

LAÍS SILVA BATALHA

**ENCAPSULAMENTO DE BACTERIÓFAGOS EM DIFERENTES MATRIZES E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PARA A FAGOTERAPIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B328e
2017 Batalha, Laís Silva, 1991-
Encapsulamento de bacteriófagos em diferentes matrizes e
avaliação do potencial para fagoterapia / Laís Silva Batalha. –
Viçosa, MG, 2017.
ix, 81f : il. (algumas color) ; 29 cm.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Encapsulamento.
3. Bacteriófagos. 4. Polímeros. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

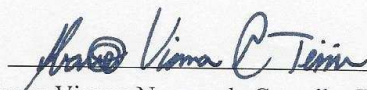
CDD 22. ed. 664


LAÍS SILVA BATALHA

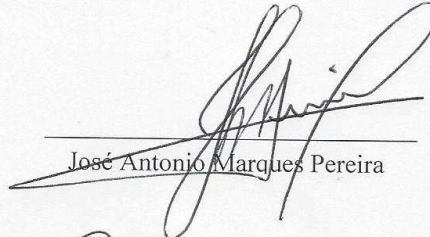
**ENCAPSULAMENTO DE BACTERIÓFAGOS EM DIFERENTES
MATRIZES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PARA A FAGOTERAPIA**

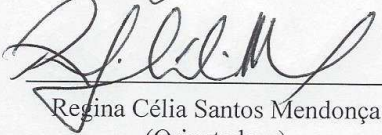
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2017.


Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira
(Coorientador)


Igor José Boggione Santos
(Coorientador)


José Antonio Marques Pereira


Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

*A Deus,
meus pais, meus irmãos e
aos meus amigos
pelo amor, apoio e momentos felizes.
A Pitucha (in memoriam),*

DEDICO.

“Eu não vim até aqui, pra desistir agora”.
(Engenheiros do Hawaii)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, fé e por nunca me deixar sozinha nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Antônio e Eloisa pelo amor incondicional, educação, respeito, confiança, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Laura e Luide, pelo carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de cursar minha graduação e pós-graduação.

À professora Regina pela orientação.

Ao professor Alvaro, pela imensa contribuição no trabalho e, principalmente, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Sem sua ajuda não teria sido possível a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

Aos professores José Antonio e Igor, pelas contribuições e sugestões.

Aos professores Edimar, Weyder, Afonso e Nilda, pela concessão do laboratório e equipamentos para realização de algumas análises.

Ao Haroldo, pela companhia e momentos agradáveis.

Aos colegas de laboratório Dani, Nayara, Rodrigo e Angélica Machalela, por terem proporcionado dias de muita alegria. Em especial a Maryoris, por se tornar parte da minha família (também Juan Antônio), grande amiga e companheira. À Delaine, pela ajuda e conselhos que me fizeram crescer cientificamente e espiritualmente.

Aos estagiários Lorena, Angélica Batalha, Sabrina, Tayara, Letícia, Lucas, Tainah e em especial, ao Marco Túlio, pela amizade, disposição em me ajudar e colaboração durante todo o mestrado.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela atenção dada, em especial ao Nélio, pela amizade e suporte nos experimentos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, pelo auxílio nas análises microscópicas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação,

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
JUSTIFICATIVA.....	1
OBJETIVOS	2
CAPÍTULO 1.....	3
Revisão de literatura.....	3
1. BACTERIÓFAGOS.....	3
2. ENCAPSULAMENTO	8
3. GELIFICAÇÃO	17
4. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 E PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR	18
5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 2.....	30
Dispositivo de encapsulamento por extrusão com alginato-polímeros gelificantes para uso em sistemas de transporte de moléculas bioativas	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPÍTULO 3.....	57
Caracterização e liberação controlada de fagos UFV-AREG1 para modular a microbiota intestinal de animais.....	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4. CONCLUSÃO	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE ABREVIACÕES

