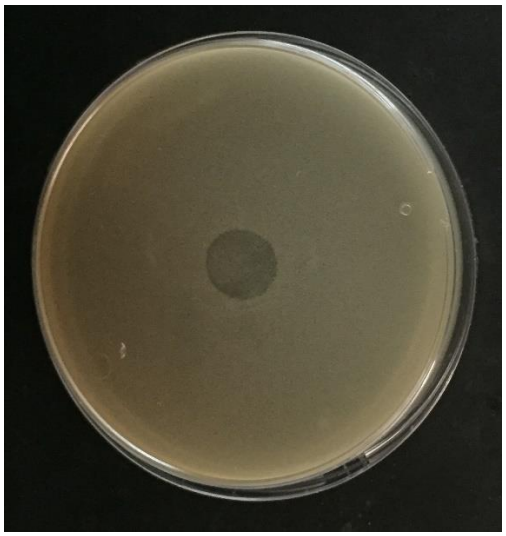


Fonte: Elaboração própria

Para o emprego no revestimento polimérico é necessário que o bacteriófago mantenha sua atividade lítica. Fatores como pH e temperatura, são cruciais para a manutenção da viabilidade do fago (TEY *et al.,* 2014). Desta forma, para verificar sua eficácia frente a *Salmonella enterica*, periodicamente, se fez necessário a realização de *Spot test*. Em todos os ensaios realizado os fagos mantiveram-se ativos, ou seja, provocaram a lise bacteriana. A Figura 12 mostra um halo formado sobre uma cultura de *S. enterica* feito com o coquetel de fagos (fagos 36 e 46). Os fagos 36 e 46 foram integrados no revestimento polimérico, numa

espécie de “coquetel de fagos”. O uso de vários fagos líticos contra uma estirpe bacteriana é mais interessante em comparação com o uso de um único tipo de fago, pois entre outras vantagens, pode retardar a resistência da bactéria aos fagos (CHAN; ABELON; CARRILO, 2013).

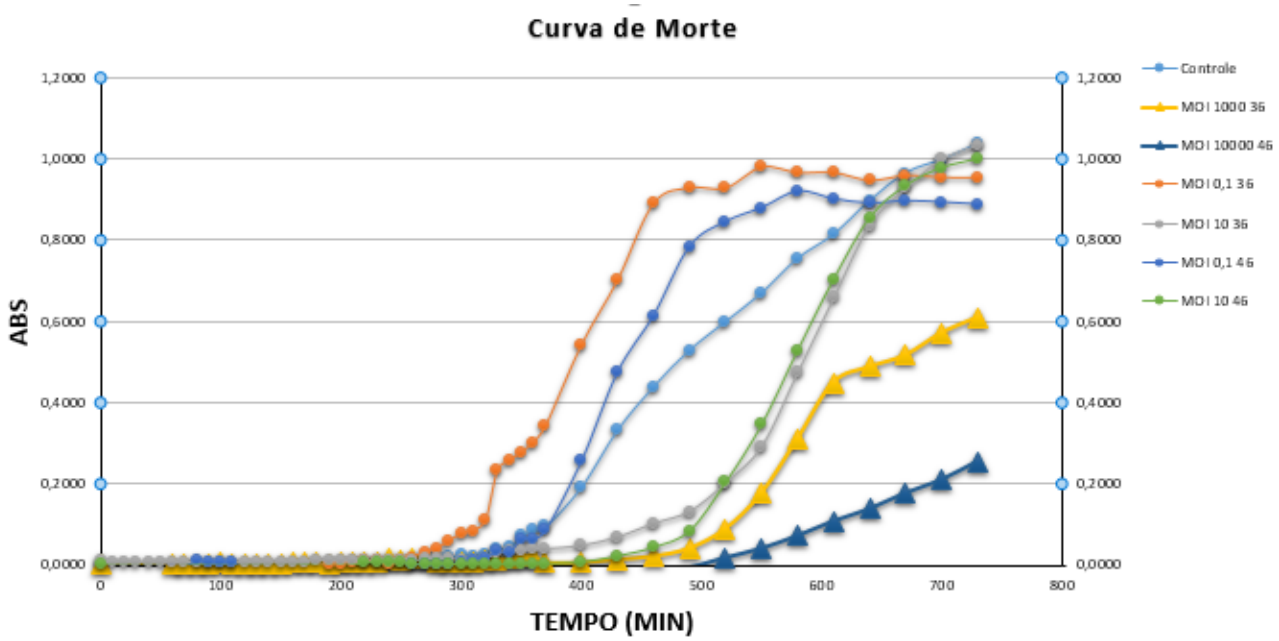
Figura 12. Imagem fotográfica de *Spot test* com coquetel fágico (fagos 36 e 46) com a formação de lise bacteriana



Fonte: Elaboração própria

A etapa seguinte foi a determinação do MOI (razão vírus/bactéria) mais adequada de cada fago para incorporação no revestimento alimentício, de modo que, o revestimento fosse eficaz no controle de uma possível contaminação por *S. enterica*. Para isto foram feitas curvas de morte, para observar o decréscimo da população bacteriana frente os fagos em diferentes relações (diferentes MOIs). A Figura 13 apresenta as curvas de morte realizadas e, pode-se perceber, que os melhores resultados foram, para fago 36 o MOI 1000 e, para o fago 46 o MOI 10000 em comparação com uma curva controle.

Figura 13. Curvas de morte realizadas para os fagos 36 e 46 com diferentes relações vírus/bactérias (MOIs) (n=3) em comprimento de onda de 600 nm



Fonte: Elaboração própria

A bactéria *S. enterica* utilizada teve sua cinética de crescimento determinada no trabalho de Oliveira (2021) que indicou início da fase de crescimento exponencial em aproximadamente 7 horas, semelhante ao observado no experimento realizado.

O método utilizado (turbidimetria), é um método indireto de contagem de bactérias. A turvação do meio indica a quantidade de massa (bactérias) que pode ser medida por variância da quantidade de luz absorvida, transmitida ou espalhada (BOMBARDI, 2017).

Pode-se observar que em 500 min (≅ 8 horas) os ensaios com os fagos 36 em MOI1000 e 46 em MOI 10000 apresentaram redução de absorbância em relação ao ensaio controle e também em relação às demais concentrações estudadas. Isto indicou que houve redução significativa das partículas bacterianas em função da atividade fágica. A capacidade infecciosa da bactéria é reduzida na presença dos bacteriófagos. Após 12 horas de tratamento, a taxa de inativação bacteriana ainda era consideravelmente alta. Neste sentido, o revestimento contendo os fagos poderá proteger o alimento do crescimento bacteriano nas concentrações definidas.

5.2. Desenvolvimento e caracterização do revestimento comestível

Mais recentemente, tem ocorrido um aumento significativo da literatura científica na área das embalagens comestíveis e, da sua aplicação na indústria alimentar. Porém, a aceitação de

filmes comestíveis pelo consumidor depende de fatores tais como propriedades funcionais adequadas, a aparência da embalagem, propriedades organoléticas, preço, entre outros aspectos (FONTE; MACHADO; REAL, 2021). O valor aproximado do revestimento produzido, neste trabalho representou cerca de 7,8% do valor final do alimento (queijo tipo Minas meia cura), mas a embalagem pode representar em torno de 25% do custo final de um produto (DURE; BAUMHARDT, 2012). Nesta perspectiva, o uso do revestimento desenvolvido seria viável. Contudo, a produção dos fagos em quantidade suficiente ainda é um empecilho e, o custo para a produção de fagos em grande volume é difícil de ser mensurado. Nos últimos anos, vários projetos foram publicados sobre o uso bem-sucedido de bacteriófagos no combate a bactérias patogênicas em diferentes áreas, como segurança dos alimentos, agricultura, aquicultura e saúde humana. No mundo, várias empresas estão comercializando bacteriófagos ou produtos à base de bacteriófagos, no entanto, esta tecnologia ainda está em desenvolvimento e há desafios a serem superados para a produção em larga escala (GARCIA *et al*., 2019).

O revestimento edível foi preparado com alginato de sódio por gelificação inotrópica. O alginato de sódio foi escolhido por suas interessantes características ligadas a biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade no contato *in vivo* e capacidade de gelificação (MANJULA *et al.*, 2013).

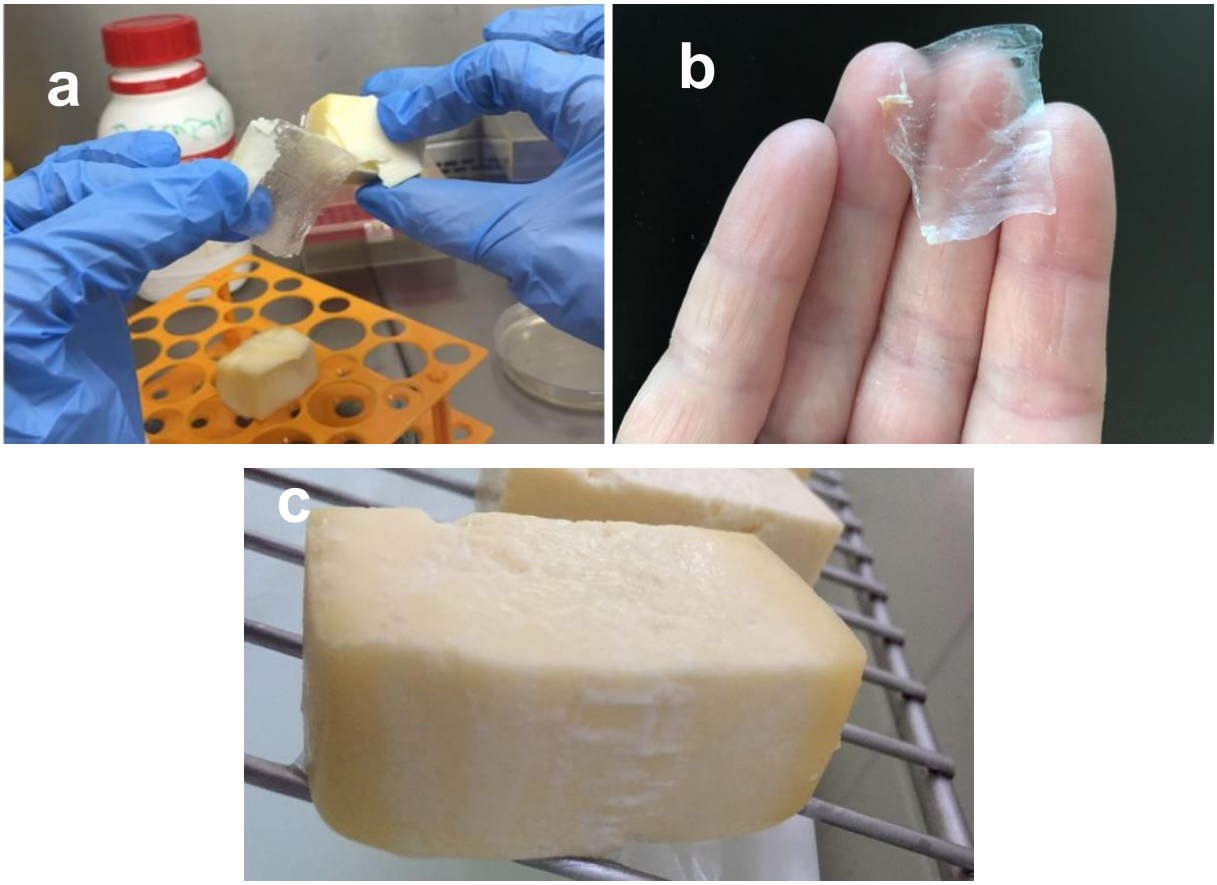
O alginato de sódio tem sido aplicado em filmes e revestimentos comestiveis, com sucesso, objetivando proteção dos alimentos e também bem como carreadores de alguns agentes preservantes de alimentos (antioxidantes e antimicrobianos) (DE'NOBILI *et al*., 2014). Além disto, outros trabalho indicaram que matrizes a base de alginato são adequadas para a incorporação de fagos (ALVES *et al*., 2020).

