

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
BACTERIÓFAGOS SOBRE *SALMONELLA* HEIDELBERG
MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE BIOFILMES**

Tese de Doutorado

Bruna Webber

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
BACTERIÓFAGOS SOBRE *SALMONELLA* HEIDELBERG
MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE BIOFILMES**

Autora: Bruna Webber

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva, especialidade Bacteriologia.**

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Coorientadora: Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2020

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

BRUNA WEBBER

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
BACTERIÓFAGOS SOBRE *SALMONELLA HEIDELBERG*
MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE BIOFILMES.**

Aprovada em 03 ABRIL 2020.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da comissão



Profª. Dra. Laura Beatriz Rodrigues
Coorientadora

Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Membro da Comissão

Profª. Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

Dr. Thales Quedi Furian
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença insubstituível em minha vida.

Aos meus pais, Jane e Celso, por todo o apoio e carinho, e aos quais devo todas as minhas conquistas. Ao meu irmão Mateus, pelo carinho e amizade.

Ao meu marido Felipe, por ser o maior incentivador nessa escolha, obrigada por tudo.

À Universidade de Passo Fundo pela disponibilidade, apoio e infraestrutura para realização deste projeto.

Agradeço ao meu orientador, professor Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela oportunidade oferecida para que eu realizasse o doutorado na UFRGS, e pela confiança para o desenvolvimento deste projeto.

À Professora Laura Beatriz Rodrigues, coorientadora deste projeto, por acreditar na minha capacidade, estar sempre disposta a ajudar, pela dedicação, amizade, orientação e eterno exemplo profissional e pessoal. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Professora Luciana Ruschel dos Santos, pela amizade, ajuda valiosa e ensinamentos.

À Professora Luciane Daroit, pelo empenho e dedicação em realizar a análise estatística do projeto, sem você não seria possível.

Agradeço a ajuda valiosa da Karen e do Thales, que auxiliaram nas etapas do projeto realizadas no CDPA. Aos colegas e amigos do CDPA, Daiane Wilsmann, Daiane Carvalho, Vivian e Hiran, pela ajuda, apoio e amizade.

À família do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo: Carol, Natalie, Suelen, Luciane, Maisa, Adele, Lucas, Rafael, Enzo, Ana Luiza, Rayssa, obrigada pela amizade, ensinamentos e disponibilidade para a realização dos meus experimentos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A constante busca pelo aperfeiçoamento nos processos que garantam a segurança dos alimentos impulsionam estudos com o intuito de conhecer melhor as características de patógenos, que, quando presentes, causam impactos negativos ao setor avícola. *Salmonella* Heidelberg (SH) é o sorovar que se destacou nos últimos anos devido sua alta prevalência e multirresistência aos antimicrobianos. Buscou-se nesse trabalho informações quanto à formação de biofilmes, à suscetibilidade antimicrobiana, e à detecção de genes de virulência, permitindo, assim, melhor entendimento e maneiras alternativas de eliminação da SH. Encontramos variados perfis genotípicos (56), diferentes graus de formação de biofilme e altas taxas de multirresistência (125/126 - 99,2%), sugerindo que há uma diversidade de isolados de SH em produtos avícolas, o que pode indicar a existência de fontes de contaminação variáveis na indústria de alimentos. Atualmente, o mundo está enfrentando um crescente surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos e a necessidade de reduzir o seu uso indiscriminado é fundamental. A procura de novos compostos antimicrobianos a partir de espécies vegetais, como óleos essenciais (OEs), e o uso de bacteriófagos (fagos), tem se mostrado bastante expressiva. Os fagos são predadores naturais de bactérias, onipresentes no ambiente e com alta especificidade ao hospedeiro, inofensivo para homens e animais. Os OEs são utilizados desde a idade média nos mais diferentes ramos das indústrias farmacêutica, sanitária, agrícola e de alimentos, e sua atividade bactericida também é tida como destaque. Nesse contexto, ambos são considerados alternativas valiosas e uma oportunidade de reduzir o uso de antimicrobianos. Avaliou-se a capacidade de biocontrole com o uso de três bacteriófagos (UPF_BP1, UPF_BP2, UPF_BP3) isolados ou combinados (*pool*) para prevenção e remoção de biofilmes de SH em superfície de poliestireno, em tempos de 3, 6 e 9 horas de ação. Os fagos individuais e em combinação demonstraram reduções na adesão de SH em até 83,4%, e remoção do biofilme pré-formado de até 64,0%. Ressalta-se que o uso de combinações sinérgicas entre os fagos é a mais indicada por potencializar a redução, bem como o uso no condicionamento de superfícies ser mais eficaz do que em biofilmes pré-formados. No teste com os OEs, avaliou-se a ação *in vitro* de cinco óleos (orégano, canela, tomilho, cravo e gengibre) sobre os isolados de SH, avaliando atividade antimicrobiana em ágar difusão e concentração inibitória mínima (CIM). O orégano e a canela obtiveram ação antimicrobiana em baixas concentrações sobre os isolados. Além disso, o efeito do OE de orégano foi testado em matriz cárnea nas temperaturas de $12\pm 1^\circ\text{C}$ e a $4\pm 1^\circ\text{C}$ por 0, 1, 3 e 5 dias, sendo eficiente para redução da carga microbiana em diferentes temperaturas e tempo de contato com a matriz confrontada, enfatizando a importância da associação à baixas temperaturas. Com esses resultados temos disponíveis métodos naturais que podem ser alternativas para o controle desse patógeno, e contribuem para o futuro uso de bacteriófagos como medida de condicionamento de superfícies no biocontrole de biofilmes de SH.

Palavras-chave: bacteriófagos, óleos essenciais, biofilme, susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência

ABSTRACT

The constant search for improvement in processes that guarantee food safety, stimulate studies in order to better understand pathogens characteristics, if present, causes negative impacts to poultry sector. Salmonella Heidelberg (SH) is the sorovar that has stood out in recent years due to its high prevalence and antimicrobials resistance. The objective of this research was to find information regarding the biofilm formation, antimicrobial susceptibility, and virulence genes detection, thus allowing a better understanding and alternative ways to eliminate SH. We found varied genotypic profiles (56), different biofilm formation degrees and high multi-resistance rates (125/126 - 99.2%), suggesting that there is a diversity of SH isolates in poultry products, which may indicate existence of sources contamination at food industry. Currently, the world is facing an increasing emergence of antibiotic resistant bacteria and the need to reduce their indiscriminate use is fundamental. The search for new antimicrobial compounds from plant species, such as: the essential oils (EOs) and also the use of bacteriophages (phages), has been shown to be expressive. Phages are natural predators of bacteria, they are ubiquitous in environment and with high specificity to the host, harmless to man and animals. EOs have been used since middle ages in most different branches of pharmaceutical, sanitary, agricultural and food industries, and their bactericidal activity is also highlighted. In this context, both are considered valuable antimicrobial alternatives and an opportunity to reduce the use of antimicrobials. The biocontrol ability was evaluated using three bacteriophages (UPF_BP1, UPF_BP2, UPF_BP3) isolated or combined (pool) to prevent and remove SH biofilms on polystyrene surfaces, in 3, 6 and 9 h of action. Individual and combined phages showed reductions in SH adherence up to 83.4%, and preformed biofilm removal up to 64.0%. It's noteworthy that the use of synergistic combinations between phages is most indicated, since it has enhanced reduction, as well as use in surface conditioning to be more effective than in preformed biofilms. In test with EOs, in vitro action of five oils (oregano, cinnamon, thyme, cloves and ginger) on SH isolates was evaluated, evaluating antimicrobial activity in diffusion agar, minimum inhibitory concentration (MIC). Oregano and cinnamon obtained antimicrobial action in low concentrations on isolates. In addition, the effect of EO of oregano was tested in a meat matrix at temperatures of $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ and at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 0, 1, 3 and 5 days, being efficient for reducing the microbial load at different temperatures and time of contact with the confronted matrix, emphasizing the importance of association with low temperatures. With these results we have available natural methods that can be alternatives for pathogen control and contribute to future use of bacteriophages as a measure of surface conditioning in SH biofilms biocontrol. With these results we have available natural methods that can be alternatives for pathogen control and contribute to future use of bacteriophages as a measure of surface conditioning in SH biofilms biocontrol.

Keywords: bacteriophages, essential oils, biofilm, antimicrobial susceptibility, virulence genes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de um bacteriófago.....	37
Figura 2	Organograma com as etapas desenvolvidas neste projeto.....	46
Figura 3	Distribuição das densidades ópticas de isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg formadores de biofilme.....	48
Figura 4	Dendrograma com os dados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 126 isolados de <i>S. Heidelberg</i>	56
Figura 5	Ação lítica de bacteriófagos visualizada em placas frente a <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	75
Figura 6	Percentual de redução pela ação lítica de bacteriófagos sob <i>Salmonella</i> Heidelberg na adesão (formação) do biofilme e remoção do biofilme pré-formado em superfície de poliestireno.....	80
Figura 7	Interação fago e biofilme.....	81
Figura 8	Média dos halos de inibição (mm) de óleos essenciais frente a isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	89
Figura 9	Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre isolados de SH pela técnica de ágar difusão.....	90
Figura 10	Ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à <i>Salmonella</i> Heidelberg na carne de frango sob diferentes temperaturas.....	97
Figura 11	Mecanismo antibacteriano do timol e carvacrol desintegrando a membrana externa de uma bactéria gram-negativa.....	100

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1	Susceptibilidade antimicrobiana dos 126 isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg frente aos antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar com classificação em três categorias (sensível, intermediário e resistente)	53
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação taxonômica dos bacteriófagos quanto à família, características morfológicas e classe dos ácidos nucleicos	35
Tabela 2	Classificação de <i>Salmonella</i> Heidelberg conforme a capacidade de formação de biofilme à 36±1°C	48
Tabela 3	Valores de halos inibitórios esperados para a família Enterobacteriaceae (CLSI, 2014)	51
Tabela 4	Distribuição do padrão de resistência e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA) de <i>Salmonella</i> Heidelberg de origem avícola	54
Tabela 5	Número total e percentual dos 126 isolados de <i>S. Heidelberg</i> susceptíveis, com resistências intermediárias e resistentes em relação a cada antimicrobiano testado	55
Tabela 6	Função dos genes associados à virulência e patogenicidade detectados através de PCR.....	60
Tabela 7	Sequência de primers, tamanho do amplicon e referência dos protocolos de PCR utilizados para a detecção dos genes de virulência	61
Tabela 8	Determinação dos perfis genotípicos de isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg	63
Tabela 9	Distribuição dos 24 genes de virulência detectados através de PCR nos isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg	66
Tabela 10	Isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg selecionados para o teste de ação dos bacteriófagos contra a formação e para remoção de biofilmes	72
Tabela 11	Perfil de sensibilidade de <i>Salmonella</i> Heidelberg aos bacteriófagos	75
Tabela 12	Caracterização da suscetibilidade aos bacteriófagos conforme lise em placa	78
Tabela 13	Percentual de prevenção na adesão do biofilme (formação) de <i>Salmonella</i> Heidelberg em superfície de poliestireno	133

Tabela 14	Percentual de redução do biofilme pré-formado de <i>Salmonella</i> Heidelberg em superfície de poliestireno com 9 horas de ação dos fagos	134
Tabela 15	Percentual de redução do biofilme pré-formado de <i>Salmonella</i> Heidelberg em superfície de poliestireno com 6 horas de ação dos fagos	135
Tabela 16	Percentual de redução do biofilme pré-formado de <i>Salmonella</i> Heidelberg em superfície de poliestireno com 3 horas de ação dos fagos	136
Tabela 17	Valores médios de halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> , <i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Cinnamomum cassia</i> e <i>Eugenia caryophyllus</i> frente a dez isolados de <i>S. Heidelberg</i>	91
Tabela 18	Concentração inibitória mínima (CIM) do OE de orégano (<i>Origanum compactum</i>) e canela (<i>Cinnamomum cassia</i>)	94
Tabela 19	Ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à <i>Salmonella</i> Heidelberg em diferentes temperaturas na carne de frango	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> (Caldo Infusão Cérebro Coração)
UFC	Unidade formadora de colônia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
TTSS	<i>Type Three Secretion System</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
CDC	<i>Center of Disease Control and Prevention</i>
DTA	Doença transmitida por alimentos
CIM	Concentração inibitória mínima
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
NARMS	<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System</i>
OEs	Óleos essenciais
UPF_BP1	<i>Salmonella Phage</i> UPF_BP1
UPF_BP2	<i>Salmonella Phage</i> UPF_BP2
UPF_BP3	<i>Salmonella Phage</i> UPF_BP3

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
μg	Micrograma
μL	Microlitro
χ ²	Teste do Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	O gênero <i>Salmonella</i> spp.	18
3.2	<i>Salmonella</i> Heidelberg	19
3.3	Salmonelose e saúde pública	21
3.4	Patogenia de salmonelose em humanos	22
3.5	Patogenicidade e fatores de virulência em <i>Salmonella</i>	23
3.5.1	Ilhas de patogenicidade	24
3.5.2	Plasmídeos	25
3.6	Resistência antimicrobiana	26
3.7	Biofilmes Microbianos	29
3.7.1	Métodos alternativos para controle de biofilme	32
3.8	Bacteriófagos	33
3.8.1	Classificação dos bacteriófagos	34
3.8.2	Taxonomia dos bacteriófagos	35
3.8.3	Ciclo de Replicação dos Bacteriófagos	36
3.8.4	Controle Biológico com o uso dos Bacteriófagos	38
3.9	Óleos essenciais como agentes antimicrobianos	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Local de realização dos experimentos	45
4.2	Microrganismos utilizados	45
4.3	Análises estatísticas	45
5	EXPERIMENTOS	46
5.1	Experimento 1 - Avaliação da adesão bacteriana de <i>Salmonella</i> Heidelberg em poliestireno	47
5.1.1	Material e Métodos	47
5.1.2	Resultados e discussão	47

5.2	Experimento 2 - Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	50
5.2.1	Material e Métodos	50
5.2.2	Resultados e discussão	52
5.3	Experimento 3 - Detecção de genes relacionados a virulência e patogenicidade	59
5.3.1	Material e Métodos	59
5.3.2	Resultados e discussão	63
5.4	Experimento 4 – Teste de suscetibilidade de <i>Salmonella</i> Heidelberg frente a bacteriófagos	69
5.4.1	Material e Métodos	69
5.4.2	Resultados e discussão	73
5.5	Experimento 5 – Teste de suscetibilidade de <i>Salmonella</i> Heidelberg frente a óleos essenciais	85
5.5.1	Material e Métodos	85
5.5.2	Resultados e discussão	89
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
7	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	APÊNDICE A – Porcentagens de redução no biofilme de <i>S. Heidelberg</i> pela ação dos bacteriófagos	133
	APÊNDICE B– Laudos de cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa (CG/MS) dos óleos essenciais utilizados no experimento 5	137
	APÊNDICE C– Relatório de análises microbiológicas realizadas na carne de frango adquirida em varejo	154
	ARTIGO PUBLICADO	155
	ARTIGO A SER SUBMETIDO	156

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário avícola mundial. Consolidou-se como um dos setores de maior importância para economia do país, produzindo 12,86 milhões de toneladas de carne de frango em 2018. Deste total 31,9% foi destinado ao mercado externo, destacando o Brasil como o maior exportador mundial desde o ano de 2004. Além disso no ano de 2018, 95.000 milhões de toneladas de carne de frango foram produzidas em todo o mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2019). Frente a isso, é necessário manter os padrões de higiene e de qualidade como prioridades na indústria avícola.

A segurança dos alimentos caracteriza-se pela preocupação com os perigos que podem estar associados aos produtos que fazem parte da alimentação humana, sendo assim qualquer risco de origem física, química ou biológica é inaceitável (GODOY *et al.*, 2016).

A bactéria *Salmonella* spp. é um dos principais agentes causadores de infecção alimentar em humanos (VIEIRA *et al.*, 2009), sendo os produtos de origem avícola as principais fontes de contaminação (GAST, 2008). A presença desse perigo microbiológico afeta negativamente o setor avícola, desse modo, toda produção brasileira é acompanhada por um completo e detalhado programa de controle do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Os produtos avícolas brasileiros são exportados para cinco continentes, e esses produtos devem atingir as certificações sanitárias para tal comércio. O controle de *Salmonella* spp. em matadouros-frigoríficos é rigoroso, pois além de ter relevância como causadora de doenças veiculadas por alimentos, possui reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

O sucesso deste controle também está relacionado à vigilância epidemiológica através de técnicas fenotípicas e genotípicas, que auxiliam no estudo das características dos diversos sorovares de *Salmonella*. A atuação do governo com programas de controle para os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* levou à redução de suas prevalências. Em contrapartida, nos últimos anos observou-se um aumento na prevalência de outros sorovares, como é o caso da *Salmonella* Heidelberg.

Quando microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., formam biofilmes nas indústrias alimentícias, estas se tornam uma preocupação do ponto de vista da

segurança dos alimentos. O biofilme favorece a permanência do microrganismo no ambiente de processamento, sendo pontos de contaminação importantes, além de apresentarem maior resistência a sanitizantes químicos, tornando mais difícil a sua remoção (COSTERTON *et al.*, 1995).

Com o intuito de minimizar a incidência de *Salmonella* spp. em aves e em toda sua cadeia produtiva, bem como na indústria de alimentos, geralmente se faz uso de antimicrobianos e de sanitizantes químicos. No entanto, existem preocupações a respeito da seleção de bactérias resistentes. Esse fato limita as opções de tratamento em casos de salmoneloses, representando uma preocupação extra com relação à saúde pública.

A necessidade de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto na medicina humana como na área veterinária, é fundamental. Se sabe que apesar das legislações vigentes proibirem a utilização de algumas classes de antibióticos como promotores de crescimento, está ainda é uma prática rotineira na produção animal. Por esses motivos, surge o interesse em tratamentos alternativos no controle de microrganismos patogênicos.

A procura de novos compostos antimicrobianos a partir de espécies vegetais, como o uso dos óleos essenciais, e também o uso de bacteriófagos utilizados na fagoterapia e no controle biológico, tem se mostrado bastante expressiva nos últimos anos. A busca por alternativas a fim de evitar a adesão bacteriana através do condicionamento de superfícies e redução do biofilme formado, com uso desses compostos, é uma importante ferramenta a ser estudada, principalmente frente a bactérias patogênicas de interesse em saúde pública.

Nesse intuito, o objetivo deste estudo foi caracterizar a formação de biofilmes, o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e de genes de virulência de isolados de *Salmonella* Heidelberg, bem como a capacidade de uso de bacteriófagos para prevenção e remoção de biofilmes, e a ação antimicrobiana de óleos essenciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antimicrobiana de bacteriófagos e de óleos essenciais em diferentes isolados de *Salmonella* Heidelberg (SH), provenientes de amostras de matadouro-frigorífico avícola, caracterizadas quanto à formação de biofilmes, à suscetibilidade antimicrobiana, e à detecção de genes de virulência.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno.
- Determinar o perfil fenotípico de resistência a onze antimicrobianos através do teste *in vitro* de sensibilidade por disco-difusão em ágar.
- Caracterizar genotipicamente os isolados de SH através da detecção de 24 genes de virulência pela técnica de reação em cadeia da polimerase.
- Avaliar o potencial lítico de três bacteriófagos (UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3) através do teste de ágar difusão em placas.
- Avaliar o efeito anti-adesão e de remoção de biofilme de três bacteriófagos contra SH em superfície de poliestireno.
- Avaliar a ação antimicrobiana de cinco óleos essenciais (*Zingiber officinale*, *Origanum compactum*, *Cinnamomum cassia*, *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* L.) frente a isolados de SH em matriz cárnea e pela técnica de ágar-difusão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O gênero *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é pertencente à família Enterobacteriaceae. Essa família possui mais de 50 gêneros bacterianos, incluindo um grande número de patógenos, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. entre outros. Estudos genéticos estimam que os genomas de *E. coli* e de *Salmonella enterica* possuam uma diferença de apenas 10% nas suas sequências de DNA, sugerindo que estas espécies tenham derivado de um ancestral comum (JONG *et al.*, 2010).

A classificação reconhecida atualmente inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta com seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. Em 2007, o Instituto Pasteur descreveu em torno de 2.600 sorovares, através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL), visando caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas (FORSYTHE, 2013; GRIMONT & WEIL, 2007).

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente e no intestino de alguns animais em todo o mundo, e foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885 por Daniel Elmer Salmon. *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos e com formato de bastonetes curtos. A maioria das espécies é móvel (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*) e apresenta flagelos peritríquios. Fermenta a glicose produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Possui como temperatura ótima de multiplicação aproximadamente 38°C e, de acordo com Tortora *et al.*, (2012), a temperatura mínima de 5°C. São microrganismos mesófilos, relativamente termossensíveis, podendo ser destruídos a 60°C por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2013; BERGEY'S MANUAL, 2015).

Salmonella possui diferentes tipos de sorovares, identificados por estruturas presentes na sua parede bacteriana. Cientistas classificam os diferentes tipos de *Salmonella* em sorotipos, sendo que cada um possui sua história e local de isolamento, portanto, podendo se comportar de maneira diferente. Os sorotipos são grupos dentro de uma única espécie de microrganismos, tais como bactérias ou vírus, que partilham estruturas superficiais distintas. Por exemplo, as bactérias do gênero *Salmonella* são

parecidas ao microscópio, mas podem ser separadas em diversos sorotipos com base em duas estruturas na sua superfície: a porção mais externa das bactérias, chamado de antígeno O; e uma estrutura filiforme delgada, chamada antígeno H, a qual corresponde a parte flagelar. Alguns sorovares também possuem o antígeno Vi (capsular) (BRENNER *et al.*, 2000).

Os antígenos O são distinguidos pela sua diferença na composição. Os antígenos H distinguem-se pelo teor de proteína dos flagelos. Cada antígeno O e H tem um número de código único e os cientistas determinam o sorotipo baseado na combinação antigênica distinta de O e H (GRIMONT & WEILL, 2007).

Os principais sorogrupos são A, B, C1, C2, D1, E1 e G, sendo 97% dos isolados de casos clínicos em humanos classificados a um destes grupos. Alguns sorotipos são encontrados somente em um tipo de animal ou em um único lugar, outros são encontrados em vários animais e em todo o mundo. Alguns podem causar doenças graves, enquanto outros causam doenças mais leves. Grupos de pessoas, como idosos, e crianças com sistemas imunitários enfraquecidos têm um maior risco de infecção por *Salmonella*, resultando em consequências para a saúde a longo prazo ou em morte (FIELDS, 2006).

Mais de 2.600 sorotipos já foram descritos para *Salmonella*, mas como muitos são raros, sabe-se pouco sobre a maioria deles. Menos de 100 sorotipos são os responsáveis pela maioria das infecções humanas, cerca de 60% dos sorovares isolados pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT & WEILL, 2007; LIBBY *et al.*, 2008). O que se estuda sobre cada sorotipo pode ajudar a entender melhor a doença e a história natural de todas as estirpes de *Salmonella*.

3.2 *Salmonella* Heidelberg

Com a atuação do governo brasileiro em programas de controle e de monitoramento de *Salmonella*, sorovares como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* tiveram redução de suas prevalências. Em contrapartida, nos últimos anos observou-se uma ascensão de outros sorovares, como é o caso da *Salmonella* Heidelberg (FERRARI *et al.*, 2019), pertencente ao grupo de *Salmonella* paratíficas, as quais podem causar doença em animais ou humanos.

Salmonella Heidelberg (SH) é um dos sorovares de maior distribuição no mundo e está entre os 10 sorovares de *Salmonella* mais associados a doenças humanas, pertencendo ao sorogrupo O:4 (B) com formula antigênica $\underline{1},4, [5],12\text{-r-}1,2$ (GRIMONT

& WEILL, 2007; CDC, 2016). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*), em seu programa Global Salm-Surv (GSS), até o ano de 2012, no Brasil *S. Heidelberg* esteve entre os 15 sorovares mais sorotipificados em amostras de animais, meio ambiente e na alimentação animal. É um dos sorovares mais detectados em seres humanos e mais prevalente em alimentos destinados para alimentação humana. Resultados semelhantes foram reportados em outros países, o que torna a pesquisa de *S. Heidelberg* essencial (WHO, 2016; WHO, 2017; WHO, 2017a).

Segundo Robinsom (2013), *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana* e *S. Heidelberg* são os cinco sorovares mais comumente encontrados em casos de surtos de salmoneloses em todo o mundo, sem considerar a fonte de contaminação. Conforme dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention – CDC*), os quatro mais preocupantes sorovares de *Salmonella* relacionados à saúde pública são *Typhimurium*, *Newport*, *Hadar* e *Heidelberg* devido à sua associação com resistência a múltiplas drogas (CDC, 2016). Já no Brasil, os principais sorovares encontrados em carcaças de frango e aves vivas, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são *S. Enteritidis*, *Infantis*, *Typhimurium*, *Heidelberg* e *Mbandaka* (BRASIL, 2008).

O sorovar *Heidelberg* é citado como o terceiro isolado mais frequente na avicultura no Canadá, sendo destaque em saúde pública e alternando com *S. Enteritidis* a posição de segundo ou terceiro sorovar mais isolado em humanos (DEMEZUK *et al.*, 2003; CHITTICK *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos, *S. Heidelberg* é um dos principais sorovares que causam infecções em humanos, ocupando o 3º lugar com 3,9% dos isolamentos, após *S. Enteritidis* com 16,9% e *S. Typhimurium* com 16% (VIEIRA *et al.*, 2009; CDC, 2016).

No Brasil, entre os anos de 1962 e 1991, em um estudo retrospectivo de 30 anos, *S. Heidelberg* já havia sido identificada em aves e produtos derivados (HOFER *et al.*, 1997). Este sorovar foi isolado por Nascimento *et al.*, (1997) em carcaças de frango, com a identificação de *S. Enteritidis* em 51% das amostras, *S. Hadar* em 26% e *S. Heidelberg* em 11%. Dickel (2004) avaliou o processo higiênico sanitário de abate de frangos em matadouros-frigoríficos no Sul do Brasil e relatou que carcaças, antes e depois do chiller, apresentaram respectivamente, 31,7% e 20% de positividade, sendo identificados os sorovares *S. Heidelberg* (63,9%), *S. Enteritidis* (31,9%), *S. Worthington* (2,1%) e *S. Tennessee* (2,1%).

Dentre as salmonelas que causam infecções em humanos, a *S. Heidelberg* vem se mostrando mais invasiva em comparação aos outros sorovares que causam gastroenterite, sendo que aproximadamente 13% dos casos desenvolvem infecção sistêmica (PHACASPC, 2007; JONES *et al.*, 2008; DUTIL *et al.*, 2010, CDC, 2016).

De acordo com o Sistema de Alertas Rápidos para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (*Food and Feed Safety Alerts - RASFF*), *S. Heidelberg* esteve entre os sorovares mais encontrado nos anos de 2013 e 2014, bem como no ano de 2016 e 2018 (RASFF, 2016; 2018). Sua crescente importância tem levado também a estudos em razão da frequente resistência à drogas antimicrobianas, como ceftiofur e ceftriaxona, limitando as opções de tratamento em casos de salmoneloses (PHACASPC, 2007; SHAH *et al.*, 2017).

3.3 Salmonelose e saúde pública

Salmonella spp. é considerada uma bactéria cosmopolita, com distribuição em praticamente todos os países. A salmonelose é uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças alimentares, constituindo uma grande responsabilidade em saúde pública e representando um custo significativo em muitos países (VIEIRA *et al.*, 2009). O número exato de casos clínicos não é conhecido devido à subnotificação, mas milhões de casos em seres humanos são mundialmente relatados todos os anos. A doença resulta em milhares de mortes, sendo responsável por um em cada quatro casos de diarreia no mundo (WHO, 2017a).

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, com padrões diferenciados de acordo com diversos fatores numa região, como diferenças nos hábitos alimentares, práticas de manipulação de alimentos, criação de animais, padrões de higiene e saneamento básico (RODRIGUES, 2011). No Brasil, de acordo com os dados da Vigilância Epidemiológica, no ano de 2018 foram identificados 503 surtos de DTA notificados, com 6.803 doentes, 731 hospitalizados e 9 óbitos relacionados. De 2009 a 2018, obteve-se registro de 2.350 surtos. A região Sudeste lidera o histórico com mais notificações de casos de DTAs, seguida da região Nordeste. Os sintomas mais evidentes, os quais caracterizam os surtos são: diarreia, dor abdominal, vômito e náuseas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Ainda no Brasil, em 90,5% dos casos de DTAs, os principais microrganismos envolvidos são: *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*. Destes, até o ano de 2016, *Salmonella* foi

o patógeno mais isolado. Contudo, cabe ressaltar que no país, durante os anos de 2009 e 2018, grande parte dos surtos não teve o microrganismo identificado, correspondendo a 66,4%. Em 2018 dos alimentos suspeitos identificados a água foi a mais incriminada (29,9%), seguida pelos alimentos mistos (23,4%). Conforme notificações de anos anteriores, as residências continuaram sendo o local de ocorrência mais associado aos surtos de DTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Conforme dados do CDC, 48 milhões de pessoas ficam doentes e outras 3.000 morrem por ano em decorrência das DTAs, apenas nos Estados Unidos (CDC, 2013; CDC, 2014). Deste total, acredita-se que 1,2 milhões dos casos sejam causados por *Salmonella* spp. levando a mais de 23.000 hospitalizações e 450 mortes (CDC, 2014b). Segundo dados da Autoridade em Segurança dos Alimentos da Europa (*European Food Safety Authority – EFSA*), mais de 100.000 casos de salmonelose são reportados em humanos todos os anos, ocasionando custos de mais de 3 bilhões de euros por ano (EFSA, 2015; EFSA, 2017).

A Organização Mundial da Saúde estima que todos os anos as DTAs causam perda de qualidade de vida de 33 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em crianças com menos de cinco anos, inclusive levando a óbito de cerca de 420.000 mil pessoas. Além disso, as doenças diarreicas são responsáveis por adoecer 550 milhões de pessoas e causar 230.000 mortes todos os anos. Os principais agentes etiológicos causadores são *Salmonella* não-tifoides, *E. coli*, *Campylobacter* e Norovírus (WHO, 2018).

O controle das salmoneloses representa um desafio para a saúde pública, devido ao surgimento de novos sorovares e à reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados, sendo assim, os esforços para o controle da *Salmonella* são muitas vezes dificultados pela diversidade de sorovares existentes (WHO, 2013).

3.4 Patogenia de salmonelose em humanos

Após a ingestão oral da *Salmonella*, as bactérias que sobrevivem ao baixo pH provocado pelo ácido clorídrico no estômago colonizam o intestino principalmente na região das placas de Peyer, onde estão localizadas as células M. Depois da colonização intestinal, a *Salmonella* spp. invade as células M e os enterócitos, com auxílio do Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) (GAL-MOR, 2014). Após a invasão celular, as células

bacterianas são fagocitadas por macrófagos. Quando os mesmos conseguem deter a bactéria, ela causa apenas a infecção local no trato digestivo. Por outro lado, quando as bactérias conseguem permanecer viáveis dentro de vacúolos nos macrófagos, ocorre a infecção sistêmica. Dentro dos macrófagos, *Salmonella* spp. consegue multiplicar-se e é levada a todo o organismo (BÄUMLER, 1997).

A salmonelose pode causar infecções focais, febre entérica, septicemia e, o mais comum, a enterocolite. Uma pessoa infectada apresenta sinais clínicos como febre, cólicas abdominais e diarreia a partir de 12 a 72 horas após o consumo do alimento ou bebida contaminada. A doença pode durar de 4 a 7 dias, e a maioria das pessoas recuperam-se sem o uso de antibióticos. Entretanto, a severidade da doença depende do sorovar e da imunidade do hospedeiro (CDC, 2014).

3.5 Patogenicidade e fatores de virulência em *Salmonella*

Patogenicidade é definida como a capacidade de um microrganismo causar doença, enquanto que virulência refere-se à gravidade da doença ocasionada pelo agente. Os mecanismos de virulência bacterianos conferem uma melhor habilidade ao microrganismo de sobreviver, invadir, multiplicar e persistir dentro do hospedeiro (BECEIRO *et al.*, 2013).

A patogenicidade está intimamente relacionada aos fatores de virulência presentes nas cepas, com o sorovar envolvido, quantidade do inóculo, fatores de virulência expressos pelo microrganismo e do estado imunológico do hospedeiro. Sendo assim, *Salmonella* spp. pode ocasionar desde uma infecção gastrointestinal branda até uma infecção sistêmica (BECEIRO *et al.*, 2013).

O conjunto de fatores de virulência de *Salmonella* aumenta com o conhecimento contínuo sobre os mecanismos moleculares por trás da patogenicidade. Por exemplo, as proteínas efetoras envolvidas na sobrevivência e na replicação da *Salmonella* em vacúolos citoplasmáticos foram caracterizadas apenas recentemente. Já outros fatores de virulência, como plasmídeos de virulência, toxinas, fímbrias e flagelos são objeto de estudos há décadas, sendo classificados como fatores de virulência "clássicos" (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005; MILJKOVIC-SELIMOVIC *et al.*, 2010).

As fímbrias, os flagelos e o lipopolissacarídeo são componentes da estrutura bacteriana e possuem um papel importante na virulência das cepas. A camada de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular é um exemplo. Os lipídeos presentes no LPS,

denominados endotoxinas ou lipídios A, interagem com os macrófagos de modo que se tornam resistentes aos peptídeos catiônicos, à ação endotóxica e à ação antimicrobiana das enzimas lisossomais (TORTORA *et al.*, 2000).

As fímbrias presentes na superfície da bactéria funcionam como adesinas, facilitando a interação entre bactéria e hospedeiro (CLOUTHIER *et al.*, 1993; ÁLVAREZ, 2007) e são importantes no processo de formação de biofilmes (GIBSON *et al.*, 2007; CERCA, 2012; JONG *et al.*, 2012). Os flagelos que levam a bactéria até o epitélio intestinal, mediante a quimiotaxia, permitem a bactéria atravessar a espessa camada de muco e contribuem para o processo inflamatório, e a capsula está diretamente relacionada com a capacidade invasiva da bactéria (ÁLVAREZ, 2007).

Os fatores de virulência são codificados por uma série de genes, e podem estar localizados no próprio cromossomo da bactéria, os chamados genes *housekeeping*, os quais conferem características específicas e básicas a bactérias de uma mesma família. Como podem estar presentes nas chamadas Ilhas de Patogenicidade, ou em elementos genéticos móveis, como transposons, plasmídeos e bacteriófagos (GROISMAN & OCHMAN, 1996; MARCUS *et al.*, 2000; VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005), esses genes irão conferir vantagens a bactéria, como adaptação da bactéria à célula hospedeira, resistência aos antimicrobianos e superação dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

3.5.1 Ilhas de patogenicidade

Os fatores de virulência de *Salmonella* estão codificados e agrupados em locais denominados Ilhas de Patogenicidade (*Salmonella Pathogenicity Islands* – SPI) (VIEIRA, 2009). Estas ilhas são largos agrupamentos de genes codificadores de fatores que contribuem com um determinado fenótipo de virulência que se manifesta em momentos chave do processo infeccioso (MARCUS *et al.*, 2000; ÁLVAREZ, 2007).

Estas ilhas genéticas estão localizadas no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos, e foram historicamente adquiridas através de eventos de transferência horizontal de genes. A aquisição de uma única SPI pode transformar um microrganismo comensal em um patógeno, dependendo das características da bactéria e do hospedeiro (MARCUS *et al.*, 2000).

Já foram descritas até o ano de 2013, 23 SPI, porém as funções dos genes contidos dentro de cada ilha ainda não foram completamente elucidadas (HAYWARD *et al.*,

2013). As SPI-1 e SPI-2 são as mais estudadas e descritas, já que possuem importante papel na infecção por *Salmonella* spp. (JONG *et al.*, 2012).

A SPI-1 é importante para que ocorra a infecção intestinal, possui mais de 26 genes que codificam proteínas para os sistemas de secreção tipo III, para a invasão das células não fagocíticas, como as células M do intestino, e para a ativação da resposta inflamatória (ÁLVAREZ, 2007; MIRMOMENI *et al.*, 2008; VIEIRA, 2009; JONG *et al.*, 2012). Esses genes são responsáveis pela multiplicação da *Salmonella* no interior de macrófagos (*spiA*), para a sobrevivência no interior de fagossomos (*msgA*, *pagC*), para a captação do ferro (*iroN*) e para codificar endotoxinas (*stm*, *cdtB*). Todos com importante papel na patogenicidade da *Salmonella* ao hospedeiro (ÁLVAREZ, 2007).

A invasão na célula depende do Sistemas de Secreção do Tipo III (TTSS), que são complexos sistemas de proteínas e estão presentes em todas as bactérias Gram negativas (MIRMOMENI *et al.*, 2008). Um fator importante para a internalização da *Salmonella* spp. é a polimerização do citoesqueleto de actina no local de contato com a bactéria, culminando com a formação de projeções na membrana da célula hospedeira, englobando a bactéria. Para completar a entrada e reparar o citoesqueleto das células epiteliais, *Salmonella* spp. inicia a despolimerização da actina. Ao final do processo, a bactéria localiza-se no interior das células do hospedeiro, dentro de vesículas membranosas, chamadas de SVCs (Vacúolos que contêm *Salmonella*) (SANSONETTI, 2002).

A SPI1-SST3, através de distintas proteínas efetoras (SopE, SopE2, SopB), contribuem para o início da resposta inflamatória, resultando em inflamação e o recrutamento de neutrófilos para o epitélio intestinal. A ilha de patogenicidade SPI2 é responsável pela capacidade da *Salmonella* spp. sobreviver dentro dos macrófagos e se multiplicar dentro dos SVCs, ocasionando infecção sistêmica (SHIMIDT & HANSEL, 2004). Esta ilha constitui um exemplo da eficácia da adaptação de um patógeno em uma célula hospedeira (ÁLVAREZ, 2007).

3.5.2 Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos genéticos dispersos no citoplasma bacteriano, de formato circular, que se replicam independentemente do cromossomo do hospedeiro, e que podem ser transmitidos entre as bactérias através da transferência horizontal em um processo chamado de conjugação bacteriana. A grande importância dessa transferência de genes, é que esta possibilita vantagens aos microrganismos, como o recebimento de

genes os quais podem aumentar virulência ou conferir maior resistência antimicrobiana (MADIGAM, 2010; SENGUPTA & AUSTIN, 2011; GYLES & BOERLIN, 2014). Apenas algumas cepas de *Salmonella* spp. possuem este tipo de plasmídeo (JONG *et al.*, 2012), como é o caso dos sorotipos de *Salmonella enterica* pertencentes à subespécie I, principalmente aqueles mais adaptados ao homem. O *operon spv* (*Salmonella plasmid virulence*) é comum a todos os plasmídeos de virulência de *Salmonella* spp. e está relacionado à sobrevivência no interior do macrófago (ÁLVAREZ, 2007).

3.6 Resistência antimicrobiana

A história das drogas antimicrobianas iniciou com a descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de atividade clínica, descoberto quando Alexander Fleming estudava culturas de *S. aureus*. Após observar que culturas desta bactéria deixadas sobre uma bancada haviam sido contaminadas por um fungo do ar, e que ao redor do contaminante não existia multiplicação do estafilococo, Fleming verificou presença de um fungo que pertencia ao gênero *Penicilium*, o qual estava exercendo o efeito antimicrobiano (TAVARES, 2001). Porém, oito anos após a introdução da penicilina, 68% dos *S. aureus* já apresentavam resistência a esse antibiótico (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

No início da década de 70, a resistência aos antimicrobianos começou a ser discutida quando médicos foram forçados a abandonar suas convicções de que, com a ampla oferta de agentes antimicrobianos existente, todas infecções bacterianas eram tratáveis (LOWY, 2003). Atualmente, este assunto vem sendo amplamente estudado em diferentes gêneros bacterianos, principalmente com relação a microrganismos responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos, como no caso da *Salmonella* spp. (RIBEIRO *et al.*, 2006).

As doenças transmitidas por alimentos e a resistência aos antimicrobianos são questões internacionais de saúde. As bactérias podem apresentar dois tipos de resistência aos antimicrobianos: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é natural, ou seja, quando uma espécie é resistente a um determinado antimicrobiano, mesmo antes do seu uso. A resistência adquirida ocorre quando um microrganismo continua a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano ao qual ele já foi sensível (ANVISA, 2008), sendo o principal efeito colateral de seu uso à seleção de bactérias resistentes (SCHWARZ *et al.*, 2010; RAO, 2013).

Enquanto algumas linhagens bacterianas apresentam resistência intrínseca, outras obtêm resistência a antibióticos por mutação, pela recombinação de um DNA estranho no cromossomo ou pela aquisição horizontal de genes. Vários elementos genéticos móveis têm sido relatados por serem capazes de mobilizar diferentes tipos de genes de resistência aos antimicrobianos por processos conhecidos como transformação, conjugação ou transdução (GOGARTEN & TOWNSEND, 2005).

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

O uso indiscriminado de antibióticos no processo de produção de alimentos de origem animal pode funcionar como uma ferramenta de seleção para alguns microrganismos e para a resistência desses aos antimicrobianos (GYLES, 2008; KOLUMAN & DIKICI, 2013). Bem como o uso irresponsável na medicina humana, já que o aumento de infecções alimentares provocadas pela *Salmonella* ocorre principalmente devido ao desenvolvimento de novas características específicas, tornando-as capazes de se adaptar e de apresentar resistência aos antibióticos (COOK *et al.*, 2009; TONDO & RITTER, 2012; KOLUMAN & DIKICI, 2013).