AL: Alginato

AL1: Alginato 0,75 g mL⁻¹

AL2: Alginato 1,0 g mL⁻¹

AL3: Alginato 1,5 g mL⁻¹

AL4: Alginato 2,0 g mL⁻¹

CA: Carragena

CA1: Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹

CA2: Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹

CH: Quitosana

CH1: Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹

CH2: Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹

EE: Eficiência de Encapsulamento

FDA: Food and Drug Administration

FGS: Fluido Gástrico Simulado

FIS: Fluido Intestinal Simulado

FSANZ: Food Standards Australia New Zealand

GRAS: Geralmente Reconhecido como Seguro

K: Índice de consistência

MCVL: Microscopia Confocal de Varredura a Laser

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

n: Índice de comportamento ao escoamento

PI: Ponto Isoelétrico

UFP: Unidade Formadora de Placa

UFV-AREG1: Bacteriófagos de *Escherichia coli* O157:H7

WP: Proteína do soro de leite

WP1: Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹

WP2: Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹

RESUMO

BATALHA, Laís Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Encapsulamento de bacteriófagos em diferentes matrizes e avaliação do potencial para a fagoterapia.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Igor José Boggione Santos.

O uso de bacteriófagos (fagos) para modular a microbiota intestinal de animais reduz o risco de contaminação de alimentos por micro-organismos causadores de doenças de origem alimentar. No entanto, a viabilidade dos fagos é baixa em ambiente gastrointestinal, tornando o encapsulamento, uma alternativa promissora para aplicação em sistemas de administração oral. O objetivo desta pesquisa foi investigar as características de proteção e liberação *in vitro* dos fagos de *Escherichia coli* O157:H7 (UFV-AREG1) encapsulados em esferas de alginato-polímeros preparadas por método de extrusão. Um dispositivo de encapsulamento por extrusão foi montado para produção de esferas carregadas com fagos usando alginato, carragena, proteína do soro de leite e quitosana como polímeros base. O comportamento reológico e a eficiência de encapsulamento para cada formulação foram determinados. Testes *in vitro* (fluido gástrico simulado-FGS, fluido intestinal simulado-FIS e sais biliares) foram realizados simulando as condições as quais os fagos são expostos quando administrados oralmente. A viabilidade dos fagos encapsulados foi avaliada durante o armazenamento e após secagem das esferas. O sistema montado apresentou potencial para imobilizar outras biomoléculas, além dos fagos, para sistemas de liberação controlada. As formulações apresentaram comportamento de fluido não-newtoniano pseudoplástico e cerca de 99% dos fagos foram encapsulados nas esferas. O título dos fagos UFV-AREG1 livres reduziu a um nível indetectável 5 min após exposição em pH abaixo de 3,4 e após 150 s em FGS (pH 2,5), indicando que os mesmos foram sensíveis a ambientes ácidos. No entanto, a viabilidade dos fagos foi mantida em esferas de alginato-proteína do soro, com redução de somente 0,04 ciclos \log_{10} no título. Sais biliares não afetaram a estabilidade dos fagos livres ou encapsulados, mesmo incubados por 3 h em soluções de bile a 1 % e 2 %. Os fagos foram liberados rapidamente em FIS (pH 6,8) nos tempos iniciais e gradualmente nos tempos seguintes. A viabilidade dos fagos encapsulados foi mantida sob refrigeração durante cinco meses, no entanto, o processo de secagem das esferas reduziu o título a um nível não detectável. O sistema montado foi compatível com polissacarídeos e proteínas para encapsulamento de biomoléculas e as esferas produzidas, mantiveram os fagos UFV-AREG1 biologicamente ativos e com potencial para fagoterapia.

ABSTRACT

BATALHA, Laís Silva, M.Sc., Federal University of Viçosa, February, 2017. **Encapsulation of bacteriophages in different matrices and evaluation of potential for phage therapy.** Advisor: Regina Célia Santos Mendonça. Co-advisors: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Igor José Boggione Santos.