A obtenção de filmes ou coberturas com alginato de sódio exige, inicialmente, a formação de um gel por adição de cátions polivalentes, sendo os íons mais utilizados os de cálcio (Ca^{++}). Os íons estabelecem ligações entre as cadeias de alginato através de interações iônicas, após terem ocorrido ligações de hidrogênio entre as mesmas. Forma-se uma estrutura reticulada tridimensional com boa capacidade de reter água, formando um gel estável. Ao se adicionar diretamente íons cálcio a uma solução de alginato de sódio, a gelificação ocorre instantaneamente na região de contato, e o gel formado não pode mais ser manuseado (TURBIANI, 2007). Assim para evitar gelificação rápida, optou-se pela gelificação ionotrópica ou gelificação interna empregando-se íons cálcio originados de carbonato de cálcio, de modo semelhante ao trabalho desenvolvido por Campos (2020). Na gelificação ionotrópica, o cálcio é liberado sob condições controladas dentro da solução de alginato. A gelificação é mediada

por uma mudança no pH, que permite a liberação lenta de cálcio de uma fonte de cálcio inativa, como o carbonato de cálcio insolúvel. A mudança lenta de pH é mediada por d-glucono-δ-lactona (GDL) (GURIKOV; SMIRNOVA, 2018). Esta substância tem uso permitido em alimentos, sendo também utilizado como sequestrante, acidificante ou agente de cura, entre outros fins (ANVISA, 2010; FSA, 2021).

A técnica escolhida permitiu a preparação de um revestimento com boa aparência, espessura e flexibilidade adequadas para o uso como um revestimento para fins alimentares. O revestimento apresentou-se translúcido, uniforme e permitiu a formação de uma película delicada sobre as amostras de queijos (Figura 14) com espessura de 0,003 mm ± 0,009 (revestimento com fago) e 0,003 mm ± 0,005 (revestimento sem fago).

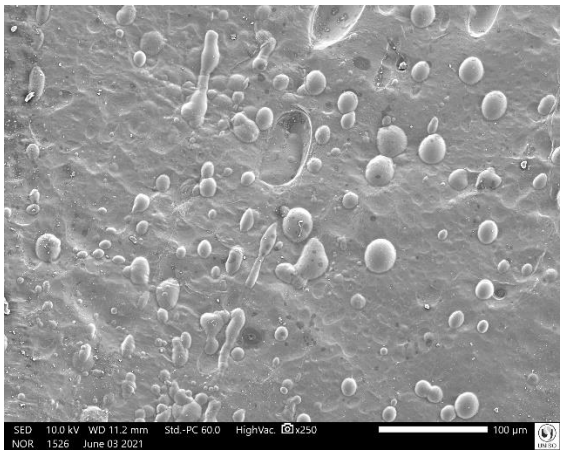
Figura 14. Imagens de revestimento alimentício de alginato de cálcio obtido por gelificação ionotrópica: a) sendo retirado de amostra de queijo; b) após retirado do queijo; c) em amostra de queijo



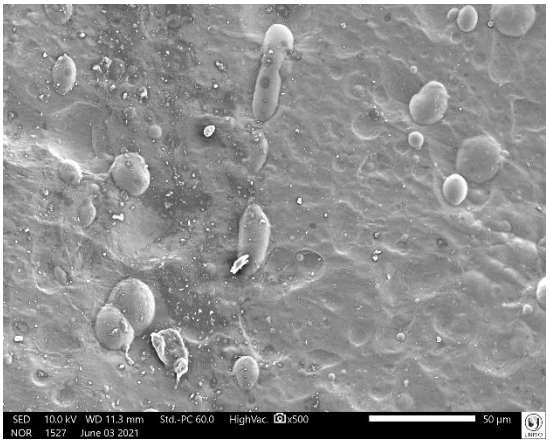
Fonte: Elaboração própria

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmam a formação de um produto com características homogêneas (Figura 15).

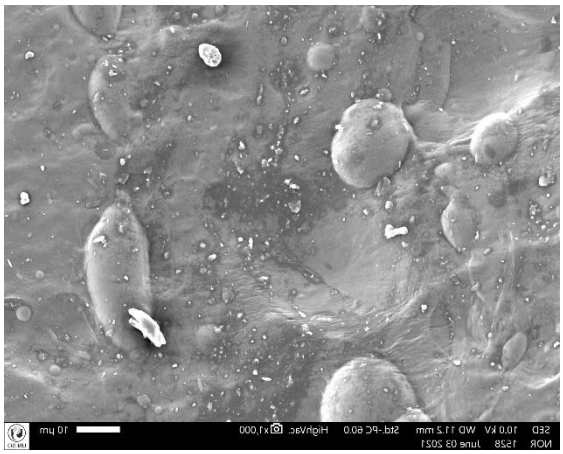
Figura 15. Micrografias (MEV) do revestimento de alginato de cálcio (x250; x500; x 1000; x 2500).



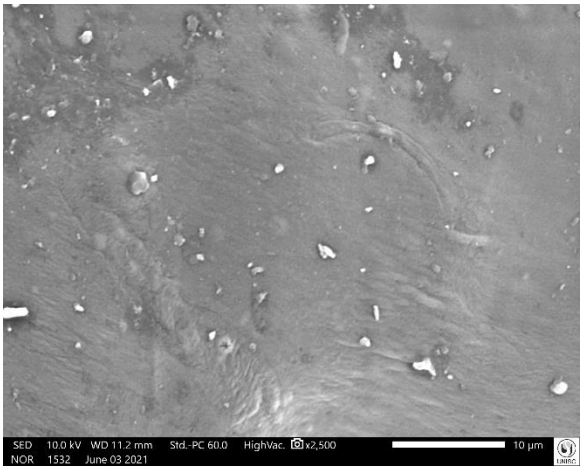
x 250



x 500



x 1000

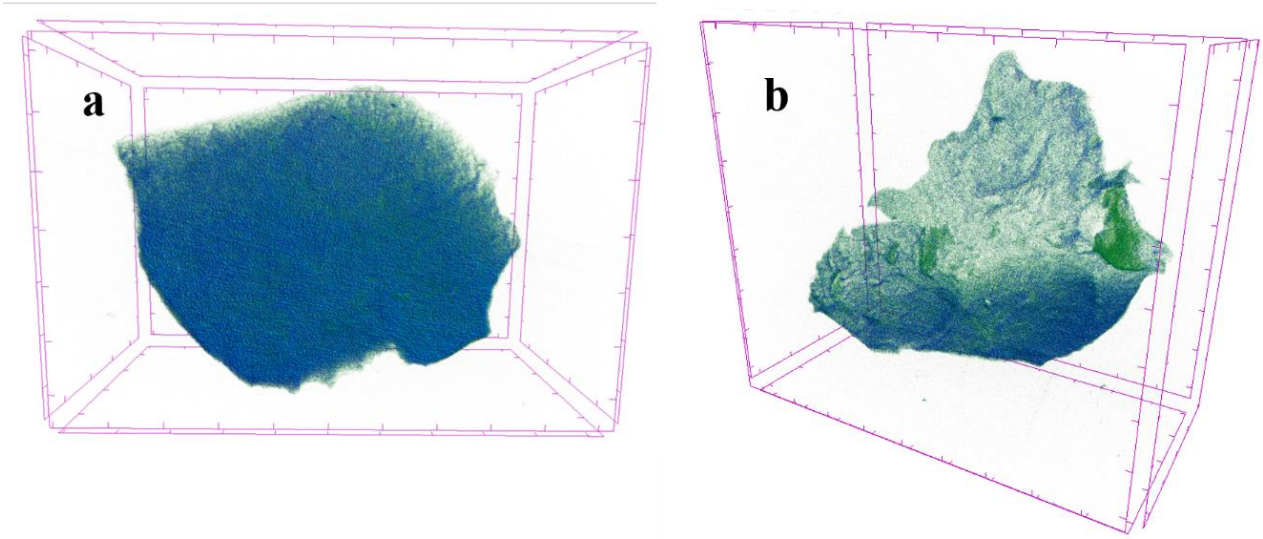


x 2500

Fonte: Elaboração própria

As imagens bidimensionais obtidas por tomografia de transmissão por raios-X (XRT) (Figura 16) também permitiram observar a uniformidade do revestimento obtido. Não há uma zona de maior ou menor densidade atômica, de modo geral, o que é interessante para um revestimento de uso alimentar.

Figura 16. Imagens obtidas por tomografia de transmissão por raios-X (XRT) do revestimento de alginato de cálcio

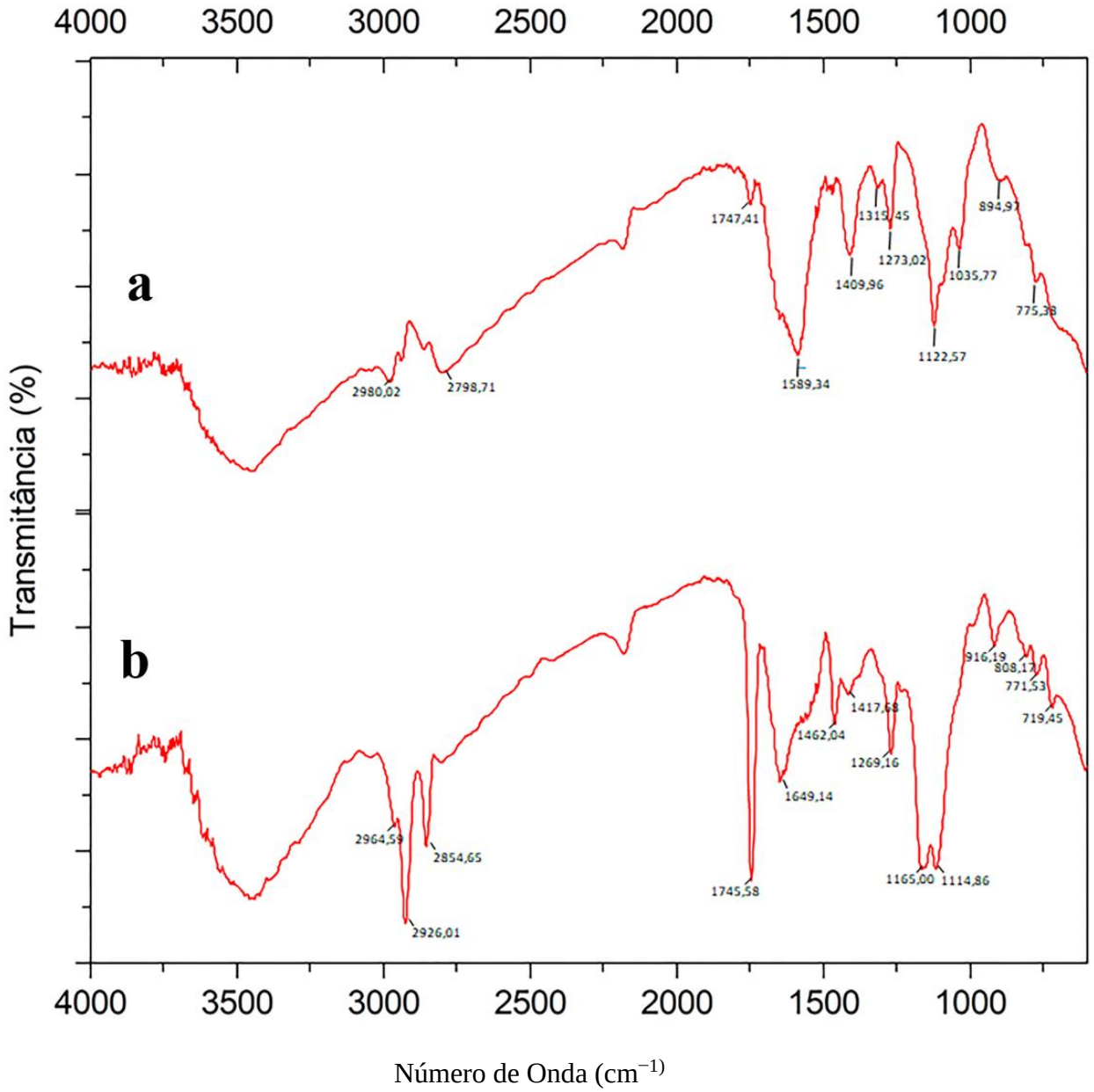


a = revestimento sem fago (controle)**; b =** revestimento com fago (amostra)

Fonte: Elaboração própria

A Figura 17 apresenta os espectros de FTIR do revestimento de alginato de cálcio com adição de fagos (amostra) e sem adição de fagos (amostra controle).