Reardon (2017) descreve que o gene *mcr-1* emergiu há cerca de 18 meses em bactérias de suínos na China. Este gene vem sendo responsável por conferir taxas alarmantes de resistência à colistina, o qual é conhecido como “antibiótico de último recurso” na medicina humana. Em alguns locais quase 100% dos animais de produção possuem o gene *mcr-1* em bactérias encontradas nas fezes, além de relatos de um número cada vez maior em amostras de fezes humanas. Destaca-se que a propagação deste gene é um dos exemplos mais claros de como o uso de antibióticos em animais de produção pode levar à resistência em infecções humanas (REARDON, 2017^a).

Até o ano de 2019, já foram descritos oito homólogos do gene *mcr* (*mcr-1* a 8). Carroll *et al.* (2019) identificaram um novo homólogo desse gene de resistência à colistina em isolados de um paciente humano em 2010. O *mcr-9* foi identificado em um isolado de *Salmonella* Typhimurium multirresistente durante a triagem de rotina de genomas de *Salmonella* para genes de resistência antimicrobiana. Os genes *mcr* transmitidos por plasmídeo que conferem resistência à colistina ameaçam a saúde pública em escala

internacional, pois podem ser transmitidos via transferência horizontal e tem potencial para se espalhar globalmente (CARROLL *et al.*, 2019).

O planeta está repleto de agentes antimicrobianos, e isso contribuiu significativamente para a seleção de bactérias resistentes e para a transferência de genes de resistência entre os biomas. Estratégias para combater essa disseminação já estão sendo implementadas, como a diminuição do uso de antibióticos e a redução de sua expansão no ambiente. Além disso, tem-se adotado o financiamento de programas para sintetizar novos compostos antimicrobianos, a exploração de novas terapias alternativas e melhorias nos estudos das estratégias da transferência horizontal de genes com o objetivo de bloquear a transferência de resistência (BROWN-JAQUE *et al.*, 2015).

A resistência antimicrobiana para *Salmonella enterica* está sendo verificada em vários países nos últimos anos. Este fato é preocupante, uma vez que a *S. enterica* é uma das causas mais comuns de gastroenterite humana em todo o mundo (OLIVEIRA & BRAZ, 2011). A resistência a apenas um antimicrobiano não é de grande preocupação, mas estudos têm relatado um aumento na taxa de patógenos resistentes a mais de um antimicrobiano, sendo classificados como multirresistentes (resistência a três ou mais classes de antibióticos) (LERTWORAPREECHA *et al.*, 2012).

Com relação a *Salmonella* spp., outro ponto importante é a crescente resistência às quinolonas, fluoroquinolonas ou cefalosporinas. Este problema induz a necessidade de monitoramento da resistência deste patógeno e de sua prevalência em alimentos, principalmente em função das implicações de uma potencial propagação de microrganismos resistentes e de importância em saúde pública. A implementação de normas sanitárias rigorosas na indústria de alimentos, controle rigoroso de agentes antimicrobianos na indústria pecuária, diagnóstico rápido e tratamento adequado, são importantes ferramentas para reduzir significativamente a carga global de salmonelose (HUR *et al.*, 2012).

Segundo o NARMS (2015), cepas de *Salmonella* spp. isoladas de fonte avícola apresentaram resistência à ceftriaxona, antibiótico importante usado para tratar pacientes gravemente doentes, durante o primeiro semestre de 2015. Deste ano para 2017 a resistência à ceftriaxona aumentou de 6,5% para 9,3% (NARMS, 2018). Em perus, os isolados de *Salmonella* spp. também apresentaram resistência à ceftriaxona, aumentando as taxas de 8% para 12% do ano de 2015 para 2017 (NARMS, 2018). Dentre as fluoroquinolonas, a ciprofloxacina é um importante antibiótico para o tratamento de infecções por *Salmonella* spp. Ainda nestes isolados avícolas, a resistência à

ciprofloxacina não foi observada, bem como para a azitromicina, antibiótico importante e recomendado para o tratamento de *Salmonella* spp. e outros agentes patogênicos intestinais.

Embora a resistência à azitromicina entre isolados de *Salmonella* em humanos seja rara, dados do NARMS (2018) mostram um aumento em 2017. Durante 2011 à 2016, apenas 26 isolados de *Salmonella* (0,2%) foram resistentes à azitromicina. No entanto, somente em 2017, 26 (1,1%) isolados resistentes à azitromicina foram identificados. As salmonelas de amostras de alimentos e animais coletadas entre 2015 e 2017 não apresentaram resistência à azitromicina (NARMS, 2018). Durante 2015 à 2017, houve um aumento substancial de *Salmonella* multirresistentes a antibióticos recuperadas de aves rotineiramente amostradas (9,5% a 18%) e em amostras de swab cecal de frango (15% a 25%) (NARMS 2018).

A importância de *Salmonella* spp. na saúde pública não é devido apenas a sua alta frequência em surtos, mas também devido à grande resistência antimicrobiana que este microrganismo apresenta (TONDO & RITTER, 2012). *Salmonella* resistentes a antimicrobianos representam uma grave ameaça, porque podem comprometer o tratamento. Além disso, pessoas infectadas com cepas resistentes são mais propensas a sofrer um efeito adverso a saúde, como doença prolongada, aumento da gravidade da doença, hospitalização ou morte, em comparação àquelas infectadas com cepas sensíveis (COOK *et al.*, 2009). Torna-se essencial alternativas de controle microbiano no combate às bactérias patogênicas.

3.7 Biofilmes Microbianos

A microbiologia tradicional estudou, desde seu início, a caracterização das células encontradas em suspensões, denominadas como planctônicas, ou seja, de vida livre. Contudo, as primeiras observações de células aderidas foram realizadas por Antonie van Leeuwenhoek através do estudo de amostras de dente no século XVII. Em seu microscópio rudimentar, o pesquisador visualizou mais fragmentos de células agregadas (sésseis) do que sob a forma planctônica. A capacidade das bactérias de formar comunidades complexas e viver em agregados foi estudada desde os tempos de Robert Koch no século XIX (CAIXETA, 2008).

A primeira publicação que descreve células aderidas foi descrita por Zobell em 1943, quando se iniciaram estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de

navios e em diferentes tipos de superfícies (ZOBELL, 1943). Em 1978, técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas foram empregadas por Costerton, o qual verificou que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava fixa a suportes, e não na forma livre, atribuindo o nome de biofilme às células microbianas aderidas (COSTERTON *et al.*, 1995).

Biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), produzida de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, aderidas a um substrato biótico ou abiótico, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN & COSTERTON, 2002; FLEMMING *et al.*, 2016).

Os biofilmes podem estar aderidos a qualquer superfície e são envolvidos por uma matriz de polímeros orgânicos, local onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, conhecidos como EPS (COSTERTON *et al.*, 1999). A adesão superficial dos microrganismos forma o EPS, o qual resiste a ambientes hostis, de modo a bloquear e reter os nutrientes necessários para o crescimento dos biofilmes, além de oferecer proteção às células contra agentes antimicrobianos (TORTORA *et al.*, 2000).

As EPS sintetizadas por células microbianas variam muito na sua composição, e conseqüentemente, nas propriedades químicas e físicas. Os polissacarídeos são cadeias moleculares longas e finas, podendo estar associados de diferentes formas. As EPS presentes nos biofilmes assemelham-se aos polímeros sintetizados pelas correspondentes células em suspensão, e sua quantidade sintetizada nos biofilmes dependerá da disponibilidade de substratos de carbono e outros nutrientes (SUTHERLAND, 2001). De acordo com alguns autores, esta matriz tem inúmeras funções, como adesão inicial, retenção de água, adsorção de compostos, fonte de nutrientes, troca e armazenamento de informações genéticas. Além disso, o EPS é a principal barreira protetora no biofilme, capaz de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos e agentes sanitizantes, restringindo a difusão destes para o interior da matriz (GILBERT & FOLEY, 1997; ELVERS & LAPPIN-SCOTT, 2000).

A composição dos biofilmes depende de vários fatores: do tipo de microrganismo, do seu estado fisiológico, ambiente físico e da superfície na qual as células estão aderidas. As várias fases da interação microbiana parecem requerer a produção de estruturas extracelulares que ajudam na adesão inicial, na manutenção da estrutura do biofilme, e

mesmo no desprendimento de agregados (SAUER *et al.*, 2002). Os produtos excretados incluem enzimas, proteínas, bacteriocinas, solutos de baixa massa e ácidos nucleicos liberados devido à lise celular (CERCA, 2012).

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, debaixo das quais os microrganismos continuam a se multiplicar, seja em cultivo puro ou em associação com outros microrganismos. Assim, os microrganismos tornam-se mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização (RICHARD *et al.*, 2003; MARQUES, 2005).

Há várias descrições diferentes de estrutura dos biofilmes. Pelo menos três tipos de estruturas diferentes foram publicadas até o momento: a estrutura tradicional do biofilme (estrutura plana e homogênea); o modelo homogêneo em mosaico (constituída por microcolônias de bactérias unidas por EPS rodeadas por uma fase líquida); e a forma em cogumelo (estrutura de biofilme semelhante a um cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida), sendo essa última a mais citada (BEER D *et al.*, 1994; COSTERTON *et al.*, 1995).

A formação do biofilme consiste em cinco etapas: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; II) transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; III) início do processo de adesão bacteriana reversível; IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível e V) biofilme com alta atividade metabólica e liberação de células localizadas na periferia (CHARACKLIS, 1984).

Depois do contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras tornam-se mais grossas com o tempo, levando à formação das matrizes. A produção de EPS aumenta conforme a adesão das bactérias às superfícies (KUMAR & ANAND, 1998).

Além disso, no biofilme há um mecanismo de comunicação celular, o qual envolve a síntese bacteriana e a liberação de moléculas sinalizadoras difusíveis, chamado de *quorum sensing* (QS). Estes sinais podem ser dependentes da densidade celular ou produzidos pelas bactérias em diferentes fases de crescimento, permitindo uma regulação da expressão gênica. O QS é medido pelas moléculas N-acil homoserina-lactonas (AHLs), podendo assim se monitorar a população de biofilmes em um determinado ambiente (CERCA, 2012).

Salmonella spp. pode aderir e formar biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos (MANIJEH, 2008). A celulose é um dos principais

componentes do biofilme produzido por *Salmonella* spp. Representa um fenótipo essencial do ciclo de vida do organismo para uma melhor adaptação da sobrevivência bacteriana no ambiente e maior probabilidade de colonização em um hospedeiro animal (SOLANO *et al.*, 2002). Além da celulose, *Salmonella* spp. produz Tafi, finas fimbrias agregativas que facilitam a adesão às superfícies e fornecem resistência às células contra forças químicas e mecânicas. A síntese de ambos componentes, celulose e Tafi, é regulada por um sistema complexo, que leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica com células muito compactadas em uma matriz rígida (CERCA, 2012).

Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando fragmentos ou células planctônicas dos microrganismos, como *Salmonella* spp., podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos (FUSTER-VALLS *et al.*, 2008). Na indústria alimentícia, constituem um risco higiênico, causando perdas econômicas devido às falhas técnicas nos sistemas de águas, na qualidade da higienização e na manipulação dos produtos. Atualmente a preocupação é notável com organismos patogênicos que se aderem às superfícies e que, posteriormente, irão causar risco à saúde do consumidor.

3.7.1 Métodos alternativos para controle de biofilme

A susceptibilidade reduzida aos desinfetantes e a agentes antimicrobianos pelos biofilmes microbianos torna o seu controle um desafio. Costerton *et al.*, (1995) relataram que estas células aderidas são quinhentas a mil vezes mais resistentes em comparação às células planctônicas, sendo necessário encontrar novas maneiras e compostos para o controle dos biofilmes.

Neste contexto, inúmeros estudos buscam métodos alternativos e promissores para controle da formação de biofilmes na indústria de alimentos. Dentre eles, pode-se destacar o uso dos bacteriófagos (GREGORACCI *et al.*, 2006; SKURNIK & STRAUCH, 2006; McLAUGHLIN & KING, 2008; SONI & NANNAPARENI, 2010; SREY & HA, 2013; PIRES *et al.*, 2017), o uso de biosanitizantes produzidos por bactérias (NDAHETUYE *et al.*, 2012) e de bacteriocinas (GÓMEZ *et al.*, 2012). Além disto, destaca-se o uso de ionização e radiação ultravioleta (BAE & LEE, 2012), o tratamento com ultrassom, o uso da água eletroquimicamente ativada (AYEBAH *et al.*, 2006; WILSMANN *et al.*, 2019), a ação do ozônio (BAUMANN *et al.*, 2009), o uso de ácidos orgânicos e biossurfactantes, além de produtos naturais como os óleos essenciais (TIWARI *et al.*, 2009).

3.8 Bacteriófagos

Os bacteriófagos ou fagos são um grupo de vírus que se caracterizam pela sua capacidade de infectar células procarióticas (ACKERMANN, 2011). São intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies ou grupos dentro de uma mesma espécie (HANGENS & LOESSNER, 2007). Seu nome vem do grego e significa “comedor de bactéria”. Estes microrganismos encontram-se onipresentes em grande quantidade na biosfera, o que faz com que sejam considerados uma das entidades biológicas mais abundantes na terra (ACKERMANN, 2011; CLOKIE *et al.*, 2011).

O primeiro relato da existência de bacteriófagos foi feito em 1896, quando o bacteriologista Ernest Hanking detectou a presença em dois rios na Índia de uma elevada atividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, limitando a expansão da epidemia da cólera nesses locais (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001; HAQ *et al.*, 2012). Mas foi em 1915 que os bacteriófagos foram descobertos por Frederick Twort que testava a hipótese de os vírus possuírem capacidade de crescer em meios de cultura artificiais (DUCKWORTH, 1976; SULAKVELIDZE *et al.*, 2001).

Muitas vezes a descoberta dos bacteriófagos é associada a Félix D’Herelle, microbiologista do Instituto *Pasteur* (DUCKWORTH, 1976; FRUCIANO & BOURNE, 2007). Em 1915, durante a primeira guerra mundial, ocorreu um surto de disenteria hemorrágica bacteriana entre as tropas francesas, cuja a fonte de infecção era a água contaminada com fezes humanas. D’Herelle coletou esta água, obtendo um filtrado livre de bactérias, o qual posteriormente incubou juntamente com a bactéria *Shigella* spp. Como resultado, observou-se um fenômeno idêntico ao que havia sido descrito por Twort, e para o qual deu o nome de placas de lise (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001). Dois anos depois, D’Herelle publicou esse achado sob o título “*micróbio invisível e antagonista do Bacillus disenteri*”, reportando uma relação causal entre a cura da disenteria e a presença deste vírus, intitulando de bacteriófago (D’HÉRELLE, 2007). Em 1919, D’Herelle foi responsável pelo início do conceito de terapia fágica, administrando dose de bacteriófagos para tratar crianças com disenteria bacteriana, obtendo melhora dos pacientes em 24 horas.

Logo após esse período, outros estudos foram conduzidos com fagos, nos quais constatou-se sua capacidade em lisar outras bactérias patogênicas, como *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *V. cholerae*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus species*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitis* (FRUCIANO & BOURNE, 2007).

Uma década depois D'Herelle e colaboradores inauguraram em Paris o *Laboratoire du Bacteriophage*, onde eram comercializados cinco *cocktails* de bacteriófagos que asseguravam o tratamento de uma ampla variedade de infecções (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001; FRUCIANO & BOURNE, 2007; ABEDON *et al.*, 2011). A novidade gerou muitas controvérsias em torno da ausência de ensaios clínicos que comprovassem a eficácia desta terapêutica. O forte impacto negativo, juntamente com o início da era dos antibióticos, fez com que o interesse na fagoterapia começasse a decair no Ocidente durante os anos 1940 e 1950. Contudo, na União Soviética e no Leste Europeu (Geórgia, Ucrânia, Polônia e Rússia) continuaram as pesquisas com bacteriófagos para controle de infecções bacterianas (SULAKVELIDZE, 2006).

3.8.1 Classificação dos bacteriófagos

Em 1971, David Baltimore desenvolveu um sistema de classificação de vírus, o qual é baseado na síntese de RNAm Viral. O sistema de Baltimore agrupa os vírus em sete classes, de acordo com seu genoma (DNA e RNA, fita dupla ou simples), modo de replicação e expressão gênica. Os fagos pertencem às classes: I (DNAds que fazem a transcrição do mRNA por assimetria), II (DNAss da mesma polaridade do mRNA), III (RNAds que fazem a transcrição do mRNA por assimetria e produzem RNAm diretamente) e IV (RNAss de sentido positivo).

Os fagos são constituídos por ácido nucleico e proteínas e dividem-se em seis grupos distintos (GRATH & SINDEREN, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010). O genoma viral pode apresentar-se sob a forma de DNA ou RNA, de cadeia simples (ss) ou dupla (ds), na conformação linear, circular ou superenrolada. Os fagos com DNA cadeia dupla podem ser com cauda contrátil (A), cauda não-contrátil (B), cauda curta (C), sem cauda (D3) e pleomórficos com invólucro lipídico (G). Os fagos de DNA cadeia simples podem ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2). Os do grupo E são icosaédricos com RNA cadeia simples (E1) ou dupla (E2) (ACKERMANN, 1998).

3.8.2 Taxonomia dos bacteriófagos

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses- ICTV*) é uma entidade internacional responsável pela taxonomia de todos os tipos de vírus e pela classificação de bacteriófagos (ACKERMANN, 2011). Atualmente os bacteriófagos encontram-se divididos em 13 famílias distintas, com base na natureza do ácido nucleico e morfologia apresentada (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos bacteriófagos quanto à família, características morfológicas e classe dos ácidos nucléicos.

Família	Características morfológicas	Ácido Nucléico
<i>Corticoviridae</i>	sem envelope, capsídeo icosaédricos	dsDNA
<i>Cystoviridae</i>	com envelope, capsídeo icosaédricos	dsRNA
<i>Fuselloviridae</i>	com envelope, pleomórfico, sem capsídeo	dsDNA
<i>Inoviridae</i>	sem envelope, filamentosos	ssDNA
<i>Leviviridae</i>	sem envelope, capsídeo icosaédricos	ssRNA
<i>Lipothrixviridae</i>	com envelope, simetria helicoidal	dsDNA
<i>Microviridae</i>	sem envelope, capsídeo icosaédricos	ssDNA
<i>Myoviridae</i>	sem envelope, cauda contrátil	dsDNA
<i>Plasmaviridae</i>	com envelope, pleomórficos	dsDNA
<i>Podoviridae</i>	sem envelope, cauda curta não contrátil	dsDNA
<i>Rudiviridae</i>	sem envelope, simetria helicoidal	dsDNA
<i>Siphoviridae</i>	sem envelope, cauda longa não contrátil	dsDNA
<i>Tectiviridae</i>	sem envelope, cauda contrátil	dsDNA

Fonte: ACKERMANN (2011).

De todos os fagos descritos até então, cerca de 96% pertencem à ordem *Caudovirales*, grupo caracterizado pela presença de cauda (ORLOVA, 2012; KING *et al.*, 2012). De acordo com as morfologias desta estrutura, estão ainda organizados em 3 famílias filogeneticamente distintas: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*

Alguns bacteriófagos já conhecidos para *Salmonella enterica* são denominados OX174 e pertencem à família *Microviridae*. O bacteriófago T4 pertence à família *Myoviridae*, sendo relacionado ao sorovar *S. Enteritidis* (ABEDON, 2008). Bacteriófagos

da família *Podoviridae*, como o P22, estão relacionados ao sorovar *S. Typhimurium* (BYL & KROPINSKI, 2000).

3.8.3 Ciclo de Replicação dos Bacteriófagos

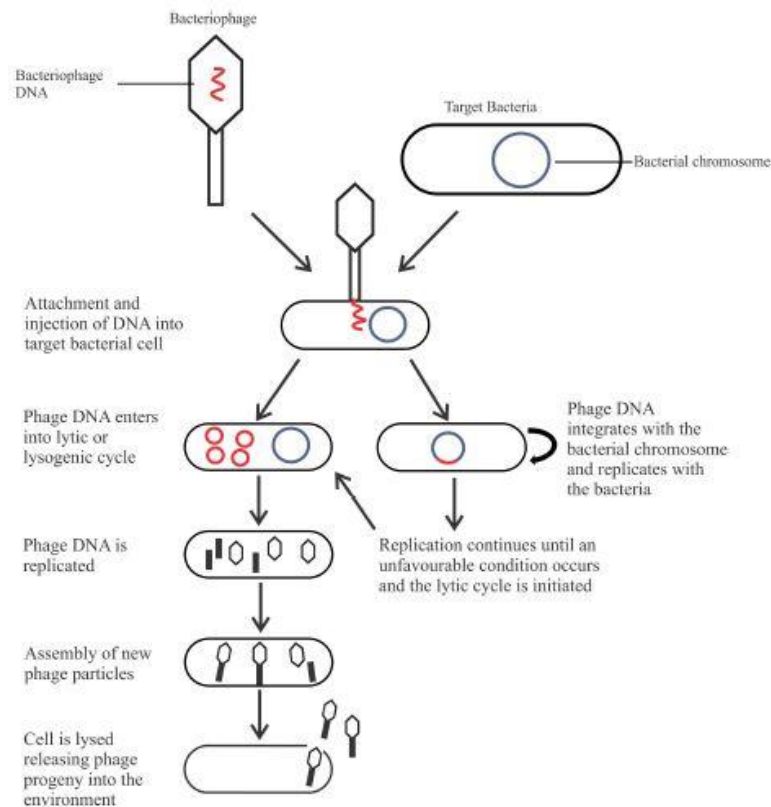
Os bacteriófagos não possuem sistemas geradores de ATP e sistemas necessários à síntese das suas próprias proteínas e ácidos nucleicos. Com isso, o seu processo de replicação depende do metabolismo das células hospedeiras que serão susceptíveis (TORTORA *et al.*, 2012).

A replicação do fago consiste na ligação nos receptores da célula bacteriana com posterior injeção do material genético, RNA ou DNA fágico, no hospedeiro bacteriano. As próximas etapas da adsorção e penetração do ácido nucleico viral, referem-se a síntese de componentes, replicação do material genético e a produção de novos capsídeos, com isso o fago assume a maquinaria biossintética do hospedeiro, e proteínas são sintetizadas. As últimas etapas consistem na montagem do novo fago e na liberação, a qual ocorre mediante lise bacteriana (SULAKVELIDZE, 2011).

No final do seu ciclo de crescimento, os novos fagos gerados precisam sair da bactéria hospedeira. Fagos de DNA de cadeia dupla saem das células bacterianas expressando duas proteínas, a holina e a endolisina (SHI *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2016). A holina é responsável por criar um poro na membrana citoplasmática, permitindo que a endolisina passe e interaja com a matriz de peptidoglicano resultando em lise celular (LOESSNER, 2005; FISCHETTI, 2010). A endolisina produzida por bacteriófagos, quando clonada e purificada, tem ação antimicrobiana e seu uso se torna outra possibilidade para atuação dos fagos (DONAVAN *et al.*, 2006).

Dependendo do tipo de bacteriófago, o ciclo de vida do vírus pode divergir numa via lítica ou lisogênica, e terá diferentes consequências tanto para a célula hospedeira como para a possível infecção viral (Figura 1). O ciclo lítico, ocorre dentro do hospedeiro e induz a lise das células, resultando na liberação de uma nova progênie de bacteriófagos, recomeçando, assim, um novo ciclo de infecção (MANDILARA *et al.*, 2006; GRAY *et al.*, 2018).

Figura 1 - Ciclo de vida de um bacteriófago.



Fonte: GRAY *et al.* (2018).

O ciclo lisogênico ocorre quando o ácido nucleico de um fago temperado é integrado no cromossomo ou no plasmídeo da célula hospedeira, recebendo o nome de prófago. Ao replicar-se, a bactéria replica o prófago para as células filhas. Esse estado lisogênico não é irreversível, pode haver estímulos, como exposição a temperatura ou à radiação ultravioleta, que fazem com que o prófago se desprenda do genoma da bactéria e inicie um novo ciclo lítico (GOLDING, 2011; GRAY *et al.*, 2018). Quando persiste no cromossomo ou plasmídeo do microrganismo, o prófago pode conferir novas funções aos seus hospedeiros como resultado da transferência horizontal de genes, por meio da transdução. Porém, o papel dos fagos na disseminação de genes de resistência a antibióticos entre hospedeiros bacterianos ainda não foi claramente resolvido, e deve ser considerado ao projetar estratégias para enfrentar a crise global de resistência aos antibióticos (LEKUNBERRI *et al.*, 2017).

O processo de replicação dos bacteriófagos pode levar a lise das células bacterianas, e isso faz com que estas partículas virais representem uma alternativa terapêutica viável para as infecções bacterianas (SULAKVELIDZE, 2006). São considerados atraentes devido às diversas características que possuem, como serem

hospedeiro-específicos, não destruindo a microbiota adjacente, não serem prejudiciais para as células eucariotas, e rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de novas ameaças bacterianas (GONÇALVES *et al.*, 2015).

A lise bacteriana possibilita a liberação de novos bacteriófagos no local de infecção e uma dose inicial é suficiente para atingir a eficácia terapêutica, ao contrário dos antibióticos que necessitam de repetidas doses superiores para que sejam mantidas as concentrações adequadas (ABEDON & ABEDON, 2010; LOC-CARRILLO & ABEDON, 2011; VANDAMME, 2013). Além disso, tem demonstrado ser eficaz no combate a formação de biofilmes e atuação em biofilmes pré-formados, situação essa que os antibióticos, muitas vezes são ineficazes devido à impossibilidade de atuarem nas células sésseis que estão embebidas por EPS (ABEDON *et al.*, 2011).

3.8.4 Controle Biológico com o uso dos Bacteriófagos

Há muitos anos os bacteriófagos são isolados e purificados da natureza para tratar infecções, principalmente nos países da antiga União Soviética. Como já se sabe, fagos são considerados seguros para uso, já que são espécie-específicos (REARDON, 2017b). O Instituto Eliava (George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology), fundado em 1923, na Rússia, conta com uma biblioteca de bacteriófagos líticos, os quais possuem atuação contra um amplo espectro de bactérias patogênicas. Neste local são realizados procedimentos de terapia fágica, onde pacientes acometidos por bactérias multirresistentes a antibióticos encontram uma alternativa ao tratamento. Desde o início, o instituto foi considerado líder por suas realizações no campo da pesquisa de bacteriófagos. Nos anos 80, quando não havia menção de terapia fágica no Ocidente, contava com inúmeros colaboradores, e os volumes diários de produção chegaram a exceder duas toneladas de preparações de bacteriófagos (ELIAVA, 2010).

Com inspiração no Instituto Eliava, os produtos à base de bacteriófagos comercializados pela empresa Biochimpharm[®] são utilizados na medicina veterinária, em alimentos e na agricultura. Na área veterinária esses produtos demonstraram até 100% de eficácia contra patógenos bacterianos. Com essa tecnologia, tem-se uma alternativa saudável, já que pode ser administrada em bovinos, aves, suínos e na piscicultura. Além disso, esses produtos são usados no controle biológico e podem reduzir com segurança a contaminação bacteriana dos alimentos. No período soviético, na Geórgia e no Leste

Europeu, os bacteriófagos líticos para *Salmonella* spp. foram ativamente utilizados na indústria de embutidos (BIOCHIMPHARM, 2017).

Além disso, são comercializados diferentes produtos à base de fagos para medicina humana (fagoterapia), os quais podem ser administrados por via oral (comprimidos e tablets), *spray* e via intravenosa. Outra vantagem, é que os fagos não possuem efeitos adversos relatados e não causam processos disbióticos, como é o caso de alguns medicamentos sintéticos (BIOCHIMPHARM, 2017).

Em 2017, começaram a ser comercializados no Brasil os bioprotetores patogênicos PhageGuard Listex e PhageGuard S (R\$ 1.191,56/1L), produtos à base de bacteriófagos líticos para o combate de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. A atuação dá-se através da aplicação direta no alimento, no ambiente de fabricação, em superfícies de contato, nos pisos e drenos (SACOO, 2017). Porém, deve-se ressaltar que o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não autorizou a utilização direta em carne de frango em matadouros-frigoríficos do Brasil, somente no ambiente de processamento, diferente do que já ocorre há anos nos EUA e na União Europeia. Recentemente, a Bayer lançou o Fagolac®, produto em pó à base de bacteriófagos líticos para controle de bactérias patogênicas causadoras de diarreia em bezerros, através da administração via alimento (BAYER, 2018).

Muitos matadouros-frigoríficos do Brasil exportam os seus produtos para diversos países, contudo, diversas vezes, ocorre o retorno de *containers* com grandes quantidades de carne de frango, em função de ter sido ultrapassado os limites de contaminação por patógenos, como *Salmonella* spp. Frente a isso, a indústria avícola tem grande interesse no uso de novas tecnologias antimicrobianas, como o uso de bacteriófagos. Neste contexto, o governo (MAPA) publicou em 2017 a Instrução Normativa nº 30 de 9 de agosto de 2017, a qual estabelece procedimentos para submissão de propostas, avaliação, validação e implementações de inovação tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal em estabelecimentos registrados (BRASIL, 2017). Com isso, o Brasil dá um importante passo para a possibilidade de aprovação da aplicação de bacteriófagos na indústria de alimentos. Esta tecnologia pode ser usada para prevenir e/ou reduzir a colonização por patógenos nas doenças em humanos e animais, na descontaminação de carcaças, na desinfecção e no controle de biofilmes de equipamentos e superfícies, aprimorando a qualidade dos alimentos produzidos (HUNGARO, 2010).

Os fagos são considerados agentes antimicrobianos promissores para prevenção e controle de biofilmes. No entanto, muitos estudos são necessários para entender melhor a interação entre fagos e biofilmes, uma vez que sua limitação já foi relatada (PIRES *et al.*, 2017). Vários estudos mostram reduções significativas nos biofilmes mono e multiespécies após uso de bacteriófagos, porém a erradicação completa é praticamente impossível (LEHMAN & DONLAN, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; GONG & JIANG, 2017).

Os fagos necessitam alcançar a bactéria hospedeira para se conectar aos receptores específicos que estão localizados na superfície celular. Somente após isso, a infecção e replicação é iniciada. A partir dessa teoria, o acesso aos receptores em células planctônicas é mais fácil quando se compara a células sésseis, já que nas células de vida livre os receptores estão mais facilmente disponíveis para o encaixe dos fagos (AZEREDO & SUTHERLAND, 2008; SILLANKORVA & AZEREDO, 2014). O biofilme é envolto pela matriz de substância polimérica extracelular, o que limita a difusão do fago. Estima-se que 10% da biomassa que compõe o biofilme são células, os outros 90% são diferentes tipos de polímeros (EPS) (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Com isso, a matriz de EPS é considerada um dos principais obstáculos que limita a difusão de agentes antimicrobianos, incluindo os bacteriófagos, até às células bacterianas sésseis.

A difusão de fagos através da matriz do biofilme pode ser influenciada tanto pela morfologia do fago quanto pela densidade do biofilme. A difusão de fagos através de biofilmes densos será mais difícil do que através de biofilmes menos densos. Em teoria os biofilmes que possuem canais de água maiores, são mais propensos ao ataque de fagos do que as estruturas mais densas (HU *et al.*, 2010).

O estado fisiológico das células também tem grande influência na replicação dos fagos. As células na fase exponencial são mais rapidamente lisadas do que as bactérias na fase estacionária (STORMS *et al.*, 2014). Além disso, as células que ficam nas camadas mais profundas do biofilme e sob baixas condições de nutrientes e oxigênio reduzem a ação do fago, sendo uma das principais razões pelas quais os fagos replicam mais nas células planctônicas em comparação às células sésseis (MAH & OTOOLE, 2001; SILLANKORVA & AZEREDO, 2014).

Para superar essas limitações do controle biológico com uso de fagos, pode ser utilizada combinações sinérgicas com múltiplos fagos na forma de *cocktails* ou associado a antimicrobianos e outros agentes bactericidas (CHAN *et al.*, 2013). Desta forma, essa

pesquisa busca mais informações sobre a interação fago-biofilme, que ainda é um processo complexo.

3.9 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos

A crescente resistência dos microrganismos aos produtos químicos convencionais e aos antimicrobianos levou cientistas a procurar novas alternativas biocidas, já que desde a antiguidade plantas e seus derivados, como os óleos essenciais (OEs), são utilizados na medicina popular. Desempenham papel protetor de plantas contra agentes infecciosos, como bactérias. Utilizados desde a idade média nos mais diferentes ramos das indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e de alimentos, a atividade bactericida dos OEs é tida como destaque (BAKKALI *et al.*, 2008).

A busca de garantias para a segurança dos alimentos impulsiona o desenvolvimento de métodos que podem ser substituídos por alternativas naturais, menos prejudiciais à saúde e, muitas vezes, mais viáveis economicamente (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008; TIWARI *et al.*, 2009). Na indústria de alimentos, o uso de aditivos que aumentem a segurança microbiológica é de grande interesse, o que abre perspectivas para o uso de compostos bioativos, dentre eles o uso de OEs (SARTORATTO *et al.*, 2004; TIWARI *et al.*, 2009; SHAO *et al.*, 2011).

A composição química dos OEs é variável, tendo influência de fatores como clima, região geográfica, solo e estágio de desenvolvimento da planta. Essas características podem alterar a resposta bioativa dos compostos (MATTOS *et al.*, 2007). Os OEs são uma fonte rica de alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides, muitos com atividade antimicrobiana comprovada. Estão presentes terpenóides, especialmente monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20). Também possuem uma variedade de peptídeos antimicrobianos, tais como ácidos, álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos alifáticos, ésteres acíclicos ou lactonas, outros compostos raros contendo azoto e enxofre, cumarinas e homólogos de fenilpropanóides (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Os OEs contêm uma série de metabólitos secundários que podem inibir ou retardar a multiplicação bacteriana. Seus componentes têm uma variedade de alvos, particularmente a membrana e o citoplasma, e em determinadas situações, eles alteram completamente a morfologia das células (CHORIANOPOULOS *et al.*, 2008; MARTINO *et al.*, 2009).

A ação antimicrobiana dos OEs está ligada à sua hidrofobicidade, que permite a associação aos lipídios da membrana celular, tornando os óleos permeáveis e causando perdas do conteúdo das células. Condições físicas, como o baixo pH, baixa temperatura e baixos níveis de oxigênio melhoram a ação antimicrobiana de óleos essenciais (BURT, 2004). Os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais podem alterar a permeabilidade da membrana celular, permitindo assim a perda de macromoléculas, como a ribose e glutamato de sódio. Além disso, podem interagir com proteínas da membrana causando deformação na sua estrutura e funcionalidade (FUNG *et al.*, 1977; BAJPAI *et al.*, 2008). Com esse efeito sobre a membrana celular da bactéria, os OEs muitas vezes são utilizados em sinergismo com outros compostos bactericidas, como o caso da associação com ácidos orgânicos e biossurfactantes.

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta nativa da Ásia (LORENZI & MATOS, 2002). É uma especiaria da culinária usada na medicina tradicional para melhora da digestão e que auxilia no tratamento de condições inflamatórias, tais como osteoartrite e artrite reumatóide (YADAV *et al.*, 2012). O gengibre contém componentes bioativos, como o gingerol, shogal e outros gingerones (ALMALKI *et al.*, 2016). Estudos realizados com seu óleo essencial e o extrato de gengibre frente a diversos patógenos alimentares verificaram excelente atividade antimicrobiana contra diferentes sorovares de *Salmonella* (SANGUANPUAG, 2011; AHMED, 2012).

O orégano pertence à família *Lamiaceae*, com mais de 30 gêneros e 223 espécies, representa um grande interesse ecológico e econômico, pois inclui muitas espécies medicinais e aromáticas (BENABID, 2000). Dentro desta família, o gênero *Origanum* é representado por cinco espécies, incluindo o *Origanum compactum*, umas das mais estudadas. Usado principalmente como condimento culinário, é empregado também em medicamentos para o tratamento de distúrbios pulmonares (BENABID, 2000; ENNABILI *et al.*, 2000; BOUHDID *et al.*, 2008). O óleo essencial de *O. compactum* possui ação antifúngica significativa, sendo o carvacol e o timol os dois principais fenóis, os quais constituem 78 a 85% de concentração para atividade antimicrobiana (BOUCHRA *et al.*, 2003; FRATINI *et al.*, 2017). O OE *O. compactum* possui ação sobre diferentes bactérias patogênicas, entre elas *S. Typhimurium* (MITH *et al.*, 2014).

A canela (*Cinnamomum cassia*), uma planta aromática da família *Lauraceae*, é originária do sul da China. É uma especiaria obtida a partir da casca interna, sendo amplamente usada em alimentos e na indústria cosmética, bem como erva medicinal para tratar doenças (OOI *et al.*, 2006; CHAUDHRY & TARIQ, 2006; KANG *et al.*, 2014). Os

OEs do gênero *Cinnamomum* possuem efeito antibacteriano contra um amplo espectro de bactérias patogênicas (CHANG *et al.*, 2001; SHAN *et al.*, 2007; LÓPEZ *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2012). É importante conhecer a composição química deste OE para compreender a ação antibacteriana (NAZZARO *et al.*, 2013), sendo o cinamaldeído e eugenol os componentes principais, compostos não voláteis usados como conservante natural em alimentos. O OE de *C. cassia* é eficaz na inibição da multiplicação de vários isolados de bactérias, incluindo Gram-positivo e Gram-negativo, entre essas a *Salmonella*, e fungos, incluindo leveduras (OOI *et al.*, 2006).

Estudos evidenciam o uso de OE de *Cinnamomum* como uma alternativa natural para conservantes químicos na preservação de alimentos (DUSSAULT *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, o OE de canela é Geralmente Reconhecidos como Seguro (GRAS) e possui status como aditivo alimentar.

Os OEs que são considerados Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) em doses tipicamente usadas em alimentos (BURT, 2004; SOUSA *et al.*, 2012) foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos e bebidas. Nesta lista está incluído o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (FDA, 2009), cujos constituintes são o timol, terpineno, carvacol e linanol (DONEGÁ *et al.*, 2014). A eficácia do tomilho na inibição de uma gama de bactérias patogênicas já foi previamente relatada (BALLESTER-COSTA *et al.*, 2013; NEZHADALI *et al.*, 2014; KOHIYAMA *et al.*, 2015). Além disso, segundo D'Amanto *et al.*, (2016), o óleo essencial de tomilho é eficaz para ser aplicado na superfície de carne fresca sem afetar o perfil sensorial do produto, sendo um bom conservante natural, com perspectivas de prolongar a vida útil.

O cravo (*Eugenia caryophyllus*) também possui ação antimicrobiana. Estudos demonstraram que o óleo essencial de *E. caryophyllus* contendo 78% de eugenol é efetivo contra bactérias patogênicas (*E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*) (OUSSALAH *et al.*, 2007; ALAM *et al.*, 2016). De acordo com Leuschner & Lelsch, (2003), o óleo de cravo tem um efeito bactericida a uma concentração de 1% (vol/vol), e reduz significativamente contagens de bactérias como a *L. monocytogenes*.

O uso dos OEs pode oferecer vantagens no processamento de alimentos, uma vez que podem aumentar a vida útil e a segurança do produto, além de permitir que novos produtos sejam introduzidos no mercado. Contudo, cabe ressaltar que são necessários muitos estudos para avaliar a ação dos óleos frente às condições intrínsecas de cada alimento, já que a eficácia antimicrobiana pode sofrer ação da composição do alimento.

Bem como, pesquisar maneiras de não alterar as características sensoriais do produto, como por exemplo, uso de microencapsulação ou liofilização, sendo essa última amplamente utilizada na produção de ração para frangos de corte.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização dos experimentos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (UPF) e no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Microrganismos utilizados

Utilizou-se 126 isolados de *Salmonella* Heidelberg provenientes de produto final de matadouro-frigorífico avícola no ano de 2015 e sorotipificadas pela Fiocruz. Foram cedidas gentilmente pelo professor Dr. Eduardo Cesar Tondo do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

Os microrganismos estavam armazenados em *freezer* a -20°C em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol. Todos os isolados foram reativados para verificação da pureza, utilizando um meio de enriquecimento não seletivo (BHI - Oxoid[®]), e posteriormente inoculados em caldo Rappaport Vassiliadis (RV - Merck[®]), plaqueadas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD - Merck[®]) e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Depois de 24 horas, foi observado o padrão de colônias para avaliar se são compatíveis com *Salmonella* spp., seguido da confirmação bioquímica e sorológica.