The use of bacteriophages (phages) to modulate intestinal microbiota of animals reduces the risk of food contamination by foodborne microorganisms. However, the phage viability in the gastrointestinal environment is low, making encapsulation a promising alternative for oral delivery systems application. The objective of this research was to investigate the *in vitro* protection and release characteristics of the *Escherichia coli* O157:H7 phage (UFV-AREG1) encapsulated in alginate-polymer spheres prepared by the extrusion method. An extrusion encapsulation device was assembled, producing phage loaded spheres using alginate, carrageenan, whey protein and chitosan as base polymers. The rheological behavior and the encapsulation efficiency for each formulation were determined. *In vitro* tests (simulated gastric fluid-SGF, simulated intestinal fluid-SIF and bile salts) were performed, simulating conditions in which the phages are exposed when orally administered. The viability of the encapsulated phages was evaluated during storage and after drying of the spheres. The assembled system presented potential to immobilize other biomolecules, in addition to the phages, for controlled release systems. The formulations showed behavior of non-Newtonian pseudoplastic fluids and about 99% of the phages were encapsulated in the spheres. The titer of the free UFV-AREG1 phages reduced to an undetectable levels 5 min after exposure at pH under 3.4 and after 150 s at SGF (pH 2.5), indicating that they were sensitive to acidic environments. However, the viability of the phages was maintained in alginate-whey protein spheres, reducing only 0.04 log₁₀ cycles in the titer. Bile salts did not affect the stability of free or encapsulated phages, even incubated for 3 h in 1% and 2% bile solutions. Phages were rapidly released in SIF (pH 6.8) at the initial times and gradually at the following times. The viability of the encapsulated phages was kept under refrigeration for five months, however, the drying of the spheres reduced the titer to an undetectable levels. The assembled system was compatible to polysaccharides and proteins for the encapsulation of biomolecules and the spheres produced maintained the UFV-AREG1 phages biologically active with potential for phage therapy.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este documento está dividido em três capítulos:

- Capítulo 1: contém a **revisão de literatura** e apresenta uma contextualização dos aspectos abordados neste trabalho. A revisão sobre bacteriófagos apresenta a definição, caracterização, classificação e ciclos biológicos, produtos a base de fagos e suas aplicações na indústria de alimentos e os principais fatores que afetam os fagos. A revisão sobre encapsulamento apresenta as técnicas de encapsulamento, os principais materiais utilizados e os métodos de gelificação. Ainda, uma revisão sobre a bactéria patogênica *Escherichia coli* O157:H7 e algumas técnicas de caracterização empregadas como, reologia, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser.

- Capítulo 2: compreende ao artigo “**Dispositivo de encapsulamento por extrusão com alginato-polímeros gelificantes para uso em sistemas de transporte de moléculas bioativas**”. Apresenta a montagem do sistema de encapsulamento por extrusão e determinação dos parâmetros operacionais, encapsulamento dos fagos UFV-AREG1 em esferas de alginato, carragena, proteína do soro de leite e quitosana, a eficiência de encapsulamento dos fagos em cada formulação, determinação do comportamento reológico das soluções encapsulantes e a caracterização morfológica das esferas contendo os fagos.

- Capítulo 3: compreende ao artigo “**Caracterização e liberação controlada de fagos UFV-AREG1 para modular a microbiota intestinal de animais**”. Apresenta a caracterização dos fagos UFV-AREG1 quanto à viabilidade em diferentes temperaturas, luzes e pH, avaliação da resistência dos fagos livres e encapsulados em fluido gástrico simulado, avaliação da estabilidade dos fagos livres e encapsulados em sais biliares, avaliação da liberação dos fagos encapsulados em fluido intestinal simulado e avaliação da viabilidade dos fagos encapsulados durante o armazenamento e após a secagem das esferas.