Figura 17. Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos revestimentos com fagos (a) e sem fagos (b)



Fonte: Elaboração própria

Fernandes e colaboradores (2018) analisando um polímero a base de alginato de cálcio observaram uma banda larga entre 3200 e 3600 cm^{-1} correspondendo ao alongamento dos grupos OH presentes na cadeia do polímero de alginato. O mesmo foi observado por Daemi e

Barikan (2012) entre as bandas entre 3000–3600cm^{-1}. Nos espectros obtidos também pode-se observar bandas largas ao redor de 3500 cm^{-1}. Fernandes e colaboradores (2018) também observaram bandas em 1414 cm^{-1} e 1621 cm^{-1}, as quais foram correlacionadas, respectivamente, com as deformações axiais assimétricas e simétricas dos grupos –COO^{-} indicando a presença do grupo ácido carboxílico do alginato. Nos espectros estudados observou-se picos mais intensos no revestimento sem fagos na faixa aproximada entre 17000 a 11000 cm^{-1}, particularmente nos picos em 1745,58 e 1165,00 cm $^{-1}$. Talvez possa ocorrer algum tipo de interação entre os fagos e os grupamentos -COO^{-}. Helmiyati e Aprilliza (2017) observaram um pico ao redor de 2928 cm^{-1} em amostras de alginato e indicaram ser devido ao estiramento do grupamento CH_2. Um pico próximo (2926,01 cm^{-1}) foi observado no revestimento sem fago. Foi constatada ausência deste pico no revestimento com fagos, o que talvez possa indicar algum tipo de interação entre os fagos e o alginato, como uma ligação CH-O. Tradicionalmente, o carbono não tem sido considerado um doador convencional de ligações de hidrogênio devido à sua eletronegatividade relativamente baixa em comparação com o oxigênio e o nitrogênio. No entanto, vários estudos ilustraram que mesmo átomos de carbonos alifáticos são capazes de formar ligações de hidrogênio fracas, que são designadas como ligações de hidrogênio CH-O (HOROWLTZ; TRLEVE, 2012). As bandas ocorridas em 2964,59 e 2798,71 cm^{-1} (revestimento com fagos) e 2964,59; 2926,01 e 2854,65 cm^{-1} (revestimento sem fagos) podem ser atribuídas as vibrações de C–H alifático (DAEMI; BARIKAN, 2012). Estas bandas na amostra com fagos foram menos evidentes, talvez também por formação de ligação CH-O.

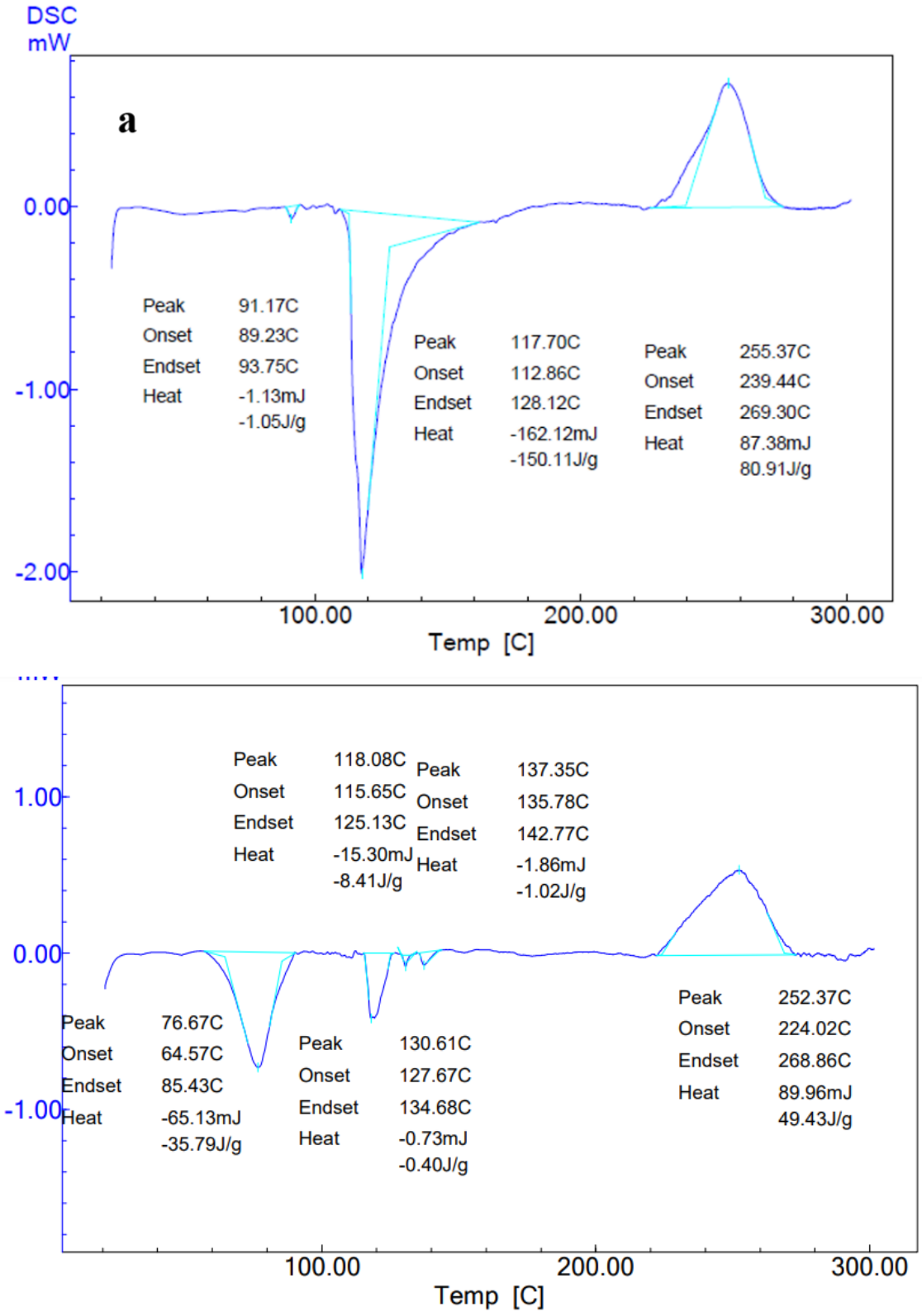
Na caracterização dos revestimentos também foram feitas análises térmicas. Os termogramas de DSC dos revestimentos poliméricos produzidos estão mostrados na Figura 18 e, os principais eventos endotérmicos nas amostras estão disponibilizados na Tabela 3.

Tabela 3. Eventos térmicos obtidos dos termogramas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos revestimentos alimentícios sem fagos (controle) e com fagos (amostra)

Eventos térmicos	Revestimento com fagos (amostra)	Revestimento sem fagos (controle)
1º- Endotérmico	76,67 ºC / -35,79 J/g	91,17 ºC / -1,05 J/g
2º- Endotérmico	118,08 ºC / - 8,41 J/g	117,70 ºC / -150,11 J/g
3º- Endotérmico	130, 61 ºC / - 0,40 J/g	**
4º- Endotérmico	137,35 ºC / - 1,02 J/g	**
1º - Exotérmico	252,37 ºC / 49,43 J/g	255,37 ºC / 80,91 J/g

Fonte: Elaboração própria

Figura 18. Termogramas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos revestimentos alimentício sem fagos (a- controle) e com fagos (b-amostra)



Fonte: Elaboração própria

Os revestimentos preparados foram basicamente feitos de alginato de cálcio. Assim, pode-se observar eventos térmicos semelhantes entre si. Os primeiros eventos endotermico (amostra e controle), provavelmente, estão relacionados a desidratação do revestimento (LAIA; COSTA JR; COSTA, 2014). Os segundos eventos endotérmicos (amostra e controle), talvez possam ser em decorrências de um processo de despolimerização. A decomposição térmica de polímeros inclui as etapas de desidratação e despolimerização acompanhada pela ruptura de C-O e C-C ligações e formação de CO, CO_2 e H_2 (LOPES *et al.*, 2017). A amostra apresentou ainda, dois pequenos eventos endotérmicos, que talvez possam ser devido a influência de componentes da solução tampão (onde os fagos estão diluídos) que aumentam a estabilidade conformacional por interações eletrostáticas dos componentes presentes (KIM *et al.*, 2014). Segundo Helmiyati e Aprilliza (2017), em ensaios de análise térmica com alginatos, demonstraram que a temperatura de decomposição de alginato de sódio puro foi de 251,12 °C, bastante próxima a temperatura de degradação dos revestimentos preparados (amostra e controle), como pode ser visto nos 3º eventos exotérmicos. Neste sentido, pode-se afirmar que os revestimentos exibiram altas temperaturas de fusão e, portanto, são estáveis para a aplicação pretendida.

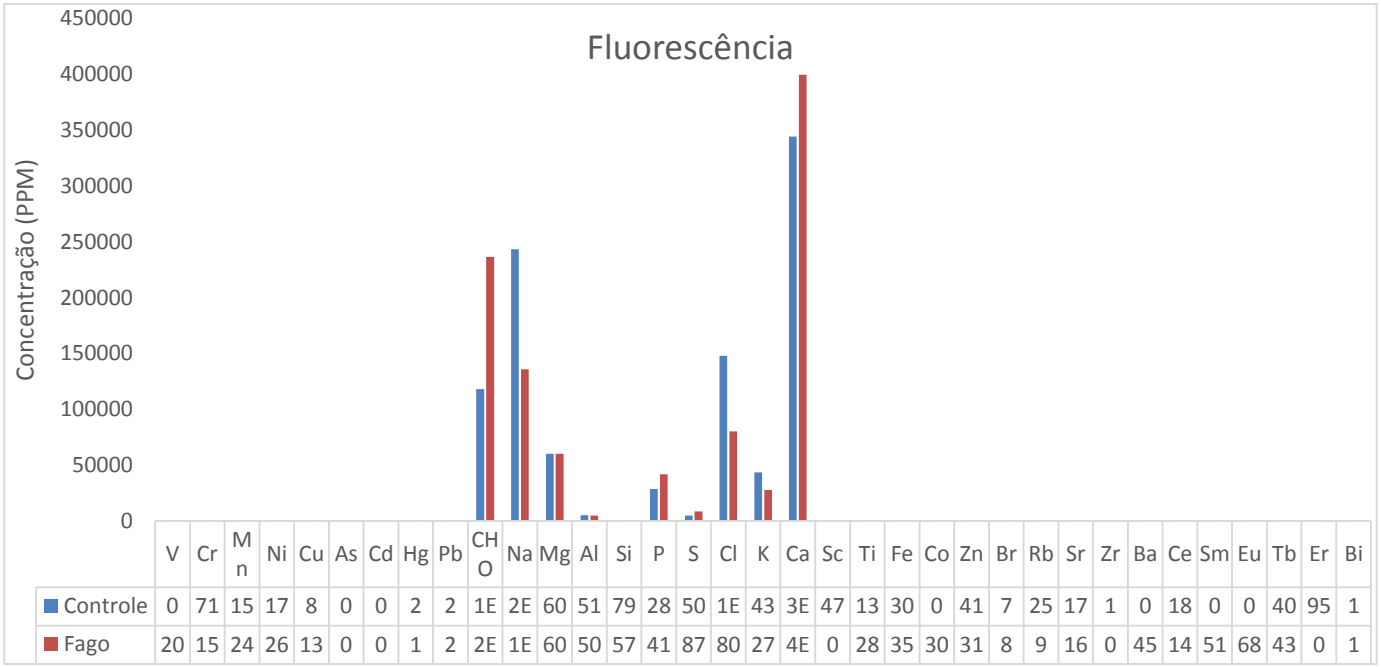
Foram também realizadas análises por fluorescência de raios -X para a caracterização do revestimento. A técnica de fluorescência de raios-X é multielementar e, deste modo, permite a obtenção de informações em relação à composição da amostra com quantificação simultânea de diversos elementos. Apresenta ainda, rapidez analítica, baixo custo operacional, procedimentos limpos, sem consumo de reagentes e geração de resíduos (SHIMAMOTO *et al*., 2011). Contudo, quando se trata da determinação direta de elementos leves (C, O e N, por exemplo), tem-se que a FRX apresenta uma baixa eficiência, dado que as energias das linhas de fluorescência de raios-X para elementos leves possuem baixa energia de penetração e baixo rendimento. De modo geral, o melhor rendimento da técnica é compreendido na faixa dos elementos sódio ao urânio, melhor dizendo, para elementos que possuem número atômico maior do que 11 (LIRA, 2019). A Tabela 4 e a Figura 19 apresentam os resultados obtidos. Na Figura 19 destacam-se os elementos em maior concentração.