4.3 Análises estatísticas

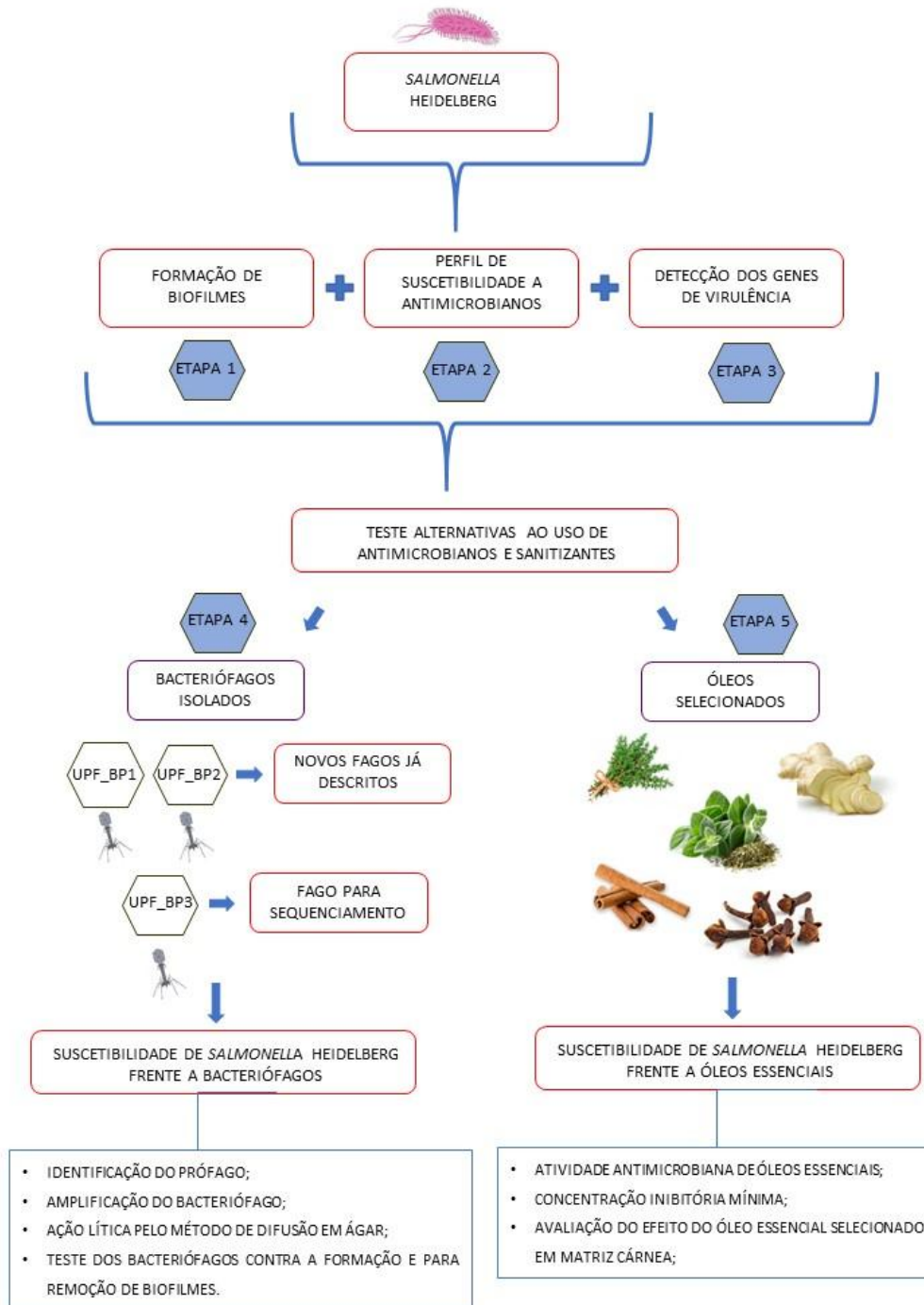
Os programas Microsoft Excel (Microsoft; Redmond, EUA), SPSS versão 2.3 (SILVA, 2014) e PAST 3.20 (IBM; Hong Kong) foram utilizados para a análise estatística dos dados.

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância e a comparação das médias será realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade. Os testes não paramétricos de Qui-quadrado (χ^2) foram usados para a classificação estatística da capacidade de formação de biofilme dos isolados e o dendrograma foi gerado utilizando o software PAST 3.20.

5 EXPERIMENTOS

Na Figura 2 é apresentado o organograma com as principais etapas que foram realizadas na metodologia deste projeto.

Figura 2 - Organograma com as etapas desenvolvidas neste projeto.



Fonte: elaborado pelo Autor (2020).

5.1 Experimento 1 - Avaliação da adesão bacteriana de *Salmonella* Heidelberg em poliestireno

5.1.1 Material e Métodos

Os 126 isolados de SH reativados foram usados para os ensaios de capacidade de formação de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno e a quantificação de biofilmes foi realizada conforme Stepanovic *et al.* (2000; 2004), Rodrigues *et al.* (2009) e Dojjad *et al.* (2015).

Uma alíquota de cada cultura foi transferida para caldo triptona de soja (TSB) sem glicose (Oxoid[®]) para incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas até atingir a escala 1 de MacFarland. Posteriormente, 200 μL de cada suspensão bacteriana foi inoculada, em triplicata, em poços de placas de microtitulação de poliestireno de 96 cavidades (Kasvi[®]). Os controles negativos foram poços com caldo TSB sem glicose, em triplicata, não inoculados. Após a incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, a suspensão bacteriana foi aspirada de cada poço, lavada 3 vezes com 250 μL de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (Synth[®]), secando-se levemente a placa. Em seguida, as células bacterianas foram fixadas com 200 μL de metanol p.a. (Neon[®]) por 15 minutos. O metanol removido e as placas secas em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram coradas com 200 μL de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec[®]) por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Após adição de 250 μL ácido acético glacial 33% foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos[®] 2010) a 550 nm.

O valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtida pela média aritmética da absorbância dos três poços e comparado com a média da absorbância dos controles negativos (Docn). Para determinar o grau de formação de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($\text{Doa} \leq \text{Docn}$), fracamente formadora de biofilme ($\text{Docn} < \text{Doa} \leq 2 \cdot \text{Docn}$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \cdot \text{Docn} < \text{Doa} \leq 4 \cdot \text{Docn}$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \cdot \text{Docn} < \text{Doa}$).

5.1.2 Resultados e discussão

O ensaio de formação de biofilmes em microplacas de poliestireno serviu como uma triagem para selecionar os isolados de *S. Heidelberg* com potencial de formação de biofilme em superfície abiótica.

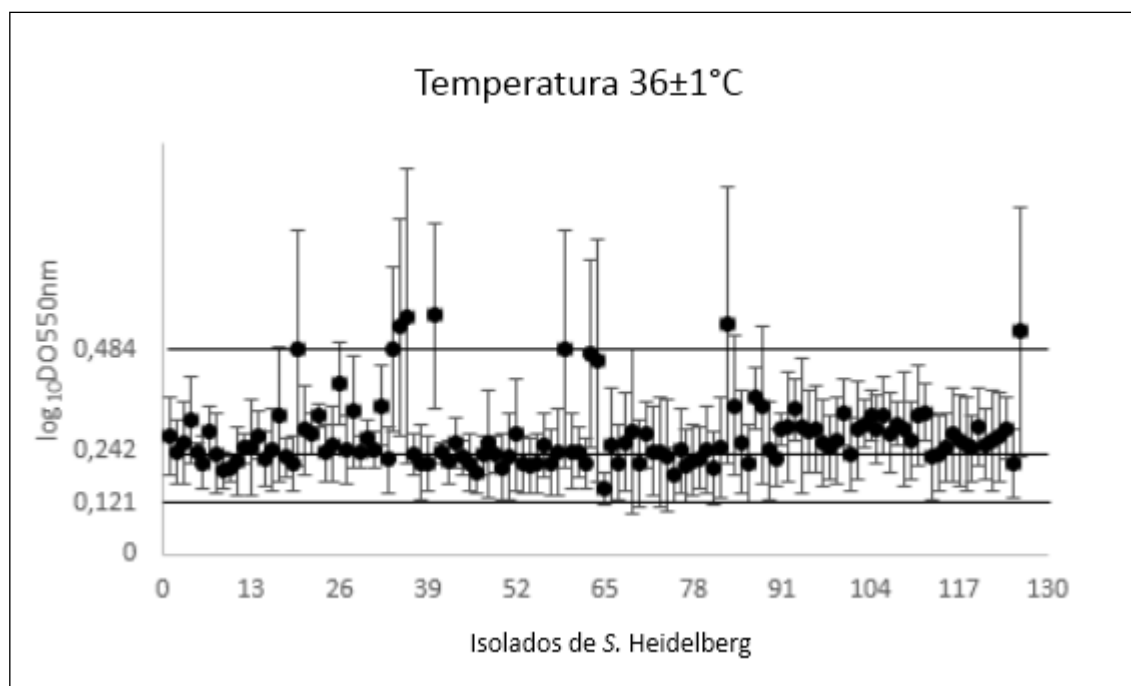
A técnica permitiu a detecção de isolados de *Salmonella* Heidelberg produtores de biofilmes em diferentes graus ($p < 0,0001$). Entre as amostras analisadas, 6% (8/126) foram classificadas como fortemente produtoras de biofilmes, 57% (71/126) com moderada formação e 37% (47/126) foram fracamente formadoras (Tabela 2). Na Figura 3, observa-se a distribuição das densidades ópticas de formação de biofilme das amostras de *S. Heidelberg*.

Tabela 2 - Classificação de *Salmonella* Heidelberg conforme a capacidade de formação de biofilme à $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Temperatura	Formação de Biofilme - DO 550 nm				p-valor*
	Não produtora	Fraca ($\text{Docn} < \text{Doa} \leq 2\text{Docn}$)	Moderada ($2\text{Docn} < \text{Doa} \leq 4\text{Docn}$)	Forte ($4\text{Docn} < \text{Doa}$)	
$36 \pm 1^\circ\text{C}$	0/126 (0%)	47/126 (37%)	71/126 (57%)	8/126 (6%)	$< 0,0001$

*Teste Qui-quadrado.

Figura 3 - Distribuição das densidades ópticas de isolados de *Salmonella* Heidelberg formadores de biofilme.



*Legenda: DO acima de 0,484 classificadas como fortemente formadora de biofilmes; DO entre 0,242 à 0,484 classificadas como moderadamente formadoras; DO abaixo de 0,242 à 0,121 classificadas como fracamente formadora de biofilmes.

A superfície de poliestireno mimetiza alguns dos materiais plásticos utilizados em plantas de processamento de alimentos e apresenta uma boa simulação *in vitro* (PIRAS *et al.*, 2015), como é o exemplo do polietileno presente nas placas de corte e do poliuretano presente nas esteiras de transporte dos matadouros-frigoríficos avícolas. Bem como o uso do caldo TSB sem glicose, que pareceu favorecer a formação de biofilmes *in vitro*, por ser um meio menos enriquecido que o caldo TSB. Estudos mostram que condições menos favoráveis servem como um estímulo à formação de biofilmes (RODRIGUES *et al.*, 2009; REUTER *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013).

Outros trabalhos já detectaram isolados de *Salmonella* spp. capazes de produzir biofilmes em placas de poliestireno. Porém, o grau de formação é variável entre os trabalhos publicados (STEPANOVIC *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009; TONDO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2018). A habilidade da *S. Heidelberg* formar biofilmes nessa superfície é importante, pois os materiais plásticos são muito utilizados no ambiente de criação dos animais e no processamento de alimentos, tanto nas indústrias como nas residências (STEENACKERS *et al.*, 2012). Uma vez formado o biofilme nessas superfícies ele age como ponto de contaminação constante podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos (FUSTER-VALLS *et al.*, 2008).

Isolados que apresentam maior capacidade de produzir biofilmes apresentam um risco elevado de persistirem nas superfícies industriais, sabe-se que microrganismos em forma de vida séssil resistem significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização (COSTERTON *et al.*, 1995; STEENACKERS *et al.*, 2012). O biofilme formado atua como uma barreira física que impede ação de agentes sanitizantes (COSTERTON *et al.*, 1995; STEPANOVIC *et al.*, 2004), tornando a eliminação desses patógenos um grande desafio em instalações de processamento de alimentos.

Além disso o biofilme formado por *Salmonella* spp. tem uma matriz rígida altamente hidrofóbica com células muito compactadas, ou seja, é um biofilme denso formado principalmente por celulose e finas fimbrias agregativas (CERCA, 2012). Frente a isso, essa estrutura densa dificulta ainda mais a eliminação desse biofilme.

Alguns estudos relatam a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. até mesmo sob baixas temperaturas, como 4°C e 8°C, e ressaltam a dificuldade que os desinfetantes comuns tem em eliminá-los (MOREY & SINGH, 2012; CORCORAN *et al.*, 2014; WEBBER *et al.*, 2019, OLIVEIRA *et al.*, 2019). Desta forma, testes para avaliar a eficácia de tratamentos alternativos, como o biocontrole com uso de bacteriófagos podem

oferecer importantes contribuições para estudos futuros. Além disso, sabe-se da necessidade de impedir a formação do biofilme, ou seja, atuar nas primeiras fases da formação do biofilme onde ainda é reversível, isso pode ser feito usando os bacteriófagos como ferramenta na anti-adesão de bactérias patogênicas.

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as classificações de formação de biofilme entre os isolados do mesmo sorovar, este resultado demonstra que mesmo dentro de um sorovar existem variações importantes quanto à habilidade em produzir biofilme. Vale ressaltar que essa diferença encontrada, pode ser explicada devido a ação da própria cepa e suas características intrínsecas, como a presença de genes associados a formação de biofilme, e devido à alta variabilidade dos isolados dentro de um mesmo sorovar (BORGES *et al.*, 2018). Vestby *et al.* (2009), Lianou & Koutsoumanis (2012), Wang *et al.* (2013), relatam diferenças significativas entre isolados de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. sobre a capacidade de formar biofilme. Além disso, observaram que a variabilidade das estirpes na formação do biofilme é afetada por diversos parâmetros ambientais, e parece aumentar a formação do biofilme à medida que as condições tornaram-se menos favoráveis para o microrganismo.

Outros trabalhos avaliaram a formação de biofilmes por *Salmonella* Heidelberg e a maioria dos isolados produziram biofilmes de forma moderada ou fraca (BORGES *et al.*, 2018), corroborando com nossos resultados. A habilidade desse sorovar formar biofilmes é preocupante, devido à sua alta frequência de isolamento em frigoríficos avícolas nos últimos anos, e principalmente por se mostrar altamente resistentes a antimicrobianos, dificultando o tratamento em muitos casos de salmoneloses (CDC, 2016).

5.2 Experimento 2 - Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

5.2.1 Material e Métodos

O experimento foi realizado em parceria com o laboratório de microbiologia de alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. O ensaio de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado utilizando a metodologia de disco-difusão em ágar descrita por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Foram utilizados onze princípios ativos (Sensifar[®]): sulfazotrim (250 ou 300 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), cefoxitina (30 µg) ceftriaxona (30 µg), estreptomina (10 µg),

gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg); tetraciclina (30 µg), imipinem (10 µg) e cefazolina (30 µg). Foram escolhidos por serem de diferentes classes e princípios ativos, e por serem utilizados no Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF).

Posteriormente à reativação dos 126 isolados, foram selecionadas as colônias compatíveis, as quais foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37±1°C por 18-24 horas. Em seguida foi realizada a diluição da suspensão bacteriana até atingir a escala 0,5 de Mac Farland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL). Após, um suabe estéril foi submerso na suspensão bacteriana e realizado o espalhamento em placas de petri contendo ágar *Müller-Hinton* (Kasvi®). Os discos de antimicrobianos foram adicionados individualmente e as placas foram incubadas a 37±1°C por 18-24 horas. A leitura foi realizada através da mensuração dos halos de inibição de multiplicação microbiana, obtidos em milímetros (mm). Os isolados, então, classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes, conforme os padrões estabelecidos pelas normativas do CLSI (2014), apresentados abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de halos inibitórios esperados para a família Enterobacteriaceae (CLSI, 2014).

ANTIMICROBIANOS	Resistente*	Intermediário*	Sensível*
SUL (250 ou 300 µg)	≤ 12	13 – 16	≥ 17
AMP (10 µg)	≤ 13	14 – 17	≥ 17
CLO (30 µg)	≤ 12	13 – 17	≥ 18
CFO (30 µg)	≤ 14	15 – 17	≥ 18
CRO (30 µg)	≤ 19	20 – 22	≥ 23
EST (10 µg)	≤ 11	12 a 14	≥ 15
GEN (10 µg)	≤ 12	13 – 14	≥ 15
CIP (5 µg)	≤ 20	21 – 30	≥ 31
TET (30 µg)	≤ 11	12 a 14	≥ 15
IMP (10 µg)	≤ 19	20 – 22	≥ 23
CFZ (30 µg)	≤ 19	20 – 22	≥ 23

Legendas: Sul: sulfazotrim (250 ou 300 µg), Amp: ampicilina (10 µg), Clo: cloranfenicol (30 µg), Cfo: cefoxitina (30 µg), Cro: ceftriaxona (30 µg), Cfz: cefazolina (30 µg), Est: estreptomicina (10 µg), Gen: gentamicina (10 µg), Cip: ciprofloxacina (5 µg); Tet: tetraciclina (30 µg), Imp: imipinem (10 µg). *resultados em milímetros (mm).

Com base na sensibilidade ou resistência dos microrganismos frente aos diferentes antimicrobianos, as mesmas foram classificadas em perfis fenotípicos de resistência. Isolados que apresentaram resistência para três ou mais classes de antimicrobianos foram

classificados como multirresistentes, conforme Schwarz *et al.* (2010). Além disso, a multirresistência também foi confirmada através do cálculo do IRMA (índice de resistência múltipla a antimicrobianos), segundo Krumperman (1983). O $IRMA \geq 0,2$ é um dos indicadores relacionados ao fenômeno da múltipla resistência. Para o cálculo do IRMA, a seguinte fórmula foi aplicada (Krumperman, 1983):

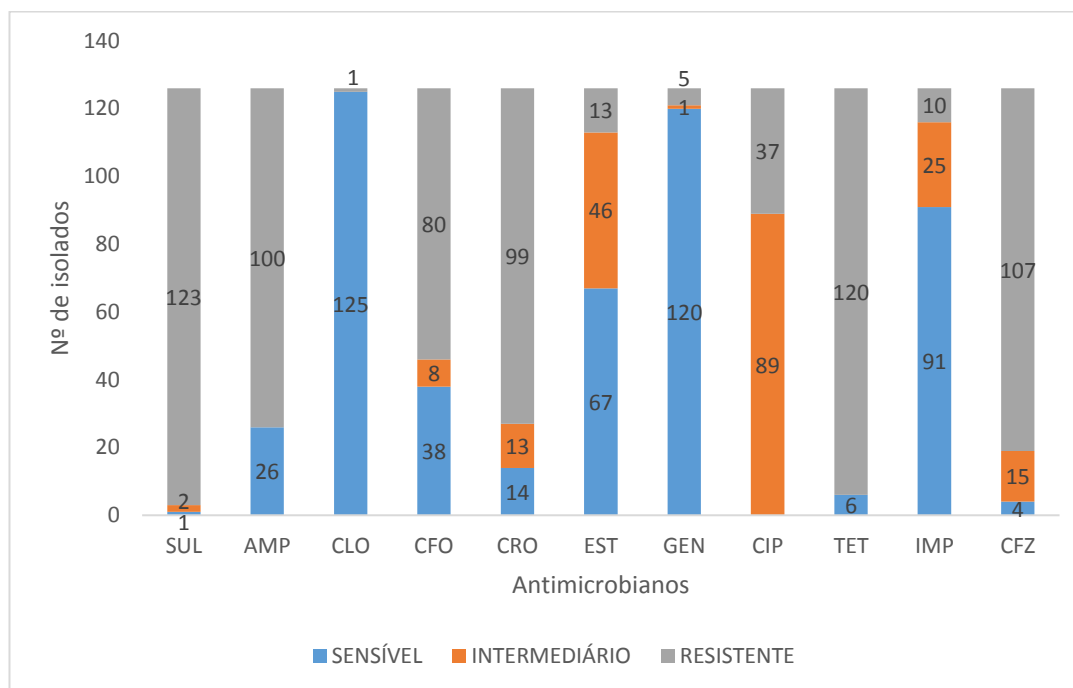
$$IRMA = n^{\circ} \text{ de antibióticos resistentes} / n^{\circ} \text{ de antibióticos testados}$$

5.2.2 Resultados e discussão

Dos 126 isolados de *Salmonella* Heidelberg, 97,62% (123/126) foram resistentes ao sulfazotrim (classe das sulfonamidas) e 79,36% (100/126) foram resistentes a ampicilina (classe dos β -lactâmicos). Da classe dos aminoglicosídeos, a gentamicina teve ação sobre 95,24% (120/126) dos isolados. O imipinem, classe dos carbapenêmicos, teve ação sobre a maioria dos isolados 72,22% (91/126) e somente 7,9% (10/126) mostraram-se resistentes (Gráfico 1).

Referente às cefalosporinas, a taxa de resistência foi alta, cefoxitina 63,49% (80/126), ceftriaxona 78,57% (99/126) e cefazolina 84,92% (107/126). Além disso, 95,24% (120/126) dos isolados mostraram-se resistentes à tetraciclina. Às quinolonas, foi verificada 27,77% (35/126) de resistência à ciprofloxacina, porém ressalta-se a alta taxa de resistência intermediária 70,63% (89/126), sugerindo uma resistência futura já que nenhum isolado demonstrou sensibilidade (Gráfico 1). Ao observar a classe dos anfenicóis o antimicrobiano cloranfenicol foi o mais efetivo contra as SH, com 99,21% (125/126) de sensibilidade (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Susceptibilidade antimicrobiana das 126 isolados de *Salmonella* Heidelberg frente aos antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar com classificação em três categorias (sensível, intermediário e resistente).



Legenda: Sul: sulfazotrim (250 ou 300 µg), Amp: ampicilina (10 µg), Clo: cloranfenicol (30 µg), Cfo: cefoxitina (30 µg), Cro: ceftriaxona (30 µg), Cfz: cefazolina (30 µg), Est: estreptomicina (10 µg), Gen: gentamicina (10 µg), Cip: ciprofloxacina (5 µg); Tet: tetraciclina (30 µg), Imp: imipinem (10 µg).

Na Tabela 4, estão descritos os vinte e quatro perfis de resistência aos antimicrobianos utilizados no ensaio. O perfil 6 reuniu o maior número de isolados 24,6% (31/126) e apresentou resistência à Sulfonamida, Ampicilina, Cefazolina, Ceftriaxona, Estreptomicina, Ciprofloxacina, Tetraciclina e à Cefoxitina. O segundo perfil com maior número de cepas foi o 8 com 15,87% (29/126) e apresentou resistência à Ceftriaxona, Sulfonamida, Ampicilina, Cefazolina, Ciprofloxacina, Tetraciclina e à Cefoxitina.

Outro dado importante é quanto a classificação com base na resistência múltipla (resistência a três ou mais classes de antibióticos), 125 (99,2%) isolados foram multirresistentes, e somente um (0,79%) foi resistente a duas classes de antimicrobianos (cefalosporinas e quinolonas). A multirresistência também foi confirmada através da análise do IRMA, o qual variou de 1,0 a 0,3, conforme a Tabela 4. Segundo Krumperman (1983), o $IRMA \geq 0,2$ é um dos indicadores relacionados ao fenômeno da múltipla resistência.

Tabela 4 - Distribuição do padrão de resistência e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA) de *Salmonella* Heidelberg de origem avícola.

Perfil de resistência	Padrão de resistência aos antimicrobianos	Número de isolados	IRMA
1	Sul, Amp, Clo, Cfo, Cro, Est, Gen, Cip, Tet, Imp, Cfz*	1	1,0
2	Sul, Amp, Cfo, Cro, Est, Gen, Cip, Tet, Imp, Cfz*	1	0,9
3	Sul, Amp, Cfo, Cro, Est, Cip, Tet, Imp, Cfz*	15	0,8
4	Sul, Amp, Cro, Est, Gen, Cip, Tet, Imp, Cfz*	1	0,8
5	Sul, Amp, Cfo, Cro, Cip, Tet, Imp, Cfz*	10	0,7
6	Sul, Amp, Cfo, Cro, Est, Cip, Tet, Cfz*	31	0,7
7	Sul, Amp, Cro, Est, Gen, Cip, Tet, Cfz*	2	0,7
8	Sul, Amp, Cfo, Cro, Cip, Tet, Cfz*	29	0,6
9	Sul, Cro, Est, Cip, Tet, Imp, Cfz*	2	0,6
10	Sul, Amp, Cro, Gen, Cip, Tet, Cfz*	1	0,6
11	Sul, Amp, Cro, Est, Cip Tet, Cfz*	1	0,6
12	Sul, Amp, Cro, Cip, Tet, Cfz*	7	0,5
13	Sul, Cro, Cip, Tet, Imp, Cfz*	1	0,5
14	Amp, Cfo, Cro, Cip, Tet, Cfz*	1	0,5
15	Sul, Cro, Cip, Tet, Cfz*	4	0,4
16	Sul, Cro, Cip, Imp, Cfz*	3	0,4
17	Sul, Cro, Est, Cip, Cfz*	1	0,4
18	Sul, Est, Cip, Tet, Cfz*	1	0,4
19	Sul, Est, Cip, Tet, Imp*	1	0,4
20	Sul, Cip, Tet, Cfz*	8	0,4
21	Sul, Est, Cip, Tet*	1	0,4
22	Sul, Est, Cip, Cfz*	1	0,4
23	Sul, Cip, Tet*	2	0,3
24	Cro, Cip, Cfz	1	0,3

Legenda: **Sulfonamidas:** Sul = sulfazotrim (250 ou 300 µg), **β-Lactâmicos:** Amp = ampicilina (10 µg), **Fenicóis:** Clo = cloranfenicol (30 µg), **Cefalosporinas:** Cfo = cefoxitina (30 µg), Cro = ceftriaxona (30 µg), Cfz = cefazolina (30 µg), **Aminoglicosídeos:** Est = estreptomicina (10 µg), Gen = gentamicina (10 µg), **Quinolonas:** Cip = ciprofloxacina (5 µg); **Tetraciclinas:** Tet = tetraciclina (30 µg), **Carbapenêmicos:** Imp = imipinem (10 µg). *multirresistência (resistência à três ou mais classes).

Na Tabela 5, consta o número total de isolados de *S. Heidelberg* e seu respectivo percentual de resistência, resistência intermediária e de susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

Tabela 5 - Número total e percentual dos 126 isolados de *S. Heidelberg* susceptíveis, com resistências intermediárias e resistentes em relação a cada antimicrobiano testado.

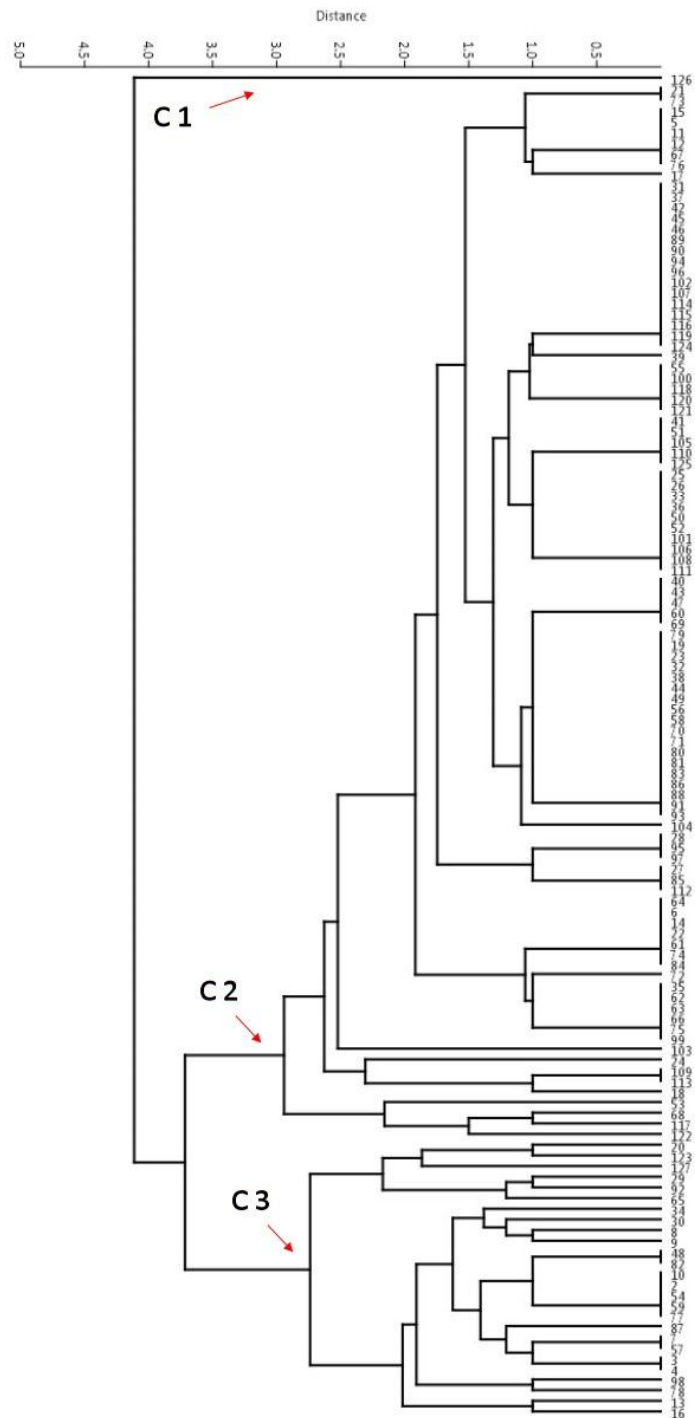
Antimicrobiano	Susceptíveis		Resistência Intermediária		Resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cloranfenicol (CLO)	125	99,2	0	0,0	1	0,79
Gentamicina (GEN)	120	95,2	1	0,79	5	3,96
Imipenem (IMP)	91	72,2	25	19,8	10	7,93
Estreptomicina (EST)	67	53,2	46	36,5	13	10,3
Ciprofloxacina (CIP)	0	0,0	89	70,6	37	29,3
Cefoxitina (CFO)	38	30,2	8	6,35	80	63,5
Ceftriaxona (CRO)	14	11,1	13	10,3	99	78,5
Ampicilina (AMP)	26	20,6	0	0,0	100	79,3
Cefazolina (CFZ)	4	3,17	15	11,9	107	84,9
Tetraciclina (TET)	6	4,76	0	0,0	120	95,2
Sulfonamida (SUL)	1	0,79	2	1,58	123	97,6

Fonte: a autora, 2019.

Na Figura 4, consta o dendrograma formado a partir da classificação fenotípica da susceptibilidade dos isolados aos onze princípios ativos, utilizando o programa PAST 3.16. Os isolados reunidos nos *clusters* apresentam semelhanças em relação aos dados da susceptibilidade de cada antimicrobiano. Quanto mais distante da base do dendrograma, mais diferentes são as características dos isolados. Foi identificado três *clusters* os quais estão identificados pelas setas destacadas.

O *cluster* C1 é formado por apenas um isolado (SH 623), com resistência somente a ciprofloxacina, e suscetível aos demais antimicrobianos testados. O maior *cluster* é o C2 composto por um número de 99 isolados. O *cluster* C3 é formado por 26 isolados, apresentando suscetibilidade ao cloranfenicol e gentamicina, e resistentes a sulfonamida e tetraciclina.

Figura 4 - Dendrograma com os dados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 126 isolados de *S. Heidelberg*.



Nota: As setas assinalam os principais clusters formados a partir das semelhanças entre os isolados.

O resultado que mais chama a atenção é a taxa de multirresistência dos isolados de *S. Heidelberg* (99,2%), sabe-se que existe um preocupação global em relação ao

aumento da resistência bacteriana ao longo dos anos, com isso é necessário avaliações constantes da sensibilidade dos microrganismos patogênicos, principalmente os responsáveis por doenças transmitidas pelos alimentos. Esses testes são fundamentais na escolha correta para o tratamento de infecções e conseqüentemente evitam o uso indiscriminado, que leva muitas vezes a seleção de bactérias resistentes.

A multirresistência aos antimicrobianos também foi reportada por Giuriatti *et al.* (2017), onde 100% das cepas de *S. Heidelberg* isoladas de carnes de frango, apresentaram multirresistência a, pelo menos, quatro classes de antimicrobianos. Mion *et al.* (2014) demonstraram que 100% dos isolados de *S. Heidelberg* de matadouros-frigoríficos avícola, apresentaram resistência a, pelo menos, quatro princípios ativos. Medeiros *et al.* (2011) investigaram cepas de *Salmonella* spp. provenientes de carcaças de frango, 6,4% foram identificados como *S. Heidelberg* e todas apresentaram multirresistência. Esses dados corroboram com nossos achados e salientam a preocupação com o uso de antimicrobianos na avicultura.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na IN 13/2004, apresenta uma chamada “lista positiva” onde estão descritos os princípios ativos autorizados para uso como aditivos em ração para os animais (BRASIL, 2004). Vale ressaltar que sempre dependerá das leis do país de importação do produto, antimicrobianos permitidos nessa lista, podem ser banidos pelo país importador. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é muito questionado devido à preocupação que se tem com a crise mundial de resistência aos antimicrobianos.

Sabe-se que os promotores de crescimento utilizados na pecuária são doses baixas de antimicrobianos adicionados nas rações dos animais de produção, e isso pode levar a seleção de bactérias resistentes. A grande preocupação é que essas cepas resistentes impactam diretamente na resistência aos antimicrobianos em humanos (TONDO & RITTER, 2012). A WHO classifica alguns princípios ativos como extremamente importantes para o tratamento de infecções humana e recomenda atenção especial quanto ao uso e à vigilância da resistência antimicrobiana nos animais (WHO, 2011b).

Um dos maiores desafios na área de produção animal tem sido à busca de alternativas para reduzir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, conseqüência das crescentes pressões impostas por países que importam produtos de origem animal do Brasil, como exemplo a comunidade Europeia. Estas restrições geram impactos na produção e economia, e impulsionam pesquisas de novos compostos seguros que melhorem o desempenho dos animais.

Obtivemos resultados altos de resistência as sulfonamidas, possivelmente devido a ampla utilização desta classe de antimicrobiano na avicultura industrial, o que resulta em um aumento da pressão seletiva de cepas resistentes (WHO, 2011a; MAKHA *et al.*, 2015). A resistência às sulfonamidas é comum em animais de produção e em humanos, e já foi descrita na literatura (WHO, 2011b; PROROGA *et al.*, 2015). Em relação a resistência a ampicilina, mesmo ela não sendo usada na avicultura, pode estar relacionada ao uso de outras classes de antimicrobianos, como a tetraciclina. Já que a resistência as beta-lactamases são devido a transferência horizontal de genes, através de elementos genéticos móveis (AMAND *et al.*, 2013).

Obtivemos taxas alarmantes de resistência às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, que foram testadas nesse estudo. Vale ressaltar que as cefalosporinas de terceira geração são a primeira opção para o tratamento quando crianças, gestantes e imunodeprimidos estão acometidos por salmoneloses (DUTIL *et al.*, 2010; WHO, 2011; AMAND *et al.*, 2013).

Dados sobre a resistência antimicrobiana de *S. Heidelberg* foram reportados em 2012 pelo Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana para Bactérias Entéricas (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria – NARMS*) e demonstraram que 22% (9/41) dos isolados de SH foram resistentes ao antibiótico ceftriaxona. A porcentagem em 2010 é maior quando comparada aos dados de 2003 a 2007, em que os níveis de resistência foram de somente 8%. Dos isolados de 2012, 27% (11/41) apresentaram multirresistência aos antibióticos (NARMS, 2012).

No Brasil não há controle para o uso da tetraciclina na área veterinária, com isso sua utilização é ampla, principalmente na avicultura (BRASIL, 2009, WHO, 2011a). Isso pode ser a possível razão para a alta resistência que obtivemos frente a esse princípio ativo. Zhao *et al* (2008) encontraram porcentagens de 39,9% de resistência para tetraciclina frente a *S. Heidelberg*, corroborando com nossos achados.

A ciprofloxacina pertencem à classe das fluorquinolonas é amplamente utilizada na medicina humana e a WHO classifica este antimicrobianos como importante no tratamento de infecções (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005). Nenhum dos nossos isolados foi resistente a ciprofloxacina, mas obtivemos altas taxas de resistência intermediária, ressaltamos que nenhum isolado foi sensível. Pesquisas também mostram que a taxa de bactérias resistentes à ciprofloxacina em humanos é muito baixa (CHENG *et al.*, 2012).

Apesar dos isolados de *S. Heidelberg* apresentarem alta sensibilidade a gentamicina (95,24%), seu uso requer cautela, pois os aminoglicosídeos foram muito usados na medicina veterinária, o que pode levar a uma futura seleção de cepas resistentes (MATTIELO *et al.*, 2015). Outro antimicrobiano que apresentou ótimas taxas de sensibilidade foi o cloranfenicol, o mais efetivo contra as SH, vale ressaltar que no Brasil desde o ano de 2003 foi proibido o uso desse princípio ativo para uso veterinário (IN 9/2003), e isso pode explicar a não seleção de bactérias resistentes a esse antimicrobiano (BRASIL, 2003). Mattiello *et al.* (2015) destaca a possibilidade de haver resistência ao cloranfenicol devido ao uso de outro princípio ativo semelhante, o florfenicol, usado na medicina veterinária, esta resistência pode favorecer a transferência de genes comum a esses dois antimicrobianos.

Nenhum antimicrobiano foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas avaliadas, achado preocupante no combate a resistência microbiana, ainda mais no Brasil que não possui programas efetivos para monitorar a resistência antimicrobiana dos principais patógenos causadores de DTAs. Esses estudos são importantes para no futuro ajudar a controlar e monitorar a resistência na produção de alimentos evitando a disseminação desses patógenos multirresistentes.

5.3 Experimento 3 - Detecção de genes relacionados a virulência e patogenicidade

5.3.1 Material e Métodos

A caracterização molecular dos 126 isolados de *S. Heidelberg* foi realizada através da pesquisa de 24 genes envolvidos na virulência e patogenicidade de *Salmonella*. São eles: *invA*, *hilA*, *lpfA*, *lpfC*, *sefA*, *agfA*, *spvB*, *pefA*, *sopE*, *avrA*, *sivH*, *orgA*, *prgH*, *spaN*, *tolC*, *sipB*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, *iroN*, *sopB*, *cdtB*, *sifA*. O nome e a respectiva função dos genes estão descritos na Tabela 6.

A extração do DNA foi realizada através do tratamento térmico, adaptado da técnica de Borsoi *et al.* (2009). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Swift MaxPro (Esco; Singapura). Após a amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. A análise dos produtos amplificados foi feita através da visualização das bandas correspondentes em transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia LKB Biotechnologies; Uppsala, Suécia) e da fotodocumentação digital (Alpha Innotche; San Leandro, EUA). A sequência dos *primers*

que foram utilizados, bem como o tamanho do amplicon e a referência dos protocolos para detecção de cada gene estão descritos na Tabela 7. A concentração dos reagentes do *mix* e as condições de amplificação no termociclador foram adaptadas a partir de trabalhos previamente descritos na literatura (SKYBERG *et al.*, 2006; PETERSON *et al.*, 2010; BARMAN *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2013).

Tabela 6 - Função dos genes associados à virulência e patogenicidade detectados através de PCR.

Nome	Gene	Função
Fímbria Longa Polar	<i>lpfA</i>	-favorece o tropismo pelas Placas de Peyer - adesão às células M do intestino - confere imunidade cruzada entre sorovares
Fímbria Longa Polar	<i>lpfC</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão
Fímbria Agregativa	<i>agfA</i>	-autoagregação (maior sobrevivência) - interação entre <i>Salmonella</i> e o intestino - formação de biofilmes
Fímbria de <i>S. Enteritidis</i>	<i>sefA</i>	- melhor interação entre bactéria e macrófagos - atuação em conjunto com outras fímbrias
Fímbria codificada por plasmídeo	<i>pefA</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão
Plasmídeo de Virulência de <i>Salmonella</i>	<i>spvB</i>	- crescimento no interior da célula hospedeira
Invasiva	<i>invA</i>	- componente da estrutura dos TTSS - reconhecimento do hospedeiro e invasão - internalização da bactéria para invasão de célula epiteliais
Hiperinvasiva	<i>hilA</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - regulação dos componentes do TTSS
Virulência A	<i>avrA</i>	- indução da apoptose celular - inibe produção de IL-8 e TNF- α - proteína efetora dos TTSS
Proteína de membrana externa de <i>Salmonella</i>	<i>sopB</i>	- proteína efetora dos TTSS - reconhecimento do hospedeiro e invasão - associada à ativação das vias de inflamação
Proteína de membrana externa de <i>Salmonella</i>	<i>sopE</i>	- proteína efetora dos TTSS - deformação da membrana plasmática e citoesqueleto da célula do hospedeiro
Proteína de invasão regulada por oxigênio	<i>orgA</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - componente da estrutura dos TTSS

(conclusão Tabela 6)

Nome	Gene	Função
Proteína intramembrana	<i>pegH</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - componente da estrutura dos TTSS
Proteínas de apresentação de antígenos	<i>spaN</i>	- entrada em células não fagocíticas - morte de macrófagos - componente da estrutura dos TTSS
Proteína da membrana externa	<i>tolC</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - funcionamento de alguns sistemas de efluxo
Proteína da membrana	<i>pagC</i>	- sobrevivência no interior do macrófago
Proteína da membrana externa	<i>sifA</i>	- proteína efetora dos TTSS - invasão e sobrevivência nos tecidos do hospedeiro
Homólogos invasiva de <i>Salmonella</i>	<i>sivH</i>	- colonização das Placas de Peyer - proteína efetora dos TTSS
Proteína sobrevivência no macrófago	<i>msgA</i>	-sobrevivência no interior do macrófago
Proteína secreção da membrana externa	<i>spiA</i>	-sobrevivência no interior do macrófago - participação na formação de biofilmes
Transportador de ferro de <i>Salmonella</i>	<i>sitC</i>	- aquisição de ferro
Receptor sideróforo relacionado ao ferro	<i>iron</i>	- aquisição de ferro
Toxina citoletal defensiva	<i>cdtB</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - toxina
Proteína de invasão celular	<i>sipB</i>	- entrada em células não fagocitadas - morte de macrófagos - componente da estrutura dos TTSS

Fonte: COLLINSON *et al.*, 1992; BÄUMLER & HEFFRON, 1995; SWAMY *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SKYBERG *et al.*, 2006; PETERSON *et al.*, 2010; BARMAN *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2013.