INTRODUÇÃO GERAL

A principal forma de controle de infecções bacterianas são os antibióticos, no entanto, seu uso indiscriminado tem levado a seleção de micro-organismos resistentes. O uso de bacteriófagos (fagos) no combate a bactérias resistentes a multidrogas isolados de animais, humanos e alimentos vem se tornando uma realidade promissora (GOUVÊA et al., 2016; SCHROEDER et al., 2002).

A terapia com fagos para diminuir a colonização de *E. coli* O157:H7 em animais vivos, tem sido desenvolvida, principalmente, para bovinos e aves, mas a administração direta dos mesmos em água ou no alimento para animais pode não ser bem sucedida (SILLANKORVA et al., 2012). Fatores físico-químicos, como temperatura, acidez, salinidade e conteúdo iônico podem afetar a viabilidade dos fagos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (JOŃCZYK et al., 2011) devido a danos nos elementos estruturais, perdas de lipídeos e alterações estruturais no material genético (ACKERMANN et al., 2004).

Uma alternativa para proteger os fagos expostos a um ambiente adverso é o encapsulamento. O encapsulamento de fagos é uma técnica com possibilidade de reduzir a morte viral durante a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como uma alternativa para o controle da liberação destas partículas (COLOM et al., 2017; STANFORD et al., 2010). Normalmente são usadas matrizes poliméricas como materiais encapsulante e o alginato sozinho ou combinado com outros polímeros, incluindo outros carboidratos, proteínas e lipídios, é um dos polímeros mais estudados e com mecanismo de ação elucidada para administração oral (WANDREY et al., 2010).

Dessa forma, o encapsulamento de fagos para administração oral é uma estratégia para aumentar a segurança alimentar, pois reduz a contaminação microbiana no início da cadeia de processamento de alimentos.

JUSTIFICATIVA

A administração oral de fagos resulta em perda de viabilidade associada à passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, o que é atribuído à acidez, sais biliares e enzimas presentes.

Tais perdas de viabilidade podem ser reduzidas por encapsulamento dos fagos em uma matriz de polímero. O encapsulamento melhora a sobrevivência dos fagos em ambientes ácidos, preserva a capacidade de infectar bactérias entéricas patogênicas (*Escherichia coli*,

Salmonella spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*) no intestino e assegura a viabilidade durante o armazenamento dos produtos (por exemplo ração) a longo prazo.

Assim, o presente trabalho traz uma alternativa para a redução de patógenos entéricos em aves e/ou suínos utilizando a tecnologia de encapsulamento de fagos e, conseqüentemente, reduzir o risco de contaminação de produtos alimentícios derivados desses animais.

OBJETIVOS

Geral

Investigar as características de proteção e liberação *in vitro* dos fagos de *Escherichia coli* O157:H7 (UFV-AREG1) encapsulados em esferas de alginato-polímeros preparadas por método de extrusão.

Específicos

- ✓ Montar um sistema de encapsulamento por extrusão e determinar os parâmetros operacionais;
- ✓ Encapsular fagos UFV-AREG1 em esferas de alginato, carragena, proteína do soro de leite e quitosana;
- ✓ Avaliar a eficiência de encapsulamento dos fagos UFV-AREG1;
- ✓ Determinar o comportamento reológico das soluções encapsulantes;
- ✓ Caracterizar morfologicamente as esferas contendo fagos UFV-AREG1;
- ✓ Caracterizar os fagos UFV-AREG1 quanto à viabilidade em diferentes temperaturas, luzes e pH;
- ✓ Avaliar a resistência dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados em fluido gástrico simulado;
- ✓ Avaliar a estabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados em sais biliares;
- ✓ Avaliar a liberação dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em fluido intestinal simulado;
- ✓ Avaliar a viabilidade dos fagos UFV-AREG1 encapsulados durante o armazenamento;
- ✓ Avaliar a viabilidade dos fagos UFV-AREG1 encapsulados após a secagem das esferas.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