Tabela 4. Análise por fluorescência de raios-X (XRF) das amostras de revestimento comestível a base de alginato de cálcio com e sem adição do coquetel fágico

Elemento	**Amostra controle Concentração (ppm)**	**Amostra com fagos Concentração (ppm)**
Vanádio (V)	0	20,2
Crômio (Cr)	71,1	153,3
Manganês (Mn)	159,4	23,6
Níquel (Ni)	17,1	26,1
Cobre (Cu)	7,8	12,6
Arsênio (As)	0	0
Cádmio (Cd)	0	0
Mercúrio (Hg)	2,4	0,8
Chumbo (Pb)	1,7	1,6
Grupos CHO	118260	236560
Sódio (Na)	243270	135870
Magnésio (Mg)	60385,5	60267,4
Alumínio (Al)	5169,2	5080,9
Silício (Si)	79,4	574,5
Fosforo (P)	28688	41808,9
Enxofre (S)	5064,9	8776
Cloro (Cl)	147970	80261,7
Potássio (K)	43521,5	27804,6
Cálcio (Ca)	344250	399520
Escândio (Sc)	477,8	0
Titânio (Ti)	129,9	282
Ferro (Fe)	303,7	355,1
Cobalto (Co)	0	299,8
Zinco (Zn)	419,2	313,1
Bromo (Br)	7,1	7,5
Rubidio (Rb)	25,2	8,6
Estrôncio (Sr)	172,9	160
Zircônio (Zr)	0,9	0
Bário (Ba)	0	45
Ce (Cério)	183,7	141,5
Samário (Sm)	0	511,7
Európio (Eu)	0	682,4
Térbio (Tb)	402,7	433
Érbio (Er)	955,6	0
Bismuto (Bi)	1,2	1,4

Fonte: Elaboração própria

Figura 19. Representação gráfica da análise de fluorescência da raios-X (XRF) das amostras de revestimento comestível a base de alginato de cálcio com e sem adição do coquetel fágico



	V	Cr	Mn	Ni	Cu	As	Cd	Hg	Pb	CHO	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Sc	Ti	Fe	Co	Zn	Br	Rb	Sr	Zr	Ba	Ce	Sm	Eu	Tb	Er	Bi
Controle	0	71	15	17	8	0	0	2	2	1E	2E	60	51	79	28	50	1E	43	3E	47	13	30	0	41	7	25	17	1	0	18	0	0	40	95	1
Fago	20	15	24	26	13	0	0	1	2	2E	1E	60	50	57	41	87	80	27	4E	0	28	35	30	31	8	9	16	0	45	14	51	68	43	0	1

Fonte: Elaboração própria.

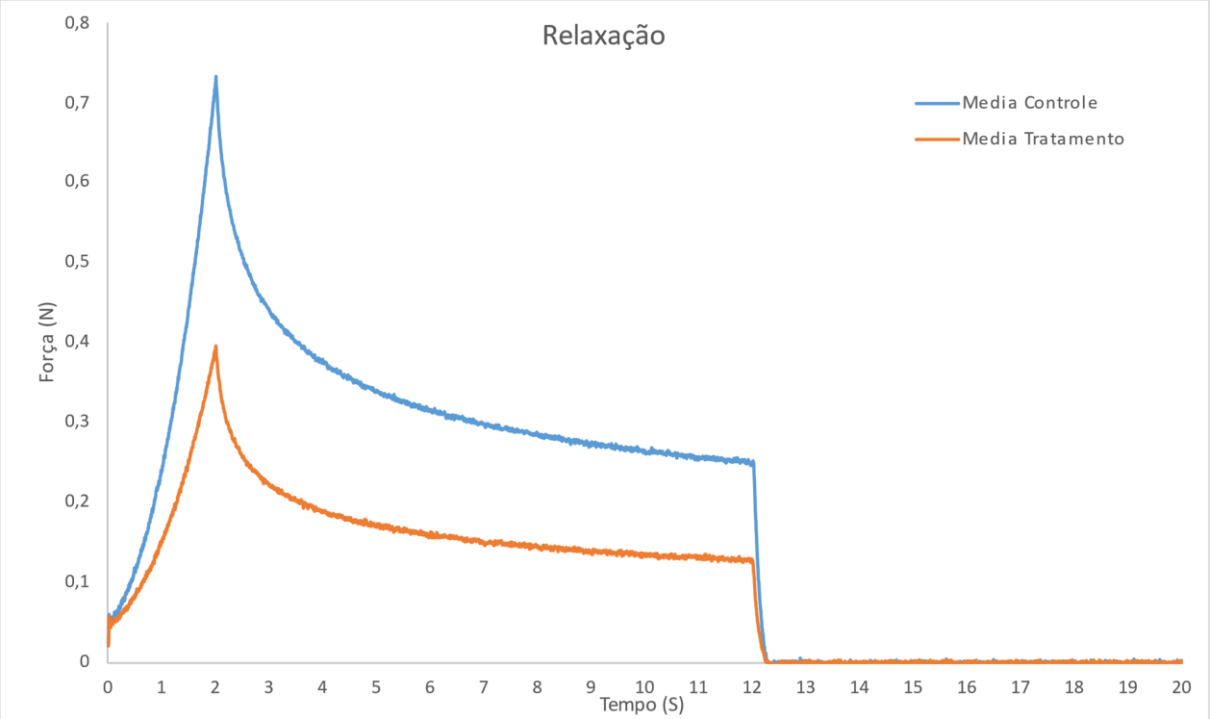
Os elementos presentes foram grupos CHO, sódio (Na), cloro (Cl) e cálcio (Ca). O alginato de sódio, base do revestimento comestível, é extraído de algas marinhas e, no seu processo de extração e purificação, adiciona-se, normalmente, formaldeído, solução a 0,2% de HCl e solução a 2% de carbonato de sódio (FERTAH *et al*., 2017). Assim os elementos carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), sódio (Na) e cloro (Cl) em maior proporção, são advindas, provavelmente, do alginato de sódio. O elemento cálcio (Ca) também foi encontrado em maior concentração em função da adição do mesmo no processo de gelificação do revestimento. Os elementos fósforo (P), potássio (K) e magnésio (Mg) também se destacaram, provavelmente, vindos das substâncias utilizadas no preparo do revestimento como contaminantes. No entanto, estes elementos não são considerados tóxicos.

As propriedades mecânicas dos revestimentos foram observadas pelo uso de texturômetro e estão disponibilizadas nas Figuras 20, 21, 22 e 23 sendo relaxação, tração, resiliência e perfuração, respectivamente. A verificação das características mecânicas é importante na avaliação geral do produto. O revestimento desenvolvido deve apresentar resistência ao estresse mecânico, mantendo sua integridade durante o transporte, manuseio e armazenamento

(RODRIGUES *et al*., 2021). No caso específico, as determinações das propriedades mecânicas visaram avaliar a flexibilidade e a resistência necessárias para o uso pretendido.

De modo geral, pode-se dizer que as propriedades mecânicas estão diretamente ligadas ao grau de reticulação da rede polimérica, além das características do próprio alginato (massa molar e relação M/G (ácido manurônico (blocos M) e ácido a-L-gulurônico (blocos G)). Produtos reticulados com cloreto de sódio apresentam maiores valores de resistência à tração e menores valores de resiliência, quando comparados com outro agentes cedentes de íons (COSTA *et al*., 2018b). Em nível molecular, a presença do íon Ca^{2+} é considerada como um obstáculo à rotação (movimento) das cadeias de alginato, diminuindo a mobilidade das mesmas e, consequentemente, a capacidade do filme em alongar-se (TURBIANI; KIECKBUSCH; GIMENES, 2011). Os filmes desenvolvidos apresentaram teores de cálcio próximos entre si, no entanto, a amostra com fagos apresentou menor capacidade de relaxação, como indicado na Figura 20. Talvez a presença de compostos como K_2HPO_4; KH_2PO_4; NaCl; $MgSO_4$ e $CaCl_2$, mesmo em pequenas quantidades, advindos do tampão fágico (solução carreadora de fagos) podem ter contribuído para a menor capacidade de relaxação do revestimento com os fagos.

Figura 20. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a relaxação obtidos por texturômetro (n=3).

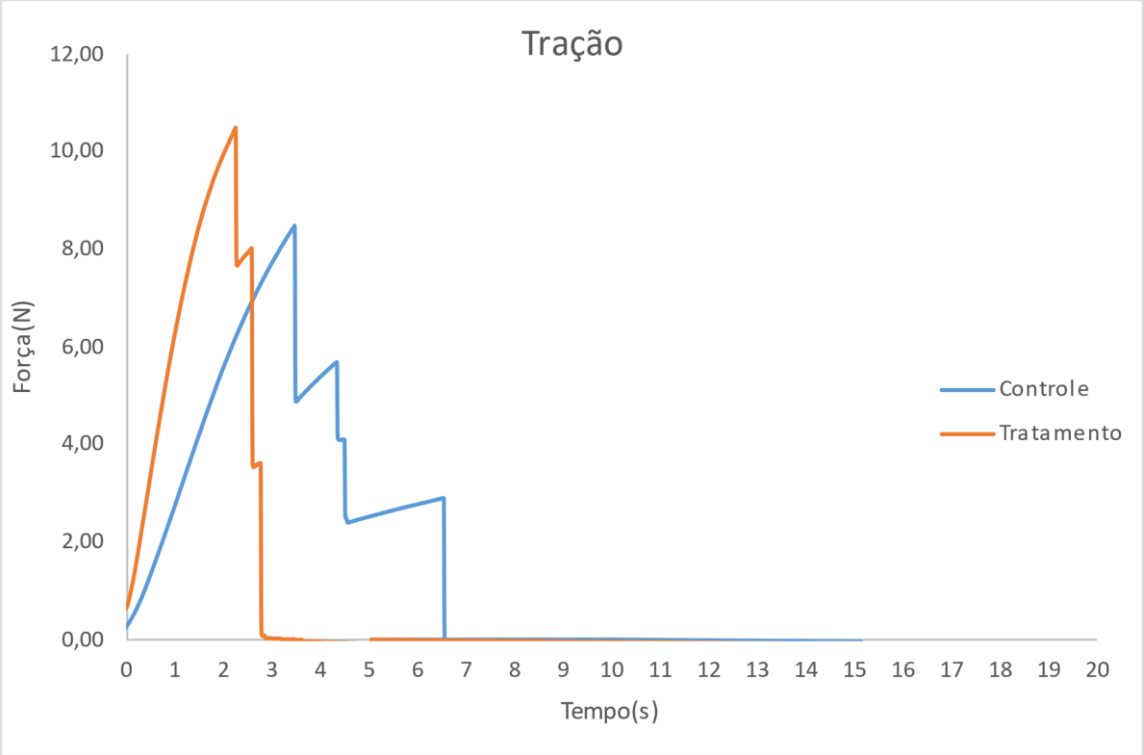


Controle = amostras de revestimento comestível sem adição de fagos; Tratamento = amostras de revestimento com adição de fagos.