Tabela 7 - Sequência de primers, tamanho do amplicon e referência dos protocolos de PCR utilizados para a detecção dos genes de virulência.

Gene	Sequência de <i>Primer</i> (5'-3')	Pares de bases	Referência
<i>lpfA</i>	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	250	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>agfA</i>	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	350	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>sefA</i>	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	488	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>hilA</i>	CTGCCGCAGTGTTAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT	497	Borges <i>et al.</i> 2013

(Continuação Tabela 7)

Gene	Sequência de <i>Primer</i> (5'-3')	Pares de bases	Referência
<i>avrA</i>	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	385	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>sopE</i>	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>sivH</i>	CAGAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	763	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>lpfC</i>	GCCCCGCTGAAGCCTGTGTTGC AGGTCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA	641	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>spvB</i>	CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>pefA</i>	GCGCCGCTCAGCCGAACCAG GCAGCAGAAGCCAGGAAACAGTG	157	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>orgA</i>	CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG TTTTTGCAATGCATCAGGGAACA	255	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>prgH</i>	GCCCGAGCAGCCTGAGAAGTTAGAAA TGAAATGAGCGCCCCTTGAGCCAGTC	756	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>spaN</i>	AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG	504	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>tolC</i>	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC CCGCGTTATCCAGTTGTTGC	161	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sipB</i>	GGACGCCGCCCGGGAAAAACTCTC AACTCCCGTCGCCGCTTCACAA	875	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sitC</i>	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>pagC</i>	CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC GAAGCCGTTTATTTTTGTAGAGGAGATGTT	454	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>msgA</i>	GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	189	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>spiA</i>	CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>iroN</i>	CCGCGTTATCCAGTTGTTGC ACTGGCACGGCTCGCTGTGCTCTAT	1205	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sopB</i>	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220	Skyberg; Logue; Nolan, 2006

(Conclusão Tabela 7)

Gene	Sequência de <i>Primer</i> (5' – 3')	Pares de bases	Referência
<i>cdtB</i>	ACAACGTGTCGCATCTCGCCCCGTCATT CAATTTGCGTGGGTTCTGTAGGTGCGAGT	268	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sifA</i>	TTTGCCGAACGCGCCCCACACG GTTGCCTTTTCTTGCGCTTCCACCCATCT	449	Skyberg; Logue; Nolan, 2006

5.3.2 Resultados e discussão

Determinou-se os diferentes perfis genotípicos dos isolados de *Salmonella* Heidelberg, com base na detecção de 24 genes associados à virulência. Na Tabela 8 estão expressos os 56 perfis genotípicos detectados e a quantidade de amostras que expressaram o perfil referido.

Nenhum dos isolados avaliados apresentou todos os genes testados, mas a prevalência foi alta, pois o menor número de genes detectados em um isolado foi 10/24.

Tabela 8 - Determinação dos perfis genotípicos de isolados de *Salmonella* Heidelberg.

Perfil Genotípico	Genes Detectados	Quantidade de isolados	Porcentagem
1	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB, pefA</i>	1	0,8%
2	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	3	2,4%
3	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	38	30,2%
4	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
5	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, pefA</i>	1	0,8%
6	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
7	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
8	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
9	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%

10	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, sipB, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
11	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
12	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
13	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
14	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
15	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
16	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
17	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
18	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
19	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sopB</i>	1	0,8%
20	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	18	14,3%
21	<i>invA, hilA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
22	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
23	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
24	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
25	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
26	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
27	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sopB</i>	1	0,8%
28	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, pefA</i>	1	0,8%
29	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
30	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
31	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
32	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, iroN, lpfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
33	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, iroN, lpfC, sifA, sopB</i>	3	2,4%
34	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, sop</i>	1	0,8%
35	<i>invA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, spaN, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
36	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN</i>	1	0,8%
37	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, tolC, iroN, sopB</i>	1	0,8%
38	<i>invA, hilA, avrA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sopB</i>	1	0,8%

39	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, tolC, iroN, sitC, ipfC, sifA, sopB</i>	2	1,6%
40	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, tolC, iroN, sitC, ipfC, sifA, sopB</i>	3	2,4%
41	<i>invA, hilA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, spaN, tolC, iroN, sifA, sopB</i>	1	0,8%
42	<i>invA, hilA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, spaN, orgA, tolC, iroN, sopB</i>	1	0,8%
43	<i>invA, hilA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sopB</i>	1	0,8%
44	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, spaN, tolC, iroN, ipfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
45	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, spaN, tolC, sitC, ipfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
46	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, spaN, tolC, iroN, sifA, sopB</i>	1	0,8%
47	<i>invA, hilA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, iroN, sopB</i>	3	2,4%
48	<i>invA, hilA, avrA, ipfA, agfA, sivH, msgA, orgA, tolC, sitC, ipfC, sifA, sopB, pefA</i>	1	0,8%
49	<i>invA, hilA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, orgA, tolC, sopB</i>	1	0,8%
50	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, orgA, tolC, sitC, sopB</i>	1	0,8%
51	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, msgA, orgA, tolC, ipfC, sifA, sopB</i>	1	0,8%
52	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, tolC, iroN, sopB</i>	1	0,8%
53	<i>invA, ipfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, spaN, tolC, sopB</i>	1	0,8%
54	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sivH, spiA, pagC, cdtB, msgA, orgA, tolC, sopB</i>	1	0,8%
55	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sivH, cdtB, msgA, orgA, tolC, sopB</i>	1	0,8%
56	<i>invA, avrA, ipfA, agfA, sivH, cdtB, msgA, tolC, sitC, sopB</i>	1	0,8%
		126	100%

As frequências absolutas e relativas dos 24 genes associados à virulência pesquisados e agrupados conforme a suas respectivas funções estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição dos 24 genes de virulência detectados através de PCR nos isolados de *Salmonella* Heidelberg.

Função do gene	Gene	Frequência absoluta (n=126)	Frequência relativa (%)	
Fímbrias	<i>sefA</i>	0	0%	
	<i>lpfA</i>	126	100%	
	<i>lpfC</i>	107	84,9%	
	<i>agfA</i>	126	100%	
	<i>pefA</i>	4	3,17%	
TTSS	Estrutura	<i>sipB</i>	91	72,2%
		<i>invA</i>	126	100%
		<i>orgA</i>	84	66,7%
		<i>prgH</i>	65	51,6%
		<i>spaN</i>	103	81,7%
	Proteínas efectoras	<i>avrA</i>	124	98,4%
		<i>sopE</i>	112	88,9%
		<i>sopB</i>	123	97,6%
		<i>sivH</i>	126	100%
		<i>sifA</i>	108	85,7%
Proteína reguladora	<i>hilA</i>	84	66,6%	
Sobrevivência no interior de células (macrófagos)	<i>pagC</i>	120	95,2%	
	<i>spiA</i>	120	95,2%	
	<i>msgA</i>	126	100%	
	<i>tolC</i>	126	100%	
Plasmídeo	<i>spvB</i>	1	0,79%	
Metabolismo do ferro	<i>iroN</i>	112	88,9%	
	<i>sitC</i>	100	79,4%	
Toxinas	<i>cdtB</i>	11	8,73%	

Os fatores de virulência são codificados por uma série de genes, e podem estar localizados no próprio cromossomo da bactéria, como podem estar presentes nas chamadas Ilhas de Patogenicidade, ou em elementos genéticos móveis (GROISMAN & OCHMAN, 1996; MARCUS *et al.*, 2000; VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005), relatam que esses genes quando presentes e principalmente quando expressos irão conferir vantagens à bactéria.

Os genes de virulência fimbriais desempenham um papel importante na patogenicidade da bactéria porque promovem a ligação bacteriana às células epiteliais do intestino (VAN DER VELDEN *et al.*, 1998). Nesse estudo os genes fimbriais *sefA*, *lpfA*, *lpfC*, *agfA* e *pefA* foram analisados e 100% dos isolados apresentaram os genes *lpfA* e *agfA* (Tabela 9). O gene *lpfA* codifica a subunidade principal das fímbrias longas polares,

que são responsáveis pela adesão às células de Peyer no intestino e por conferir imunidade cruzada entre sorovares (GINOCCHIO & GÁLAN, 1995; DARWIN & MILLER, 1999).

As fímbrias agregativas finas são essenciais na síntese de substância polimérica extracelular (EPS), que está envolvida na formação de biofilme e na persistência ambiental. O gene *agfA* é um dos que codifica a presença dessas fímbrias, que também possuem propriedades relacionadas à patogenicidade e autoagregação (maior sobrevivência), além disso são pró-inflamatórias e aumentam a invasão em células eucarióticas (GIBSON *et al.*, 2007). Outros pesquisadores relatam elevada frequência de detecção do gene *agfA* em diferentes sorovares de *Salmonella* spp. (BORSOI *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2013; BORGES, 2016; RIZZO, 2017; BORGES *et al.*, 2019), corroborando nossos achados. Doran *et al.* (1993) analisaram 604 cepas de *Salmonella*, pertencentes a diferentes sorovares e observaram que 603 apresentaram *agfA*, sugerindo que o gene é bem conservado entre os sorovares.

Em nenhum isolado foi detectado o gene *sefA* e somente em quatro isolados o gene *pefA* (Tabela 9). O gene *pefA* pode estar ausente em algumas salmonelas devido à localização do gene, sua origem é plasmidial, e os plasmídeos estão presentes em apenas alguns sorovares de *Salmonella* spp. (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). Vale ressaltar que o gene *sefA* é considerado um dos gene-alvo para detecção do sorovar *S. Enteritidis* (BORGES *et al.*, 2013).

Todas as SH (100%) apresentaram o gene *invA* que está relacionado ao reconhecimento do hospedeiro e internalização da bactéria para invasão nas células epiteliais. Este gene está associado à estrutura dos TTSS (Type Three Secretion System – Sistema de Secreção do Tipo III) e é considerado o principal gene-alvo para a detecção de cepas deste gênero através da PCR (CRACIUNAS *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2019). Nesse estudo, 66,6% das SH apresentaram o gene *hilA*, responsável por codificar a proteína hiperinvasiva HilA, a principal reguladora dos componentes do TTSS e ainda codificam a SPI-1 (FOLEY; LYNNE, 2008). Esse gene está relacionados com o processo de reconhecimento e de invasão celular e juntamente com o *invA*, também é considerado um gene-alvo para a detecção do gênero *Salmonella* (CRACIUNAS *et al.*, 2012).

Os genes *orgA*, *sipB*, *prgH* e *spaN* também estão relacionados com a estrutura destes sistemas (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). Nos isolados de SH a frequência foi alta de detecção do gene *spaN* (81,7%) e do *sipB* (72,2%), seguido dos demais genes. O gene *spaN* é um dos 12 genes que formam um cluster associado às propriedades de

invasão ao hospedeiro (EMBL-EBI, 2016). Borges (2016), em seu estudo relatou a presença dos genes *orgA*, *sipB*, *prgH* e *spaN* em diferentes sorovares de *Salmonella*, ressaltando que o gene *spaN* está associado com as cepas isoladas de fontes avícolas e é um possível marcador de origem.

Os genes que codificam as proteínas efetoras secretadas pelo SSTT como: *sifA*, *avrA*, *sopE*, *sopB* e *sivH* foram detectados em quase todas as cepas de SH testadas (Tabela 9). É importante pesquisar estes genes pois eles podem alterar conforme a capacidade de cada sorovar de *Salmonella* tem em se manter em novos hospedeiros, podendo estar relacionado com o aparecimento de surtos de salmonelose (PRAGER *et al.*, 2000).

Para conferir a sobrevivência no interior de células, principalmente dentro dos macrófagos, em nosso estudo foram pesquisados quatro genes: *msgA*, *spiA*, *pagC* e *tolC*. Detectamos 100% de presença para os genes *msgA* e *tolC* nos 126 isolados de SH testados, e 95,2% para os genes *pagC* e *spiA* (Tabela 9). Vale ressaltar que o gene *spiA* também está relacionado com a habilidade dos isolados em produzir biofilmes. Borges (2016) corrobora com os nossos achados, detectou a presença em 100%, das cepas testadas, do gene *msgA* e os genes *spiA* e *pagC* apresentaram uma frequência de 93,8%. Enquanto que Rizzo (2017), também detectou os genes *msgA*, *spiA*, *tolC* e *pagC* em todas as cepas de *Salmonella Gallinarum* analisadas.

Somente um isolado de SH apresentou o gene *spvB* (0,79%), que é de origem plasmidial, ou seja, está associado ao plasmídeo de virulência da *Salmonella*, responsável pela manutenção e sobrevivência bacteriana no interior das células (CASTILLA *et al.*, 2006). A baixa frequência de detecção desse gene era esperada para a SH, pois a presença de plasmídeos em *Salmonella* está muito relacionada com o sorovar envolvido, e a detecção é mais comum no sorovar Enteritidis (JONG *et al.*, 2012). Segundo Rizzo (2017), para o sorovar Gallinarum o gene *spvB* foi expresso em 80% (12/15) das amostras testadas, mostrando que em outros sorovares pode ser comum.

Pesquisamos genes associados ao metabolismo de aquisição ao ferro, como os genes *iroN* e *sitC*. Dos isolados de SH, 88,9% apresentaram o gene *iroN* e 79,4% *sitC* (Tabela 9). Para sobrevivência celular a bactéria precisa de mecanismos para a aquisição de ferro, e o gene *sitC* codifica proteínas de membrana associada com a captação de ferro. Já o gene *iroN* codifica proteínas que funcionam como um receptor para sideróforos (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006; ZARATÉ-BONILLA *et al.*, 2014). Após a invasão celular, *Salmonella spp.* encontra um ambiente com quantidade restrita de ferro, elemento essencial para a sobrevivência e para o crescimento das cepas no interior da

célula hospedeira (ZARATÉ-BONILLA *et al.*, 2014). Conseqüentemente, as bactérias desenvolveram uma variedade de sistemas para aquisição de ferro, os quais geralmente são redundantes e não são expressos simultaneamente. Por esta razão, é pouco provável que a ausência destes genes seja um problema para a sobrevivência e a multiplicação de *Salmonella* no interior da célula hospedeira. O gene *iroN* apresenta associação positiva em relação ao sorovar Heidelberg (BORGES 2016). Segundo Borges (2016), em seu estudo com diferentes sorovares de *Salmonella*, a ausência do gene *iroN* e a presença de *spaN* estão associadas com as cepas de fontes avícolas.

O gene *cdtB* é um dos genes que codificam toxinas responsáveis por causar apoptose das células infectadas. Dos isolados testados somente 11 (8,73%) apresentaram esse gene. Essa baixa frequência é corroborada em outros trabalhos com diferentes sorovares de *Salmonella* spp. (BORGES, 2016; RIZZO, 2017). De acordo com a literatura (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006) é provável que esse gene seja restrito há alguns sorovares de *Salmonella* spp.

Alguns resultados foram inesperados, como a baixa frequência dos genes *hila*, *orgA* e *prgH*, e apresentaram diferenças em relação aos perfis moleculares encontrados nas cepas de SH isoladas entre 1996 e 2006 (Borges *et al.*, 2016). A variação na frequência dos genes e do perfil genético ao longo dos anos pode estar influenciando na capacidade de sobrevivência e de multiplicação das cepas, e conseqüentemente levando a um aumento na frequência de isolamento deste sorovar em fontes avícolas na região sul do Brasil.

Por fim, observamos que entre os isolados de *S. Heidelberg* testados há diferenças no perfil genotípico e características de resistência aos antimicrobianos variadas, o que sugere uma diversidade de isolados de *S. Heidelberg* em produtos avícolas. O fato de não ter somente um perfil predominante, pode indicar a existência de fontes de contaminação variáveis da SH na indústria de alimentos.

5.4 Experimento 4 – Teste de suscetibilidade de *Salmonella* Heidelberg frente a bacteriófagos

5.4.1 Material e Métodos

5.4.1.1 Bacteriófagos

Avaliou-se a ação de três bacteriófagos previamente isolados em estudo desenvolvido por Pottker (2016), mediante método proposto por Sillankorva *et al.* (2008), com algumas modificações. Estes bacteriófagos já demonstraram ação lítica contra vários sorovares isolados de *Salmonella enterica*, os quais possuem genes de virulência, multirresistência aos antimicrobianos e/ou capacidade de formação de biofilmes (POTTKER, 2016).

Os bacteriófagos utilizados foram caracterizados, de acordo com Kropinski *et al.* (2011), seguindo protocolos que envolvem genômica, proteômica e sequenciamento. Os bacteriófagos tiveram seus genomas sequenciados, demonstrando serem fagos ainda não descritos. O denominado como *Salmonella Phage UPF_BP1*, registrado no GenBank sob o número KX776161, foi isolado a partir de efluentes de abate antes do tratamento, utilizando *S. Brandenburg* como hospedeira. Possui genoma circular, DNA fita dupla, com 39.902 pb, 382 *Open Reading Frames* (ORFs) identificadas (>100 pb), e destas somente 68 identificadas no BLAST. Pertence à ordem *Caudovirales* e à família *Podoviridae* Tipo 3, e ainda não havia sido descrito. O denominado *Salmonella Phage UPF_BP2*, com registro no GenBank sob o número KX826077, foi isolado a partir de efluentes de abate antes do tratamento, mas utilizando *S. Bredeney* como hospedeira. Possui genoma circular, DNA fita dupla, 54.894 pb e 446 ORFs identificadas (>100 pb), e somente 41 dessas ORFs gerando resultados no BLAST. É pertencente à ordem *Caudovirales* e à família *Myoviridae* Tipo 1 Grupo 7, até então não descrito. Também foi utilizado o bacteriófago *Salmonella Phage UPF_BP3*, em fase de sequenciamento e identificação, o qual foi isolado do sorovar *Salmonella* Enteritidis, e a fonte de isolamento foi de fezes de galinhas caipiras.

5.4.1.2 Identificação do prófago

Os 126 isolados de *Salmonella* Heidelberg foram testados para a presença de prófago no seu DNA, para não resultar em falso positivo para presença de bacteriófago. Para isso foram produzidas placas de petri contendo uma fina camada de *Trypticase Soy Agar* (TSA, Difco®) e uma sobre camada, contendo ágar semissólido composto por caldo TSB (Difco®) e 0,6% de ágar-ágar (*soft ágar*). Foram inoculados 100 µL da bactéria a ser testada e pipetadas 10 gotas de 10 µL de um inóculo da mesma bactéria utilizada na sobre camada. As placas foram incubadas invertidas por 24 horas a 37±1°C e posteriormente realizada a leitura, a qual não deveria apresentar áreas de lise.

5.4.1.3 Amplificação do bacteriófago

Os bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3 foram amplificados utilizando as bactérias hospedeiras, *Salmonella* Brandenburg, *S. Bredney* e *S. Enteritidis*, respectivamente, em caldo TSB de concentração dupla. Em uma solução contendo 5 mL de TSB, foram inoculados 2 mL da bactéria hospedeira a uma concentração de 10^7 UFC/mL e adicionado 1 mL do fago, sendo posteriormente incubado por 24 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, a solução foi centrifugada sob refrigeração em 8000 rpm por 5 à 10 minutos, filtrada em seringa com filtros de $0,22\mu\text{m}$, transferida para frascos estéreis e armazenada a 4°C . Em seguida foi avaliada a qualidade lítica dos bacteriófagos amplificados para verificar a viabilidade dos mesmos.

5.4.1.4 Ação lítica a isolados de *Salmonella* Heidelberg pelo método de difusão em ágar

Os 126 isolados de SH foram incubados em BHI à $37\pm 1^\circ\text{C}$ até a cultura atingir a fase exponencial (*over night*). Posteriormente, 100 μL da suspensão bacteriana foram inoculados em uma placa de *Tryptic Soy Agar* (TSA, Difco®) de fina camada, e o meio semi-sólido vertido sobre a superfície (TSB e 0,6% de Agar-ágar - *soft ágar*), com o objetivo de homogeneizar a suspensão bacteriana junto ao meio através de movimentos em forma do número oito. Esperou-se secar o meio e inoculou-se 10 μL de cada fago a ser testado em triplicata. Incubou-se pelo período de 4 a 6 horas, após este período, realizou-se a leitura para verificar a suscetibilidade da bactéria hospedeira frente aos bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3, observando as áreas de lise ou unidades formadoras de placa (UFP). As placas de bacteriófagos foram registradas como +++: lise confluyente; ++: lise semi-confluyente; +: placas individuais; S: lise sombreada; -: sem placa de lise; representando a atividade lítica da mais alta para nenhuma, ou seja, forma decrescente (HERINGA *et al.*, 2010; HOOTON *et al.*, 2011). Como controle negativo utilizou-se 10 μL de TSB estéril.

5.4.1.5 Teste dos bacteriófagos contra a formação e para remoção de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg

Nesta etapa do estudo foram utilizadas dez *S. Heidelberg* com diferentes perfis de formação de biofilme, perfis genotípicos e perfis de suscetibilidade antimicrobiana, conforme a Tabela 10. A avaliação da ação de bacteriófagos na inibição da formação de biofilmes e na remoção do biofilme pré-formado foi realizada utilizando quatro diferentes tratamentos. Foram efetuados a partir da administração individual de cada um dos fagos (UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3), e pela elaboração de um coquetel com um *pool* dos três fagos, amplificados separadamente e unidos na proporção de 1:1:1 somente ao final do processo de amplificação de cada amostra.

Tabela 10 - Isolados de *Salmonella* Heidelberg selecionados para o teste de ação dos bacteriófagos contra a formação e para remoção de biofilmes.

Isolados de SH	Formação de biofilme	Perfil genotípico	IRMA*
P622	FRACAMENTE	38	1,0
P217	FORTEMENTE	53	0,8
P506	MODERADAMENTE	27	0,5
P212	FORTEMENTE	7	0,7
P227	FRACAMENTE	3	0,8
P109	FRACAMENTE	29	0,4
P113	MODERADAMENTE	3	0,6
P405	FORTEMENTE	47	0,6
P311	MODERADAMENTE	3	0,6
P120	FORTEMENTE	29	0,7

*índice de resistência múltipla aos antimicrobianos.

Foi usado um método colorimétrico, utilizando microplaca de 96 poços, para determinar quantitativamente a eficácia do bacteriófago, baseando-se no trabalho de Gong & Jiang (2017), com modificações. As 10 amostras de *S. Heidelberg* previamente selecionadas em diferentes perfis foram cultivadas individualmente em caldo TSB sem glicose por 18 a 24 h a $37\pm 1^\circ\text{C}$, ajustadas na escala 1 de Mac Farland (aproximadamente $3,0 \times 10^8$ UFC/mL), e inoculados 150 μL em cada poço da microplaca, em triplicata. Como controle positivo de formação de biofilmes inoculou-se poços onde não foram adicionados os bacteriófagos. A partir desta inoculação realizou-se os demais ensaios.

Para avaliar a remoção do biofilme pré-formado, as microplacas inoculadas com as *S. Heidelberg* foram incubadas a $30\pm 1^\circ\text{C}$ por 39 horas. Após, em três momentos

diferentes (3, 6 e 9 horas), foram adicionados 150 µL individual de cada bacteriófago e do coquetel (1:1:1), em um título final de 10^4 a 10^6 UFP/mL, em cada poço. Como os fagos estão em caldo TSB com concentração dupla, serão adicionados mais 150 µL de TSB estéril com concentração dupla nos poços do controle positivo, a fim de garantir as mesmas condições de formação de biofilme, e totalizar 300 µL em todos os poços. Após as microplacas foram incubadas por mais 3, 6 e 9 horas a $30\pm 1^\circ\text{C}$. Os controles positivos tiveram o tempo total de 48h de incubação.

Para avaliar a inibição/prevenção da formação do biofilme, além dos 150 µL de *S. Heidelberg* inoculados, antes da incubação, foi adicionado 150 µL individual de cada bacteriófago e o coquetel (1:1:1), em um título final de 10^4 a 10^6 UFP/mL, em cada poço. Foi adicionado 150 µL de TSB com concentração dupla, estéril, nos poços do controle positivo. As microplacas foram incubadas a $30\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, para padronizar o tempo total de incubação.

Após os tempos e tratamentos, cada poço foi enxaguado com 300 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (Synth[®]) por 3 vezes e seco ao ar. Em seguida, as células bacterianas fixadas com 300 µL de metanol p.a. (Neon[®]) por 15 minutos. O metanol foi removido e as placas secas em temperatura ambiente. Corou-se com 300 µL de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec[®]) por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente, sendo realizada a leitura após a adição de 250 µL ácido acético glacial 33%, da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos[®] 2010) a 600 nm. A porcentagem de reduções de biofilme foi calculada conforme Gong & Jiang (2017), pela equação:

$$\% \text{ remoção/prevenção de biofilme} = \frac{DO \text{ Controle} - DO \text{ Tratamento}}{DO \text{ Controle}} \times 100\%$$

5.4.2 Resultados e discussão

5.4.2.1 Ação lítica a isolados de *Salmonella* Heidelberg pelo método de difusão em ágar

Nos ensaios de ação lítica com os bacteriófagos, observou-se que 92,1% dos isolados (116/126) sofreram lise por, pelo menos, um fago testado. Destes, ressalta-se que 50,8% (64/126) sofreram lise pelos três fagos, demonstrando a eficácia da infecção fágica

no biocontrole de SH. Somente 7,9% (10/126) não apresentou ação lítica por nenhum dos fagos testados (Tabela 11 e Figura 5).

Em trabalhos anteriores, o bacteriófago UPF_BP2 demonstrou bom desempenho antimicrobiano frente a outros sorovares de *Salmonella* spp., tais como, *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Bredney*, *S. Schwarzemgrund*, *S. Infantis*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Panamá*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Gallinarum* (POTTKER, 2016; RIZZO, 2017; PEIXOTO, 2019). No presente estudo, o bacteriófago UPF_BP2 apresentou o melhor potencial de lise, 76,2% (96/126). Seguido do bacteriófago UPF_BP3, que demonstrou um potencial de lise sobre 76% (94/126) dos isolados.

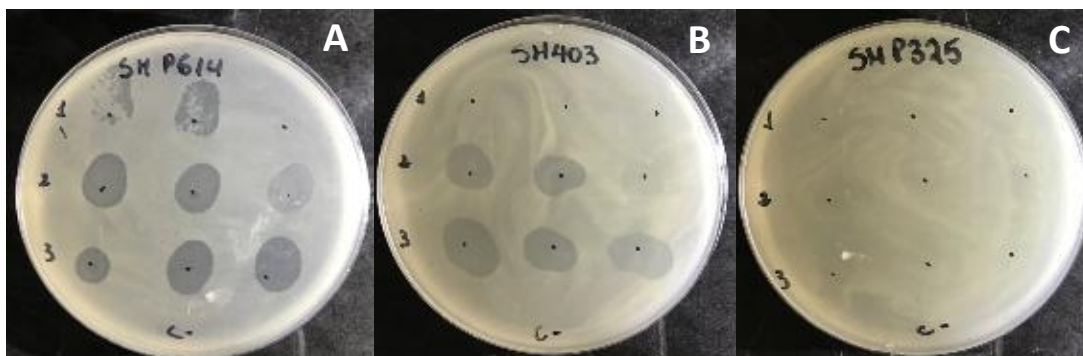
Outros pesquisadores relataram que o bacteriófago UPF_BP1 também teve desempenho em outros sorovares de *Salmonella* spp., como por exemplo, *S. Brandenburg*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Schwarzemgrund*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Typhimurium* e *S. Gallinarum* (POTTKER, 2016; RIZZO, 2017; PEIXOTO, 2019). Porém, ao comparar os três fagos testados no atual estudo, o UPF_BP1 obteve o menor desempenho, com percentual de lise de 67% (85/126).

Ao testar os mesmos bacteriófagos (UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3) sobre amostras *S. Enteritidis* isoladas de surto de DTA e de origem avícola, Peixoto (2019) corrobora com nossos resultados, já que os cinco isolados de SE sofreram lise pelos fagos testados, demonstrando a eficácia da infecção fágica para o biocontrole de diferentes sorovares de *Salmonella*.

Vale ressaltar que a busca de novos fagos, é uma alternativa eficaz, uma vez que os fagos atacam, replicam-se e lisam células bacterianas patogênicas específicas, não interferindo na microbiota natural do ambiente e/ou dos alimentos. Ou seja, possuem efetividade e especificidade.

Tabela 11 - Perfil de sensibilidade de *Salmonella* Heidelberg aos bacteriófagos.

Perfil de sensibilidade a bacteriófagos	Bacteriófago	Quantidade de Isolados	Porcentagem
1	UPF_BP1, UPF_BP2, UPF_BP3	64	50,8%
2	UPF_BP1, UPF_BP2	1	0,8%
3	UPF_BP2, UPF_BP3	30	23,8%
4	UPF_BP1	20	15,9%
5	UPF_BP2	1	0,8%
6	Nenhum dos fagos testados obtiveram potencial de lise	10	7,9%
Total:		126	100%

Figura 5 - Ação lítica de bacteriófagos visualizada em placas frente a *Salmonella* Heidelberg.

Fonte: elaborado pelo Autor (2019)

Legenda: Na primeira linha horizontal (1) refere-se ao fago UPF_BP1; na segunda linha horizontal (2) refere-se ao fago UPF_BP2; na terceira linha horizontal (3) refere-se ao fago UPF_BP3.

A: ação lítica pelo fago UPF_BP1; UPF_BP2 e UPF_BP3 frente a SH 614.

B: ação lítica pelo fago UPF_BP2 e UPF_BP3 frente a SH 403.

C: sem visualização de placas de lise frente a SH 325.

C-: controle negativo.

Filogeneticamente, os bacteriófagos UPF_BP1 e UPF_BP2 são muito semelhantes ao P22 já descrito na literatura (BOTSTEIN & HERSKOWITZ, 1974; ACKERMANN, 2015; POTTKER, 2016). Em um estudo realizado por Sharma *et al.* (2015), em que testou-se o fago P22 frente aos sorovares, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e

S. Typhimurium, foi observada uma redução de 4 logs quando comparado aos controles não tratados. Estes dados corroboram com os obtidos no presente estudo.

Um novo fago denominado fmb-p1, isolado da bactéria hospedeira *S. Typhimurium*, foi capaz de lisar 10 das 34 cepas de *Salmonella* testadas, incluindo SH (WANG *et al.*, 2017). Sukumaran *et al.* (2015) também relataram ação lítica do produto SalmoFresh™ (preparação de fagos líticos para *Salmonella*) na redução de *S. Heidelberg* em carne de frango.

Grygorcewicz *et al.* (2017) verificaram a ação do bacteriófago sall_v01, isolado de águas residuais, e esse foi capaz de infectar eficientemente vários sorovares de *Salmonella* encontrados em esterco suíno. Salientando a importância no uso de bacteriófagos líticos na redução do risco de salmonelose de origem hídrica, e consequentemente levar a uma melhoria na saúde pública.

Métodos antimicrobianos tradicionais como pasteurização, processamento de alta pressão, irradiação e desinfetantes químicos são capazes de reduzir as populações microbianas nos alimentos em graus variados, mas também têm considerável desvantagens, como grandes investimentos, danos potenciais aos equipamentos devido à corrosão e um impacto nas características organolépticas dos alimentos. Com isso o biocontrole utilizando fagos é uma intervenção antimicrobiana mais ecológica disponível hoje. A maioria, dos produtos de biocontrole com fagos que existem comercialmente hoje são oriundos de fagos naturais, isolados do meio ambiente, que não são geneticamente modificados (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE; 2018). Além disso destaca-se outras vantagens do uso de fagos, tem rápida ação na bactéria hospedeira, custo relativamente baixo, não tóxico e de fácil manipulação.

Sabe-se que pelo menos quatro preparações de fagos para *Salmonella* já estão liberadas pela FDA e estão atualmente no mercado, os produtos SalmoFresh™, PhageGuard S™, SalmoFREE® e SalmoPro® (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE; 2018; CLAVIJO *et al.*, 2019). Com isso vale ressaltar a utilização de combinações de fagos, os chamados coquetéis. Woolston *et al.* (2013) examinaram seis fagos listados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) na redução de níveis de *Salmonella* presente em superfícies encontradas na indústria de alimentos, e verificaram redução significativa na população de *Salmonella*.

Pereira *et al.* (2016) relatam eficiência semelhante no uso dos fagos usados individualmente e do uso em coquetéis, porém ressaltam que o desenvolvimento de

menor resistência bacteriana indica que os coquetéis de fagos pode ser a escolha mais promissora a ser usada no biocontrole de salmonelose.

Os fagos são usados muito além do controle de microrganismos em alimentos, meio ambiente e na medicina humana. São usados na engenharia genética como veículo de liberação de drogas, como sensores biológicos altamente específicos usados em kit de ensaios laboratoriais para detecção de microrganismos através do uso de fagos que expressam luciferases e na nanotecnologia (MILETIC *et al.*, 2016).

Como já mencionado anteriormente o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não autorizou a utilização direta em carne de frango em matadouros-frigoríficos do Brasil, somente no ambiente de processamento, diferente do que já ocorre há anos nos EUA e na União Europeia. Diante desse empasse, o governo publicou em 2017 a Instrução Normativa nº 30 de 9 de agosto de 2017, a qual estabelece procedimentos para submissão de propostas, avaliação, validação e implementações de inovação tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal (BRASIL, 2017).

Diante disso o Brasil dá um importante passo, com auxílio da pesquisa científica, para a possibilidade de aprovação do uso de bacteriófagos na indústria de alimentos, ganhando destaque devido a sua ação efetiva contra as bactérias patogênicas, e fortalecendo uma futura implementação de protocolos com uso de biocontrole, tendo impacto direto na qualidade dos alimentos.

5.4.2.2 Teste dos bacteriófagos contra a formação e para remoção de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg

Na tabela 12 podemos observar a suscetibilidade dos 10 isolado de SH, selecionados para esse teste, aos bacteriófagos conforme suas características de lise em placa.

Tabela 12 - Caracterização da suscetibilidade aos bacteriófagos conforme lise em placa.

Isolados de SH	Suscetibilidade aos bacteriófagos*		
	UPF_BP1	UPF_BP2	UPF_BP3
SH 109	+++	+++	+++
SH 113	+	+	-
SH 120	+++	+++	++
SH 622	++	+++	+++
SH 506	+++	++	S
SH 227	-	+++	+
SH 311	S	++	++
SH 212	+++	-	S
SH 217	-	+++	+++
SH 405	++	++	++

*Os resultados da lise foram registrados conforme o efeito da lise decrescente da seguinte maneira: +++: lise confluyente; ++: lise semi-confluyente; +: placas individuais; S: lise com sombra; -: sem placa (HERINGA *et al.*, 2010; HOOTON *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos com a ação lítica dos bacteriófagos contra a formação e para remoção do biofilme pré-formado, em diferentes tempos de incubação (9, 6 e 3 horas), estão descritos na Figura 6. Os dados, em forma de tabela, estão disponíveis no Apêndice A.

A combinação sinérgica do *pool* de fagos foi o tratamento com melhor percentual de prevenção da adesão da SH em superfície de poliestireno, com reduções em até 83,4%, e remoção do biofilme pré-formado em até 64,0%, confirmando que a ação do fago na prevenção da formação do biofilme é mais eficiente do que no biofilme pré-formado.

Vale ressaltar que diante dos tratamentos testados na prevenção da formação do biofilme, ambos não diferiram entre si estatisticamente, apenas o isolado SH 212 apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$), alcançando um percentual de redução de 72,2% pela melhor ação do fago UPF_BP1. Vale ressaltar que esse isolado é caracterizado como multirresistente a antimicrobianos e fortemente formador de biofilmes (Tabela 10), bem como no teste de ação lítica em ágar difusão, foi sensível somente ao UPF_BP1 (Tabela 12), corroborando com esse achado.

Os tratamentos apresentaram diferença significativa no tempo de 9 h somente para o isolado SH 109, sendo o *pool* o único que reduziu o biofilme pré-formado ($p < 0,05$). Esse isolado é caracterizado como fracamente formador de biofilme (Tabela 10), e foi sensível aos três bacteriófagos testados no teste em ágar difusão (Tabela 12), enfatiza-se o uso dos fagos em associação já que houve melhor ação no biofilme.

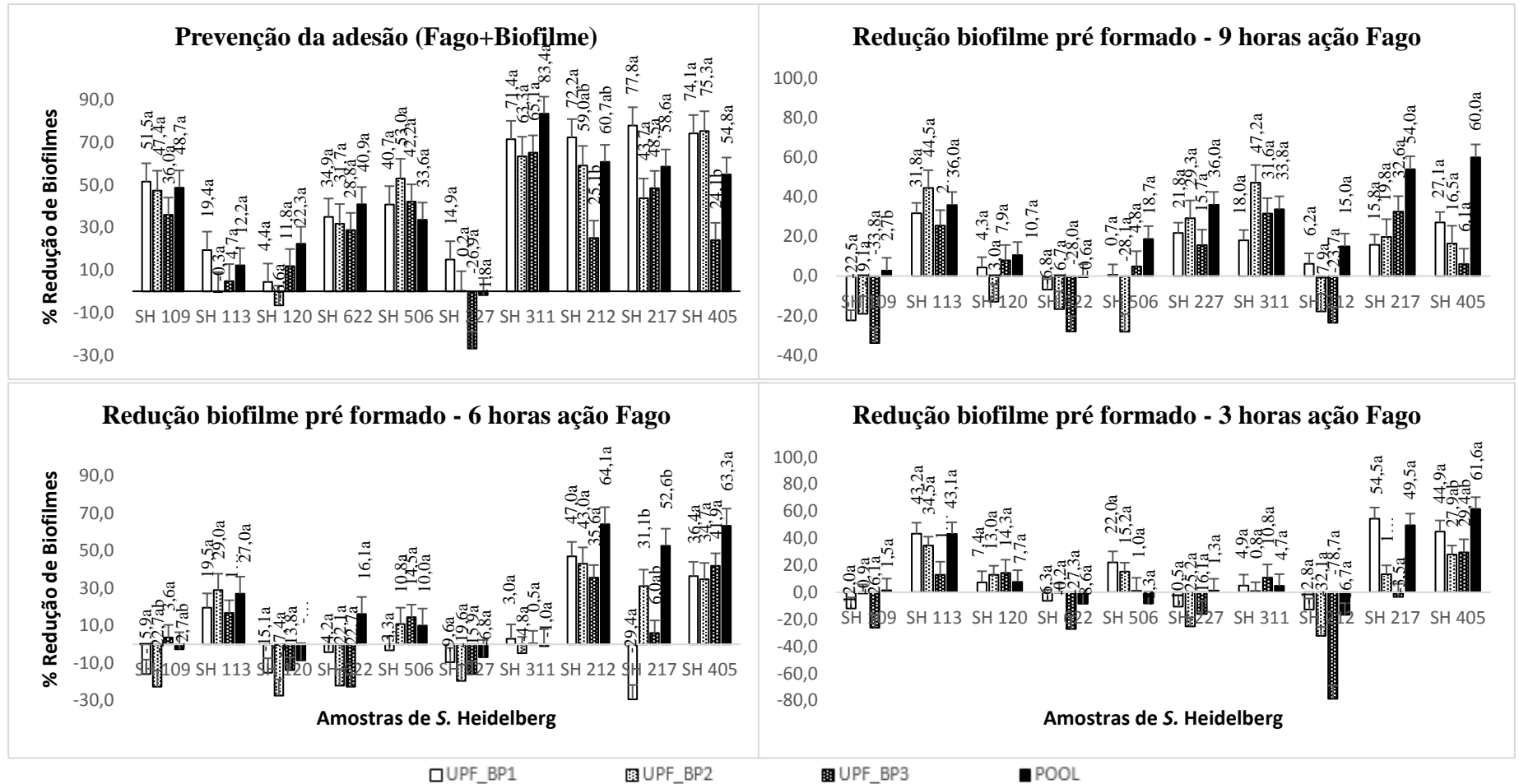
O fago UPF_BP2 e o *pool* apresentaram a mesma ação frente ao biofilme formado pela amostra SH 217 com 6 h de incubação, diferindo estatisticamente do fago UPF_BP1, que não obteve ação sobre o biofilme. Ao observar a tabela 12, confirmamos esse resultado, já que o isolado SH 217 não foi sensível ao fago UPF_BP1 em teste lítico.

Em 3 h, tempo de menor contato do fago com o biofilme, ainda assim se conseguiu redução do biofilme pré-formado de até 61% com a ação do *pool* para o isolado SH 405. Mesmo esse sendo fortemente formador de biofilme e multirresistente a antimicrobianos, tivemos ótimas taxas de redução com o uso do biocontrole com fagos.