1. BACTERIÓFAGOS

Definição, caracterização, classificação e ciclos biológicos

Bacteriófagos são entidades virais capazes de infectar micro-organismos procariotos e são responsáveis pelo processo de infecção bacteriana que resulta na lise celular e inviabilização de bactérias nos mais diversos ambientes ou em sistemas *in vivo* (MUÑOZ e KOSKELLA, 2014; VERBEKEN et al., 2014; WITTEBOLE et al., 2014). Os fagos necessitam do metabolismo de outro sistema biológico para sua replicação, sendo parasitas intracelulares obrigatórios por falta de metabolismo próprio (HUNGARO et al., 2014; MONK et al., 2010; ROHWER e EDWARDS, 2002). Devido sua atuação sobre bactérias, os fagos desempenham função fundamental na regulação da ecologia microbiana em diversos ecossistemas (HUNGARO et al., 2014).

Existem três meios básicos de caracterizar os fagos: o fenótipo da infecção (inclui a gama de hospedeiros), morfologia (incluindo a forma da partícula, suas dimensões, propriedades físico-químicas e características de ácidos nucleicos) e a sequência do genoma. Em relação à morfologia, fagos podem medir de 24 a 200 nanômetros, apresentar capsídeo com forma icosaédrica, cúbica, filamentosa ou pleomórfica e presença de cauda (ACKERMANN, 2005). Tais características são utilizadas como parâmetros na classificação de acordo com sua taxonomia. O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) classifica os fagos com base no tipo de morfologia e de ácidos nucleicos agrupando-os em 13 famílias (Figura 1) (ICTV, 2012).

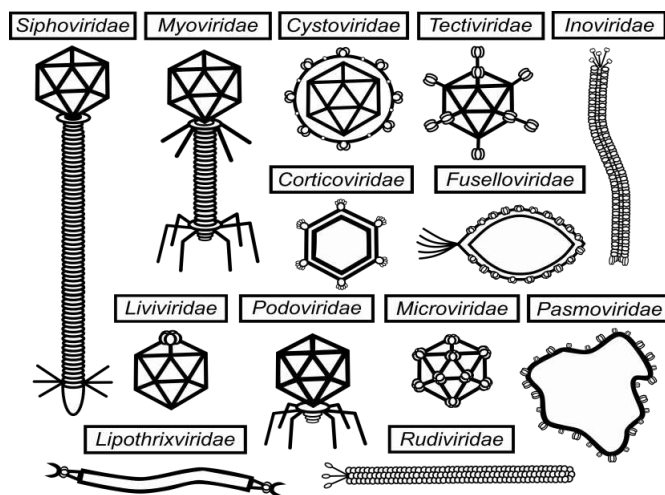


Figura 1 - Tipos de morfologias e famílias de bacteriófagos. Fonte: Albino, 2015.

A grande maioria dos fagos estudados com o objetivo de biocontrole e identificação de bactérias faz parte da ordem dos *Caudovirales* e apresentam caudas com comprimentos variáveis e cabeças icosaédricas contendo dsDNA (ACKERMANN, 1998; MUÑOZ e KOSKELLA, 2014; WITTEBOLE, DE ROOCK e OPAL, 2014). Esses fagos podem ser classificados em três grupos morfológicos: *Myoviridae* (caudas contráteis, longas e rígidas), *Podoviridae* (caudas não contráteis e curtas) e *Siphoviridae* (caudas não contráteis, longas e flexíveis) (GREGORACCI et al. 2006; MONK et al., 2010; HUNGARO et al., 2014).

Fagos podem apresentar diferentes ciclos de infecção, sendo os principais, o ciclo lítico, ciclo lisogênico e ciclo pseudo-lisogênico. Para isso, se aderem à superfície da célula microbiana, intermediado por proteínas ou outras estruturas acessórias e, injetam seu material genético no interior do hospedeiro. Para serem aplicados como ferramentas de controle de patógenos, devem-se empregar fagos líticos, que apresentam o ciclo lítico de infecção. Nesse ciclo, os fagos injetam seu material genético no interior da célula para a produção de novas partículas virais, causando a lise celular (MUÑOZ e KOSKELLA, 2014; WITTEBOLE et al., 2014). Na ausência de um sistema biológico para infectar, a existência dos fagos se limita a um estado metabolicamente inerte. A capacidade de infectar somente organismos procaríotos é uma distinção dos fagos em relação a outros vírus (BREITBART et al., 2003; PETTY et al., 2007; WITHEY et al., 2005).