Fonte: Elaboração própria.

Na análise das propriedades mecânicas, um dos testes mais usados é o ensaio executado sobre carga de tração denominado ensaio de tração ou força de tensão. O ensaio de tração consiste na aplicação gradativa de carga de tração uniaxial nas extremidades de um corpo de prova especificado (REIS, 2019). A força de tração é afetada pela presença de agentes plastificantes (como glicerol, manitol, xilitol) (SANTANA; KIECKBUSCH, 2013), no entanto, estes compostos não foram objetos de estudo no revestimento preparado. As curvas tensão-deformação obtidas do ensaio de tração (Figura 21) indicaram que a presença dos fagos aumentou a propriedade do revestimento em relação a força de tração e diminuiu a capacidade de relaxação indicando um comportamento mais rígido, no entanto de forma pouco significativa.

Figura 21. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a tração obtidos por texturômetro (n=3).

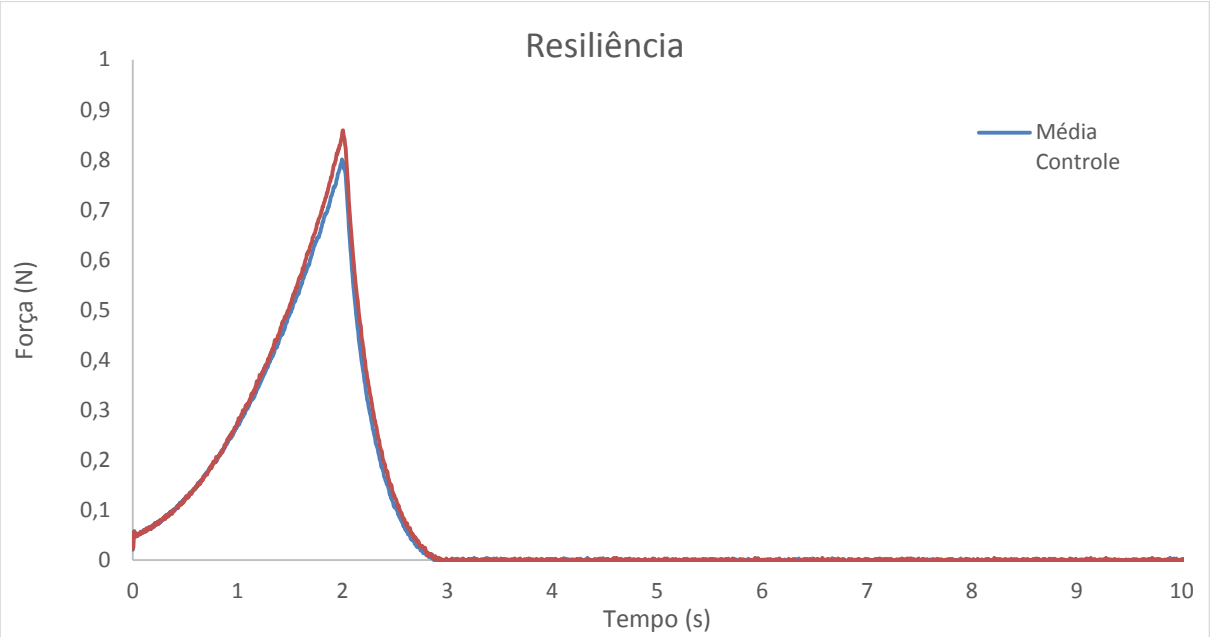


Controle = amostras de revestimento comestível sem adição de fagos; tratamento = amostras de revestimento com adição de fagos.

Fonte: Elaboração própria

O ensaio de resiliência indica a elasticidade do filme (NASCIMENTO, CALADO; CARVALHO, 2012) e, como pode-se observar na Figura 22 não foram observadas alterações desta propriedade em relação a amostra com ou sem fagos. Os filmes mais elásticos, apresentam menor resistência à tração, com consequente redução de manutenção da integridade (RODRIGUES *et al.*, 2021). Pelos resultados apresentados, pode-se dizer que os dois revestimentos apresentam a mesma capacidade de manutenção da integridade física.

Figura 22. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a resiliência obtidos por texturômetro (n=3).



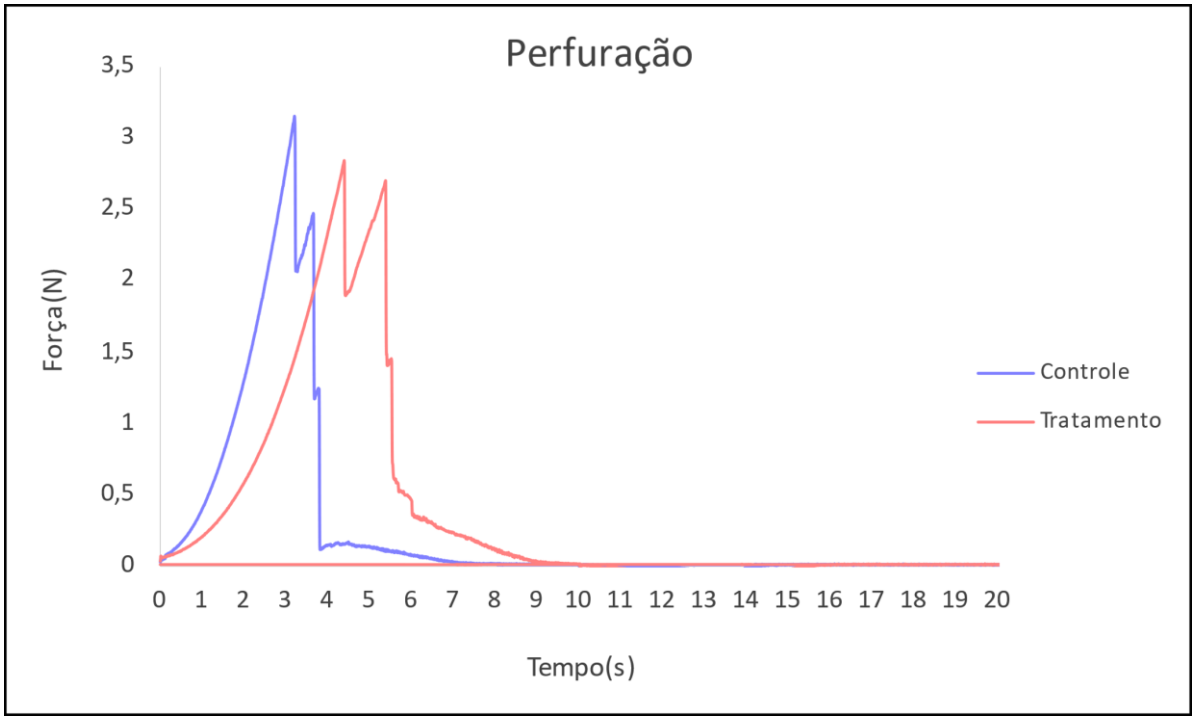
Controle = amostras de revestimento comestível sem adição de fagos; Tratamento = amostras de revestimento com adição de fagos.

Fonte: Elaboração própria

A força de perfuração é uma medida para avaliação da força para penetração em filmes e revestimentos (NASCIMENTO, CALADO; CARVALHO, 2012), sendo um parâmetro importante no acondicionamento de produtos com pontas ou outros tipos de protuberâncias que possam danificar o revestimento (AMARAL, 2014). Pelos resultados observados (Figura 23), não houve diferença desta propriedade entre os revestimentos.

De modo geral, pode-se dizer que a adição dos fagos não prejudicou as características mecânicas do revestimento desenvolvido.

Figura 23. Representação gráfica dos resultados dos testes de resistência mecânica do revestimento em relação a perfuração obtidos por texturômetro (n=3).

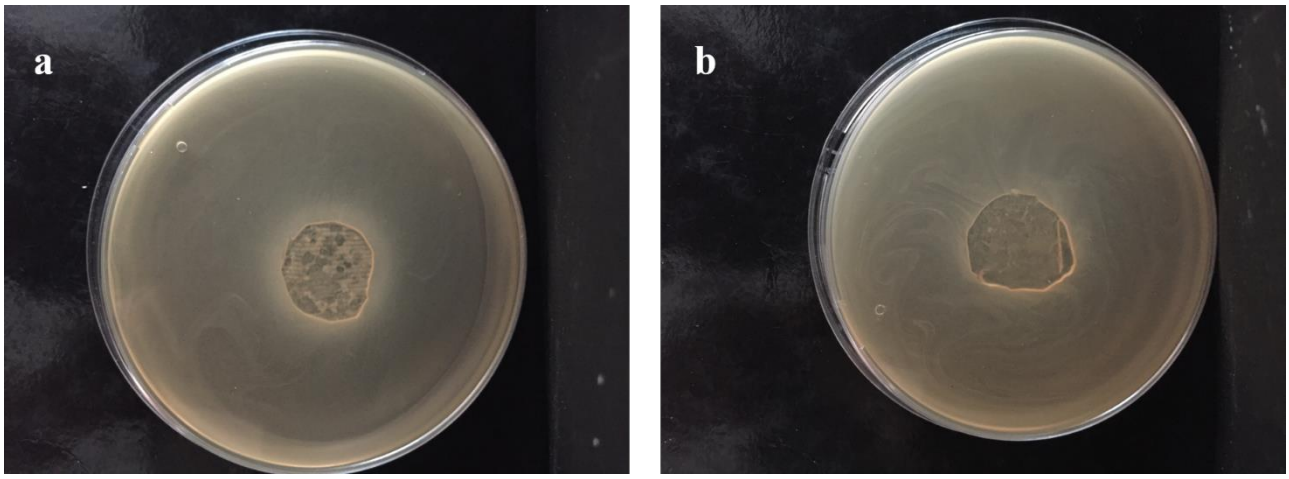


Controle = amostras de revestimento comestível sem adição de fagos; Tratamento = amostras de revestimento com adição de fagos.

Fonte: Elaboração própria

A atividade dos fagos no revestimento foi determinada, uma vez que, a imobilização em diferentes matrizes pode afetar sua viabilidade ou disponibilidade. O processo de obtenção de filmes, revestimentos e hidrogéis com fagos acaba expondo os mesmos a condições de estresse tais como mistura, agitação, dessecação e secagem. Em um trabalho que preparou um filme a base de álcool polivinílico, gelatina, caseína, glicerol e alginato de sódio para veiculação de fagos contra *Listeria monocytogenes* observou redução da atividade lítica de 2 log (DICASTILLO *et al.*, 2021). A Figura 24 apresenta imagens de placas de Petri contendo *S. enterica* e, sobre ela, os revestimentos (com e sem fagos). Pode-se perceber zonas de lise no revestimento com os fagos indicando a manutenção da atividade lítica do coquetel de fagos sobre a bactéria hospedeira.