Nossos resultados demonstram maiores porcentagens de redução na prevenção da adesão de SH do que sobre o biofilme já formado, indicando que essa estratégia poderia ser utilizada na prevenção da formação dos biofilmes com a técnica de condicionamento de superfícies. Sabe-se que no processo de formação de biofilme a fixação é o passo inicial para as bactérias colonizarem uma nova superfície através de motilidade bacteriana (COSTERTON, 1995; SREY *et al.*, 2013), nesta etapa, a adesão irreversível da população bacteriana ainda não foi formada, e as células bacterianas podem se desprender da superfície e retornar ao estilo de vida planctônico. Esse dado corrobora com nossos achados, já que a aplicação de bacteriófagos na fase de adesão inicial é mais eficaz do que sobre biofilmes desenvolvidos e protegidos por uma estrutura complexa e resistente (KINLEY, 2009; HERINGA *et al.*, 2010; KELLY *et al.*; 2012; GONG & JIANG, 2017).

Gong e Jiang (2017) demonstram que os fagos foram eficazes na redução na etapa de fixação e remoção de biofilmes formados de *Salmonella* em superfícies, corroborando ao nosso trabalho. Os bacteriófagos foram capazes de prevenir a formação de biofilme até 90% por 48 h, reduzindo o risco de um novo ciclo de produção de células patogênicas em plantas de produtos processados. Chen *et al.* (2018) isolaram fagos de amostras de swab retal de suínos, e apresentaram infectividade bacteriana, os fagos individuais ou em coquetéis inibiram o crescimento de cepas de *S. Enteritidis* ou reduziram a formação de biofilme de *S. Typhimurium*.

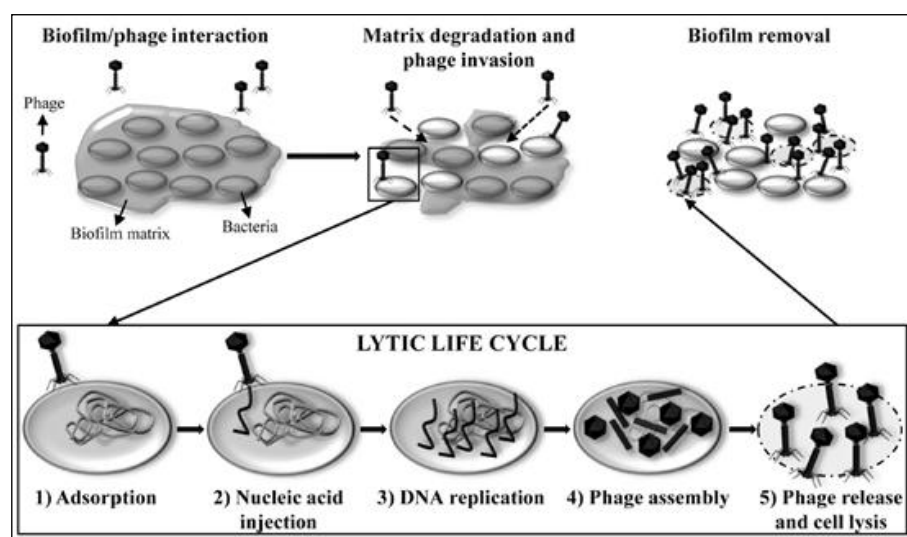
Figura 6 - Percentual de redução pela ação lítica de bacteriófagos sob *Salmonella* Heidelberg na adesão (formação) do biofilme e remoção do biofilme pré-formado em superfície de poliestireno.



Legenda: (A) Percentual de redução na adesão do biofilme na superfície de poliestireno; (B) Percentual de redução na remoção do biofilme pré-formado após 9 horas de ação dos fagos; (C) Percentual de redução na remoção do biofilme pré-formado após 6 horas de ação dos fagos; (D) Percentual de redução na remoção do biofilme pré-formado após 3 horas de ação dos fagos.

Há limitações já definidas na interação fago e biofilme (Figura 7) (ATTERBURY *et al.*, 2007; FLEMMING & WINGENDER, 2010; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2017). Os fagos precisam alcançar a bactéria hospedeira para se ligar ao receptor, com isso a difusão do fago depende também da densidade do biofilme (HU *et al.*, 2010). O biofilme formado pela *Salmonella* spp. é altamente hidrofóbico com células compactadas em uma matriz rígida e densa, o que dificulta muito a ação dos bacteriófagos (CERCA, 2012). Inclusive destaca-se que os isolados de SH selecionados para esse estudo, apresentam diferentes perfis de formação de biofilme, sendo a maioria fortemente e moderadamente formador em superfície de poliestireno (Tabela 10), indicando a dificuldade que os fagos encontram ao tentar se ligar aos receptores da bactéria.

Figura 7 - Interação fago e biofilme



Fonte: GUTIÉRREZ *et al.* (2016).

A eficácia do fago frente às bactérias hospedeiras, pode ser influenciada por diversos parâmetros, como o número de fagos e hospedeiros necessários para permitir a sua replicação, o surgimento de bactérias mutantes resistentes (BIM), o pH, atividade em um substrato sólido, e principalmente devido a densidade da matriz de substância polimérica (EPS) que limita a difusão do fago (ATTERBURY *et al.*, 2007; FLEMMING & WINGENDER, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Na adsorção do fago é necessário primeiro ocorrer interações reversíveis entre elementos específicos do bacteriófago e do hospedeiro, para que após ocorra uma ligação irreversível. Ou seja, o processo de ligação do fago na célula hospedeira ocorre por uma

combinação de fatores, como o modo de ação do fago, fisiologia da célula hospedeira, difusão física, interações bioquímicas da superfície e alterações conformacionais induzidas por proteínas receptoras presentes em cada fago, por exemplo a proteína receptora descrita do fago P22 é a GP9 (MILETIC *et al.*, 2016). O fago T7 com ação na hospedeira *E. coli* possui 3 proteínas receptoras, gp14, gp15 e a gp16 que são responsáveis pela ligação na célula hospedeira (HU *et al.*, 2013). Vale ressaltar que uma cinética de adsorção da maioria dos bacteriófagos não foi ainda descrita na literatura, isso devido a diversidade de fagos presente na natureza.

Frente a essa limitação, se faz uso de combinações sinérgicas (CHAN *et al.*, 2013). Cui *et al.* (2018), utilizaram combinação sinérgica de fagos com plasma de nitrogênio (CNP) na erradicação de biofilmes de *E. coli* O157: H7 em vegetais. Obtiveram reduções expressivas na contagem de células viáveis de *E. coli* O157: H7. Portanto, o uso dos fagos em sinergismo é uma grande promessa para melhorar os atuais sistemas de tratamento de contaminação bacteriana em alimentos. Pereira *et al.* (2016) relatam eficiência semelhante no uso dos fagos individualmente e do uso em coquetéis, porém ressaltam que o desenvolvimento de menor resistência bacteriana indica que os coquetéis de fagos pode ser a escolha mais promissora a ser usada no biocontrole de salmonelose.

Outros estudos também citam o biocontrole usando o *pool* de fagos, com capacidade de reduções na adesão inicial e no biofilme pré-formado em diferentes bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella* spp. (ANDREATTI FILHO *et al.* 2007; WOOLSTON *et al.*; 2013; HOSSEINIDOUST *et al.* 2013; SHARMA *et al.*, 2015; BAO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016).

A SH 311 foi o isolado que sofreu maior percentual de redução na prevenção da fixação do biofilme, com redução de 83,4% pelo *pool*, porém sem diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Esse isolado é caracterizado com capacidade moderada de formar biofilme e multirresistente a antimicrobianos, e mesmo assim teve taxas altas de sensibilidade ao biocontrole.

Observamos ação reduzida dos fagos nos biofilmes já formados no tempo de 3 horas, houve fraca ação lítica, ou seja, obtivemos menor redução, porque é um biofilme com 45 horas de formação, conseqüentemente um biofilme mais maduro e com mais EPS. Ressaltando que a ação dos fagos em células planctônicas é mais fácil do que em sésseis, depois do biofilme formado a eliminação se torna um grande desafio (PIRES *et al.*, 2017).

Sadekuzzaman *et al.* (2018) avaliaram a eficácia de fagos na redução de biofilmes de *Salmonella* spp. por um período de ação de somente 2 horas quando os fagos foram

capazes de reduzir significativamente os biofilmes cultivados em alimentos e diferentes superfícies.

Garcia *et al.* (2017) citam que biofilmes formados por *S. Heidelberg* em superfícies de vidro foram resistentes a 6 h de tratamento com o *pool* de fagos, mas após 9 h de ação os fagos tiveram ação lítica e reduziram o biofilme. Corroborando com nossos achados, com 9 h houve maiores porcentagens de redução no biofilme pré-formado. Vale ressaltar que o fago já demonstrou reduções mesmo em curto tempo de contato.

Segundo Madigam *et al.* (2010), a partir da infecção fágica em cerca de 25 minutos a formação dos novos fagos culmina na lise da bactéria, e iniciam-se novos ciclos líticos. Em nosso estudo observamos ação do fago em um tempo de contato reduzido de 3 horas, o que é relevante para bactérias patogênicas como *Salmonella*, que possuem tempo rápido de geração e longa permanência no ambiente e nas superfícies de equipamentos de processamento de alimentos (BENSINK, 1979; NESSE *et al.*, 2005; IIBUCHI *et al.*, 2010).

Como já se sabe, fagos são espécie-específicos (REARDON, 2017b), porém vale ressaltar que esses mesmos fagos em trabalhos anteriores demonstraram bom desempenho antimicrobiano frente a outros sorovares de *Salmonella* spp., tais como, *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Bredney*, *S. Schwarzemgrund*, *S. Infantis*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Panamá*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Gallinarum* (POTTKER, 2016; RIZZO, 2017; PEIXOTO, 2019). Evidenciando a ação em uma ampla variedade de sorovares, sendo possivelmente específico para o gênero *Salmonella*.

Como perspectivas para ampliar o uso de bacteriófagos pesquisas futuras analisarão a possibilidade de reaplicação dos fagos em intervalos de tempos no processamento de alimentos, a fim de garantir maior efetividade do biocontrole nas etapas de higienização. Bem como o uso de técnicas antimicrobianas combinadas, como luz UV e fagos, que já foram testadas e podem ser usadas em ambientes industriais para melhorar o controle de *Salmonella* no processamento de carnes (YEH *et al.*, 2018).

Sabe-se que no ciclo lítico dos bacteriófagos, os novos fagos que são formados saem da bactéria expressando duas proteínas líticas, a holina e a endolisinas (enzimas proteolíticas) (MADIGAM *et al.*, 2010). Com isso outra proposta de combinações sinérgicas é o uso de proteínas com atividade lítica, as endolisinas isoladas são alternativa antimicrobiana vantajosa pois até o momento não foi descrito nenhuma bactéria resistente

a proteínas líticas de fago (RODRÍGUEZ-RUBIO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2017; GRAY *et al.*, 2018), diferente do que já ocorre para os bacteriófagos.

Segundo Lekunberri *et al.* (2017) as bactérias mutantes insensíveis a bacteriófagos (BIM) utilizam mecanismos de resistência à infecção fágica, através da ação de enzimas de restrição que degradam o DNA/RNA do fago assim que ele é injetado na célula hospedeira, ou são capazes de bloquear os receptores no momento da adsorção prevenindo a injeção do material genético, além de produzem matriz extracelular e inibidores competentes (LABRIE *et al.*, 2010).

Frente a essa questão de resistência bacteriana aos fagos vale ressaltar que ao contrário dos agentes quimioterápicos/antimicrobianos sintéticos, os bacteriófagos são entidades biológicas vivas que evoluem constantemente para contornar as defesas dos seus hospedeiros, já que são totalmente dependentes da maquinaria da bactéria.

Outros estudos são realizados com o uso dos fagos *in vivo*, ou seja, o que chamamos de fagoterapia (MALIK *et al.*, 2017). Albino *et al.* (2014) relatam reduções significativas de *Salmonella* após a administração oral de *pool* de bacteriófagos para suínos após jejum, indicando que o *pool* de bacteriófagos foi capaz de reduzir efetivamente a colonização de *Salmonella*. Clavijo *et al.* (2019) avaliaram a eficácia do coquetel de bacteriófagos SalmoFREE® para controlar *Salmonella* em uma fazenda de frangos de corte e obtiveram controle da incidência de *Salmonella* nos animais testados, não afetando os parâmetros de produção.

Contudo mais estudos são necessários para provar a eficácia e segurança do biocontrole como alternativa antimicrobiana no processamento de alimentos, como por exemplo requererem algum tipo de proteção (por exemplo, microencapsulação) para permanecer viáveis sob várias condições fisiológicas e de fabricação (ZHANG *et al.*, 2015).

Embora a indústria de alimentos tenha evoluído nas últimas décadas, o risco de contaminação durante o processamento de alimentos continua alto, e a presença de biofilme é uma das principais causas de contaminação. O biocontrole com uso de bacteriófagos ainda deve ser muito estudado, é necessário unir informações para garantir que esta seja uma ferramenta adicional em programas de controle de qualidade dos alimentos.

Nossos resultados sugerem que o sorovar Heidelberg capaz de formar biofilme e multirresistente a antimicrobiano, teve ação lítica dos bacteriófagos. E demonstram que a ação do fago na prevenção da formação do biofilme de *S. Heidelberg* é mais eficiente

do que no biofilme pré-formado. Bem como o uso de combinações sinérgicas é a mais indicada, já que potencializou a redução dos biofilmes. Assim conclui-se que o uso do *pool* de bacteriófagos no condicionamento de superfícies é uma alternativa no controle de biofilme de SH.

5.5 Experimento 5 – Teste de suscetibilidade de *Salmonella* Heidelberg frente a óleos essenciais

5.5.1 Material e Métodos

5.5.1.1 Seleção dos óleos essenciais

Foram realizados ensaios *in vitro* com cinco óleos essenciais selecionados com base nas suas ações antimicrobianas previamente descritas, frente a *S. Heidelberg* (MACIA *et al.*, 2014; BALOUIRI *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais foram adquiridos de fornecedores comerciais (Oshadii®), sendo selecionados para os ensaios por terem diferentes graus de ação antimicrobiana frente a bactérias patogênicas. Desta forma utilizou-se o óleo de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (MAJOLO *et al.*, 2014), de orégano (*Origanum compactum*), de canela (*Cinnamomum cassia*), de cravo (*Eugenia caryophyllus*) (MITH *et al.*, 2014) e de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (CARVALHO *et al.*, 2015). Todos os óleos foram previamente caracterizados por Cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa (CG/MS), sendo os dados destas análises descritos no apêndice B.

5.5.1.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Os efeitos antibacterianos foram testados sobre dez isolados de *S. Heidelberg* com diferentes perfis de formação de biofilme, perfis genotípicos e perfis de suscetibilidade antimicrobiana (conforme tabela 10 apresentada acima no item 5.4.1.5), pela técnica de Ágar difusão de acordo com Balouiri *et al.* (2016), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de acordo com CLSI (2014), Majolo *et al.* (2014) e Shahbazi (2015).

Atividade antimicrobiana em ágar difusão

Para os testes de ágar difusão, uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (NaCl 0,85%) equivalente à 0,5 da escala Mac Farland (1×10^6 UFC/mL) foi preparada. Um suabe estéril foi embebido na suspensão bacteriana e semeado em cinco direções em placa com Agar Mueller Hinton (Kasvi®). Após 5 minutos, um furo com um diâmetro de 8 mm foi puncionado assepticamente com um perfurador estéril. Um volume de 80 µL do óleo essencial na concentração desejada foi então introduzido no poço. As placas de ágar foram incubadas em condições favoráveis $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. O agente antimicrobiano se difundirá no meio do ágar e inibirá a multiplicação da estirpe microbiana testada. Após, o diâmetro da zona de inibição foi medido em milímetros, tendo tetraciclina como controle positivo e óleo mineral estéril como negativo e *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) como organismos controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinar a CIM dos óleos essenciais foi utilizada microplaca estéril de 96 poços. Foram selecionados os óleos essenciais que apresentaram melhores resultados no teste de ágar difusão, o orégano e a canela, sob seis isolados de SH que tiveram maior suscetibilidade aos OEs. Inicialmente preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (NaCl 0,85%) equivalente à 0,5 da escala Mac Farland (1×10^6 UFC/mL) de seis isolados de *S. Heidelberg* selecionados também no teste de ágar difusão. Nos poços do controle negativo foi adicionado somente 100 µL do caldo nutritivo com 10% de DMSO (9 mL de BHI concentração dupla + 1 mL de DMSO) sem adição da bactéria. O controle do óleo essencial foi composto por 100 µL do caldo nutritivo com DMSO e mais 100 µL do óleo essencial selecionado. Por fim, o controle positivo foi o caldo nutritivo com DMSO e a suspensão bacteriana.

Nos demais poços da microplaca adicionou-se 100 µL do caldo nutritivo com 10% de DMSO. Também na primeira fileira da microplaca, foi adicionado 100 µL do óleo essencial puro a ser testado, totalizando 200 µL em cada poço. A diluição seriada foi realizada transferindo 100 µL da fileira A para os poços da fileira B, consecutivamente até a última fileira (foi utilizado duas microplacas), obtendo no total 15 concentrações do óleo essencial de 100% até 0,006% (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, 1:8192, 1:16384). Por fim, adicionou-se 30 µL da suspensão bacteriana em todos os poços, exceto nos controles negativos, e as microplacas

foram incubadas em condições favoráveis à $37\pm 1^\circ\text{C}$, e a leitura visual foi realizada após 24 e 48 horas.

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a confirmação da concentração bactericida mínima (CBM) uma alíquota de cada poço das três diluições anteriores sem turvação, foram transferidas para Ágar nutriente e as placas incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24h, determinando-se como a CBM a menor concentração sem multiplicação bacteriana visível nas placas.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de Kruskal Wallis e a diferença entre as amostras foi avaliada segundo o teste de Student- Newman- Keuls ($p>0,05$).

5.5.1.3 Avaliação do efeito dos óleos essenciais em matriz cárnea com *Salmonella* Heidelberg

Nesta etapa do estudo foi utilizado um isolado de *S. Heidelberg* (SH 212) que sofreu ação dos OEs no teste descrito no item 5.5.1.2.

A carne de frango foi comprada em supermercado de varejo da região norte do estado do Rio Grande do Sul. As amostras de frango foram analisadas preliminarmente em laboratório de microbiologia de alimentos para análise dos parâmetros microbiológicos segundo metodologia de PCR VIDAS® *Salmonella* (SLM) Easy, técnica de microbiologia convencional para a presença/ausência de *Salmonella* spp. e determinação quantitativa de bactérias mesófilas aeróbias facultativas pela técnica de contagem em profundidade (ISO 4833-1, 2013), a fim de atender as normas previstas pela RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, bem como para saber a carga inicial bacteriana através da contagem total de mesófilos (BRASIL, 2011) (Apêndice C).

Foram fracionados pedaços de 2 g de carne de frango crua em placas de Petri estéril, posteriormente os fragmentos foram expostos a luz UV por 15 min para cada lado a fim de reduzir /evitar a contaminação superficial. Após os fragmentos foram inoculados por imersão por 2 min em um volume de 18 mL (proporção 1:10) de inóculo à uma concentração de 1×10^7 UFC/mL do microrganismo para obter uma carga bacteriana inicial de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL, segundo metodologia descrita por Cardoso-Toset *et al.* (2017). Os fragmentos adicionais de carne foram também imersos em solução

de água peptona 0,1% estéril usados como controle. Após essa imersão na suspensão bacteriana, os fragmentos da carne de frango foram colocados em placas de Petri estéreis à temperatura ambiente ($24\pm 1^\circ\text{C}$) por 10 min para permitir a fixação microbiana.

A matriz cárnea previamente inoculada com a bactéria foi imersa individualmente em um volume de 18mL (proporção 1:10) por 10 minutos à temperatura ambiente na suspensão do óleo essencial de orégano, selecionado de acordo com sua ação no teste de ágar difusão, e com uma concentração acima da concentração inibitória mínima obtida, definida a partir de testes preliminares em matriz cárnea ($0,48 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os controles negativos foram imergidos em 18 mL de solução AP 0,1 % estéril nas mesmas condições.

Após o tratamento os fragmentos de carne foram colocados individualmente em tubos estéreis e selados com fita parafilme para reduzir a desidratação da carne. Em seguida foram incubadas a $12\pm 1^\circ\text{C}$ e a $4\pm 1^\circ\text{C}$, para mimetizar respectivamente a temperatura da sala de cortes dos matadouros frigoríficos avícolas e a temperatura da gondola de distribuição no varejo, a fim de assumir o cenário da saída do frigorífico até o armazenamento nos supermercados, por um período de 0, 1, 3 e 5 dias.

Após cada tempo, o número de SH remanescentes na matriz foi determinado com imersão em 18 mL de água peptonada 0,1% e agitado em vórtex por 2 minutos. Diluições seriadas decimais foram feitas e transferidas para ágar PCA (padrão de contagem, Kasvi[®]) para quantificação pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10 μL de cada diluição). Com isso, as placas foram incubadas em estufas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h (APOSTOLIDIS *et al.*, 2008; ERUTEYA & ODUNFA, 2016).

O cálculo de UFC/g de amostra, seguiu a metodologia descrita por Silva *et al.* (2010), com a seguinte equação:

$$\text{UFC/g} = \text{UFC/mL da suspensão} \times \frac{\text{volume de diluente (mL)}}{\text{peso da amostra de carne (g)}}$$

5.5.2 Resultados e discussão

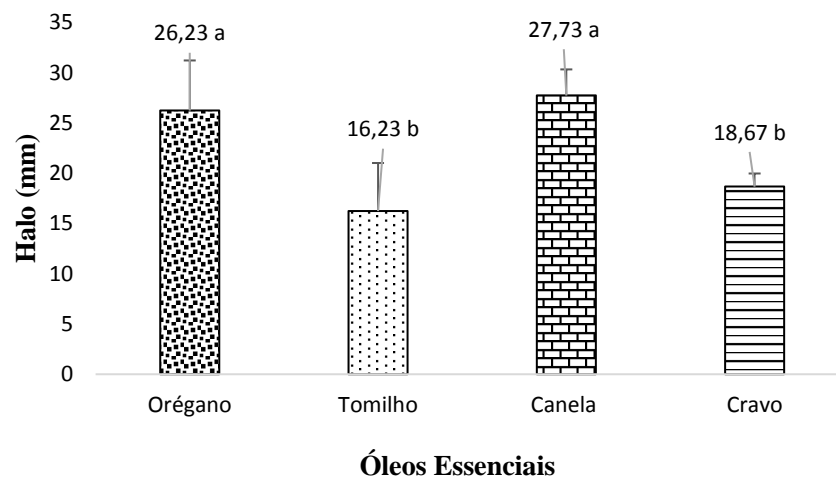
5.5.2.1 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Atividade antimicrobiana em ágar difusão

Os resultados obtidos indicam que os óleos essenciais de canela, orégano, cravo e tomilho apresentaram ação antimicrobiana sobre SH, com exceção do óleo de gengibre, que não teve ação antimicrobiana sobre nenhum dos isolados testados.

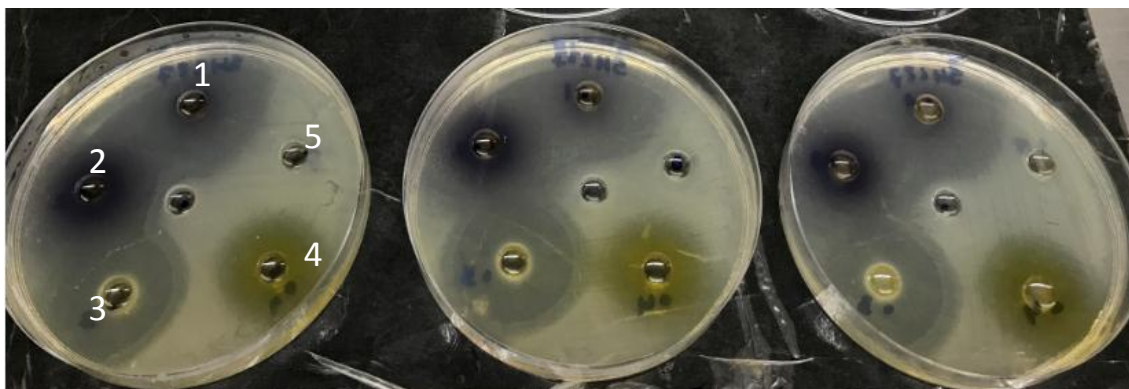
Os óleos essenciais de canela e orégano demonstraram maior espectro de ação, com maiores leituras de halos de inibição ao comparar com o cravo e o tomilho, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 8 e 9). Vale ressaltar que os óleos essenciais de orégano e canela obtiveram melhores resultados e foram capazes de inibir o crescimento de todas as amostras testadas.

Figura 8 - Média dos halos de inibição (mm) de óleos essenciais frente a isolados de *Salmonella* Heidelberg.



Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p > 0,05$).

Figura 9 - Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre isolados de SH pela técnica de ágar difusão.



Fonte: elaborado pelo Autor (2019).

Legenda:

- 1: ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a SH 227.
- 2: ação antimicrobiana do óleo essencial de tomilho frente a SH 227.
- 3: ação antimicrobiana do óleo essencial de canela frente a SH 227.
- 4: ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo frente a SH 227.
- 5: ação antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente a SH 227.
- 6: controle negativo: óleo mineral.

Com base nos resultados apresentados na tabela abaixo (Tabela 17), o óleo essencial de orégano teve maior ação antimicrobiana sob a amostra SH 227, com maior sensibilidade, comparado com as outros isolados, sendo o maior halo de inibição observado (37,67mm). Observando o óleo essencial de canela, a SH 212 e a SH 506 obtiveram maiores halos comparando com as outras amostras.

Vale ressaltar que todas as amostras selecionadas para esse estudo são multirresistentes à antimicrobianos com variações de IRMA (índice de resistência múltipla a antimicrobianos) de 0,4 a 1,0 e possuíam diferentes capacidades de formação de biofilme a 36°C.

Tabela 17 - Valores médios de halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* L., *Cinnamomum cassia* e *Eugenia caryophyllus* frente a dez isolados de *S. Heidelberg*.

Amostras SH	Orégano	Tomilho	Canela	Cravo
SH 622	26,33 aA	19,00 aA	26,00 aA	18,00 aA
SH 217	26,67 aA	24,00 aA	25,33 abA	19,33 aA
SH 506	21,00 abA	14,00 bAB	29,00 acA	17,33 aAB
SH 212	27,00 abcA	17,00 abcAB	29,67 acdA	19,33 aAB
SH 227	37,67 acdA	16,33 abcdB	27,33 abcdeAB	18,67 aAB
SH 109	27,33 acdeA	17,33 abcdeAB	32,67 cdfA	19,33 aAB
SH 113	21,67 abcA	15,00 bcdefAB	26,00 abcdeA	18,33 aAB
SH 405	27,00 acdeA	16,33 abcdefAB	28,33 abcdefgA	20,00 aAB
SH 311	22,67 abceA	16,33 abcdefAB	25,67 abcefgA	18,67 aAB
SH 120	25,00 abceA	7,00 bdfB	27,33 abcdegA	17,67 aAB

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p > 0,05$).

De acordo com Hyldgaard *et al.* (2012) as propriedades antibacterianas dos metabólitos secundários dos óleos essenciais foram avaliadas pela primeira vez em 1881. Já a atividade de inibição bacteriana dos OEs de orégano e tomilho foi relatada pela primeira vez no ano de 1950. Esses possuem alto teor de carvacrol e timol, tendo capacidade de permeabilização e despolarização da membrana plasmática do microrganismo, sendo eficazes contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (OUSSALAH *et al.*, 2007; VASILE *et al.*, 2017; LAGHMOUCHI *et al.*, 2018). Esses dados reforçam nossos achados, já que ambos óleos demonstraram ação antimicrobiana frente SH, bactéria Gram negativa.

Vale ressaltar que devido à composição complexa dos OEs é provável que sua atividade antibacteriana seja devido a diferentes mecanismos de ação e isso implica em vários alvos na célula bacteriana (BURT, 2004). Por esta razão, espera-se que as bactérias raramente desenvolvam mecanismos de resistência para os OEs, forte razão para uso desses compostos como alternativa ao controle de patógenos. Porém já há relatos de microrganismos com mecanismos de resistência, como bombas de efluxo, a alguns OEs,

por exemplo, ao óleo essencial de pinho (MOKEN *et al.*, 1997; PAPADOPOULOS *et al.*, 2008).

Marques *et al.* (2015) corroboram com nosso estudo, avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sobre bactérias isoladas de carne de frango, e todos os isolados foram sensíveis, sendo uma ferramenta na prevenção quando se trata de inibição bacteriana. Há relatos da ação do óleo essencial de orégano, tomilho e cravo frente a várias cepas Gram positivas e Gram negativas, e ambos estudos relatam forte ação antibacteriana (HONÓRIO *et al.*, 2015; VASILE *et al.*, 2017).

Segundo Benavides *et al.* (2012) o óleo essencial de orégano foi considerado um dos mais eficazes antimicrobianos e agentes naturais antioxidantes. Dados publicados sobre a eficácia antimicrobiana de vários óleos essenciais, relatam a seguinte classificação geral, em ordem decrescente de atividades antibacterianas sob diferentes patógenos: orégano/cravo/canela/tomilho > hortelã > alecrim > mostarda > coentro/sálvia (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2015).

Gonçalves *et al.* (2017) estudaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais por meio de encapsulamento e em meio livre. Observaram que o OE encapsulado teve maior efeito do que comparado com o OE livre. Ressaltando forte potencial de uso da tecnologia de microencapsulação, alternativa no uso desses aditivos. Moraes-Lovison *et al.* (2017) estudaram a técnica de encapsulação por nanoemulsão com diferentes concentrações do óleo de orégano para avaliar a atividade antibacteriana e tiveram bons resultados quando incorporado em pate de frango, prevenindo o controle microbiológico e estendendo a vida útil do produto. Vale ressaltar que o uso dessa tecnologia de encapsulação auxilia a manter as características organolépticas do alimento.

Um efeito aditivo foi obtido pela combinação de óleos essenciais de tomilho e orégano na pesquisa realizada por Reyes-Jurado *et al.* (2016). Estes resultados sugerem o potencial uso de misturas de óleos essenciais para inibir o crescimento microbiano e preservar alimentos, no entanto, seu efeito sobre a qualidade sensorial em alimentos selecionados compatíveis com seu sabor precisa ser avaliado. Zhou *et al.* (2007) encontraram efeitos sinérgicos contra *Salmonella* Typhimurium ao combinar cinamaldeído com carvacrol. Dado importante se observarmos nossos resultados em ágar difusão que mostraram o orégano e a canela com maior ação antibacteriana sobre SH, impulsionando pesquisas futuras com o uso de combinações, os chamados *blends*.

Becerril *et al.* (2012) estudaram a suscetibilidade de bacilos gram-negativos frente aos OEs de orégano e canela, e a combinações de ambos. Os resultados mostraram que

todas as cepas foram suscetíveis a ambos OEs e sua combinação, independentemente do perfil de resistência a antibióticos, corroborando com nossos achados. Porém não foi observado efeito sinérgico nem antagonistas entre os óleos essenciais de orégano e canela nas concentrações testadas.

Embora a indústria de alimentos utilize os OEs principalmente como aromatizantes, os mesmos representam uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos. No entanto, a aplicação dos OEs na conservação de alimentos, requer conhecimentos detalhados sobre suas propriedades, ou seja, a concentração inibitória mínima (CIM), os microrganismos envolvidos, modo de ação, além do efeito dos componentes da matriz do alimento sobre suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (HYLDGAARD *et al.*, 2012).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), é definida como a menor concentração do OE no caldo, o qual resulta na ausência de multiplicação microbiana. O ponto final pode ser visualizado através da densidade ótica (turbidez) (BURT, 2004). Com diluições seriadas dos óleos essenciais de orégano e canela, feitas a partir da concentração do óleo puro 1:1 (100%) até 1:16384 (0,006%), buscou-se saber qual era a última concentração na qual não houve crescimento bacteriano, sabe-se que o volume e a concentração dos óleos são parâmetros que podem ser observados na avaliação do efeito inibitório.

Analizou-se a CIM frente às seis amostras de *S. Heidelberg* com maior sensibilidade aos OEs e os melhores resultados foram obtidos com orégano e canela, resultados apresentados na tabela 18. Além disso, foi determinada também a concentração bactericida mínima (CBM), através da visualização de crescimento da bactéria em placa, a fim de confirmar a turbidez de cada poço e conseqüentemente confirmar a concentração inibitória mínima.

A determinação da CBM, através da visualização de crescimento da bactéria em placa, demonstrou resultado equivalente as encontradas na CIM para as seis amostras. O conjunto dos dois fatores, CIM e CBM, demonstram a atividade destes óleos essenciais frente a *S. Heidelberg* multirresistentes e o potencial uso destes OEs no controle desse microrganismo.

Os resultados presentes na Tabela 18 demonstram forte atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, já que uma baixa concentração foi capaz de inibir o crescimento das SH, sendo promissor o seu uso no controle desse microrganismo.

Tabela 18 - Concentração inibitória mínima (CIM) do OE de orégano (*Origanum compactum*) e canela (*Cinnamomum cassia*).

CIM $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (proporção v/v)*		
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Orégano	Canela
SH 120	0,122 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:8192) 0,012%	0,061 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:16381) 0,006%
SH 212	0,24 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:4096) 0,024%	0,122 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:8192) 0,012%
SH 217	0,24 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:4096) 0,024%	0,122 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:8192) 0,012%
SH 227	0,24 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:4096) 0,024%	0,061 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:16381) 0,006%
SH 405	0,48 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:2048) 0,048%	0,24 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:4096) 0,024%
SH 622	0,24 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:4096) 0,024%	0,122 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ (1:8192) 0,012%
Média	0,26 $\mu\text{L. mL}^{-1}$	0,121 $\mu\text{L. mL}^{-1}$

*resultados em triplicata.

Vale ressaltar a importância da utilização do agente emulsificante DMSO (dimetil sulfóxido) na técnica de concentração inibitória mínima, que facilita a difusão do óleo essencial no caldo nutritivo, importante na etapa de diluição dos óleos. Bem como é importante analisar as propriedades físicas e químicas, que são importantes para auxiliar na visualização da atividade antimicrobiana dos óleos (PESAVENTO *et al.*, 2015), através da técnica de cromatografia (dados no apêndice B).

CIM e CBM semelhantes aos encontrados nesse estudo foram relatadas por outros autores, mas também foram encontrados valores diferentes em outros casos. Como exemplo, Mayaud *et al.* (2008) obtiveram CIM semelhantes contra bacilos Gram-negativos para canela, enquanto obtiveram valores diferentes para o orégano. A disparidade nos resultados pode ser atribuída a variações na composição química dos OEs obtidos das mesmas espécies de plantas, uma vez que a composição química dos OEs pode diferir em diferentes partes de uma planta, fase de desenvolvimento, condições de crescimento, sistema de secagem e procedimentos de extração.

As especiarias naturais estão regulamentadas como aditivos naturais ou aromatizantes e possuem status GRAS (Geralmente seguro para uso), sendo autorizadas para utilização em alimentos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e pela autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos. Também, altos valores de CIM e CBM indicam a necessidade de maiores concentrações de OEs para o controle eficiente de microorganismos, o que pode alterar as características organolépticas do produto.

Já são comercializados aditivos para a alimentação animal a base de óleos essenciais e extratos de plantas como, como por exemplo o Excential Alliin Plus (Orffa®), formulação à base de alho e canela. Estes extratos vegetais são conhecidos por terem um

efeito positivo na saúde intestinal, melhorando a microbiota do intestino das aves de produção. O uso da canela nesse produto é devido aos cinamaldeídos que estimulam as secreções intestinais e melhoram a capacidade de absorção. Ressaltamos que esta pode ser uma estratégia alternativa, a fim de reduzir o uso de antibióticos na produção animal.

Os resultados encontrados para ambos os OEs (orégano e canela) foram usados para os ensaios subsequentes com controle de SH em alimentos. Para o teste em matriz cárnea selecionamos o isolado SH 212 que apresenta MIC de $0,24 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ no óleo essencial de orégano.

Os resultados deste estudo confirmam que a canela e o orégano são agentes antimicrobianos eficientes em baixas concentrações contra SH. Destaca-se que todos isolados testados apresentaram formação de biofilme e padrões de multirresistência com altos valores de IRMA, e ainda assim foram sensíveis aos OEs de orégano e canela, o que pode indicar aplicação em estudos futuros com alimentos.

5.5.2.2 Avaliação do efeito do óleo essencial de orégano em matriz cárnea com *Salmonella* Heidelberg

Os ensaios realizados com a carne de frango avaliaram a eficiência do óleo essencial de orégano na redução de SH 212, em temperaturas $4\pm 1^\circ\text{C}$ e $12\pm 1^\circ\text{C}$, afim de mimetizar respectivamente a temperatura da sala de cortes dos matadouros frigoríficos avícolas e a temperatura da gondola de distribuição no varejo, a fim de assumir o cenário da saída do frigorífico até o armazenamento nos supermercados, por um período de 0, 24, 72 e 120 h, correspondendo à 0, 1, 3 e 5 dias de incubação com o tratamento.

Ao avaliarmos o controle, a matriz cárnea contaminada sem tratamento, ou seja, sem aplicação do óleo essencial de orégano, é possível observar que na temperatura de $12\pm 1^\circ\text{C}$ houve multiplicação bacteriana, tendo uma multiplicação exponencial da SH, com diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre o tempo 0 e o 5º dia de experimento (Tabela 19), como era o esperado.

Na temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$, este comportamento se repete, mas com carga microbiana menor que na temperatura de $12\pm 1^\circ\text{C}$ e não diferem estatisticamente em relação aos dias ($p > 0,05$). Dados estes esperados, quando avaliamos o tempo de exposição, ou seja, o número de dias de contato do sorovar com a carne de frango nas temperaturas de $4\pm 1^\circ\text{C}$ e $12\pm 1^\circ\text{C}$, os valores são crescentes, expressando que, quanto maior tempo de contato com a matriz cárnea, maior poder de multiplicação bacteriana,

pelo binômio tempo e temperatura. Vale ressaltar que a temperatura de refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) não permitiu a multiplicação microbiana com o passar do tempo, sendo uma ferramenta de controle já comprovada.

Tabela 19 - Ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à *Salmonella* Heidelberg em diferentes temperaturas na carne de frango.

Carne – Controle x Óleo de orégano						
	Temperatura	Tempo (dias)				p-valor
		0	1	3	5	
Controle	4°C	6,70* aA	6,31* aA	7,21* aA	7,58* aA	0,1770
	12°C	6,64* aA	8,86* bB	9,37* bB	10,70* bC	0,0001
Óleo de orégano	4°C	3,91* bA	5,10* aA	4,76* cA	4,88* cA	0,2430
	12°C	3,77* bA	5,70* aB	6,51* aB	10,77* bC	0,0001
	p-valor	0,0040	0,0001	0,0001	0,0001	-----

Legenda:* = $\log_{10}\text{UFC/g}$. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

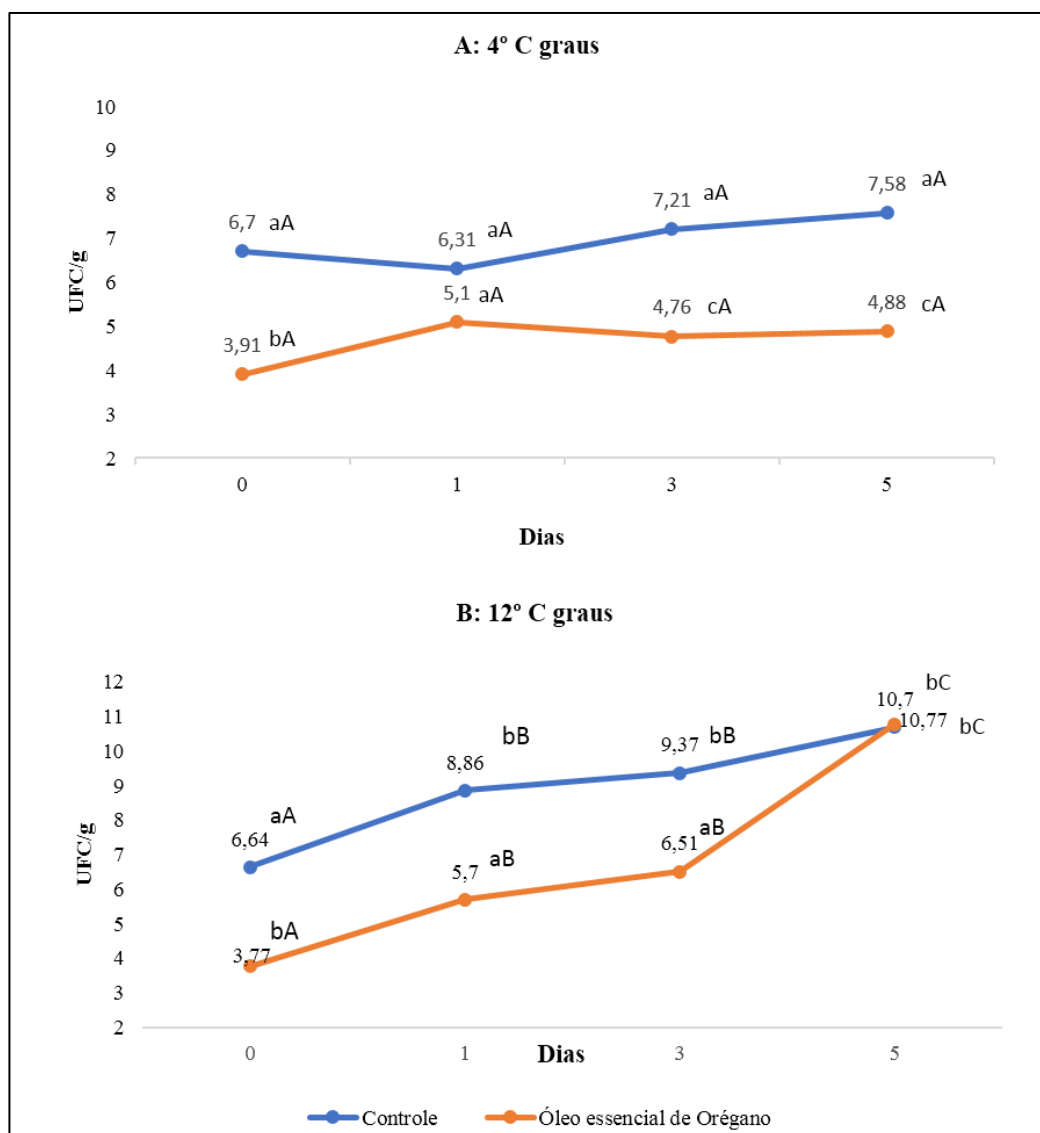
A contaminação de frango refrigerado e congelado é alta em comparação a outros alimentos (UYTTENDALE *et al.*, 1997). As salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais e estes sorovares possuem facilidade em adaptar-se em diferentes situações e condições, comprovado por sua habilidade de se multiplicar em valores de pH entre 3.8 e 9.5, temperatura ótima de 35°C a 43°C e uma atividade de água $> 0,94$, ocorrendo variações entre sorovares e/ou cepas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em alimentos como a carne de frango, onde diversas intervenções tentam reduzir o agente patogênico, mais investigações são necessárias para proporcionar uma temperatura ótima de refrigeração que realmente iniba a multiplicação *Salmonella*. É essencial estudar os padrões de multiplicação de *Salmonella* Heidelberg em temperaturas de refrigeração, já que são escassos os dados sobre multiplicação em baixas temperaturas (MOREY; SINGH, 2012).