Aplicações de bacteriófagos em escala comercial

A principal forma de controle de infecções bacterianas atualmente são os antibióticos. No entanto, seu uso indiscriminado tem proporcionado a seleção de bactérias multirresistentes, responsáveis por milhares de mortes anualmente. O desenvolvimento de antibióticos pela indústria farmacêutica está estagnado, intensificando as pesquisas com

bacteriófagos em diversas áreas da saúde e segurança alimentar a fim de obter formas alternativas de controle de bactérias nos mais diversos campos de aplicação (GOLKAR et al., 2014; MUÑOZ e KOSKELLA, 2014; SERWER et al., 2014). Em relação à segurança alimentar, fagos estritamente líticos são um dos métodos antibacterianos mais inofensivos disponíveis (SILLANKORVA et al., 2012).

Algumas empresas já comercializam produtos a base de fagos, incluindo produtos para controle de patógenos de interesse alimentar. Esses produtos são considerados como seguros para o consumidor e aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) como, por exemplo, o ListShield™ e SalmFres™, usados no controle de *L. monocytogenes* e *Salmonella* em superfícies, respectivamente (ENDERSEN et al., 2014). Em 2006, o FDA aprovou o uso e a preparação de fagos como aditivo alimentar e Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS), para o controle da bactéria patogênica *L. monocytogenes* em carne de aves e derivados. Na Europa, o uso de Listex™ também foi aprovado na Suíça para fabricação de queijos e recentemente a aprovação se estendeu para outros tipos de alimentos. O Listex™ também foi aprovado para uso no processamento de alimentos pelo Food Standards Austrália Nova Zelândia (FSANZ) em 2012. Várias empresas estão atualmente realizando experimentos pré-clínicos com fagos e produtos a base de fagos (Quadro 1).

Quadro 1 - Empresas envolvidas em pesquisa com fagos e produtos a base de fagos

Fabricante	Localização	Produto	Alvo	Situação do teste
AmpliPhi	Richmond, Estados Unidos	Coquetel de fagos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Clostridium difficile</i>	Aprovado em 2015
ContraFect Corp	Yonkers, Estados Unidos	Lisinas fágicas	<i>S. aureus</i>	Inciado em 2015
EnBiotix	Cambridge, Estados Unidos	Fago geneticamente modificado	<i>S. aureus</i>	Pré-clínico
EpiBiome	San Francisco, Estados Unidos	Coquetel de fagos	<i>E. coli</i> e <i>Shigella</i>	Pré-clínico
Fixed-Phage	Glasgow, Reino Unido	Fago fixado em superfícies	<i>S. aureus</i> resistente à metilina - MRSA	Pré-clínico
Intralytix	Baltimore, Estados Unidos	Coquetel de fagos	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	Pré-clínico
Micreos	Wageningen, Holanda	Lisinas fágicas	<i>S. aureus</i> e <i>S. aureus</i> MRSA	Pré-clínico
Novolytics	Warrington, Reino Unido	Coquetel de fagos	<i>S. aureus</i> MRSA	Pré-clínico
Pherecydes Pharma	Romainville, França	Coquetel de fagos	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Iniciado em 2015
Synthetic Genomics	San Diego, Estados Unidos	Fago geneticamente modificado	Infecções em queimaduras e feridas na pele	Pré-clínico
TechnoPhage	Lisboa, Portugal	Coquetel de fagos	Úlceras crônicas, infecções respiratórias e na pele.	Pré-clínico

Fonte: Madhusoodanan, (2016) adaptado.