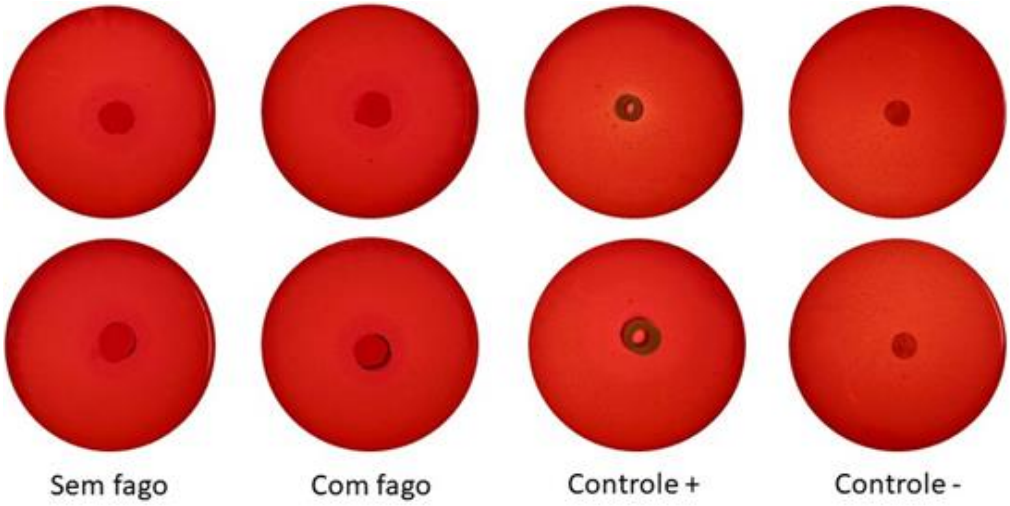
Figura 24. Imagens de placas de Petri contendo *Salmonella enterica* com revestimento a) filme com fagos b) filme sem fagos



Fonte: Elaboração própria

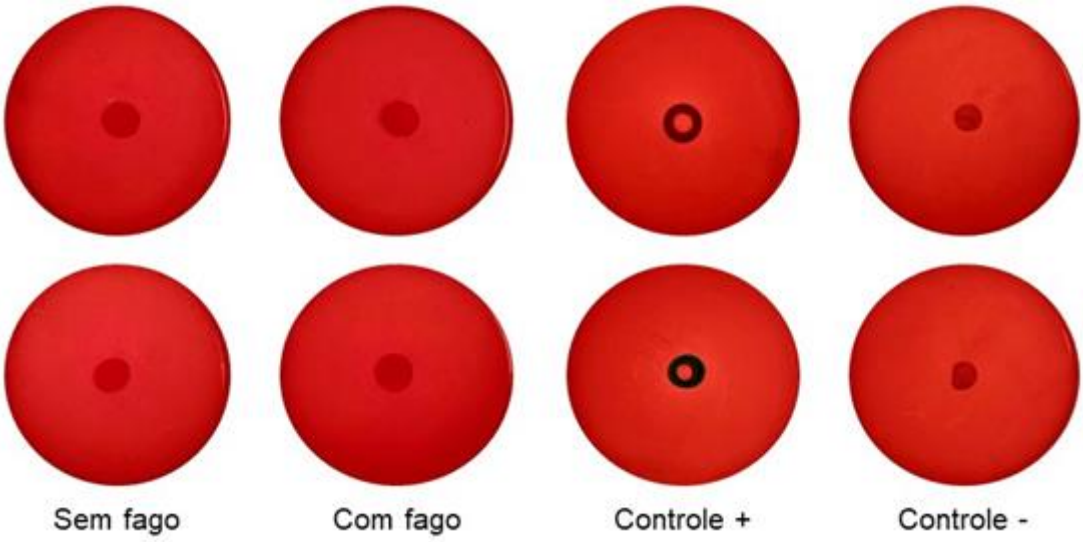
Em relação a avaliação da citotoxicidade, os resultados (Figuras 25 e 26) indicaram que o revestimento não apresentou citotoxicidade. O ensaio realizado com as linhagens das células 3T3 não demonstrou reatividade (Grau 0), ou seja, nenhuma zona de morte celular detectável ao redor da amostra. Já no ensaio com as células HaCaT houve um pequeno halo indicativo de morte celular, podendo-se considerar reatividade branda (Grau 2) e, de acordo com as especificações da Norma ISO 10993-5/2009 (ISO, 2009), isto é considerado como efeito de toxicidade negativo.

Figura 25. Análises de difusão em ágar com células HaCaT. Controle negativo (-); controle positivo (+); revestimento comestível com bacteriófagos; revestimento comestível sem bacteriófagos



Fonte: Elaboração própria

Figura 26. Análises de difusão em ágar com células 3T3. Controle negativo (-); controle positivo (+); revestimento comestível com bacteriófagos; revestimento comestível sem bacteriófagos



Fonte: Elaboração própria

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho de pesquisa, desenvolveu-se um revestimento comestível, empregando-se o alginato de sódio, associado com d-glucono-δ-lactona (GDL) e carbonato de cálcio. Foi incorporado ao revestimento, um coquetel de fagos líticos contra *Salmonella enterica,* como uma alternativa para o biocontrole deste patógeno em queijos tipo Minas meia cura.

O revestimento comestível obtido pode oferecer um importante benefício aos produtos alimentícios em relação a segurança dos alimentos, aumentando, dessa forma, a qualidade dos mesmos. Também podem se relacionar positivamente com a tendência, cada vez maior, da busca pelos consumidores por produtos industrializados que atendam o conceito "clean label", ou seja, relacionado ao uso de ingredientes orgânicos, livre de aditivos e ingredientes artificiais.

Outro fator positivo, somado a esse revestimento, diz respeito a busca por alternativas de embalagens de alimentos mais sustentáveis e não acumulativas nos ecossistemas, uma vez que a proposta pode gerar menos resíduos em função de sua biodegrabilidade. Além disto, a associação os fagos, pode acrescentar ainda mais valor ao alimento. O biocontrole de fagos está sendo cada vez mais aceito como uma tecnologia natural e eficaz para direcionar especificamente patógenos bacterianos em vários alimentos.

Todavia, pode-se dizer que o desenvolvimento de filmes/revestimentos comestíveis têm ocorrido, principalmente, em escala laboratorial, uma vez que existem ainda algumas limitações a serem ultrapassadas, como garantia de propriedades funcionais e organolépticas, aparência atraente, preço compatível, entre outros fatores, para garantia de sucesso destes materiais em escala comercial. O uso de fagos para biocontrole exige também mais estudos como avaliação da capacidade (ou não) de penetração do fago no alimento, efeito na sobrevida dos fagos frente a fatores abióticos, produção em grande volume, etc.

O revestimento comestível apresentou características físico-químicas adequadas, toxicidade negativa e manutenção da atividade lítica dos fagos sendo, desta forma, um produto promissor para o uso pretendido. Assim, pelos fatos expostos, o trabalho de pesquisa aqui realizado poderá contribuir disponibilizando uma alternativa inovadora para o revestimento e a segurança de alimentos contra *S. enterica.* Deve-se destacar, no entanto, que para seu uso comercial serão necessários outros ensaios como análise sensorial, avaliação de possível extensão da vida útil do queijo, teste de desafio para *S. enterica,* isolamento de outros fagos líticos contra *S. enterica* para elaboração de um coquetel de fagos, entre outros.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.; CERQUEIRA, M.A.; PASTRANA, L.M.; SILLANKORVA, S. Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. **Food Research International** v. 128, p.108791, 2020. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108791.

AMARAL, F.G. **Desenvolvimento de filme comestível a base de fécula de açafrão (*Curcuma longa L.*) e lipídios.** Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among Serovars. **The Scientific World Journal** v. 2015, Article ID 520179, p. 1-16, 2015 doi: http://dx.doi.org/10.1155/2015/520179.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Tabela de Aditivos**, 2010. Disponível em https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/sistema-internacional-de-numeracao-de-aditivos-alimentares-ins.pdf. Acesso em 22/09/2021.

ARAÚJO, D.S.S.; MESSIAS, C.T.; MARCHI, P.G.F.; ROSA, B.L.; SOUZA, C.A.S. Microbiological analysis of half-cured Minas cheese sold informally in the city of Rio Branco, AC. **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 2, p. 755-763, 2020.

BECK, N.K.; CALLAHAN, K.; NAPPIER, S.P.; KIM, H.; SABSEY, M.D.; MESCHKE, J.S. Development of a spot-titer culture assay for quantifying bacteria and viral indicators. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology** n 17, n. 4, p. 455-464, 2009.

BOMBARDI, F.M.L**. Sensoriamento ótico da dinâmica do crescimento de colônias de *Escherichia coli* em ambiente hídrico.** Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento e Reforma Agraria. Portaria 146 de 07/03/1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.** Disponível em: https://www.agais.com/normas/leite/queijos.htm. Acesso em 18/08/2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 74, de 24 de julho de 2020. **Dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado queijo minas meia cura.** Disponível em https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-74-de-24-de-julho-de-2020-269156370. Acesso em 30/08/2021.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 331, de 23 de dezembro de 2019a. **Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação.** Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272. Acesso em: 11/11/2021.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa, nº 60 de 23 de dezembro de 2019b**. Estabelece as listas de padrões**

microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356. Acesso em: 11/11/2021.

CAMPOS, W. F. C. **Hidrogel com líquido iônico como carreador de bacteriófagos para tratamento de infecções profundas da pele.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2020.

CARVALHO, C. et al. Bacteriophage characterization. **3 rd International Hands- on PHAGE**. Braga- Portugal, 2017.

CARRASCO, P.B.; GANDRA, E.A.; CHIM, J.F. Revestimentos comestíveis proteicos **Brazilian Jornal of Food Research** v. 10, n. 3, p. 148-160, 2019.

CHAN, B.K.; ABELON, S.T.; CARRILO, C.L. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiology**. V. 8, n. 6, p. 769-783, 2013.

COSTA, M. J; MACIEL, L.C.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. CERQUERA, M. A. Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. **Food Research International** v. 107, p. 84–92, 2018a.

COSTA, M.J.; MARQUES, A.M.; PASTRANO, L.M.; TEIXEIRA, J.A.; SILLANKOVA, S.M.; CERQUEIRA, M.A. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids** v.81, p. 442-448, 2018b.

COSTANZO, N.; CENITI, C.; SANTORO, A.; CLAUSI, M.T.; CASALINUOVO, F. foodborne pathogen assessment in raw milk cheeses. **International Journal of Food Science** v. 2020, article ID 3616713, p 1-5, 2020.

DAEMI, H.; BARIKAN, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica** v. 19, n. 6, p. 2023-2028, 2012.

DE'NOBILI M.D.; CURTO L.M.; DELFINO, J.M.; PÉREZ C.D.; BERNHARDT, D.; GERSCHENSON, L.N.; FISSORE, E.N.; ROJAS, A.M. Alginate utility in edible and nonedible film development and the influence of its macromolecular structure in the antioxidant activity of a pharmaceutical/food interface. Cap. 6, p: 119-169. In: MOORE, A. (ed.). **Alginic acid: chemical structure, uses and health benefits.** Hauppauge, New York/USA: Chemistry Research and Applications Serie. Nova Science Publishers Inc., 2014. ISBN 978-1-63463-242-3. Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/Chapter6_pp119_169_Alginateutilityinedibleandnonediblefilmdevelopmentandtheinfluenceofitsmacromolecularstruct.pdf Acesso em: 21/11/2021.

DICASTILLO, C.L.; SETTIER-RAMÍREZ, L.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CARBALLO, G.L. Development of biodegradable films loaded with phages with antilisterial properties**. Polymers** v.13, n. 327, p 1-15, 2021 https://doi.org/10.3390/polym13030327.

DOMINGO-CALAP, P.; DELGADO-MARTÍNEZ, J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. **Antibiotics** v. 7, n. 66, p 1-16, 2018. doi:10.3390/antibiotics7030066.

DRAEGER, C.L.; AKUTSU, R.; ZANDONADI, R.; DA SILVA, I.; BOTELHO, R.; ARAÚJO, W. Brazilian foodborne disease national survey: Evaluating the landscape after 11 years of implementation to advance research, policy, and practice in public health. **Nutrients** v. 11, n. 1, p 40-50, 2019.

DURE, C.; BAUMHARDT, J.A. Redução de custos de embalagem: Uma análise na cadeia de valor, 2012. Disponível em: https://domalberto.edu.br/wp-content/uploads/sites/4/2017/11/Claudiomiro_Figueiredo_Dure_Artigo_2012_1.pdf Acesso em 10/02/2022.

EFFAND, T.; LAWSON, A.; BALTER, S.; DEVINNEY, K.; REDDY, V.; WAECHTER, H.; GRAVANO, L.; HSU, D, Discovering foodborne illness in online restaurant reviews. **Journal of the American Medical Informatics Association**, v. 25, n. 12, p. 1586–1592, 2018.