Diante dos resultados houve redução no número de $\log_{10}\text{UFC/g}$ com a ação do óleo essencial de orégano em todos os tempos de contato e ambas temperaturas (Figura 10 e Tabela 19), somente na temperatura de $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ obtivemos aumento das contagens de SH no 5° dia do experimento, porém sem diferença estatística significativa ($p>0,05$), ou seja, o óleo nessa temperatura não conseguiu conter a multiplicação bacteriana a partir

de 120 h, provavelmente se mais tempos fossem avaliados, haveria um crescimento exponencial a partir do 5º dia de experimento.

Figura 10 - Ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à *Salmonella* Heidelberg na carne de frango sob diferentes temperaturas.



Fonte: elaborado pelo Autor (2019).

Legenda: (A) Ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à SH à temperatura de 4°C na carne de frango; (B) Ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente à SE à temperatura de 12°C na carne de frango. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas de tendência do controle e do *pool* de fagos não diferente entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Ao avaliarmos temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, entre os valores do controle e o tratamento, no período de 0 dias (tempo zero) houve redução de 2,79 log ($6,70 \log_{10}\text{UFC/g}$ para $3,91 \log_{10}\text{UFC/g}$), devido à ação rápida do óleo de orégano. O mesmo é observado na

temperatura para $12\pm 1^\circ\text{C}$, no contato inicial com o óleo de orégano (0 d) se observa reduções significativas de 2,87 UFC/g (6,64 para 3,77 $\log_{10}\text{UFC/g}$).

O óleo essencial foi capaz de atuar instantaneamente nas SH presentes na matriz cárnea. Pesavento *et al.*, (2015) estudaram a atividade antibacteriana e sensorial do óleo essencial do tomilho e orégano em almôndegas cozidas, relatando efeito benéfico na redução da carga bacteriana e a aceitabilidade do produto com o período de 4 dias em temperatura de conservação de 4°C .

Com 1 dia de exposição (24 h) ao OE de orégano na temperatura de $12\pm 1^\circ\text{C}$, a redução microbiana da SH 212 foi ainda maior, de 3,16 log (8,86 para 5,7 $\log_{10}\text{UFC/g}$) com diferença estatística significativa ($p<0,05$). Porém como já discutido anteriormente, com o passar dos dias do experimento, o óleo essencial de orégano diminui sua capacidade antimicrobiana, até porque essa temperatura permitiu a multiplicação das SH remanescentes.

Deste modo, é possível afirmar que a temperatura de melhor ação do OE de orégano é a de $4\pm 1^\circ\text{C}$, pois para o controle bacteriano eficiente devemos considerar a temperatura de refrigeração, que influencia diretamente no controle da multiplicação de SH. Bem como, sabe-se que condições físicas, como o baixo pH, baixa temperatura e baixos níveis de oxigênio melhoram a ação antimicrobiana de óleos essenciais (BURT, 2004). Menezes *et al.* (2018) adicionaram OE de orégano em presunto fatiado, e houve diminuição das taxas de crescimento e aumento do prazo de validade do produto, principalmente em baixas temperaturas (6°C), onde se estendeu por pelo menos 30 dias quando comparado ao controle.

Os OEs têm grande importância para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (BASER & BUCHBAUER, 2015). A composição do óleo essencial de orégano foi extensivamente estudada, são misturas complexas de compostos, em que os principais constituintes são terpenos, geralmente mono e sesquiterpenos. Os principais terpenos identificados nas diferentes espécies são carvacrol, timol, γ -terpineno e p-cimeno; enquanto o terpinen-4-ol, o linalol, o β -mirceno, o hidrato trans-sabineno e o β -cariofileno também estão presentes. A proporção desses e de outros componentes no óleo essencial dentro do mesma espécie é o que define o seu quimiotipo (LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2017).

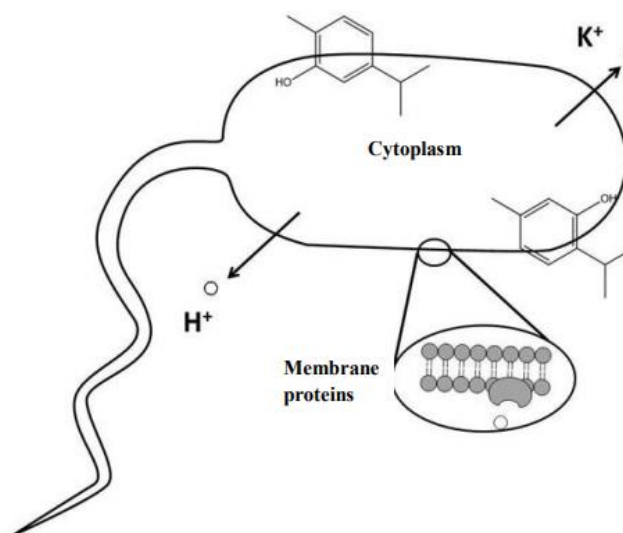
Esses compostos antibacterianos presentes no OE de orégano (principais o carvacrol e timol) tornam a membrana celular permeável devido à sua impregnação nos domínios hidrofóbicos. Vale ressaltar que este efeito é maior contra bactérias gram-positivas, mas também tem ação nas bactérias gram-negativas. Além disso, o OE de

orégano possui propriedades antioxidantes eficazes no retardamento do processo de peroxidação lipídica em alimentos gordurosos e sequestro de radicais livres (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2015; AL-HIJAZEEN *et al.*, 2017). Al-Hijazeen *et al.* (2017) verificaram o efeito do óleo de orégano nas características sensoriais e na qualidade da carne de frango cozida, concluindo ser um bom substituto para os antioxidantes sintéticos.

A atividade antimicrobiana destes compostos é atribuída ao seu caráter lipofílico que os atrai mais para as estruturas da membrana celular. Conseqüentemente, sua presença causa expansão na membrana, aumentando a fluidez e a permeabilidade, ocorrendo alteração das proteínas, inibição da respiração e altera os processos de transporte de íons (CRISTANI *et al.*, 2007). Além da ação antimicrobiana e propriedades antioxidantes o carvacrol e timol são responsáveis por fornecer o sabor e odor característicos.

O timol e o carvacrol são capazes de desintegrar a membrana externa das bactérias gram-negativas (Figura 11), liberando os componentes lipopolissacarídicos, aumentando assim a permeabilidade da adenosina trifosfato na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, alterando a permeabilidade da célula (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2015).

Figura 11 - Mecanismo antibacteriano do timol e carvacrol desintegrando a membrana externa de uma bactéria gram-negativa



Fonte: RODRIGUEZ-GARCIA *et al.* (2015).

É importante mencionar que os constituintes e concentração dos compostos do óleo de orégano variam devido a diversidade de fatores como espécies, pragas, condições do solo, época de colheita, localização geográfica, condições climáticas e de crescimento (ARSLAN *et al.*, 2012; MORCHEDLOO *et al.*, 2017).

Inúmeras pesquisas *in vitro* e *in vivo* são conduzidas para avaliar as potenciais atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica de OEs (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2015; ADAME-GALLEGOS *et al.*, 2016; MENEZES *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019; SOUTAR *et al.*, 2019). Esses estudos são de grande importância devido ao surgimento de cepas resistentes a antibióticos e diferentes espécies de orégano estão entre as ervas mais estudadas, suas diferentes composições têm sido usadas para este propósito (JAYASENA & JO, 2013).

Em consonância com nossa pesquisa, há muitos estudos com o uso do OE de orégano aplicado em produtos cárneos, frutas e legumes pós-colheita. Porém precauções devem ser tomadas na possível modificação das propriedades organolépticas de tais produtos quando adicionado o óleo essencial. Por outro lado, em alguns casos, a capacidade antioxidante do produto final é aumentada, o que é visto como um lado positivo do uso destes compostos (ARANA-SANCHEZ *et al.*, 2010; HERNANDEZ *et al.*, 2017; AL-HIJAZEEN *et al.*, 2017).

Várias técnicas estão sendo exploradas para facilitar a adição de OE de orégano como antimicrobiano aditivo alimentar, como efeitos antimicrobianos de filmes de

quitosana contendo orégano contra bactérias patogênicas (ZIVANOVIC *et al.*, 2005). Atividade antimicrobiana do OE de orégano, cinamaldeído, timol e carvacrol incorporados ao polipropileno foram considerados eficazes contra várias bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas, leveduras e bolores (GUTIERREZ *et al.*, 2009).

O OE de orégano e seus principais compostos têm sido aplicados como antimicrobianos na produção de frutas e legumes, foram usados como aditivos em sucos de maçã, manga, laranja e tomate, inibindo o crescimento de *E. coli* O157: H7 (FRIEDMAN *et al.*, 2004). Seus componentes principais também foram usados em conjunto com outras tecnologias, como em embalagem a vácuo com EDTA, em soluções de lisozima em revestido de carne de frango semi-cozida, responsável por produzir uma vida útil de 7 a 8 dias em comparação com o produto controle (NTZIMANI *et al.*, 2010). Em outra investigação, o carvacrol (0,3% a 0,5%) foi aplicado em produtos de frango empanados mostrando redução significativa nas populações de *Salmonella* spp. (MOSCHONAS *et al.*, 2012).

Carvalho *et al.* (2019) avaliaram a influência do OE de orégano na inibição de patógenos em embutidos durante armazenamento, e os resultados demonstraram atividade antimicrobiana contra todos os patógenos testados, incluindo a *Salmonella*. Estudos também foram feitos com o OE orégano em outras carnes, como filés de carpa mergulhados em carvacrol (0,5%) e timol (0,5%), e retardaram o crescimento bacteriano e estenderam seu tempo de prateleira (MAHMOUD *et al.*, 2004). O uso do OE de orégano em salsicha fresca mostrou que sua adição exerceu efeito bacteriostático (BUSATTA *et al.*, 2008).

Hac-Szymanczuk *et al.* (2018) relatam que o OE de orégano foi eficaz em retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento de bactérias patogênicas durante o armazenamento de carne de frango mecanicamente separada. Em outro estudo, quatro bactérias patogênicas foram inoculadas a uma massa feita com farinha de milho com carvacrol (0,5%, 2% e 5%) e todas as cepas foram completamente inativadas dentro de 24 h (ORTEGA-MORENTE *et al.*, 2010). Esta informação revela a potencial ação antimicrobiana do OE de orégano para ser utilizado como aditivo alimentar.

Gunduz *et al.* (2012) investigaram a atividade antimicrobiana do OE de orégano sob diferentes condições de adesão de *Salmonella* spp. em alface americana, e concluíram que lavar a alface com 500 ppm de óleo de orégano por 10 min reduziu significativamente a população bacteriana.

O efeito antimicrobiano desse óleo também foi testado contra *Salmonella* Enteritidis em experimento realizado por Oliveira *et al.* (2013), durante 6 dias foi avaliado *in vitro* e inoculado em carne bovina moída e refrigerada ($4\pm 1^\circ\text{C}$). O OE de orégano mostrou efeitos antimicrobianos, com populações microbianas reduzidas ao longo do tempo de armazenamento, corroborando com os nossos achados. Com isso vale ressaltar que a aplicação de OE em carnes processadas pode ser usada para controlar patógenos durante a vida de prateleira refrigerada.

Para conseguir uma ação antimicrobiana mais eficaz e aplicabilidade em produtos alimentícios usando o OE de orégano, várias tecnologias devem ser contempladas, como as nanoemulsões, nanocápsulas, vapores, filmes comestíveis com diferentes polímeros; associação com outras tecnologias de preservação como baixas temperaturas, embalagem de atmosfera modificada e irradiação. Esses estudos irão gerar informações e aprofundarão o conhecimento sobre o efeito antimicrobiano e o uso efetivo do OE de orégano em matrizes alimentícias.

Concluimos que é possível atingir um controle significativo em matriz cárnea contaminada com SH com o uso do óleo essencial de orégano associado com controle de temperatura. Destaca-se, ainda, a importância deste trabalho para estudos futuros, os quais poderão ter embasamento para determinar em qual temperatura é exercido a melhor ação e como ter medidas para controlar as características organolépticas do alimento.

Desta forma, indica-se que o uso do OE de orégano associado a baixas temperaturas, é uma alternativa que pode oferecer melhorias significativas no controle de microrganismos patogênicos e na saúde pública, sendo uma promissora ferramenta adicional em programas de garantia da qualidade dos alimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo buscou avaliar o sorovar Heidelberg a fim de obter maiores informações e coletar dados para seu melhor entendimento e controle na avicultura, devido à sua alta frequência de isolamento em frigoríficos avícolas nos últimos anos.

Observou-se que os isolados de *Salmonella* Heidelberg possuem a habilidade de produzir biofilme, com diferentes graus de adesão, em superfície de poliestireno. Essa variabilidade na produção indica que cada isolado possui características intrínsecas distintas que influenciam diretamente na capacidade de adesão as superfícies. Esses dados dão continuidade aos estudos com biofilmes já desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa desde o ano de 2009.

Os testes de suscetibilidade permitem monitorar a resistência antimicrobiana em *Salmonella* Heidelberg. Contribui para a discussão sobre o uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal bem como na medicina humana, e seus impactos na saúde pública, devido à seleção de cepas resistentes. Nossos resultados, com altas taxas de multirresistência, reforçam a necessidade de programas de controle de uso destes fármacos e impulsionam as pesquisas para alternativas como os óleos essenciais e o biocontrole com bacteriófagos.

Na caracterização genética dos isolados, através da pesquisa de genes associados à virulência, observou-se 56 perfis genotípicos diferentes. Vale ressaltar que essa diferença no perfil genotípico e nas características variadas de resistência aos antimicrobianos, sugere uma diversidade de isolados de *S. Heidelberg* em produtos avícolas, que podem indicar a existência de fontes de contaminação variáveis da SH nessa indústria de alimentos.

Na constante procura pelo aperfeiçoamento nos procedimentos que garantam a segurança dos alimentos, buscamos estudar alternativas ao uso de antimicrobianos, com o intuito de eliminar ou reduzir cargas bacterianas, principalmente a bactéria *Salmonella*, que gera impacto econômico ao setor avícola. Nossas pesquisas com o uso de bacteriófagos são realizadas desde o ano de 2015 e nos impulsionaram devido aos resultados no biocontrole de diferentes sorovares de *Salmonella*. No nosso estudo a maioria dos isolados sofreram ação lítica frente aos três bacteriófagos testados, demonstrando a eficácia da infecção fágica no biocontrole de SH. Esse resultado em bactérias no estado de vida planctônico levou ao uso desses fagos no controle de biofilme de SH.

Os resultados em biofilme nos confirmaram a eficácia do biocontrole com bacteriófagos, e a combinação sinérgica através do *pool* de fagos demonstrou reduções de formação de até 83,4% e remoção do biofilme pré-formado de até 64,0%, e confirmou que a ação do fago na prevenção da formação do biofilme é mais eficiente.

O uso de fagos deve ser mais estudado a fim de garantir sua eficácia na indústria de alimentos. O grande desafio hoje é sanar algumas dúvidas referentes à sua aplicabilidade e autorização de uso no Brasil. É necessário unir informações para garantir que esta seja uma ferramenta adicional em programas de controle de qualidade dos alimentos. Para isso, nosso grupo de pesquisa estuda formas de uso na indústria, através de formulações de *pool* de fagos incorporados, a fim de desenvolver um comprimido bioadesivo de liberação prolongada, que permitirá a liberação contínua na etapa de refrigeração de carcaças em *chiller*.

Uma alternativa natural aos antimicrobianos é o uso dos óleos essenciais. Os OEs de orégano e canela obtiveram ação antimicrobiana, mesmo em baixas concentrações, sobre os isolados de *Salmonella* Heidelberg. Além disso, o óleo essencial de orégano foi eficiente para redução da carga microbiana em diferentes temperaturas e tempo de contato com a matriz cárnea confrontada, enfatizando a importância do OE associado à baixas temperaturas. Assim, temos um método natural como medida alternativa para controle desse patógeno. Destaca-se a importância destes achados para estudos futuros, os quais poderão dar embasamento para determinar em qual temperatura é exercida a melhor ação do OE, e como ter medidas para controlar as características organolépticas do alimento, através do uso de tecnologias, como microencapsulação.

7 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Salmonella* Heidelberg possuem capacidade de produzir biofilmes em placas de poliestireno a 37°C, com diferentes graus de formação, sendo a maioria classificados como grau moderado (71/126);
- Obteve-se altas taxas de multirresistência (125/126 - 99,2%), e nenhum princípio ativo testado apresentou sensibilidade a todos os isolados de SH.
- Detectou-se 56 perfis genotípicos dentre os 126 isolados de SH. Nenhuma SH apresentou todos os genes testados, mas em todas foi detectado genes envolvidos na adesão, invasão e sobrevivência no hospedeiro (*invA*, *agfA*, *sivH*, *msgA* e *tolC*).
- Sugere-se que ocorram variadas fontes de contaminação de SH na indústria de alimentos de origem avícola, com base na diversidade de perfis genotípicos e de resistência aos antimicrobianos dos isolados;
- Os bacteriófagos testados (UPF_BP1, UPF_BP2, UPF_BP3) apresentaram ação lítica frente às SH, demonstrando a eficácia da infecção fágica para biocontrole. O fago com melhor potencial de lise foi o UPF_BP2, seguido do bacteriófago UPF_BP3;
- O *pool* de fagos foi o tratamento com melhor ação nos biofilmes de SH, com maior eficácia na prevenção da formação do biofilme;
- Os óleos essenciais de orégano e canela apresentaram melhores resultados na ação antimicrobiana sobre SH, seguidos da ação dos OE de cravo e tomilho;
- O óleo essencial de orégano foi eficaz na redução da carga microbiana em matriz cárnea, com melhor resultado a 4±1°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDON, S.T.; KUHL, S.J.; BLASDEL, B.G.; KUTTER, E.M. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**. vol. 1, no. 2, pp. 66–85, 2011.
- ABEDON, S.T.; THOMAS-ABEDON, C. Phage therapy pharmacology. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. vol. 11, no. 1, pp. 28–47, 2010.
- ABPA, **Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2019**. Disponível em: <http://cleandrodias.com.br/wp-content/uploads/2019/05/RELATO%3%ACRIO-ANUAL-ABPA-2019.pdf>. Acesso em fevereiro de 2020.
- ACKERMANN, H.W. Bacteriophage Taxonomy. **Microbiology Australia**. pp. 90-94, 2011.
- ACKERMANN, H.W. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. **Advances in Virus Research**. pp. 135-201, 1998.
- ACKERMANN, H.W. The lambda - P22 problem. **Bacteriophage**, v.5, n.1, p.1017084, 2015. Doi: 10.1080/21597081.2015.1017084.
- ADAME-GALLEGOS, J. R.; ANDRADE-OCHOA, S.; NEVAREZ-MOORILLON, G. V. Potential Use of Mexican Oregano Essential Oil against Parasite, Fungal and Bacterial Pathogens. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.19, n.3, p.553–567. 2016. doi:10.1080/0972060x.2015.1116413
- AHMED, S.A; JABBAR, I.I.; ABDUL, H.E. Study the antibacterial activity of *Zingiber officinale* roots against some of pathogenic bacteria. **Al-Mustansiriya Journal Science**. v.23, n.3, p.63-70, 2012.
- AL-HIJAZEEN, M., MENDONCA, A., LEE, E. J., AHN, D. U. Effect of oregano oil and tannic acid combinations on the quality and sensory characteristics of cooked chicken meat. **Poultry Science**, 97(2), 676–683. 2017. doi:10.3382/ps/pex285
- ALAM, P. *et al.* Wound healing effects of nanoemulsion containing clove essential oil. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**. Doi: 10.3109/21691401.2016.1163716. 2016.
- ALBINO, L.A; ROSTAGNO, M.H.; HÚNGARO, H.M MENDONÇA, R.C. Isolation, characterization, and application of bacteriophages for *Salmonella* spp. biocontrol in pigs. **Foodborne Pathogene Disease**. v.11, n.8, p.602-9. 2014 doi: 10.1089/fpd.2013.1600.
- ALLIIN PLUS (Orffa®). Disponível em: <https://orffa.com/products/excential-alliin-plus/>. Acesso em 23 de julho de 2019.
- ALMALKI, E. *et al.* In vitro effectiveness of Curcuma longa and Zingiber officinale extracts on Echinococcus protoscoleces. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 24, n.1, p. 90-94, 2017.

ATTERBURY, R.J. *et al.* Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.14, p. 4543–4549. 2007. doi:10.1128/aem.00049-07

ÁLVAREZ, N.M. Virulência, resistência y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. **Tese de Doutorado**: Oviedo: Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional, 2007.

AMAND, J.A.S *et al.* Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolated from poultry in Alberta. **Avian Pathology**. 42(4):379-386. 2013.

ANDREATTI FILHO, R.L. *et al.* Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. **Poultry Science**. v.86, p.1904–1909. 2007.

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

ARANA-SÁNCHEZ, A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* h. B.K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters Applied Microbiology**. v.50, p.585–590. 2010.

ARSLAN, M.; UREMIS, I.; DEMIREL, N. Effects of sage leafhopper feeding on herbage colour, essential oil content and compositions of turkish and Greek oregano. **Experimental Agriculture**. v.48, p.428–437, 2012.

AYEBAH, B. *et al.* Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. **Journal of Food Protection**. v. 69, p. 2143–2150, 2006.

AZEREDO, J.; SUTHERLAND, I.W. The use of phages for the removal of infectious biofilms. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.9, p.261-266, 2008.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb to control food-borne pathogenic and spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.117-122, 2008.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food Chemistry and Toxicology**. v.46, p.446-475, 2008.

BALLESTER-COSTA, C. *et al.* Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Industrial Crops and Products**. v.50, p.304-311, 2013.

- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; KORAICHIIBNSOUDA, S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v.6, p.71–79, 2016.
- BAO, H. *et al.* Biocontrol of *Salmonella* Enteritidis in foods using bacteriophages. **Viruses**, v.7, n. 8, p. 4836–4853, 2015.
- BARMAN, G.; SAIKIA, G.K.; BHATTACHARYYA, D.K.; ROYCHOUDHURY, P. Detection of virulence genes of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Indian Journal of Animal Sciences**. v.83, n.5, p.477–480, 2013.
- BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; p. 975. ISBN 978-1-4200-6315-8.
- BAUMANN, A. R.; MARTIN, S. E.; FENG, H. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. **Journal of Food Protection**. v.72, p.1306–1309, 2009.
- BÄUMLER, A.J. *et al.* Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon during evolution of *Salmonella* serotypes. **Journal of Bacteriology**. v.179, n.2, p.317-322, 1997.
- BÄUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of lpfABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**. v.177, n.8, p.2087-2097, 1995.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiological Reviews**. v.26, n.2, p.185-230, 2013.
- BECERRIL, R.; NERÍN, C.; GÓMEZ-LUS, R. Evaluation of Bacterial Resistance to Essential Oils and Antibiotics after Exposure to Oregano and Cinnamon Essential Oils. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.8, p.699–705. 2012. doi:10.1089/fpd.2011.1097
- BENABID, A. Flore et écosystème du Maroc. **Evaluation et préservation de la biodiversité**. Paris: Ibiss Press. pp.154, 2000.
- BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**. v.110, p.232-239. 2012.
- BENSINK, J. *Salmonella* contamination of meat and bone meal. **Australian Veterinary Journal**, v.55, p. 13–15, 1979.
- BERGEY, D.H. *et al.* **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Online -Bergey's Manual Trust. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01166. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. 2015.

BIOCHIMPHARM. **Products and phage therapy**. Disponível em: <<http://biochimpharm.ge/en/applications/>>. Acesso em: dezembro de 2017.

BIOCHIMPHARM. **Products and phage therapy**. Disponível em: <<http://biochimpharm.ge/en/products/>>. Acesso em: dezembro de 2017.

BORGES, K.A. **Tese de Doutorado**: Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.12, p.1416-1422, 2013.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N.; MENEZES, R.; TONDO, E.C.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 38 (1):71-76. 2018.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; ALMEIDA, A.S.; SALLE, C.T.; MORAES, H.L.; NASCIMENTO, V.P. Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de fontes avícolas. In: **Anais do 5º Congresso e Feira Brasil Sul de Avicultura, Suinocultura e Laticínios**: Feira de Equipamentos. Serviços e Inovação; 2016. Nov 22; Porto Alegre, Brasil.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N.; SALLE, C.T.; MORAES, H.L.; NASCIMENTO, V.P. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry sources in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 2019; 21:eRBCA-2019-0827.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**. v.88. p.750-758, 2009.

BOTSTEIN, D.; HERSKOWITZ, I. Properties of hybrids between *Salmonella* phage P22 and coliphage λ . **Nature**. v.251, n.5476, p.584-589, 1974. doi:10.1038/251584a0

BOUCHRA, C.; ACHOURI, M.; IDRISSE-HASSANI, L.M.; HMAMOUCHE, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. **Journal of Ethnopharmacology** v.89, p.165-169, 2003.

BOUHDID, S.; S.N. SKALI.; M. IDAOMAR.; A. ZHIRI.; D. BAUDOUX; M. AMENSOUR. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. **African journal of biotechnology**. v.7, p.1563–1570, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA**. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Brasília, DF, 2008; 186p.

BRASIL. Ministério da agricultura pecuária e abastecimentos- **MAPA**. Instrução Normativa nº 30 de 9 de agosto de 2017. Estabelece procedimentos para submissão de propostas, avaliação, validação e implementações de inovações tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal em estabelecimentos registrados. Nº 156 de 15 de agosto de 2017. Brasília, DF, 2017. Seção 1; p11.

BRASIL. Ministério da agricultura pecuária e abastecimentos- **MAPA**. Instrução normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. D.O.U., 01/12/2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26. Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 09. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso de princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2019. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-fevereirode2019.pdf>> Acesso em: 09 mai. 2019.

BRAZ, F.; OLIVEIRA, M.; LIMA, L.M.; BATISTA, M.E.; BENEVINA, M.; NUNES, M.V.T.; OLIVEIRA, B.M. Indiscriminate use of antibiotics and antimicrobial resistance: a reflection on the treatment of hospital Infections. **Revista Interdisciplinar NOVAFAP**. Teresina. v.4, n.4, p.72-77, 2011.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Georgia, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

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

BURT, S.A. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.94, p.223-253, 2004.

BUSATTA, C. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**. v.25, p.207-211. 2008.

BYL, C. V.; KROPINSKI, A. M. Sequence of the Genome of *Salmonella* Bacteriophage P22. **Journal of Bacteriology**. v.182, p.6472-6481 Nov. 2000.

CAIXETA, D.S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado em Microbiologia Agrícola. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2008.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M; KANASHIRO, A.M.I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**. on-line v.67, n.1, 2000.

CARDOSO-TOSET, F. *et al.* Jaime Gómez-Laguna, Survival of selected foodborne pathogens on dry cured pork loins. **International Journal of Food Microbiology**, v.258, p.68–72, 2017.

CARDOSO-TOSET, F. *et al.* Survival of *Streptococcus suis* *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* in dry cured Iberian pork shoulders and loins. **Food Microbiology**. v.61, p.66 – 71, 2017.

CARVALHO, R.J. *et al.* Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**. v.52, n.59-65, 2015.

CARVALHO, C.; COSTA, A.R.; SILVA, F.; OLIVEIRA, A. Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections. **Critical Reviews in Microbiology**, 43(5), 583–601. 2017.
doi:10.1080/1040841x.2016.1271309

CARVALHO, HELENA C. P. ALBANO, PAULA C. M. TEIXEIRA. MARTA I. P. influence of oregano essential oil on the inhibition of selected pathogens in “alheira” during storage. **Acta Science Poultry Technology Aliment**, 18, n.1, p.13–23. 2019.
<http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0624>

CARROLL, L. M., GABALLA, A., GULDIMANN, C., SULLIVAN, G., HENDERSON, L. O., WIEDMANN, M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. **MBio**, 10(3). 2019. doi:10.1128/mbio.00853-19

CDC - Center for Disease Control. **Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table.** 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/>>. Acesso em 18 mar. 2016.

CDC - Center for Disease Control. **Salmonella.** 2014b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/>>. Access em 17 mar. 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella surveillance: annual summary, 2006.** U. S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA, 2008.

Centers for Disease Control and Prevention. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2013.** 2013. Available at: <www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonellaannual-report-2013-508c.pdf>, accessed: Nov 20, 2017.

Centers for Disease Control and Prevention. **National enteric disease surveillance: salmonella annual report. Centers for Disease Control and Prevention. 2016.** Atlanta, GA. Available at: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>.

CERCA, N. **Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria.** Porto: Publindústria, Edições Técnicas. 2012.

CHAN B.K.; ABEDON S.T; LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiology.** 8:769-783, 2013.

CHANG, S.T.; CHEN, P.F.; CHANG, S.C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology.** v.77, n.1, p.123–127, 2001.

CHARACKLIS, W.G. **Biofilm development: A process analysis.** In *Microbial Adhesion and Aggregation*. 1984. Ed. K. C. Marshall, Sprig Verlag, New York.

CHAUDHRY, N.M.A.; TARIQ, P. Anti-microbial activity of *Cinnamomum cassia* against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts. **Pakistan Journal of Botany.** n.38, v.1, p.169, 2006.

CHEN, Y. *et al.* Three *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteriophages from the Siphoviridae family are promising candidates for phage therapy. **Canadian Journal of Microbiology,** v.64, n.11, p.865-875. 2018. doi: 10.1139/cjm-2017-0740.

CHENG, A.C. *et al.* Control of Fluoroquinolone Resistance through Successful Regulation, Australia. **Emerging Infectious Diseases Journal,** v. 18, n. 9, p. 1453-1460, Sep. 2012.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection.** v.69, n.5, p.1150-1153, 2006.

CHORIANOPOULOS, N.G. *et al.* Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**. v.104, p.1586–1599, 2008.

CLAVIJO, V., BAQUERO, D., HERNANDEZ, S., FARFAN, J. C., ARIAS, J., ARÉVALO, A.; VIVES-FLORES, M. Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. **Poultry Science**. 2019.
doi:10.3382/ps/pez251

CLOKIE, M.R.; MILLARD, A.D.; LETAROV, A.V.; HEAPHY, S. Phages in nature. **Bacteriophage**. v.1, n.1, pp.31–45. 2011.

CLOUTHIER, S.C. *et al.* Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**. v.175, n.9, p.2523–2533, 1993.

CLSI. Clinical and Laboratorial Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests – Twenty-Third information suplemente. **M100-S23**, v. 33, n. 1, 2013, 205p.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 11th edition, 2014.

COLLINSON, S.K.; EMODY, L.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Thin aggregative fimbriae from Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v.174, n.13, p.4490–4495, 1992.

COOK, A. *et al.* Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canadá. **Journal of Food Protection**. v. 72, p. 473–481, 2009.

CORCORAN, M. *et al.* Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, Feb. 2014.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**. v.49. p.711-745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**. v.284, p.1318-1322, 1999.

CRACIUNAS, C. *et al.* DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hlyA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. 15-18, Mar. 2012.

CRISTANI, M. *et al.* Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, p.6300-6308. 2007.

CUI, H. *et al.* Sequential effect of phages and cold nitrogen plasma against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on different vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.268, p.1–9. 2018. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.004

D'AMANTO S. *et al.* *Thymus Vulgaris* (Tomilho Vermelho) e *Caryophyllus Aromaticus* (Cravo) Óleos Essenciais para Controle de Microrganismos de Carne Suína em Atmosfera Modificada. **Italian Journal of Food Safety**. v.3, n.5, Jun, 2016.

DARWIN, K. H.; V. L. MILLER. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**. 12:405–428. 1999.

DE BEER, D.; STOODLEY, P.; ROE, F.; LEWANDOWSKI, Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. **Biotechnology and Bioengineering**. v.43, p.1131-1138, 1994.

DE MARTINO, L.; DE FEO, V.; NAZZARO, F. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. **Molecules**. v.14, p.4213–4230, 2009.

DEMEZUK, W.; SOULE, G.; CLARK, C. Phage-based typing scheme for *Salmonella* enteric Serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.9, p.4279-4284, 2003.

D'HÉRELLE, F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. **Research in microbiology**. v.158, n.7, p.553, 2007.

DICKEL, E.L. **Tese de Doutorado:** Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DOIJAD, S.P. *et al.* Biofilm-Forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different Sources. **PLoS ONE**. 10(9): e0137046.doi:10.1371/journal.pone.0137046. 2015.

DONEGÁ, M. A. *et al.* Recipientes e substratos na produção de mudas e no cultivo hidropônico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, n.2, p.71–79, 2016.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DONOVAN, D.M.; LARDEO, M.; FOSTER-FREY, J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi 11 endolysin. **FEMS Microbiology Letters**. v.265, p.133–139, 2006.

DORAN, J.L. *et al.* Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella* Enteritidis and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 233-246, Aug. 1996.

DUCKWORTH, D.H. Who discovered bacteriophage? **Bacteriology Reviews**, vol.40, no.4, p.793–802, 1976.

DUSSAULT, D., VU, K.D.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**. v.96, n.1, p.514–520, 2013.

DUTIL, L; *et al.* Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases journal**.16(1): p.48–54. doi:10.3201/eid1601.090729. 2010.

EFSA, European Food Safety Authority. **Salmonella**. 2017. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>>. Acesso em: Maio de 2017.

EFSA, European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**. 2015.

ELIAVA - **Institute Eliava** © 2010, Eliava Institute, All rights Reserved. Disponível em: <<http://www.eliava-institute.org/>>. Acesso em 11 de janeiro de 2018.

ELVERS, K.E.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms and biofouling. **Encyclopedia of Microbiology**. v.1, p.478-485. 2000.

EMBL-EBI. *Salmonella* invasion protein InvJ (IPRO003060). **InterPro**. 2016. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPRO003060>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

ENNABILI, A.; GHARNIT, N.; HAMDOUNI, E.L. Inventory and social interest of medicinal, aromatic and Honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco). **Ediciones Universidad de Salamanca**. v.19, p.57-74. 2000.

ERUTEYA, O.; ODUNFA, S. Effects of Ethanol and Aqueous Extracts of Six Indigenous Spices on *Listeria monocytogenes* in Meat. **British Microbiology Research Journal**. v.16, n.1., p.1–11. 2016.

EUROPEAN COMMUNITIES. **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) - Annual Report 2016**. Disponível: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf>. Acesso em: 11 de janeiro de 2018.

EUROPEAN COMMUNITIES. **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) - Annual Report 2018**. Disponível: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf>. Acesso em: 07 de janeiro de 2020.

FAN, J. *et al.* Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. **Veterinary Microbiology** v.191, p.65–71. 2016

FDA - Food and Drug Administration. **Antimicrobial resistance: a growing threat, 2009**. Retrieved on 15 December 2014 from <<http://www.fda.gov>>.

FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.; LIMA, N. **Microbiologia**. Lisboa: Lidel, 2010.
 FIELDS, P. *Salmonella* serotyping. In: 10th Annual Pulsenet Update Meeting. **National Salmonella Reference Lab – CDC**. 2006.

FERRARI, R. G., ROSARIO, D. K. A., CUNHA-NETO, A., MANO, S. B., FIGUEIREDO, E. E. S., & CONTE-JUNIOR, C. A. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology** 2019. doi:10.1128/aem.00591-19

FISCHETTI, V.A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control gram-positive pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**. v.300, p.357–362, 2010.

FLEMMING, *et al.*, Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. v.14, p.563-575, 2016.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, p.623-633, 2010.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre, Brazil: Artmed, p.410; 2002.

FRATINI, F. *et al.* A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological Research**, v.195, p.11–17, 2017.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; LEVIN, C.E.; MANDRELL, R.E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.6042-6048. 2004.

FRUCIANO, D.E.; BOURNE, S. Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**. v.18, n.1, pp.19–26, 2007.

FUNG, D.Y.C.; TAYLOR, S.; KAHAN, J. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Safety**. v.1, p.39-51, 1977.

FUSTER-VALLS, N.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRIGUEZ-JEREZ, J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**. v.19, n.3, p.308-314, 2008.

GAL-MOR, O. *Salmonella enterica*. **The Infectious Disease Research Laboratory** – Sheba Medical Center, Israel. Disponível em: <http://eng.sheba.co.il>>. Acesso em 05 dez. 2017.

GARCIA, K.C.O.D. *et al.* Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces presente in chicken slaughterhouses. **Poultry Science**, v.96, n. 9, p. 3393-3398, 2017.

GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTE1, C.M.; KAY, W.W. *agfC* and *agfE* facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v.153, p.1131-1140, 2007.

GILBERT, P.; FOLEY, J. Biofilms susceptibility to antimicrobials. **Advances in Dental Research**. v.11, p.160-167, 1997.

GINOCCHIO, C. C.; J. E. GALAN. Functional conservation among members of the *Salmonella* Typhimurium InvA family of proteins. **Infection and Immunity**. 63:729–732. 1995.

GIURIATTI, J. *et al.* *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum β -lactamases (ESBLs). **Microbial Pathogenesis**. 109:196-199. 2017.

GODOY, P.; BARROS, E.; PAULA, G.; BORDIN, C.; COTRIN, G.; ESMI, C. **Produção de proteína animal e a segurança alimentar**. E-book no 4. Campinas, São Paulo: Mundo Agro Editora LTDA, 2016. Disponível em: <<http://avisite.com.br/Ebooks/Seguranca-Alimentar/ebook/#page/1>>. Acesso em 06 março 2018.

GOGARTEN, J.P., TOWNSEND, J.P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. **Nature Reviews Microbiology**. v.3, p.679–687. doi:10.1038/nrmicro1204. 2005.

GOLDING. “Decision making in living cells: lessons from a simple system.” **Annual Review of Biophysics**, v.40, pp.63–80, 2011.

GÓMEZ, N. C *et al.* A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. v.30, p.51–58, 2012.

GONÇALVES, G.A.M. *et al.* Análise de critérios para utilização na seleção de bacteriófagos líticos com potencial para utilização médica: Dados preliminares. **Revista Veterinária e Zootecnia**. v.22, n. 1, p.72-82, 2015.

- GONG, C.; JIANG, X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. **Poultry Science**. 0:1–11, 2017.
- GRATH, S.M.C.; VAN SINDEREN, D. **Bacteriophage, Genetics and Molecular Biology**. 2007.
- GRAY, J.A *et al.* Novel biocontrol methods for *Listeria monocytogenes* biofilms in food production facilities. **Frontiers in Microbiology**. 9:605. doi: 10.3389/fmicb.2018.00605. 2018.
- GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G; Modern Bacteriophages Biology and Biotechnology. Kerala: **Research Signpost** (in press), p.36, 2006.
- GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**. France: Institute Pasteur, 2007.
- GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. **Cell**, v.87, p.791–794, 1996.
- GRYGORCEWICZ, B. *et al.* Bacteriophage-mediated reduction of *Salmonella* Enteritidis in swine slurry. **Applied Soil Ecology**, v.119, p.179-182, 2017. Doi: 10.1016/j.apsoil.2017.06.020.
- GULTEN TIRYAKI, G. *et al.* Antimicrobial Activity of Oregano Oil on Iceberg Lettuce with Different Attachment Conditions. **Journal of Food Science**, v. 77, n.7, 2012. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02759.x
- GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from h1A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5248-5252. 2000.
- GUTIÉRREZ, D. *et al.* Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species Staphylococcal biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.81, p.3336-3348. 2015.
- GUTIÉRREZ, L.; ESCUDERO, A.; BATLLE, R.N.; NERÍN, C. Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p. 8564-8571. 2009.
- GYLES, C.; BOERLIN, P. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. **Veterinary Pathology**. v.51, n.2, p.328-40, 2014.
- GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.2, p.149-158, 2008.
- HAĆ-SZYMAŃCZUK, E.; CEGIELKA, A.; KARKOS M.; GNIEWOSZ M.; PIWOWAREK, K. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano

(*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens. **Food Science Biotechnology**. 2018. 16;28(2):449-457. doi: 10.1007/s10068-018-0491-1.