FAGANELLO, C. **Caracterização do potencial patogênico de *Salmonella enterica* isoladas de frango.** Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2018.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L.C.B.; GONÇA~VES, P.V.M.; MILANEZ, C.R.; STEEL, C.J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. et al. Films and edible coatings based on native starches and gelatin in the conservation and sensory acceptance of Crimson grapes. **Food Science and Technology** v.27, n.2, p 369-37, 2007.

FALARDEAU, J.; TRMCIC, A.; WANG, S. The occurrence, growth, and biocontrol of *listeria monocytogenes* in fresh and surface-ripened soft and semisoft cheeses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v. 20., n 4, p. 4019-4048, 2021.

FAZZINO, L.; ANISMAN, J.; CHÁCON, J.M.; HARCOMBE, W. Phage cocktail strategies for the suppression of a pathogen in a cross-feeding coculture. **Microbial Biotechnology** v. 13, n. 6, p 1-12, 2020. doi.org/10.1111/1751-7915.13650. Disponível em: https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1751-7915.13650. Acesso em 10/02/2022.

FERNANDES, R.S.; MOURA, M.R.; GLENN, G. M.; AOUADA, F.A. Thermal, microstructural, and spectroscopic analysis of Ca2+ alginate/ clay nanocomposite hydrogel beads. **Journal of Molecular Liquids** v. 265, p. 327-336, 2018.

FERREIRA, A.C.M.; SILVA, H.A. Indicadores higiênicos sanitários em queijos do tipo minas frescal na cidade de Uberlândia-MG. **Revista Brasileira Multidisciplinar** v.24, n.1, p. 103-111, 2021.

FERTAH, M.; BELFKIRA, A.; DAHMANE, E.; TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry** v 10, n. S3707-S3714, 2017.

FGV PROJETOS. **O setor de laticínios no Brasil e suas interações com o comércio internacional.** Disponível em: https://gvagro.fgv.br/sites/gvagro.fgv.br/files/u115/laticinios_fgv_PT.pdf. Acesso em 18/08/2021

FINGER, J. A. F. F.; BARONI, W. S. G. V.; MAFFEI, D. F.; BASTOS, D. H. M.; PINTO, U. M. Overview of foodborne disease outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 434-444, 2019. 10.3390/foods8100434.

FONTE, P.; MACHADO, B.; REAL, H. Embalagens comestíveis: aplicação, efeito na segurança alimentar e aceitabilidade. **Acta Portuguesa de Nutrição** v. 25, p. 76-82, 2021.

FOUNOU, L.L.; FOUNOU, R.C.; ESSACK, S.Y. Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. **Frontiers in Microbiology** v 23, p. 1-19, 2016.https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881.

FRATARI, S.C; OLIVEIRA, A.P.; FARIA, R. A. P.G.; VILLA, R.D. Revestimentos comestíveis para conservação pós-colheita de banana: Uma revisão. **Avanços em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.4., 2021. Editora Científica Digital. Disponível em: https://downloads.editoracientifica.org/articles/210203091.pdf Acesso em 31/08/2021 doi10.37885/210203091.

FSA. FOOD STANDARTS AGENCY. Disponível em: https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers#food-additives-guidance. Acesso em 22/09/2021.

GARCÍA, R.; LATZ, L.; ROMERO, J.; HIGUERA, G.; GARCÍA, K.; BASTÍAS, R.; Bacteriophage production models: An overview. **Frontiers in Microbiology** v. 10, article 1187, p. 1-7, 2019.

GARCIA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRÍGUEZ, A. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in Applied Microbiology** v. 47, p. 479–485, 2008.

GOULART, E. M.; OLIVO, P. M; RODRIGUES, B. M.; MADRONA, G. S.; POZZA, P. C; POZZA, M. S. S Application of functional edible films in ricotta cheese. **Acta Scientiarum Technology**, v. 41, p 1-9, 2019.

GURIKOV, P.; SMIRNOVA, I. Non-conventional methods for gelation of alginate. **Gels**, v. 4, n.14, p. 1-14, 2018.

HARADA, L. K.; SILVA, E.C.; CAMPOS, W.F.; FIOL, F.S.D; VILA, M.M.D.C.; DĄBROWSKA, K.; KRYLOV, V.N.; BALCÃO, V.M. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38-58, 2018.

HARADA, J. K.; BONVENTI JR, W.; SILVA, E.C.; OLIVEIRA, T. J.; MORELI, F.C.; OLIVEIRA JR, J.M.; TUBINO, T.; VILA, M.M.D.C.; BALCÃO, V.M. Bacteriophage-based biosensing of *Pseudomonas aeruginosa*: an integrated approach for the putative real-time detection of multidrug-resistant strains. **Biosensors** v 11, p 1-24, 2021.

HELMIYATI, K.; APRILLIZA, M. Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering** v.188, p. 1-5, 2017 doi:10.1088/1757-899X/188/1/012019.

HOROWLTZ, S.; TRLEVE, R.C. Carbon-Oxygen hydrogenbonding in biological structureand function. **The Journal of Biological Chemistry** v 287, n. 50, p- 41576-41582, 2012.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices.** Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva, 2009.

JAMAL, M.; BUKHARI, S.M.A.U.S.; ANDLEEB , S.; ALI , M.; RAZA , S.; NAWAZ , M.A.; HUSSAIN ,T.; RAHMAN , S.U.; SHAH, S.S.A. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. **Journal of Basic Microbiology** v. 59, n. 2, p 123-133, 2018. doi: 10.1002/jobm.201800412.

JORQUERA, D. NAVARRO, C.; ROJAS, V.; TURRA, G.; ROBESON, J.; BORIE, C. The use of a bacteriophage cocktail as a biocontrol measure to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis contamination in ground meat and goat cheese. **Biocontrol Science and Technology** v. 25, n. 8, p. 970-974, 2015.

KAKASIS, A.; PANITSA, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.53, n. 1, p. 16-21, 2019.

KAMAL, I. edible films and coatings: classification, preparation, functionality and applications: a review. **Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences**. v 4, n. 2, p 501-510, 2020.

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

KIM, N.A.; A. I.B.; LIM, D..; LIM, J.Y.; LEE, S.Y.; SHIM, W.S.; KANG, N.; HOON, JEONG. Effects of pH and buffer concentration on the thermal stability of Etanercept using DSC and DLS. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v. 77, n. 5, p. 808–816, 2014.

KOKOSZKA, S.; LENAR, A. Edible coatings – formation, characteristics and use – a review **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences** v. 57, n. 4, p. 1-4, 2007.

KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E.H.; Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control** v. 21, n. 6, p.805-810, 2010.

LAIA, A. G.S.; COSTA JR, E.S.; COSTA, H.S. A study of sodium alginate and calcium

chloride interaction through films for intervertebral disc regeneration uses. 21º **CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais** 09 a 13 de novembro de 2014, Cuiabá, MT, Brasil.

LINDNER, J.D.D.; VANETTI, M.C.D.; MAYO, B.; PINTO, U.M. Editorial: microbiological safety and quality aspects of fermented dairy products**. Frontiers in Microbiology** v. 12, p.1-3, 2021.

LIRA, F.S. **Estudo do deslocamento do pico Compton em função do estado de preparação da amostra.** Dissertação (Mestrado em Física), Universidade Federal de Sergipe, São Crstóvão,SE, 2019.

LOBA, A.P.F.R. **Fagoterapia como alternativa ao uso dos antibióticos convencionais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

LOPES, S.; BUENO, L.; AGUIAR JÚNIOR, F; FINKLER C. Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosu.* **Annals of the Brazilian Academy of Sciences** v.89, n.3, p. 1601-1613, 2017.

MAGNONI, D.; TARDIOLI, M.; ZAGATO, M.; MIYAGI, M.; TAKAYAMA, P.; MOURA, S.; KOVACS, C.; CAMELO, V.; BARBOSA, M.; CUKIER, C. Food safety and nutritional information could reduce an alimentary intoxication outside home. **Revista Brasileira de Nutrição Clinica** v.31, n.2, p. 91-96, 2016.

MANJULA, B.; VARAPRASAD, K.; SADIKU, R.; RAY, K.M. Preparation and characterization of sodium alginate-based biohydrogels and their in vitro release studies. **Advances in Polymer Technology,** v. 32, n. 2, p. 1-12, 2013.

MARTINS, M.G.G. **Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência.** (Trabalho de Conclusão de Curso) Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MELO, E. S.; AMORIM, W.R.; PINHEIRO, R.E.E.; CORRÊA, P.G.N.; CARVALHO, S.M.R.; SANTOS, A.R.S.S.; BARROS, D.S.; OLIVEIRA, E. T.AQ.C.; MENDES, C.A.; SOUSA, F.V. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: Revisão **PUBVET** v.12, n.10, p.1-9, 2018.

MENDES, A.M.; RIBEIRO, L.F. O controle microbiológico da qualidade de alimentos. **PUBVET** v.15, n.2, p.1-10, 2021.

MOYE, Z.D.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage applications for food production and processing. **Viruses** v10, n. 4, p. 205-227, 2018 doi:10.3390/v10040205.

NASCIMENTO, T.A.; CALADO, V.; CARVALHO, C.W.P. Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. **Food Research International** v. 49, n. 1, p. 588-595, 2012.

NEITZKE, D. C.; ROZA, C. R.; WEBER, F. H. Food safety: *Salmonella sp* contamination in swine slaughter. **Brazilian Journal Food Technology** v. 20, e2015063, 2017. doi https://doi.org/10.1590/1981-6723.6315.

OLIVEIRA, T.J. **Isolamento, caracterização e avaliação *in vitro* de bacteriófagos líticos para o biocontrole de S*almonella enterica.*** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, 2021.

ORTIZ, F.; WEILER, N.; ALVAREZ, M.; ORREGO, M.V.; KAWABATA, A.; RIERA, E.; LÓPEZ, C.; ACOSTA, L.; NAGAI, M.; PORTILHO, R.; ARGÜELO, R; MERELES, E. Resistencia a múltiplos antibióticos en serovariedades de Salmonella aisladas de muestras clínicas y alimentos. **Memorias de Instituto de Investigacionaes em Ciencias de la Salud** v.19, n.1, p.37-47, 2021.

PINHEIRO A.C.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S.; MARTINS, J.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. ET AL. Utilização de revestimentos/revestimentos edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia,** p. 18-28, 2010. Disponível em https://core.ac.uk/download/pdf/55618039.pdf. Acesso em 02 de agosto de 2018.

PINEDA, A.P.A.; CAMPOS, G.Z.; PIMENTEL, N.J.; FRANCO, B.D.G.; PINTO, U.M. Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers in Microbiology** v.12, p. 1-16, 2021.

QADIR, M. I. Phage therapy: A modern tool to control bacterial infections. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science** v.28, n.1, p.265-270, 2015.

QUEIJOS MINAS ARTESANAL.Guia técnico para implantação de Boas Práticas de Fabricação em Unidades de Fabricação do queijo Minas artesanal. Emater, 2009. Disponível em: https://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_SITE/cartilha_queijo%202.pdf Acesso em: 07/02/2020.

RAGHAV, P.K.; ÁGARWAL, N.; SAINI, M. Edible coating of fruits and vegetables: A review**. International Journal of Scientific Research and Modern Education** v, 1, n. 1, p. 188-203, 2016.

RAVI, Y.; POOJA, M.K.; YADAV, K. Review- bacteriophages in food preservation. **International Journal Pure Applied Bioscience**. v.5, n.3, p. 197-205, 2017.

REIS, F. V. **Comportamento de tensão-deformação de filmes poliméricos produzidos de triacetato de celulose obtido através da palha de milho *Zea mays*** (Trabalho de Conclusão de Curso). Química Industrial, Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

RODRIGUES, A.A.M.; COSTA, R.R.; SANTOS, L.F.; SILVA, S.M.; BRITTO, D.; LIMA, M.A.C. Properties and characterization of biodegradable films obtained from different starch source. **Food Science and Technology,** p 1-7, 2021. doi: https://doi.org/10.1590/fst.28520.