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

HAQ, U.; CHAUDHRY, W.N.; AKHTAR M.N.; ANDLEEB, S.; QADRI, I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. **Virology Journal**. vol.9, n.1, p. 9, 2012.

HAYWARD, M.R.; JANSEN, V.A.A.; WOODWARD, M.J. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. **BMC Genomics**. v.14, n.1, p.365, 2013.

HERINGA, S.D. *et al.* Use of a mixture of bacteriophages for biological control of *Salmonella enterica* strains in compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.5327–5332, 2010.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HOSSEINIDOUST, Z.; N. TUFENKJI.; T. G. VAN DE VEN. Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase. **Biofouling**, v.9, p.457–68. 2013.

HOOTON, S.P.T., ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 157-163. 2011. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015

HU, B.; MARGOLIN, W.; MOLINEUX, I. J.; LIU, J. The Bacteriophage T7 Virion Undergoes Extensive Structural Remodeling During Infection. **Science**, v.339, n.6119, p.576–579. 2013. doi:10.1126/science.1231887

HU, J.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. **Biotechnology Progress**. v.26, p.1213-1221. 2010.

HUNGARO, H.M. Utilização de Bacteriófagos na Redução de *Salmonella* Enterica em pelo de frango. **Dissertação de Mestrado**. 2010. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**. v.45, n.2, p.819-830. 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers Microbiology**. v.3, n.12. 2012.

IIBUCHI, R., Y. *et al.* Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. **Journal of Food Protection**, v.73, p.1506–1510, 2010.

JAYASENA, D.D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends Food Science Technology**. v.34, p.96–108. 2013.

JONES, T.F. *et al.* Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. **Journal of Infectious Diseases**. v.198, p.109–114. 2008.

JONG, H.K. *et al.* Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**, v.8, n.10, p.1-5, 2012.

KANG, B.H.; RACICOT, K.; PILKENTON, S.J.; APOSTOLIDIS, E. Evaluation of the in vitro anti-hyperglycemic effect of Cinnamomum cassia derived phenolic phytochemicals, via carbohydrate hydrolyzing enzyme inhibition. **Plant foods for human nutrition**. v.69, n.2, p.155-160. 2014.

KELLY, D. *et al.* Prevention of Staphylococcus aureus biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. **Letters in applied microbiology**, v.54, n.4, p.286-291. 2012.

KING, A.M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.; CARSTENS, E.B. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2012.

KINLEY, B. **Prevalence and biological control of *Salmonella* contamination in rendering plant environments and the finished rendered meals**. 2009. PhD. Diss., Clemson Univ., Clemson, SC.

KOHIYAMA, C.Y. *et al.* Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v.173, p.1006-1010, 2015.

KOLUMAN, A.; DIKICI, A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends. **Critical Reviews in Microbiology**, v.39, n.1, p.57-69. 2013.

KROPINSKI, A.M.; LAVIGNE, R.; SANTOS, S.B.; VILLEGAS, A. Genomic and Proteomic Characterization of the Broad-Host-Range *Salmonella* Phage PVP-SE1: Creation of a New Phage Genus. **Journal of virology**, p.11265–11273. 2011.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, p.165-170 v.46. 1983.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam. v.42, n.1/2, p.9-27. 1998.

LAGHMOUCHI, Y.; BELMEHDI, O.; SENHAJI, N.S.; ABRINI, J. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum compactum* Benth. Essential oils from different areas at northern Morocco. **South African Association of Botanists**, v.5, p. 115:120. 2018.

LEHMAN, S.M.; DONLAN, R.M. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. **Antimicrobials Agents Chemother**, v.59, n.3, p.1127-1137. 2015.

LEKUNBERRI, I. *et al.* Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. **Environmental Pollution**, v.220, p.981–984, 2017.
doi:10.1016/j.envpol.2016.11.059

LERTWORAPREECHA, M.; SUTTHIMUSIK, S.; TONTIKAPONG, K. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated from Chicken, and Vegetables in Southern Thailand. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.6, n.11, p.36-41. 2013.

LEYVA-LÓPEZ, N. *et al.* Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v.22, p.989, 2017.
doi:10.3390/molecules22060989

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–178, Nov. 2012.

LIBBY, S.J. *et al.* *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F. SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3.ed. Blackwell Publishing, p.143-167. 2008.

LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S.T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, vol.1, n.2, pp.111–114. 2011.

LOESSNER, M.J. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.480–487. 2005.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.11, p.4348–4356. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa SP: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

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

- MACIA, M.D; *et al.* Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**. v.20, p.981–990. 2014.
- MADIGAM, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK D.P. **Microbiologia de Brock**. 12ª ed. Porto Alegre: Artemed; 2010.
- MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**. v.9, p.34-39. 2001.
- MAHMOUD, B.S.M. *et al.* Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. **Food Microbiology**. v.21, p.657-666. 2004.
- MAJOLO, C. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* rhizomes against enteric *Salmonella* isolated from chicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.3, p.505-512, 2014.
- MAKA, L. *et al.* Resistance to Sulfonamides and Dissemination of sul Genes Among *Salmonella* spp. Isolated from Food in Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 5, p. 383-389, May 2015.
- MALIK, D. J., SOKOLOV, I. J., VINNER, G. K., MANCUSO, F., CINQUERRUI, S., VLADISAVLJEVIC, G. T., KIRPICHNIKOVA, A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. **Advances in Colloid and Interface Science**, 249, 100–133. 2017. doi:10.1016/j.cis.2017.05.014
- MANDILARA, G. *et al.* The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. **Environmetal Technology**, v.27, n.4, p.367-375, 2006.
- MANIJEH, M.; MOHAMMAD, J.; ROHA, K.K. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. **Journal of Biological Science**. v.8, n.2, p.502-505. 2008.
- MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes Infection**. V. 2. p. 145–156. 2000.
- MARQUES, C.S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. **Dissertação de mestrado**. Mestrado em Microbiologia Ciência e Tecnologia de Alimentos. Lavras: Universidade Federal de Lavras - UFLA; 2005.
- MATTIELO, S.P. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1227-1238, Nov. 2015.
- MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAUJO, A.V. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, p. 61-63, 2007.

- MAYAUD, L.; CARRICAJO, A.; ZHIRI, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, p.167–173. 2008.
- McLAUGHLIN, M.R.; KING, R.A. Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from swine lagoon effluent. **Current Opinion on Microbiology**, v.56, p. 208-213, 2008.
- MEDEIROS, M.A.N. *et al.* Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Chicken Carcasses at Retail in 15 Brazilian Cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**. 30(6):555-560. 2011.
- MENEZES, N.M.C., MARTINS, W.F., LONGHI, D.A., DE ARAGÃO, G.M.F. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, v.139, p.113–119. 2018. doi:10.1016/j.meatsci.2018.01.017
- MILETIC, S. *et al.* A Plant-Produced Bacteriophage Tailspike Protein for the Control of *Salmonella*. **Frontiers in Plant Science**, v.6. 2016. doi:10.3389/fpls.2015.01221
- MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; BABIC, T.; STOJANOVIC, P. *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis – actualities and importance. **Acta Medica Medianae**. v.49, n.3. 2010.
- MION, L. *et al.* Perfil de resistência aos antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 a 2009. **Acta Scientiae Veterinariae**. 42:1197. 2014.
- MIRMOMENI, M.H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.11, p.1497-1501. 2008
- MITH, H. *et al.* Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**. v.2, n.4, p.403–416. 2014.
- MOKEN, M.C.; MCMURRY, L.M.; LEVY, S.B. Selection of multipleantibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: Roles of the *mar* and *acrAB* loci. **Antimicrobials Agents Chemother**, v.41, p.2770–2772. 1997.
- MOREY, A.; SINGH, S. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.9, p.218-223. 2012.
- MORSHEDLOO, M.R. *et al.* Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.111, p.119–128. 2017.

MOSCHONAS, G. *et al.* Activity of caprylic acid, carvacrol, epsilon-polylysine and their combinations against salmonella in not-ready-to-eat surface-browned, frozen, breaded chicken products. **Journal of Food Science**. v.77, p. M405-M411. 2012.

MOYE, Z D; WOOLSTON, J; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. **Viruses**, v. 19, n. 4, 2018.

NARMS - (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria). **Human Isolates Final Report – 2013**. CDC. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2015. 81p.

NARMS - **Eucast - Integrated Report: 2014**. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria.

NARMS - **2016-2017: narms integrated summary**. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/2016-2017-narms-integrated-summary>>.

NASCIMENTO, V.P. *et al.* Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frango. In: **Congresso brasileiro de microbiologia**, 1997, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: 1997. p.287-287.

NAZZARO, F., F. FRATIANNI; L. DE MARTINO; R. COPPOLA; V. DE FEO. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. v.6, n.12, p.1451–1474. 2013.

NDAHETUYE, J. B *et al.* G. Role of lactic acid bacteria as a biosanitizer to prevent attachment of *Listeria monocytogenes* F6900 on deli slicer contact surfaces. **Journal of Food Protection**. v. 75, p. 1429–1436, 2012.

NESSE, L.T. *et al.* Molecular epidemiology of *Salmonella* spp. Isolates from gulls, fish-meal factories, feed factories, animals and humans in Norway based on pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 53–58, 2005.

NEZHADALI, A. *et al.* Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. Beni-Suef Univ. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v.3, p. 87-92. 2014.

NTZIMANI, A.G.; GIATRAKOU, V.I.; SAVVAIDIS, I.N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 degrees C: Microbiological and sensory evaluation. *Innov. Food Science and Emerging*. v.11, p.187-196. 2010.

OLIVEIRA, A.P.; WEBBER, B.; POTTKER, E.S.; DAROIT, L.; DOS SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. *Salmonella* Enteritidis adhesion involved in food outbreaks under different surfaces and environmental conditions. **Scientia Plena**, v. 15, n. 11, 2019. doi: 10.14808/sci.plena.2019.116101

OLIVEIRA, A.R.M.F.; JEZLER, C.N.; OLIVEIRA, R.A.; COSTA, L.C.B. Influência da idade da planta na produção de óleo essencial de alevante. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 241-245. 2012.

OLIVEIRA, F.A.; PASQUALOTTO, A.P.; SILVA, W.P.; TONDO, E.C. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**, v.45, n.2, p.1000-1003. 2012.

OLIVEIRA, M. *et al.* Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v.214,p. 4-11, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.015>

OLIVEIRA, T.L; SOARES, R.D.E.A; PICCOLI, R.H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**. v.93, n.3, p.645-51. 2013. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.11.004.

OOI, L.S.M. *et al.* Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **American Journal of Chinese Medicine**, v.34, n.3, p.511–522. 2006.

ORLOVA, E.V. Bacteriophage and Their Structural Organisation, in **Bacteriophages**, I. Kurtboke, Ed. 2012.

ORTEGA MORENTE, E. *et al.* Antibacterial activity of carvacrol and 2-nitro-1-propanol against single and mixed populations of foodborne pathogenic bacteria in corn flour dough. **Food Microbiology**. v.27, p.274-279. 2010.

OUSSALAH, M. *et al.* Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* a Canadian Irradiation Center (CIC). **Research Laboratory in Sciences Applied to Food**. 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v.18, n.5, p.414–20. 2007.

PAPADOPOULOS, C.J *et al.* Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and α -terpineol. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, p.1932–1935. 2008.

PEIXOTO, C.S. **Biocontrole de *Salmonella* Enteritidis por bacteriófagos**. 2019. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

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

PETERSON, G. *et al.* Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, p.559-569. 2010.

PIRAS *et al.* Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.78, n.10, p.1875-1878, Oct. 2015.

PIRES D.P. *et al.* Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm related infections. **Current Opinion in Microbiology**. v.39, p.48–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.004>. 2017.

POTTKER, E.S. Genômica e Caracterização Fenotípica De Bacteriófagos Líticos Para Biocontrole De *Salmonella Enterica*. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, 2016.

PRAGER, R. *et al.* Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 7, p. 605-17, Dec. 2000.

PROROGA, Y.T.R. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains from food of animal origin in southern Italy. **Folia Microbiologica**, *online*, June 2015.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA – PHACASPC- *Salmonella Heidelberg*. Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates. 2007. Disponível em: <http://www.phacaspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/pdf/heidelberg_e.pdf>. Acesso em 12 maio 2017.

RAO, S. **Antibiotic Susceptibility Testing**. Disponível em: <<http://www.microrao.com>>. Acesso em 03 de abril de 2013.

REARDON, S. Modified viruses deliver death to antibiotic resistant bacteria. **Nature**. doi:10.1038/nature.2017.22173, 2017b.

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

REUTER, M.; MALLETT, A.; PEARSON, B.M.; VAN VLIET, A.H. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76, p.2122-2128. 2010.

REYES-JURADO, F.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria. **Journal of Food Protection**, v.79, n.2, p.309–315. 2016. doi:10.4315/0362-028x.jfp-15-392

RIBEIRO, A.R. *et al.* Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.73, n.3, p.357-360, 2006.

RICHARD, H.A. *et al.* Bacterial Coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**. London. v.11, n.2. p.94-99, 2003.

RIZZO, N.N. **Influência dos fatores de virulência de *Salmonella Gallinarum* na remoção química e biológica de biofilmes em cascas de ovos**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

ROBINSOM, S. The Big Five: Most Common *Salmonella* Strains in Foodborne Illness Outbreaks. **Food Safety News**, 2013. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/#.UsbJ5dJDunI>>. Acesso em 03 jan. 2016.

RODRIGUES, D. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. *In: Anais “Seminário internacional sobre Salmonellosis aviarias”*. ALA-UBABEF. Rio de Janeiro: Jun 2011. p.28-30.

RODRIGUES, L.B. *et al.* Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. 2009, v. 37, p.225–230.

RODRIGUEZ-GARCIA, I. *et al.* Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.56, n.10, p.1717–1727. 2015. doi:10.1080/10408398.2013.800832

RODRÍGUEZ-RUBIO, L.*et al.* Hidrolases de peptidoglicano associadas ao virion bacteriófago: novos enzimas potenciais. **Critical Reviews in Microbiology**, v.39, p.427-434. 2013. doi:10.3109 / 1040841X.2012.723675

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

SACCO BRASIL[®]. 2017. Disponível em: <http://saccobrasil.com.br/bacteriofagos/>. Acesso em: janeiro de 2018.

SADEKUZZAMAN, M., MIZAN, M.F.R., YANG, S., KIM, H.S.; HA, S.D. Application of bacteriophages for the inactivation of *Salmonella* spp. in biofilms. **Food Science and Technology International**, v.24, n.5, p.424–433. 2018. doi:10.1177/1082013218763424

SANGUANPUAG, K. *et al.* Ginger (*Zingiber officinale*) oil as an antimicrobial agent for minimally processed produce: a case study in shredded green papaya. **International Journal of Agriculture & Biology**. v.13, n.6, 2011, p.895-901

SANSONETTI, P. Host Pathogenes Interaction: The Seduction Of Molecular Cross Talk. **Gut**. V.50, p.1112-8, 2002.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SAUER, K. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal Bacteriology**. v.184, p.1140-1154. 2002.

SCHWARZ, S. *et al.* Multi-resistance. **DTU Food, National Food Institute - Newsletter to the National Reference Laboratories for Antimicrobial Resistance**, n.4, p.1-4, 2010.

SENGUPTA, M.; AUSTIN, S. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. **Infection and Immunity**. v.79, p.2502–2509. 2011.

SHAH, D.H., PAUL, N.C.; SISCHO, W.C.; CRESPO, R.; GUARD, J. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Poultry Science**, 96:687–702. 2017.
<https://doi.org/10.3382/ps/pew342>

SHAHBAZI, Y. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. **Journal of Pathogens**. Article ID 916305, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/916305>. 2015.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; BROOKS, J.D.; CORKE, H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, n.14, p.5484–5490. 2007.

SHAO, S.; ZHOU, T. TSAO, R. Antimicrobials from plants – food preservation and shelf-life extension. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition), University of Waterloo, Canada, v.4, p.645–58. 2011.

SHARMA, C.S.; DHAKAL, J.; NANNAPANENI, R. Efficacy of Lytic Bacteriophage Preparation in Reducing Salmonella In Vitro, on Turkey Breast Cutlets, and on Ground Turkey. **Journal of Food Protection**, n.7, pp.1250-1419, pp.1357-1362. 2015.

SHI, Y.; LI, N.; YAN, Y.; WANG, H.; LI, Y.; LU, C.; SUN, J. Combined antibacterial activity of phage lytic proteins holin and lysin from *Streptococcus suis* bacteriophage SMP. **Current Microbiology**, v.65, p.28–34. 2012.

SHIMIDT; HANSEL. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. **Clinical Microbiology**. 2004.

SILLANKORVA S, AZEREDO J. The use of bacteriophages and bacteriophage-derived enzymes for clinically relevant biofilm control. In **Phage Therapy: Current Research and Applications**. 2014.

SILVA, F.A.S. **ASSISTAT: Versão 7.7 beta**. DEAG-CTRN-UFMG – Atualizado em 01 de abril de 2014. [Internet]. [cited 2015 fev 10]. Available from: <www.assistat.com>.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4ª ed. 2010.

SIMON J.L.; JULIE E.S.; SYLVAIN M. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, p.317–327, 2010.

SKURNIK, M. & STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and Fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 5-14, 2006.

SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. **Avian Diseases**, v.50, p.77–81. 2006.

SOLANO, C. *et al.* Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**. v.43, n.3, p.793-808. 2002.

SONI, K. A.; NANNAPANENI, R. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. **Journal of Food Protection**. v.73, p.1519–1524, 2010.

SOUTAR, O., COHEN, F., WALL, R. Essential oils as tick repellents on clothing. Experimental and Applied Acarology. **Experimental and Applied Acarology**. 2019. doi:10.1007/s10493-019-00422-z

SOUSA, J.P. *et al.* Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**. v.158, p.9-13. 2012.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**. v.31, p. 572-585, 2013.

STEENACKERS, H. *et al.* *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502–531, Mar. 2012.

STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, p.428–432. 2004.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiology Methods**, v. 40, p.175-179. 2000.

STORMS, Z.J. *et al.* Impact of the cell life-cycle on bacteriophage T4 infection. **FEMS Microbiology Letters**. v.353, p.63-68. 2014.

SUKUMARAN, A.T.; NANNAPANENI, R.; KIESS, A.; SHARMA, C.S. Reduction of *Salmonella* on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 8–15, 2015.

SULAKVELIDZE, A. Safety by Nature: Potential Bacteriophage Applications
Bacteriophages offer opportunities for safely managing bacterial infections. **Microbe**, v 6, n 3, p 122-126. 2011.

SULAKVELIDZE. The Challenges of bacteriophage therapy. **Microbe**. pp. p.20–24. 2006.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**. v.147, p.3-9. 2001.

SWAMY, S.C. BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater and human sources. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p.3768-3771. 1996.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TIWARI, B.K. *et al.* Application of natural antimicrobials for food preservation: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p.5987-6000. 2009.

TONDO, E.C. *et al.* Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1027-1037, 2010.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade. In: MONTES, A.S.; SANTOS, P.E. (Eds.). **Salmonella: classification, genetics and disease outbreaks**. 1.ed. Nova Science Publishers, 2012. p.175-191.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2000; p. 827.

UYTTENDALE, M. R. *et al.* Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abattoirs. **Food Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 339-345, 1997.

VAN DER VELDEN. A *et al.* Multiple fimbrial adhesions are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. **Infection and Immunity**. 66:2803–2808. 1998.

VAN, ASTEN.; A.J.A.M.; VAN, D.I.J.K.; J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259. 2005.

VANDAMME, E. **New phage therapy**. no. January, pp. 38–41, 2013.

VASILE, C. *et al.* Comparative Analysis of the Composition and Active Property Evaluation of Certain Essential Oils to Assess their Potential Applications in Active Food Packaging. **Materials (Basel)**. v.7, n.1, p 10. 2017.

VESTBY, L.K. *et al.* Biofilm forming abilities of Salmonella are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 20, p. 1-6, May 2009.

VIEIRA, A.R. *et al.* Resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. WHO **Global Foodborne Infections** Network Country Databank. In: ISVEE Conference. Durban, South Africa: 2009.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, 2009. p.406-414

VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 526-531, 2008.

WANG, H.H.; YE, K.P.; ZHANG, Q.Q.; DONG, Y.; XU, X.L; ZHOU, G.H. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Control**. 32:650-658. 2013.

WEBBER, B. *et al.* *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49, n.07, p.20181022. 2019.

WHO (World Health Organization). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. **WHO**. 2011a. 38p.

WHO (World Health Organization). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. **WHO**. 2011b. 88p.

WHO. World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. **Global Salm Surv**. 2016. Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms>. Acesso em: Maio de 2017.

WHO. World Health Organization. Health Topics: *Salmonella*. **2017a**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/>. Acesso em: novembro de 2017.

WHO. World Health Organization. *Salmonella (non-typhoidal)*. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en>> Acesso em: dez. 2017.

WHO-World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. **Global Salm Surv**. 2013 Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms>. Acesso em 05 abril de 2016.

- WILSMANN, D. E.; CARVALHO, D.; CHITOLINA, G. Z.; BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q., MARTINS, A. C., ... DO NASCIMENTO, V. P. Electrochemically-Activated Water Presents Bactericidal Effect Against *Salmonella* Heidelberg Isolated from Poultry Origin. **Foodborne Pathogens and Disease**. 2019. doi:10.1089/fpd.2019.2682
- WOOLSTON, J. *et al.* Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. **Bacteriophage**, v.3, n.3, p.25697, 2013.
- YADAV, S.; RAI, N.; VERMA, A.K.; SHARMA, R.K. Zingiber officinale Rosc. A Monographic Review Research & Reviews: **Journal of Botany**. v.1, n.1, p.45-50, 2012.
- YANG, C.H. *et al.* Antimicrobial activity of various parts of Cinnamomum Cassia extracted with different extraction methods. **Journal of Food Biochemistry**. v.36, n.6, p.690–698. 2012.
- YEH, Y. *et al.* Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. **Meat science**, v. 139, p. 44-48, 2018.
- ZÁRATE-BONILLA, L.J. *et al.* Computational modeling and preliminary *ironN*, *fepA*, and *cirA* gene expression in *Salmonella* Enteritidis under iron-deficiency-induced conditions. **Poultry Science**, v. 93, n. 1, p. 221-230, Jan. 2014.
- ZHANG, J. *et al.* Physiological and Molecular Characterization of *Salmonella* Bacteriophages Previously Used in Phage Therapy. **Journal of Food Protection**. v.78, n.12, p.2143-9. 2015. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-350.
- ZHAO, S. *et al.* Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, n.21, p. 6656-6662. 2008.
- ZHOU, F. *et al.* The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Safety**, v.27, p.124–133. 2007.
- ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**. v.70, p. M45-M51. 2005.
- ZOBELL, C.E. The effects of solids surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**. v.46, p.39-56. 1943.

APÊNDICE A – Porcentagens de redução no biofilme de *S. Heidelberg* pela ação dos bacteriófagos.

Tabela 13 - Percentual de prevenção na adesão do biofilme (formação) de *Salmonella Heidelberg* em superfície de poliestireno.

Tratamentos	Isolados <i>S. Heidelberg</i> (resultados expressos em %)									
	SH 109	SH 113	SH 120	SH 622	SH 506	SH 227	SH 311	SH 212	SH 217	SH 405
UPF_BP1	51,47±24,4a	19,38±12,7a	4,40±40,8a	34,93±35,5a	40,74±21,7a	14,88±10,9a	71,41±16,5a	72,23±13,8a	77,80±8,8a	74,14±4,8a
UPF_BP2	47,36±28,9a	-	-	31,72±47,6a	52,95±18,5a	0,17±40,6a	63,32±21,4a	59,01±12,7ab	43,68±8,6a	75,29±5,7a
UPF_BP3	35,96±30,3a	4,71±18,7a	11,77±15,0a	28,76±34,7a	42,15±21,4a	-	65,14±18,0a	25,10±11,8b	48,47±37,1a	24,9±13,4b
POOL	48,70±26,9a	12,22±8,9a	22,27±21,2a	40,92±30,6a	33,63±17,3a	-	83,36±9,3a	60,73±22,9ab	58,56±5,3a	54,79±14,7a
p-valor	0,8230	0,6990	0,5270	0,9610	0,4240	0,0880	0,3710	0,0330	0,2330	0,0010

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

-: não houve redução da formação do biofilme.

Tabela 14 - Percentual de redução do biofilme pré-formado de *Salmonella* Heidelberg em superfície de poliestireno com 9 horas de ação dos fagos.

Tratamentos	Isolados <i>S. Heidelberg</i> (resultados expressos em %)									
	SH 109	SH 113	SH 120	SH 622	SH 506	SH 227	SH 311	SH 212	SH 217	SH 405
UPF_BP1	-	31,77±6,3a	4,32±9,3a	-	0,66±16,4a	21,76±18,6a	18,04±48,9a	6,24±27,2a	15,76±19,3a	27,15±19,9a
UPF_BP2	-	44,54±14,1a	-	-	-	29,27±18,9a	47,19±9,2a	-	19,79±10,6a	16,46±32,1a
UPF_BP3	-	25,57±12,0a	7,95±11,6a	-	4,83±24,6a	15,70±24,7a	31,65±18,4a	-	32,65±14,6a	6,10±50,0a
POOL	2,70±9,3b	35,98±8,7a	10,66±16,2a	-	18,69±13,3a	36,02±22,0a	33,77±18,1a	14,95±14,8a	54,02±14,1a	60,04±10,3a
p-valor	0,0001	0,2550	0,1350	0,0620	0,1100	0,4780	0,6670	0,1420	0,0540	0,0800

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

-: não houve redução do biofilme pré-formado.

Tabela 15 - Percentual de redução do biofilme pré-formado de *Salmonella* Heidelberg em superfície de poliestireno com 6 horas de ação dos fagos.

Tratamentos	Isolados <i>S. Heidelberg</i> (resultados expressos em %)									
	SH 109	SH 113	SH 120	SH 622	SH 506	SH 227	SH 311	SH 212	SH 217	SH 405
UPF_BP1	-	19,51±7,2a	-	-	-	-	2,96±15,2a	47,02±19,0a	-	36,37±18,0a
UPF_BP2	-	28,95±2,8a	-	-	10,82±21,6a	-	-	43,01±21,7a	31,14±16,2b	34,69±18,4a
UPF_BP3	3,63±10,7a	16,79±4,6a	-	-	14,45±25,4a	-	0,48±13,0a	35,61±27,2a	6,02±24,2ab	41,86±33,0a
POOL	-	26,97±10,8a	-	16,14±13,1a	9,95±27,0a	-	-	64,08±4,7a	52,59±13,7b	63,33±25,2a
p-valor	0,0360	0,1810	0,6500	0,4430	0,8710	0,6940	0,9570	0,4080	0,0050	0,2660

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

-: não houve redução do biofilme pré-formado.

Tabela 16 - Percentual de redução do biofilme pré-formado de *Salmonella* Heidelberg em superfície de poliestireno com 3 horas de ação dos fagos.

Tratamentos	Isolados <i>S. Heidelberg</i> (resultados expressos em %)									
	SH 109	SH 113	SH 120	SH 622	SH 506	SH 227	SH 311	SH 212	SH 217	SH 405
UPF_BP1	-	43,25±46,0a	7,38±28,7a	-	22,05±18,6a	-	4,89±21,0a	-	54,46±12,8a	44,91±9,1a
UPF_BP2	-	34,46±17,3a	12,97±15,2a	-	15,22±20,5a	-	0,78±29,2a	-	13,24±46,1a	27,90±27,6ab
UPF_BP3	-	12,85±14,3a	14,32±15,4a	-	0,98±33,7a	-	10,83±13,5a	-	-	29,41±21,0ab
POOL	1,46±9,0a	43,10±1,89a	7,67±13,4a	-	-	1,30±6,05a	4,72±5,4a	-	49,51±20,2a	61,65±14,0a
p-valor	0,0750	0,4670	0,8900	0,7590	0,2740	0,4950	0,8760	0,8710	0,0690	0,0450

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
 -: não houve redução do biofilme pré-formado.

APÊNDICE B– Laudos de cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa (CG/MS) dos óleos essenciais utilizados no experimento 5.

Ayus GmbH

1 of 5

Oshadhi
Passion for Nature

Gas Chromatography Analysis

Dear Customer,

Attached you will find the results of gas chromatography analysis based on the information provided by our Producer/Laboratory for:

Sample Reference:

We testify that the Chromatographic Analysis (GC) for the mentioned sample is identical with:

Product-Nr.: 3140

Product Name: Cinnamon (Cassia), China

Botanical Name: Cinnamomum cassia

Batch-Nr.: 1013908

Bühl, 2016-08-04

Ayus GmbH
Am Dreischlopf 1 | D-77415 Moos
Tel.: +49 (0)7227 600 99-0 | Fax: +49 (0)7227 600 99-99
E-Mail: info@oshadhi.com | www.oshadhi.com

Dr. David Nayan

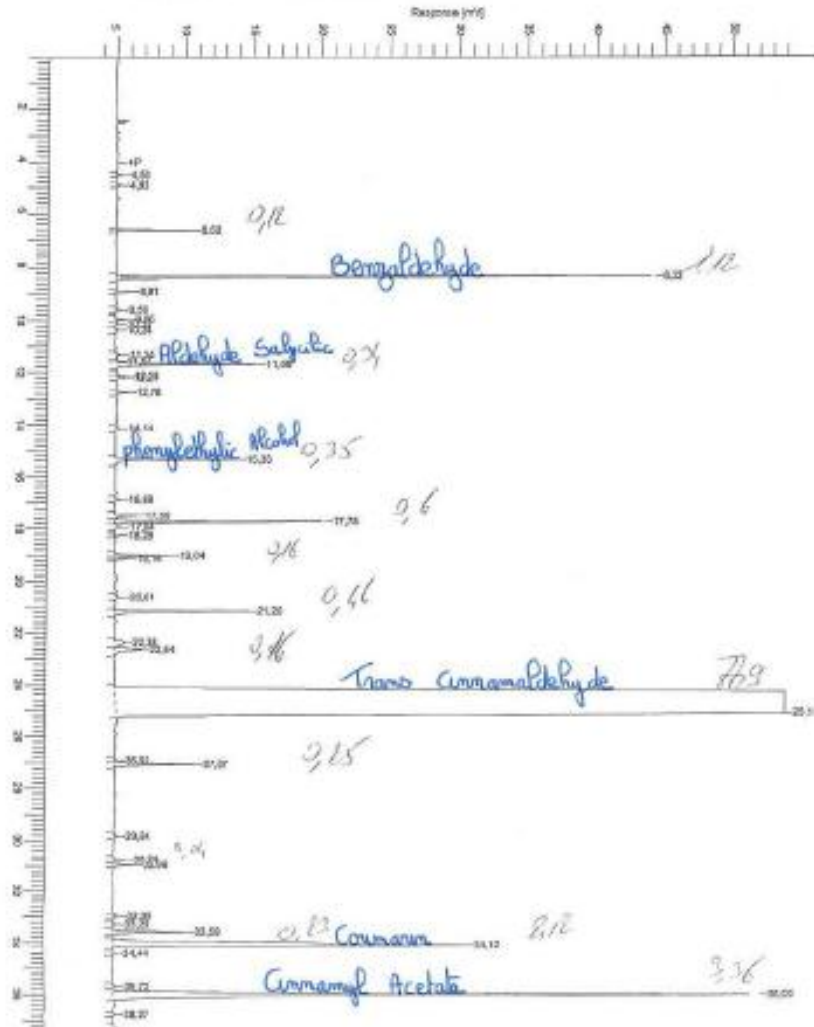
Ayus GmbH
Am Dreischlopf 1
77815 Bühl/Moos
USt-IdNr.: DE261342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadhi.com
www.oshadhi.com

Stz: Bühl
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

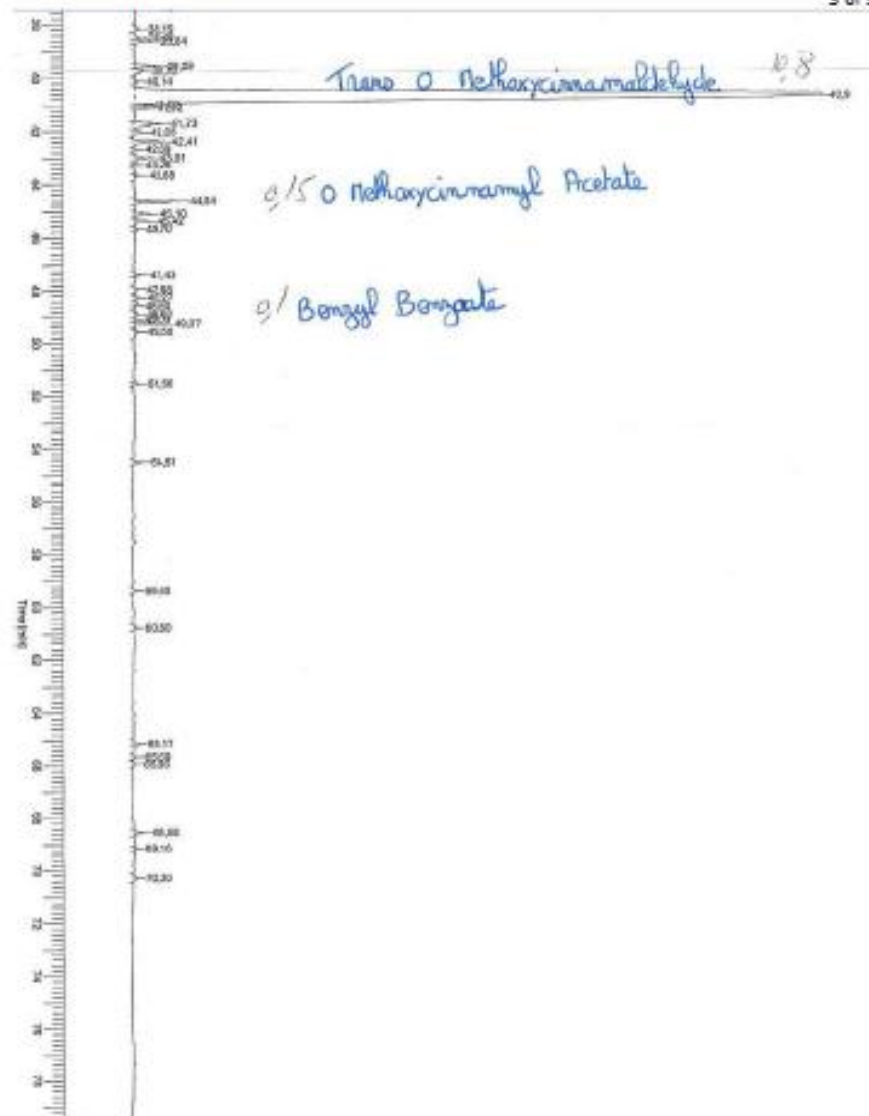
Chromatogram

Sample Name : GANESHI CHINE
 File Name : D:\GCMS\data\data1
 Date : 10/10/2015 02:01:31
 Method : MS-INT-SCAN
 Time of Injection : 10/10/2015 00:38:08
 Start Time : 0.00 min End Time : 32.00 min Low Point : 4.00 mV High Point : 54.00 mV
 Plot Offset : 4.00 mV Plot Scale : 50.0 mV



Ayus GmbH

3 of 5



Ayus GmbH
 Am Dreschschopf 1
 77015 Döhl/Moss
 USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
 Fax: 49 (0)7227 600 99-99
 info@ayushdl.com
 www.ayushdl.com

Sitz: Döhl
 Handelsregister Mannheim
 HRB Nummer 210825
 Geschäftsführer: Dr. David Nayan

Ayus GmbH

4 of 5

Reprocess Number : utilisat-5b628f; 37936
 Operator : Utilisateur
 Sample Number :
 AutoSampler : BUILT-IN
 Instrument Name : AUTOSYSTEM XL
 Instrument Serial # : None
 Delay Time : 0,00 min
 Sampling Rate : 1,5625 (pts/s)
 Sample Volume : 1,000000 ul
 Sample Amount : 1,0000
 Data Acquisition Time : 10/10/2015 00:39:05

Sample Name : CANNELLE CHINE
 Study :
 Rack/Vial :
 Channel : A
 A/D mV Range : 1000
 End Time : 02.51 min
 Area Reject : 0,000000
 Dilution Factor : 1,00
 Cycle : 7

Raw Data File : C:\TCWS\autos\data\CANNELLECHINE81015.raw
 Result File : C:\TCWS\autos\data\CANNELLECHINE81015.rst
 Inst Method : c:\tows\autos\methodes\lavpurn from C:\TCWS\autos\data\CANNELLECHINE81015.raw
 Proc Method : c:\tows\autos\methodes\lavpurn from C:\TCWS\autos\data\CANNELLECHINE81015.rst
 Calls Method : c:\tows\autos\methodes\lavpurn from C:\TCWS\autos\data\CANNELLECHINE81015.rst
 Report Format File : c:\tows\autos\methodes\lavpurn.rpt
 Sequence File : C:\TCWS\autos\sequences\LAVPURN.seq

DEFAULT REPORT

Peak #	Time [min]	Area [μ V-s]	Height [μ V]	Area [%]	Norm. Area [%]	BL	Area/Height [s]
1	4,527	706,39	358,59	0,01	0,01	BB	2,2153
2	4,927	768,22	316,88	0,01	0,01	BB	2,4180
3	6,824	12907,05	6379,48	0,12	0,12	BB	2,3417
4	8,331	113156,00	38693,84	1,12	1,12	BB	2,9274
5	8,808	3119,83	1121,88	0,03	0,03	BB	2,7810
6	9,589	1031,81	342,38	0,01	0,01	BB	3,0139
7	9,949	2391,93	616,32	0,02	0,02	BV	2,9301
8	10,118	680,89	224,24	0,01	0,01	VB	2,9478
9	10,345	1016,28	241,21	0,01	0,01	BB	4,2092
10	11,340	1312,89	401,27	0,01	0,01	BB	3,7698
11	11,566	819,12	169,93	0,01	0,01	BV	3,6433
12	11,893	34888,57	10145,01	0,34	0,34	VB	3,4388
13	12,129	2082,39	675,33	0,02	0,02	BV	3,0983
14	12,212	1963,16	611,21	0,02	0,02	VB	3,0483
15	12,760	2982,57	840,07	0,03	0,03	BB	3,6504
16	14,137	1258,50	314,75	0,01	0,01	BB	3,6984
17	15,383	35359,80	8908,42	0,35	0,35	BB	3,9701
18	16,875	1315,32	369,32	0,01	0,01	BB	3,5615
19	17,489	7387,03	1629,95	0,07	0,07	BV	4,5328
20	17,752	60617,86	16254,16	0,60	0,60	VV	3,9673
21	17,945	2166,73	499,07	0,02	0,02	VB	4,7106
22	18,277	1980,02	387,53	0,02	0,02	BB	4,0255
23	19,040	16893,78	4142,00	0,16	0,16	BV	4,0304
24	19,138	3414,06	1020,01	0,04	0,04	VB	3,5432
25	20,809	1852,35	427,90	0,02	0,02	BB	3,6919
26	21,197	46456,84	9754,94	0,46	0,46	BB	4,7824
27	22,377	7210,95	713,48	0,07	0,07	BV	10,1667
28	22,639	16322,42	2026,26	0,16	0,16	VB	8,1641
29	25,176	7886990,34	207231,20	77,80	77,80	BB	28,6137
30	26,907	971,67	189,41	0,01	0,01	BV	5,1310
31	27,071	25084,79	5905,44	0,25	0,25	VB	4,2444
32	29,842	1250,12	259,16	0,01	0,01	BB	4,8238
33	30,744	3821,10	953,23	0,04	0,04	BB	4,4265
34	30,961	6396,71	1530,69	0,06	0,06	BB	4,1790
35	32,864	1420,52	365,38	0,01	0,01	BB	3,6977
36	33,291	1290,62	291,49	0,01	0,01	BB	4,4276

Ayus GmbH
 Am Dreieckshof 1
 77615 B2H/Moos
 USt-IdNr.: DE163342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
 Fax: 49 (0)7227 600 99-99
 info@ostadhl.com
 www.ostadhl.com

Sitz: B2H
 Handelsregister Mannheim
 HRB Nummer 210835
 Geschäftsführer: Dr. David Nayan

Ayus GmbH

5 of 5

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]	Norm. Area [%]	BL	Area/Height [s]
37	33,093	23642,35	6365,53	0,23	0,23	BB	4,3706
38	34,118	214222,85	26367,84	2,12	2,12	BV	0,1244
39	34,442	1110,15	207,10	0,01	0,01	VB	5,3894
40	35,715	1337,45	230,45	0,01	0,01	BV	5,8036
41	36,089	340193,24	47985,70	3,36	3,36	VB	7,0895
42	36,796	829,38	190,99	0,01	0,01	BB	4,3426
43	37,370	6082,29	1051,26	0,06	0,06	BB	5,7857
44	38,108	2169,27	377,56	0,02	0,02	BB	5,7429
45	38,489	2023,86	436,63	0,02	0,02	BV	4,6035
46	38,638	8912,08	1311,04	0,07	0,07	VB	5,2722
47	38,695	7555,53	1730,11	0,08	0,08	BV	4,4251
48	38,750	3610,27	578,41	0,04	0,04	VB	6,2418
49	40,140	1799,44	275,21	0,02	0,02	BB	6,4052
50	40,808	1093215,87	99409,85	10,80	10,80	BV	16,9806
51	41,015	2904,06	737,62	0,03	0,03	VV	3,9376
52	41,110	4284,73	985,37	0,04	0,04	VB	4,3003
53	41,734	14333,32	2055,49	0,14	0,14	BV	6,9902
54	42,098	3220,64	585,95	0,03	0,03	VB	5,4041
55	42,414	10768,44	2149,44	0,11	0,11	BV	5,0099
56	42,693	1202,23	243,81	0,01	0,01	VB	4,9310
57	43,010	5593,32	1179,60	0,06	0,06	BB	4,7455
58	43,279	1086,04	241,23	0,01	0,01	BB	4,5436
59	43,683	2177,15	477,89	0,02	0,02	BB	4,5550
60	44,641	15288,16	3321,41	0,15	0,15	BB	4,8969
61	45,104	6397,29	1190,84	0,05	0,05	BB	4,5323
62	45,416	4987,06	1008,82	0,05	0,05	BB	4,9445
63	46,703	825,76	164,70	0,01	0,01	BB	3,7994
64	47,429	2443,84	532,84	0,02	0,02	BB	4,8958
65	47,878	1412,69	229,45	0,01	0,01	BB	6,1569
66	48,272	1294,76	270,89	0,01	0,01	BB	4,7796
67	48,690	501,14	129,47	0,00	0,00	BB	3,8708
68	48,816	2230,00	274,36	0,02	0,02	BV	8,1611
68	48,832	753,46	155,97	0,01	0,01	VV	4,8307
70	48,273	10145,14	2246,85	0,10	0,10	VB	4,5153
71	49,598	2321,58	322,28	0,02	0,02	BB	7,2035
72	51,992	1834,88	405,01	0,02	0,02	BB	4,4861
73	54,511	3317,98	638,75	0,03	0,03	BB	5,2100
74	58,404	1505,39	278,55	0,01	0,01	BB	5,4038
75	60,802	1030,05	219,16	0,01	0,01	BB	4,7001
76	65,172	2165,72	397,77	0,02	0,02	BB	5,4448
77	66,890	1116,04	220,23	0,01	0,01	BB	5,0676
78	66,958	799,69	158,24	0,01	0,01	BB	5,0472
79	68,562	4136,53	755,83	0,04	0,04	BB	5,4728
80	69,165	1037,45	214,75	0,01	0,01	BB	4,8309
81	70,297	1424,97	282,68	0,01	0,01	BB	5,6400
		10124453,75	658046,14	100,00	100,00		

Missing Component Report
Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Ayus GmbH
Am Dreischeckel 2
77815 Bülz/Moss
USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@ayushdl.com
www.ayushdl.com

Stz: Bülz
Handelsregister Mannheim
HRG Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

AYUS GmbH

Ätherische Öle und Naturrohstoffe
Essential Oils and Natural Products



Gas Chromatography Analysis

Dear Customer,

Attached you will find the results of gas chromatography analysis based on the information provided by our Producer/Laboratory for:

Sample Reference: Ginger Oil

We testify that the Chromatographic Analysis (GC) for the mentioned sample is identical with:

Product-Nr.: 1615

Product Name: Ginger (Organic)

Batch-Nr.: 1012797

Botanical Name: Zingiber officinalis

Bühl, 26.11.2015

Ayus GmbH
Am Dreschschopf 1 77815 Bühl/Moot
Tel.: +49 (0)7227 600 99-0 Fax: +49 (0)7227 600 99-99
E-Mail: info@oshadhi.eu Web: www.oshadhi.eu

Dr. David Nayan

Ayus GmbH
Am Dreschschopf 1
77815 Bühl/Moot
USt.-IdNr.: DE361342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadhi.eu
www.oshadhi.eu

Sitz: BÜH
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

Sample Name: Organic Ginger Oil

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Height%	Peak Table - Channel 1	
					Area/Height	Area%
1	5.117	2726	1353	0.0883	2.015	0.0038
2	5.523	7193	1830	0.0517	2.481	0.0059
3	5.717	1803	2475	0.0559	2.596	0.0137
4	5.949	1887	1899	0.0518	2.802	0.0076
5	6.325	5989	935	0.0402	4.176	0.0022
6	6.747	1012	485	0.0435	2.697	0.0014
7	6.771	3963	3277	0.0432	3.662	0.0047
8	6.812	2100	963	0.0429	2.428	0.0029
9	6.971	1920	627	0.0482	2.792	0.0024
10	6.992	2001	799	0.0448	2.716	0.0028
11	6.732	5390	1204	0.0379	2.816	0.0041
12	6.803	1102	460	0.0430	2.181	0.0015
13	6.837	7279	3643	0.0248	2.128	0.1022
14	7.066	358864	683592	8.2610	2.118	2.0195
15	7.132	12463	2227	0.0438	2.384	0.0284
16	7.276	6337	302	0.0033	3.434	0.0061
17	7.425	1368	367	0.0073	3.921	0.0039
18	7.589	9878	1446	0.0120	2.269	0.0525
19	7.612	421034	272334	11.3741	2.412	3.6596
20	7.806	4124	1625	0.0398	4.257	0.0061
21	7.912	2381	477	0.0031	3.697	0.0031
22	7.997	4018	1422	0.0092	2.813	0.0056
23	8.082	4728	1466	0.0100	2.813	0.0066
24	8.199	156695	68711	0.0079	2.233	2.2932
25	8.351	2594	13663	0.0046	2.741	0.0459
26	8.497	1718	447	0.0039	3.848	0.0024
27	8.621	17522	2821	0.0182	3.665	0.0250
28	8.716	1067	2279	0.0148	3.673	0.0090
29	8.824	13639	3688	0.0132	2.729	0.0382
30	8.978	482354	163681	1.0648	2.384	0.3000
31	9.101	103343	42672	0.3788	2.468	0.1460
32	9.196	9333	3730	0.0130	2.856	0.0150
33	9.282	43882	18585	0.1081	2.280	0.0773
34	9.368	10572	3417	0.0224	3.026	0.0147
35	9.460	2835	1674	0.0068	3.777	0.0055
36	9.546	29421	268262	1.3311	2.654	0.0810
37	9.978	2252816	782140	3.1084	3.007	2.2816
38	10.022	1492808	638425	4.1028	2.274	2.0800
39	10.161	21439	8136	0.0462	3.482	0.0229
40	10.298	4267	217	0.0049	3.692	0.0028
41	10.417	1577	786	0.0053	4.468	0.0040
42	10.579	1424	434	0.0028	3.256	0.0020
43	10.674	14715	4832	0.0335	3.086	0.0205
44	10.795	8977	475	0.0021	3.546	0.0023
45	10.952	2472	1000	0.0394	3.419	0.0076
46	11.093	2055	414	0.0033	3.022	0.0029
47	11.214	63952	12020	0.1113	1.784	0.0963
48	11.292	1252	4102	0.0272	4.257	0.0189
49	11.305	186901	57505	0.2322	4.629	0.2189
50	11.684	2583	992	0.0032	3.117	0.0035
51	11.794	1201	291	0.0019	3.227	0.0021
52	11.922	17824	4284	0.0245	3.816	0.0084
53	12.062	21134	6087	0.0292	1.672	0.0292
54	12.102	4508	620	0.0041	6.932	0.0060
55	12.621	318938	116293	0.7625	1.902	0.6726
56	12.844	4821	1019	0.0067	4.207	0.0021
57	13.023	3634	858	0.0056	4.198	0.0050
58	13.058	8028	1023	0.0100	1.986	0.0112
59	13.133	2436	680	0.0045	3.579	0.0034
60	13.135	10160	1611	0.0105	6.308	0.0142
61	13.152	3028	743	0.0029	4.075	0.0043
62	13.198	1796	381	0.0025	4.204	0.0033
63	13.182	2851	782	0.0110	3.081	0.0032
64	13.185	1028	488	0.0032	3.672	0.0034
65	13.192	28235	7212	0.0508	1.272	0.0352
66	13.683	6241	2013	0.0121	3.282	0.0061
67	13.184	46762	21043	0.1874	3.172	0.0931
68	13.329	4243	788	0.0060	3.613	0.0028
69	13.382	6096	1682	0.0105	3.882	0.0083

Ayas GmbH
Am Dreischopf 1
77615 Bötzingen/Moos
USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadh.eu
www.oshadh.eu

Stz: Bötzingen
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

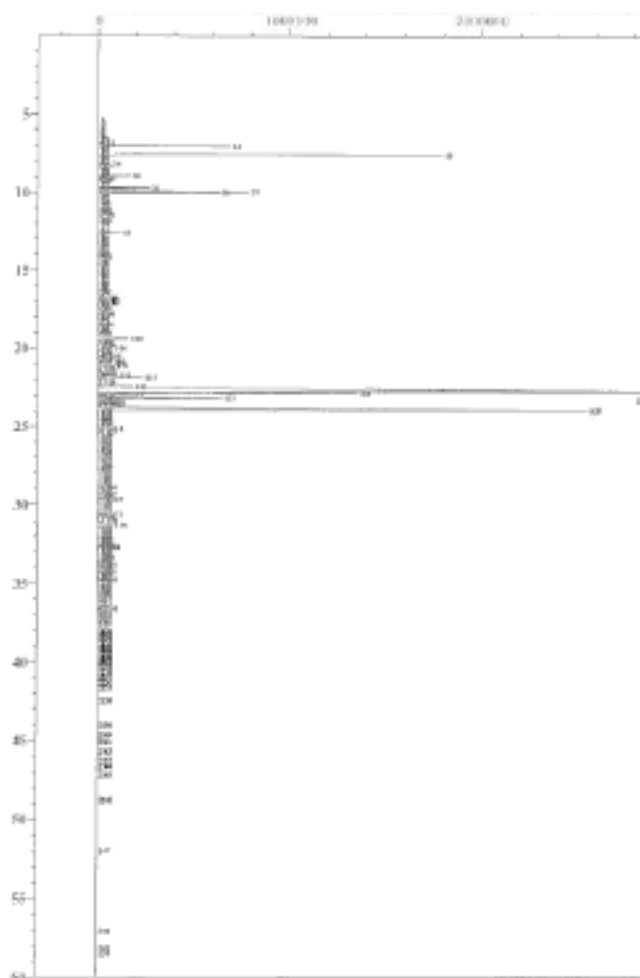
Point	Rel. Hg	Area	Height	Height/Rel. Hg	Area/Height	Area/Rel. Hg
156	23.525	1722	282	0.0121	1.426	0.3177
157	23.530	1756	282	0.0097	1.812	0.3485
158	23.535	1750	282	0.0017	6.122	0.3022
159	23.536	1746	132	0.0061	2.848	0.3102
160	23.532	2278	36	0.0034	6.153	0.3031
161	23.463	428	540	0.0042	5.130	0.3029
162	23.622	566	121	0.0086	4.621	0.3050
163	23.710	1611	234	0.013	2.817	0.3175
164	23.853	13752	1451	0.0175	4.142	0.3168
165	23.658	2642	431	0.0243	4.580	0.3188
166	23.211	521	136	0.0118	4.843	0.3133
167	23.312	1021	365	0.0160	2.427	0.3167
168	23.488	2642	111	0.0125	2.250	0.3141
169	23.618	2642	603	0.0073	3.229	0.3280
170	23.812	1620	227	0.0125	4.842	0.3128
171	23.929	1111	142	0.0081	4.261	0.3086
172	20.110	5022	412	0.0173	4.869	0.3125
173	20.249	2225	190	0.0184	3.287	0.3075
174	20.327	1292	232	0.0122	3.120	0.3088
175	20.628	2527	999	0.0084	4.257	0.3111
176	21.113	1732	118	0.0133	3.924	0.3121
177	20.697	1622	829	0.0051	3.588	0.3030
178	21.068	13122	1556	0.0121	3.307	0.3127
179	21.511	32267	1322	0.0141	3.271	0.3127
180	21.508	2628	468	0.013	4.126	0.3080
181	21.702	2185	291	0.0152	3.026	0.3120
182	21.829	19990	404	0.0163	4.806	0.3126
183	21.947	1628	234	0.0142	3.736	0.3080
184	22.151	2222	1247	0.0087	4.251	0.3185
185	22.213	2479	599	0.0135	3.026	0.3141
186	22.459	1182	262	0.0126	4.280	0.3129
187	22.588	1628	137	0.0188	4.111	0.3079
188	22.621	1628	1318	0.010	4.266	0.3181
189	22.771	6221	1022	0.0062	4.229	0.3080
190	22.888	2201	666	0.0125	3.222	0.3124
191	22.922	2722	582	0.0140	4.212	0.3081
192	23.147	4688	1418	0.0082	3.222	0.3125
193	23.221	524	277	0.0188	3.222	0.3129
194	23.445	4256	309	0.0133	3.222	0.3080
195	23.528	436	186	0.0228	3.222	0.3080
196	23.881	1628	141	0.0140	4.222	0.3120
197	23.855	16192	2622	0.0128	3.222	0.3126
198	23.921	1620	171	0.0109	4.222	0.3126
199	24.116	287	161	0.0105	4.222	0.3126
200	24.222	11628	2202	0.0082	4.212	0.3120
201	24.326	1771	262	0.0122	3.222	0.3121
202	24.322	2477	174	0.0137	4.245	0.3141
203	24.328	1186	222	0.0122	4.242	0.3080
204	24.322	14281	2218	0.0118	4.222	0.3126
205	24.827	2620	222	0.0148	3.222	0.3081
206	25.200	4211	829	0.0100	5.124	0.3081
207	25.310	3128	477	0.0129	3.222	0.3081
208	25.312	477	1418	0.0086	4.212	0.3081
209	25.614	824	171	0.0116	4.212	0.3082
210	25.798	1624	249	0.0140	3.248	0.3100
211	25.928	1712	117	0.0162	3.212	0.3121
212	26.261	1312	182	0.0127	3.212	0.3121
213	26.310	2041	1542	0.0088	3.222	0.3126
214	26.422	18212	2222	0.0071	4.222	0.3121
215	26.712	3199	177	0.0116	4.212	0.3124
216	26.810	1622	247	0.0166	3.222	0.3120
217	27.040	202	120	0.0178	3.222	0.3081
218	27.098	878	122	0.0088	3.027	0.3081
219	27.180	282	829	0.0032	3.242	0.3080
220	27.321	2018	202	0.0162	3.222	0.3121
221	27.598	101	111	0.0113	4.222	0.3124
222	28.072	278	220	0.0124	3.212	0.3121
223	28.242	122	211	0.0118	4.222	0.3121
224	28.418	272	220	0.0124	3.222	0.3080
225	28.762	284	221	0.0122	3.222	0.3080
226	29.012	1427	211	0.0118	4.222	0.3120
227	29.178	2618	122	0.0081	3.222	0.3080
228	29.328	212	122	0.0118	4.242	0.3121
229	29.622	2222	222	0.0122	3.222	0.3121
230	29.722	122	220	0.0026	3.222	0.3082
231	29.822	1216	268	0.0117	4.242	0.3081
232	29.922	1244	122	0.0112	4.242	0.3121
233	29.922	122	221	0.0081	1.242	0.3081
234	30.122	2828	262	0.0024	3.422	0.3081
235	30.188	1222	221	0.0024	3.222	0.3081
236	30.241	1618	296	0.0032	3.222	0.3080
237	30.321	284	214	0.0116	3.212	0.3081
238	30.422	1712	117	0.0086	3.212	0.3121
239	30.522	822	221	0.0028	3.242	0.3080
240	30.622	162	122	0.0012	4.222	0.3081
241	30.722	122	220	0.0017	4.222	0.3081

Ayat GmbH
 Am Dreischopf 1
 77815 BfH/Moos
 USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
 Fax: 49 (0)7227 600 99-99
 info@oshadLeu
 www.oshadLeu

Stz: BfH
 Handelsregister Mannheim
 HRB Nummer 210835
 Gesch@FzHrnc: Dr. David Nayan

PosId	Rel. Trace	Area	Höhe	Höhe/CS	Sum.Höhe	Area%
242	41.829	1126	142	0.0009	8.093	0.0036
243	48.171	2868	380	0.0025	7.261	0.0030
244	48.439	1981	270	0.0024	80.766	0.0030
245	47.217	8602	1146	0.0072	7.558	0.0121
246	48.755	26595	3063	0.0200	0.602	0.0171
247	51.381	1800	156	0.0013	9.192	0.0025
248	57.968	2735	248	0.0016	11.071	0.0030
249	58.138	2850	202	0.0013	11.656	0.0032
250	58.467	11525	876	0.0064	11.809	0.0161
Total		2114827	1331705	0.0000		100.0000



Ayas GmbH
 Am Dreschekopf 1
 77615 Böh/Moos
 USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
 Fax: 49 (0)7227 600 99-99
 info@oshadh.eu
 www.oshadh.eu

Sitz: Böh
 Handelsregister Mannheim
 HRB Nummer 210835
 Geschäftsführer: Dr. David Nayn

Rank	Rel. Rank	Avg	Stdev	Rel. Stdev	AreaUnder1	A10%
70	14.875	1809	1131	0.6250	4.751	0.0026
71	14.924	1814	1131	0.6252	4.757	0.0027
72	15.010	1838	1117	0.6073	4.731	0.0020
73	15.157	1900	1052	0.5536	4.746	0.0178
74	15.301	2022	1029	0.5088	4.699	0.0031
75	15.468	2287	1026	0.4484	4.723	0.0034
76	15.615	2560	1029	0.4011	4.869	0.0036
77	15.828	3270	1024	0.3086	4.272	0.0063
78	16.068	4120	933	0.2238	3.992	0.0161
79	16.340	5134	884	0.1722	3.446	0.0033
80	16.644	6300	841	0.1285	3.232	0.0241
81	16.981	7710	819	0.0920	4.110	0.0117
82	17.351	9380	802	0.0852	4.596	0.0060
83	17.754	11340	817	0.0717	4.877	0.0082
84	18.191	13720	810	0.0582	5.252	0.0128
85	18.661	16560	813	0.0452	5.731	0.0173
86	19.164	19900	807	0.0326	6.302	0.0227
87	19.701	23800	808	0.0202	6.977	0.0288
88	20.272	28300	808	0.0072	7.755	0.0350
89	20.877	33500	809	0.0145	8.637	0.0411
90	21.517	39400	809	0.0218	9.625	0.0472
91	22.192	46000	809	0.0291	10.719	0.0533
92	22.902	53400	809	0.0364	11.919	0.0594
93	23.647	61600	809	0.0437	13.225	0.0655
94	24.427	70700	809	0.0510	14.637	0.0716
95	25.242	80700	809	0.0583	16.155	0.0777
96	26.092	91700	809	0.0656	17.779	0.0838
97	26.977	103800	809	0.0729	19.509	0.0899
98	27.897	117100	809	0.0802	21.345	0.0960
99	28.852	131700	809	0.0875	23.287	0.1021
100	29.842	147700	809	0.0948	25.335	0.1082
101	30.867	165100	809	0.1021	27.489	0.1143
102	31.927	184000	809	0.1094	29.749	0.1204
103	33.022	204500	809	0.1167	32.115	0.1265
104	34.152	226700	809	0.1240	34.587	0.1326
105	35.317	250700	809	0.1313	37.165	0.1387
106	36.517	276500	809	0.1386	39.849	0.1448
107	37.752	304200	809	0.1459	42.639	0.1509
108	39.022	333800	809	0.1532	45.535	0.1570
109	40.327	365400	809	0.1605	48.537	0.1631
110	41.667	399000	809	0.1678	51.645	0.1692
111	43.042	434700	809	0.1751	54.859	0.1753
112	44.452	472600	809	0.1824	58.179	0.1814
113	45.897	512800	809	0.1897	61.605	0.1875
114	47.377	555400	809	0.1970	65.137	0.1936
115	48.892	600500	809	0.2043	68.775	0.2000
116	50.442	648200	809	0.2116	72.519	0.2061
117	52.027	708600	809	0.2189	76.369	0.2122
118	53.647	771800	809	0.2262	80.325	0.2183
119	55.302	837900	809	0.2335	84.387	0.2244
120	57.002	907000	809	0.2408	88.555	0.2305
121	58.747	979200	809	0.2481	92.829	0.2366
122	60.527	1054600	809	0.2554	97.209	0.2427
123	62.342	1133300	809	0.2627	101.695	0.2488
124	64.192	1215400	809	0.2700	106.287	0.2549
125	66.077	1301000	809	0.2773	110.985	0.2610
126	67.997	1390200	809	0.2846	115.789	0.2671
127	69.952	1483100	809	0.2919	120.699	0.2732
128	71.942	1580000	809	0.2992	125.715	0.2793
129	73.967	1681000	809	0.3065	130.837	0.2854
130	76.027	1786200	809	0.3138	136.065	0.2915
131	78.122	1895700	809	0.3211	141.499	0.2976
132	80.252	2009500	809	0.3284	147.139	0.3037
133	82.417	2127700	809	0.3357	152.885	0.3098
134	84.617	2250300	809	0.3430	158.737	0.3159
135	86.852	2377400	809	0.3503	164.695	0.3220
136	89.122	2509100	809	0.3576	170.759	0.3281
137	91.427	2645500	809	0.3649	176.929	0.3342
138	93.767	2786700	809	0.3722	183.205	0.3403
139	96.142	2932800	809	0.3795	189.587	0.3464
140	98.552	3083900	809	0.3868	196.075	0.3525
141	101.002	3239200	809	0.3941	202.669	0.3586
142	103.492	3398700	809	0.4014	209.369	0.3647
143	106.022	3562500	809	0.4087	216.175	0.3708
144	108.592	3730700	809	0.4160	223.087	0.3769
145	111.202	3903400	809	0.4233	230.105	0.3830
146	113.852	4080700	809	0.4306	237.229	0.3891
147	116.542	4262700	809	0.4379	244.459	0.3952
148	119.272	4449400	809	0.4452	251.795	0.4013
149	122.042	4640900	809	0.4525	259.237	0.4074
150	124.852	4837200	809	0.4598	266.785	0.4135
151	127.702	5038400	809	0.4671	274.439	0.4196
152	130.592	5244600	809	0.4744	282.199	0.4257
153	133.522	5455900	809	0.4817	290.065	0.4318
154	136.492	5672300	809	0.4890	298.037	0.4379
155	139.502	5893900	809	0.4963	306.115	0.4440

AYUS GmbH
Ätherische Öle und Naturrohstoffe
Essential Oils and Natural Products

1 of 4

Oshadhi
Passion for Nature

Gas Chromatography Analysis

Dear Customer,

Attached you will find the results of gas chromatography analysis based on the information provided by our Producer/Laboratory for:

Sample Reference: Cataire Citronnée

We testify that the Chromatographic Analysis (GC) for the mentioned sample is identical with:

Product-Nr.: 2250

Product Name: Clove Bud (Organic)

Botanical Name: Eugenia caryophyllata

Batch-Nr.: 1013241

Bühl, 2016-06-09

Ayus GmbH
Am Dreischopf 1 77815 Bühl/Moos
Tel.: +49 (0)7227 600 99-0 Fax: +49 (0)7227 60099-99
E-Mail: info@oshadhi.com www.oshadhi.com
Dr. David Nayan

Ayus GmbH
Am Dreischopf 1
77815 Bühl/Moos
USt.-IdNr.: DE361342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadhi.com
www.oshadhi.com

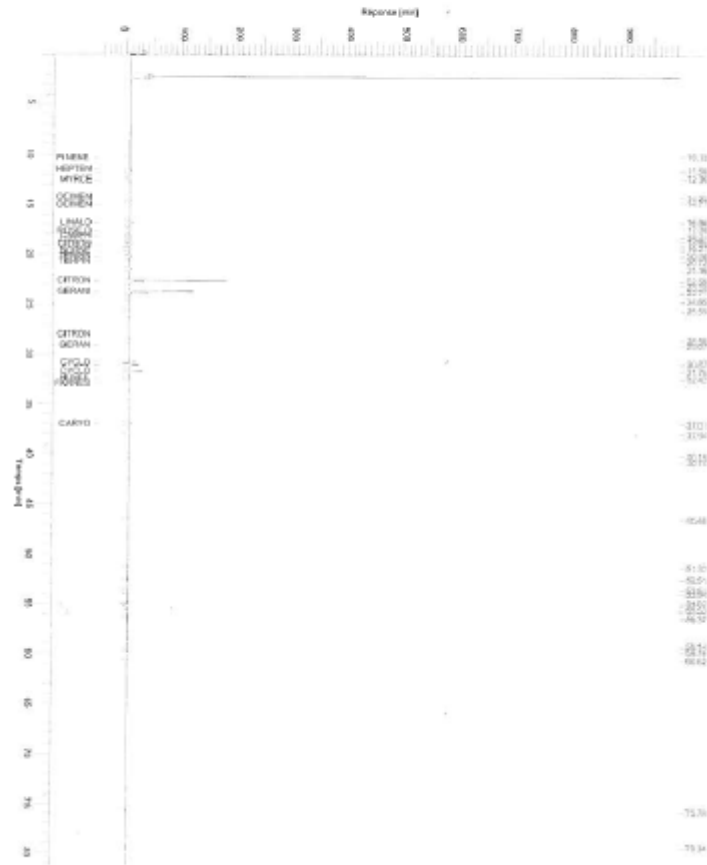
Stz: 804
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

AYUS GmbH

Ätherische Öle und Naturrohstoffe
Essential Oils and Natural Products

2 of 4

Method : GC/MS-chemie.mn Time of Injection: 20070818 21:14:08
 Start Time : 1:00 min End Time : 22:00 min Low Pass: -47.27 mV High Pass: 983.80 mV
 Pin Offset: -47.27 mV Pin Scale: 1041.1 mV



Ayus GmbH Am Dreischlopf 1 77615 Bohn/Mörs JSt.-IdNr.: DE161341890	Tel.: 49 (0)7227 600 99-0 Fax: 49 (0)7227 600 99-99 info@onbadhl.com www.onbadhl.com	Sitz: Böh Handelsregister Mannheim HRB Nummer 210833 Geschäftsführer: Dr. David Nayan
---	---	--

AYUS GmbH
Ätherische Öle und Naturrohstoffe
Essential Oils and Natural Products

3 of 4

Sample Name : Citaire Citronnée
Instrument Name : CLARUS 600
Rack/Vial : 04
Sample Amount : 1.000000
Cycle : 4

Date Acquisition Time : 02/07/2014 23:14:00
Channel : A
Operator : Dorothea
Dilution Factor : 1.000000

Result File :
Sequence File : C:\Sequences\CPG\2014\140702.seq

Rapport d'analyse

colonne apolaire

PK #	Component Name	TR [min]	Area [%]
1	pinene <alpha>	10.13	0.26
2	pinen-6-one <2-methyl-2>	11.26	0.31
3	pinene <beta>	11.72	0.42
4	myrcene	12.38	0.06
5	camphene <(2)-beta>	14.23	0.15
6	camphene <(E)-beta>	14.77	0.35
7		16.62	0.12
8	limonol	16.83	1.26
9	rose oxide <cis>	17.38	0.11
10	camphor	18.21	0.25
11		18.31	0.12
12		18.65	0.45
13	citronellal	18.97	0.95
14		19.27	0.10
15		19.45	0.10
16	borneol	19.63	0.13
17		20.06	0.27
18	terpinen-4-ol	20.23	0.39
19	terpinol <alpha>	20.72	0.12
20		21.49	0.45
21	citronellol + nerol	22.59	39.95
22	nerol	22.73	5.35
23		23.15	0.21
24	geraniol	23.71	26.34
25		23.89	0.72
26	geraniol	24.60	4.25
27		24.65	0.10
28		24.82	0.15
29		25.55	0.20
30		25.70	0.15
31	citronellyl acetate	26.50	0.25
32	geranyl acetate	29.07	0.10
33	cyclohexyl <alpha>	30.87	2.01
34	carvophyllene <(E)>	31.11	3.07
35	cyclohexyl <beta>	31.70	3.75
36	humulene <alpha>	32.42	0.25
37	farnesene <(E)-beta>	32.55	0.09
38	carvophyllene oxide	37.61	0.93
39		37.96	0.05
40		40.19	0.07
41		43.74	0.05
42		46.49	0.07
43		51.32	0.09
44		52.51	0.07
45		53.53	0.05
46		53.94	0.14
47		54.83	0.09
48		55.01	0.16
49		55.21	0.05
50		55.53	0.07
51		55.78	0.10
52		56.37	0.20
53		56.81	0.13
54		59.14	0.13
55		59.38	0.33

AYUS GmbH
Am Drieschopff 1
77815 Bötzingen
USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadfi.com
www.oshadfi.com

Stz: Bötzingen
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 230835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

AYUS GmbH

Ätherische Öle und Naturrohstoffe
Essential Oils and Natural Products



Gas Chromatography Analysis

Dear Customer,

Attached you will find the results of gas chromatography analysis based on the information provided by our Producer/Laboratory for:

Sample Reference: Thymus zygis L.

We testify that the Chromatographic Analysis (GC) for the mentioned sample is identical with:

Product-Nr.: 2830

Product Name: Thyme (Thymol) organic

Batch-Nr.: 1012844

Botanical Name: Thymus zygis

Bühl, 12.11.2015

Ayus GmbH
Am Dreschschopf 1, D-77815 Bühl/Moos
Tel.: +49 (0)7227 600 99-0 Fax: +49 (0)7227 6009 99
E-Mail: info@oshadhi.eu Web: www.oshadhi.eu
Dr. David Nayan

Ayus GmbH
Am Dreschschopf 1
77815 Bühl/Moos
USt.-IdNr.: DE361342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadhi.eu
www.oshadhi.eu

Stz: 60H
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

MOLECULES / MOLECULES	%	NORMATIFS / REGULATIONS	ALLERGENS / ALLERGENS (%)
ALPHA PINENE	1,10	0,5 - 2,5	1,10
ALPHA THUYENE	1,04	0,2 - 1,5	1,04
CAMPHERE	0,88		
MYRCENE	1,68	1 - 2,5	1,68
ALPHA TERPINENE	1,38		
LIMONENE	0,40	0,2 - 5,5	0,40
L.S. CINEOLE	0,47		
GAMMA TERPINENE	8,84	4 - 11	8,84
PARA CYMENE	18,08	14 - 28	18,08
TERPINELENE	0,18		
BETA PHELANDRENE	0,14		
CIS- β THUAMOL	0,20		
CAMPHERE	0,39		
LINALOL	4,67	3 - 6,5	4,67
CARVACOL METHYL ETHER	0,45		0,45
TERPINENE-4-OL	1,43	0,1 - 2,5	1,43
TRANS BETA CARYOPHILLENE	0,51		
THYMOL	49,12	27 - 58	49,12
DIPHS TERPINOL	0,55		
DORNEOL	1,58		
BETA CARYOPHILLENE	1,84	0,5 - 2	1,84
OXYDE DE CARYOPHILLENE	0,17		
CARVACROL	3,78	0,5 - 5,5	3,78
TOTAL	98,56		91,95

Ayax GmbH
Am Dreschschopf 1
77815 BSH/Moss
USt-IdNr.: DE161342890

Tel.: 49 (0)7227 600 99-0
Fax: 49 (0)7227 600 99-99
info@oshadl.eu
www.oshadl.eu

Sitz: BSH
Handelsregister Mannheim
HRB Nummer 210835
Geschäftsführer: Dr. David Nayan

AYUS GmbH



Dear Customer,

Attached you will find the results of gas chromatography analysis based on the information provided by our producer.

Sample References: 2350 - 1003076

Sample Name: Oregano vulgare Essential oil

Botanical Name: Oreganum vulgare

Origin: Bolivia

Date of receipt: June 2008

Corporation Laseve

Certificat d'analyse

Saguenay, 21 mars 2008

Huile reçue : *Oreganum compactum*, Kaliteri Corporation Laseve : 08-03-07-01
 Provenance : Soodevi
 Aspect physique : liquide teinté jaune. Indice de réfraction (20 °C) : 1,4807
 Huile analysée par chromatographie gazeuse (GC/FID) sur deux colonnes capillaires :
 Supelcowax 10 (polaire) et DB-5 (non polaire).

Identification	Colonne DB-5			Colonne Supelcowax 10		
	T.R.	I.K.	%	%	I.K.	T.R.
α -thujène	12,55	934	0,91	0,88	1022	5,65
α -pinène	12,89	940	0,79	0,77	1016	5,48
camphène	13,70	952	0,10	0,09	1059	6,69
sabinène	15,30	975	4,26	4,09	1117	8,72
β -pinène	15,41	977	0,39	0,37	1101	8,08
oct-1-én-3-ol	15,81	982	0,43	0,43	1459	27,01
myrcène	16,55	992	1,71	1,65	1164	10,81
octan-3-ol	16,84	995	0,26	0,25	1396	23,73
α -phellandène	17,23	1000	0,43	0,36	1160	10,58
α -terpinène	18,06	1017	5,81	5,59	1173	11,25
para-cymène	18,54	1026	1,88	1,78	1270	15,91
limonène	18,83*	1031	2,19	0,82	1190	12,16
β -phellandène	18,83*	1031		1,31	1197	12,55
1,8-cinéole	18,95	1033	0,09	n.i.	1195	12,45
cis- β -ocimène	19,65	1045	0,06	0,05	1238	14,36
trans- β -ocimène	20,32	1057	0,07	0,05	1256	15,21
γ -terpinène	20,91	1067	10,40	10,13	1242	14,57
cis-hydrate de sabinène	21,40	1075	2,52	2,46	1469	27,57
terpinolène	22,89	1098	2,04	1,95	1282	16,51
trans-hydrate de sabinène	23,51	1107	16,45	16,39	1550	32,32
linalol	23,79	1111	1,62	1,64	1556	32,71
para-mentha-1,3,8-triène ?	24,77	1125	0,35	0,34	1382	22,69
cis-para-menth-2-én-1-ol	25,06	1129	1,11	1,10	1561	33,06
non identifié	25,60	1136	0,30	0,30	1345	20,177
trans-para-menth-2-én-1-ol	26,31	1146	0,64	0,60	1623	36,78
bornéol	28,03	1168	0,23	0,22	1694	40,42
terpin-1-én-4-ol	28,88	1178	16,38	16,82	1592	35,15
α -terpinol	29,79	1188	2,60	2,60	1697	40,57
cis-pipéritol ?	30,60	1198	0,21			
trans-pipéritol	30,97	1203	0,30	0,30	1743	43,14
non identifié	33,47	1247	0,15	0,17	1607	36,027
acétate de linalyle	34,41	1263	1,59	1,62	1559	32,90
thymol	36,83	1302	0,13	0,13	2178	64,68
carvacrol	37,42	1311	18,29	18,91	2201	65,78
β -caryophyllène	44,52	1415	2,19	2,19	1575	34,00
α -humalène	46,57	1453	0,09	0,08	1647	37,99
germacrène D	48,24	1482	0,28	0,27	1691	40,23*
bicyclgermacrène	49,17	1498	1,00	0,97	1715	41,54
β -bisabolène	50,05	1513	0,20	0,19	1719	41,78
spathaléol	53,74*	1575	0,11	0,12	2108	61,31*
oxyde de caryophyllène	54,01*	1577	0,13	0,09	1953	53,98
Total des %			98,69	98,08		

* : plusieurs produits sont élus au même temps.

n.i. : pic non intégré.

Rapport d'analyse vérifié le 2008-03-21 par Guy Collin, chimiste.

APÊNDICE C– Relatório de análises microbiológicas realizadas na carne de frango adquirida em varejo.

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
CENTRO DE PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO**

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: 6083/2018

Cliente: BRUNA WEBBER
 Endereço: RUA SENADOR SALGADO FILHO, 337 - APTD. 601 - CENTRO - GETULIO VARGAS
 Item Ensaado: Frango - Congelado
 Data Fabricação: - Data Validade: - Lote: - AMOSTRA Nº: 6083/2018
 Data Recebimento: 02/10/2018 Período Realização dos Ensaio: 02/10/2018 - 10/10/2018 Data Emissão: 10/10/2018

**RESULTADO(S) DO(S) ENSAIO(S)
LAB. DE MICROBIOLOGIA (CEPA)**

ENSAIO REALIZADO / MÉTODO	RESULTADO	UNIDADE	VMP*
Salmonella spp. - Determinação qualitativa pela técnica de Presença/Ausência. (VIDAS® Salmonella (SLM) Easy). <small>APV04, Validação BSI 12/15 - 09/05 - VIDAS easy Salmonella Method (SLM) in a variety of foods.</small>	Ausência	25 g	-
Bactérias Mesófilas aeróbias facultativas - Determinação quantitativa pela técnica de contagem em profundidade. <small>ISO 4833-1:2013</small>	9,9 x 10 ²	UFC/g	-


A amostragem é de total responsabilidade do cliente. Os resultados se referem apenas a amostra ensaiada.

INFORMAÇÕES FORNECIDAS PELO CLIENTE: Responsável pela coleta: Bruna Webber.

O relatório só pode ser reproduzido na íntegra, a reprodução de partes requer aprovação por escrito do laboratório.

* VMP (valor máximo permitido)

Bióloga ISABEL CRISTINA CISCO CRB10 58516-03D
 Médica Veterinária LAURA BEATRIZ RODRIGUES CRMV/RS 7042


 Signatário Autorizado

FORM-02 versão 03
 Rodovia BR 285 - Bairro São José - Camapuã - Co. Postal 011 - Passo Fundo-RS
 CEP: 96601-070 - Fone: 5432168190 - Fax: 5432169420 - E-mail: cepa@upf.br

Página 1 de 1

CEPA

ARTIGO PUBLICADO


“Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses”(Artigo publicado na **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**)

REVISTA
DO
INSTITUTO
DE
MEDICINA
TROPICAL
DE
SÃO PAULO
JOURNAL OF THE SÃO PAULO
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

<http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961036>

Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg
isolated from chicken carcasses

Bruna Webber¹ , Karen Apellanis Borges¹, Thales Quedi Furian¹, Natalie Nadin Rizzo¹, Eduardo Cesar Tondo², Luciana Ruschel dos Santos³, Laura Beatriz Rodrigues³, Vladimir Pinheiro do Nascimento¹

ABSTRACT

During the last years, Brazilian government control programs have detected an increase of *Salmonella* Heidelberg in poultry slaughterhouses a condition that poses a threat to human health. However, the reasons remain unclear. Differences in genetic virulence profiles may be a possible justification. In addition, effective control of *Salmonella* is related to an efficient epidemiological surveillance system through genotyping techniques. In this context, the aim of this study was the detection of 24 virulence-associated genes in 126 *S. Heidelberg* isolates. We classified the isolates into 56 different genetic profiles. None of the isolates presented all the virulence genes. The prevalence of these genes was high in all tested samples as the lowest number of genes detected in one isolate was 10/24. The *lppA* and *csgA* (fimbriae), *invA* and *sivH* (TTSS), and *msgA* and *tolC* (intracellular survival) genes were present in 100% of the isolates analyzed. Genes encoding effector proteins were detected in the majority of SH isolates. No single isolate had the *sefA* gene. The *pefA* gene was found in only four isolates. We have also performed a screening of genes associated with iron metabolism: 88.9% of isolates had the *iroN* gene and 79.4% the *sitC* gene. Although all the isolates belong to the same serotype, several genotypic profiles were observed. These findings suggest that there is a diversity of *S. Heidelberg* isolates in poultry products. The fact that a single predominant profile was not found in this study indicates the presence of variable sources of contamination caused by SH. The detection of genetic profiles of *Salmonella* strains can be used to determine the virulence patterns of SH isolates.

KEYWORDS: Salmonellosis. *Salmonella* Heidelberg. Poultry. PCR. Virulence genes.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTIGO A SER SUBMETIDO

“Condicionamento de superfície com bacteriófagos reduz a formação de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg”

(Artigo a ser submetido para a revista **Letters in Applied Microbiology**)

B. Webber¹, E.S. Pottker¹, C. Peixoto², E. Mistura³, L.R. dos Santos³, L.B. Rodrigues³ and V.P. Nascimento⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, RS, Brazil

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS, Brazil

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

Aims: Avaliar a ação de três bacteriófagos isolados ou combinados na inibição da adesão e remoção de biofilme de *Salmonella* Heidelberg em superfície de poliestireno.

Methods and Results: Utilizou-se os bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2, UPF_BP3 e um *pool* dos mesmos para o biocontrole de biofilmes de SH em superfície de poliestireno nos tempos de ação de 3, 6 e 9 horas. Os fagos individuais e em combinação demonstraram reduções na adesão de SH de até 83,4%, e remoção do biofilme pré-formado de até 64,0%. Ressalta-se que o uso de combinações sinérgicas entre os fagos é a mais indicada, já que potencializou a redução dos biofilmes.

Conclusions: O uso do *pool* de bacteriófagos no condicionamento de superfícies é uma alternativa no controle de biofilmes de SH.

Significance and Impact of the Study: Esse estudo destaca-se por ser o primeiro com uso sinérgico dos bacteriófagos UPF_BP1, UPF_BP2 e UPF_BP3 na prevenção e remoção de biofilme de SH.

Keywords: bacteriófagos, biocontrole, *Salmonella* Heidelberg, biofilme, avicultura.