ROSSI, E.M.; BARRETO, J.F.; MUELLER, R.; CIPRIANI, K.; BIAZUSSI, C. Bacteriological quality of raw milk: a problem concerning many farmers**. Food and Public Health** v. 8, n. 1, p. 1-7, 2018.

SÁNCHEZ-ORTEGA, I.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.; , SANTOS-LÓPEZ , E.M.; AMARO-REYES, A.;, BARBOZA-CORONA, J.E.; REGALADO, C. Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **Scientific Word Journal** v. 2014, artigo 248935, 2014, doi 10.1155/2014/248935.

SANTANA, A.A.; KIECKBUSCH, T.G. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols**. Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 30, n. 4, p. 835 - 845, 2013.

SERNA, C.P. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de zeína, caracterização das propriedades funcionais e estruturais e avaliação do uso como cobertura na conservação das características físico-químicas do queijo Minas padrão**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

SKARADZINSKA, A.; OCHOCKA, M.; SLIWKA, P.; KUZMINSKA-BAJOR, M.; SKARADZINSKA, G.; FRIESE, A.; ROSCHANSKI, N.; MURUGAIYAN, J.; ROESLER, U. Bacteriophage amplification: A comparison of selected methods. **Journal of Virological Methods** v. 18, n. 282, p.113856, 2020. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113856.

SHI, S.C.; SHAH, P.M. Edible polymers: Challenges and opportunities. **Journal of Polymers** v. 2014, artigo ID 427259, p 1-13, 2014.

SHIMAMOTO, G. G.; KAZITORIS, B.; LIMA, L.F.R.; ABREU, N.D.; SALVADOR, V.T.; BUENO, M.I. M.S. Quantificação de antimônio em garrafas de politereftalato de etileno (PET) brasileiras por fluorescência de raios-x e avaliação quimiométrica para verificar a presença de pet reciclado através do teor de ferro. **Química Nova** v. 34, n. 8, p. 1389-1393, 2011.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A. F.; LIMA FILHO, J. L. *Samonella spp*., importante agente patógeno veiculado em alimentos. **Revista Ciências & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, F.R.; SANTANA, C.M.; MELO, W.F.; TALABERA, G.G.; SARMENTO, W.E.; SOBRINHO, W.S.; SÁ, J.A.; MACHADO, A.V. et al. Conservação e controle de qualidade de queijos: Revisão. **PUBVET** v.11, n.4, p.333-341, 2017.

SILLANKORVA, S. M.; OLIVEIRA, H.; AZEREDO, J. Bacteriophages and their role in food safety. **International Journal of Microbiology** v. 2012, artigo ID 863945, 2012.

SILVEIRA, D.R.; KAEFER, K.; PORTO, R.C.; LIMA, H.G.; TIMM, C.D.; CERESER, N.D. Qualidade microbiológica de produtos de origem animal encaminhados para alimentação escolar**. Ciência Animal Brasileira,** v.20, p. 1-8, 2019.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTE, J.C.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.8, n.14; p. 1389-1418, 2012.

SORAGNI, L.; BARBABÉ, A.S.; MELLO, T.R.C. Doenças transmitidas por alimentos e participação da manipulação inadequada para sua ocorrência: uma revisão. **Estação Científica (UNIFAP)** v. 9, n. 2, p. 19-31, 2019.

SUPUT, D.; LAZIC, V.; POPOVIC, S; HROMIS, N. Edible films and coatings: Sources, properties and application. **Food and Feed Research** v.42, n.1, p. 11-22, 2015.

TEY, B.T.; LING, T.C.; NG, M.; TAN, W.S. Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen**. African Journal of Biotechnology** v.8, n.2, p.268-273, 2014.

THUNG, T.Y.; LEE, E.; PREMARATHNE, K.; MAZLAN, N.; KUAN, C.H.; ELEXSON, N.; TAN, C.W. et al. Bacteriophages and their applications. **Food Research** v.2, n.5, p. 404-414, 2018.

TRINDADE, M.B.; SOARES, B.; SCUDINO, H.; GUIMARAEA, J.T.; ESMERINO, E.A.; FREITAS, M.Q.; PIMENTEL, T.C.; SILVA, M.C.; SOUZA, S.L.Q.; ALMADA, R.B.; CRUZ, A.G. Cheese whey exploitation in Brazil: A questionnaire survey. **Food Science and Technology** v. 39, n. 3, p. 88-791, 2019.

TONG, X.; CHEN, G.; ZANG, Z.; WEI, Y.; XU, J.; QIN, L. Cheese consumption and risk of all-cause mortality: A meta-analysis of prospective studies. **Nutrients** v.9, n.63, p1-12, 2017.

TURBIANI, F.R.B**. Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

TURBIANI, F.R.B.; KIECKBUSCH, T.G.; GIMENES, M.L. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 175-181, 2011.

USDA United States Department of Agriculture. **Dairy and Products Annual/ Brazil.** Disponível em https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2021/05/Dairy-and-Products-Annual_Brasilia_Brazil_10-15-2020.pdf. Acesso em 18/08/2021.

VALDÉS, A.; RAMOS, M.; BEKLTRÁN, A.; JIMENÉZ, A.; GARRIGÓS, M.C. State of the art of antimicrobial edible coatings for food packaging applications**. Coatings** v. 7, n. 56, p 1-23, 2017 doi:10.3390.

VIEIRA, D.A.P.; FERNANDEZ, N.C.A.Q. **Microbiologia Aplicada.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goias. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. Disponível em: https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/413/2018/12/04_microbiologia_aplicada.pdf . Acesso em: 07/02/2022.

VIKRAM, A.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Phage biocontrol applications in food production and processing. **Current Issues Molecular Biology** n.40, p. 267-302, 2021.

VIJAYANAND, P.; PATIL, J.; REDDY, M.V. Formulation, characterization and in vivo evaluation of novel edible dosage form containing nebivolol HCl. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v 52, n.1, p. 179-189, 2016.

VILLADIEGO, A.M.D.; SOARES, N.F. F.; ANDRADE, N.J.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V. P.R.; CRUZ, R. Revestimentos e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios **Revista Ceres** v.52, n.300, p.221-244, 2005.

WALTHER, B.; SHMID, A.; SIEBER, R.; WEHRMULLER, K. Cheese in nutrition and health. **Dairy Science and Technology** v.88, n.4, p 389-405, 2008.

WEBER-DĄBROWSKA, B.; MATYSIAK, E.J.; ZACZEK, M.; LOBOCKA, M.; SZELACHOWSKA, M.L.; GÓRSKI, A. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. **Frontiers in Microbiology** v. 7, p. 1-14, 2016.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L; GONZÁLEZ- REZA, R.; MENDONZA-MUNÕZ, N.; MIRANDA-LINAREZ, V.; BERNAL-COUOH, T.; MENDONZA-ELVIRA, S.; QUINTANA-GUERRERO, D. Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. **International Journal of Molecular Science** v. 19, n.705, p.1-24, 2018.

ZUBER, S.; BOISSIN-DELAPORTE, C.; MICHOT, L.; IVERSEN, C.; DIEP, B.; BRÜSSOW, H.; BREEUVER, P. Decreasing E*nterobacter sakazakii* (*cronobacter* spp.) food contamination level with bacteriophages: Prospects and problems. **Microbial Biotechnology** v. 1, n. 6, p. 532-543, 2008.

ANEXO A- Resumo do 13th Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences

Edible coating with bacteriophages for biocontrol of half-cured cheese

Edjane C. Cinto[1,*]; Thais J. Oliveira[1]; Victor M. Balcão[1,2] and Marta M. D. C. Vila[1]

1) PhageLab - Laboratory of Biofilms and Bacteriophages, University of Sorocaba, 18023-000 Sorocaba/SP, Brazil.
2) Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, P-3810-193 Aveiro, Portugal.

*e-mail: edjcinorte@gmail.com

Keywords: Bacteriophages; ***Salmonella enterica***; edible coating; half-cured cheese

ABSTRACT

Half-cured cheese is one of the most popular cheeses in the country, however, it can be a source of microorganisms such as ***Salmonella enterica*** that cause toxic food infections [1,2]. The use of edible coatings, based on natural polymers, has been used to improve food safety and quality [3]. The incorporation of lytic bacteriophages in food films can be interesting for the biocontrol and maintenance of the microbiological quality of several foods, such as cheese [4]. In this sense, the objective of this research was to develop an edible coating with lytic bacteriophages for ***S. enterica*** aiming at biocontrol of half-cured cheeses. Initially, the isolation of phage and its biological and physicochemical characterization was carried out according Carvalho [5]. Subsequently, a polymeric coating formulation was developed with the incorporation of lytic phages against ***S. enterica*** [6]. The results obtained have indicated that the prepared film has the potential for its intended use.

ACKNOWLEDGEMENTS

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (FAPESP Refs. No. 2016/08884-3 [Project PneumoPhageColor] and 2016/12234-4 (Project TransAppIL)), is hereby gratefully acknowledged. Funding for Victor M. Balcão through a BPE grant from FAPESP (São Paulo, Brazil) (Ref. No. 2018/05522-9, Project PsaPhageKill) is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, in the form of Research Productivity (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão (Refs. No. 306113/2014-7 and 308208/2017-0). Support from PROSUP-CAPES in the form of a M.Sc. Scholarship granted to Edjane C. Cinto and Thais J. Oliveira is also greatfully acknowledged. The authors have no conflicts of interest whatsoever to declare.

REFERENCES

1. Tong, X.; Chen G; Zhang, Z.; Wei, Y.; Xu, J.; Qin, L. Cheese consumption and risk of all-cause mortality: A meta-analysis of prospective studies. Nutrients 9 (2017):1-12.
2. Jordana, D.; Navarro, C.; Rojas, V.; Turra, G.; Robeson, J.; Borie, C. The use of a bacteriophage cocktail as a biocontrol measure to reduce ***Salmonella enterica*** serovar Enteritidis contamination in ground meat and goat cheese. Biocontrol Science and Technology 25 (2015): 970-974.
3. Zambrano-Zaragoza, M.L.; González-Reza, R.; Mendoza-Muñoz, N.; Miranda-Linares, V.; Bernal-Couch, T.F; Mendoza-Elvira, S.; Quintanar-Guerrero, D. Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. International Journal of Molecular Science 19 (2018): 1-24.
4. Kazi, M.; Annapure, U.S. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. Journal of Food Science and Technology 53 (2016): 1355–1362.
5. Carvalho, C. Bacteriophage characterization. 3 rd International Hands- on Phage. Braga- Portugal, 2017
6. Shigematsu, E.; Dorta, C.; Rodrigues, F.J.; Cedran, M.F.; Giannoni, J. A.; Oshiiwa, M.; Mauro, M.A. et al. Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots. Journal of Food Science and Technology 55 (2018): 3712–3720.

ANEXO B- Certificado do XXXI Brazilian Congress of Virology & XV Mercosul Virology

SBV

CERTIFICATE

Verifique o código de autenticidade 2865301.0167710.093758.8.8967353594453317468 8 em https://www.even3.com.br/documentos

XXXI BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY

VIROLOGY

EVENT ONLINE EVENT

& 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 BIOCONTROL OF ESCHERICHIA COLI, AIMING AT FOOD APPLICATIONS, authored by Edjane Consorte Cinto, Thais Jardim Oliveira, Erica CRISTINA SANTOS SILVA, Bianca Gianola Belline Silva, Fernanda Morelli, Liliam Katsue Harada, 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 Spilki
President of SBV

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

ANEXO C- Certificado do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa.

Verifique o código de autenticidade 2637606.0632954.207657.8.37839393750425983486 em https://www.even3.com.br/documentos

XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA

19 a 23 de outubro de 2021 – ON-LINE

CERTIFICADO

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Edible coating integrating lytic bacteriophage particles for biocontrolling Salmonella enterica in half-cured cheese** de autoria de Edjane Consorte Cinto, Thais Jardim Oliveira, Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e Marta Maria Duarte Carvalho Vila, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.