Fagos oferecem vantagens como agentes de biocontrole por diversas razões: (1) especificidade para atingir seu hospedeiro alvo determinado pelos receptores presentes na parede celular bacteriana, uma propriedade que favorece os fagos em relação a outros antimicrobianos, já que não causam danos colaterais à microbiota endógena; (2) autorreplicação e autolimitação, o que significa que doses baixas ou individuais vão se multiplicar enquanto um limiar de hospedeiro ainda exista; (3) se adaptam continuamente aos mecanismos de defesa de bactérias; (4) baixa toxicidade inerente, uma vez que consistem principalmente de ácidos nucleicos e proteínas; (5) são relativamente baratos e fáceis de isolar e propagar; (6) geralmente suportam as condições adversas dos alimentos e, (7) possuem vida útil prolongada (SILLANKORVA et al., 2012).

Fatores que afetam os bacteriófagos

A existência, a viabilidade e a duração do período de armazenamento de fagos são afetadas por diferentes fatores físico-químicos externos, tais como a temperatura, acidez, salinidade e presença de íons (JOŃCZYK et al., 2011). Tais fatores podem inativar os fagos por meio de danos em seus elementos estruturais (cabeça, cauda e envelope), perdas de lipídeos e alterações no material genético (ACKERMANN et al., 2004). No entanto, a capacidade que os bacteriófagos têm para sobreviver em condições desfavoráveis é bastante diversificada (JOŃCZYK et al., 2011).

Acidez

Processos de agregação de fagos têm sido descritos como fator determinante para explicar a redução no título quando o pH do meio diminui. O declínio no título de fagos pode ser devido à inativação (perda de infecciosidade), adesão ao recipiente (GASSILLOUD e GANTZER, 2005) ou agregação (FLOYD e SHARP, 1979). Sabe-se que os dois últimos fenômenos são reversíveis, embora interpretados como inativação.

A agregação é um fenômeno que depende de parâmetros ambientais tais como pH, força iônica, temperatura e também está relacionado com as propriedades superficiais coloidais (FLOYD e SHARP, 1979). A agregação de fagos ocorre quando o pH do meio se encontra próximo ou abaixo do ponto isoelétrico (PI) das proteínas dos fagos, ocasionado pelo aumento da concentração de íons de hidrogênio no meio. As repulsões eletrostáticas se tornam menos importantes que a força de Van der Waals e interações hidrofóbicas, tornando-as significativas. A neutralização das interações eletrostáticas favorece o contato entre os fagos resultando em agregação da maioria das partículas virais, levando ao declínio na contagem dos mesmos (LANGLET et al., 2007).

Temperatura

A temperatura vem sendo citada como um fator crítico para a sobrevivência de fagos, uma vez influencia na adsorção, penetração, replicação e na duração do período de latência (NASSER e OMAN, 1999; OLSON et al., 2004). O comportamento dos fagos em diferentes temperaturas de armazenamento varia de acordo com a família, a fonte de isolamento e a composição do meio de armazenamento (ACKERMANN et al., 2004; JOŃCZYK et al., 2011; THORNE e HOLT, 1974). Cada fago tem sua temperatura ótima para infecção do hospedeiro, em temperaturas inferiores à ótima, menos material genético do fago penetra nas

células hospedeiras desfavorecendo a replicação viral e, temperaturas superiores à ótima, podem prolongar a duração do estado de latência de fagos (TEY et al., 2009).

A perda de viabilidade causada por baixas temperaturas pode estar relacionada com a contração das caudas dos fagos da ordem dos *Caudovirales*, inibindo sua capacidade de infectar o hospedeiro (THORNE e HOLT, 1974). Além disso, a redução do título de fagos armazenados em temperaturas negativas (-20 °C) pode ocorrer devido à destruição das partículas causada pelos cristais de gelo formados durante o congelamento (WARREN e HATCH, 1969). Já temperaturas em torno de 70 °C ou acima, são capazes de inativar fagos que infectam bactérias mesófilas (COFFEY et al., 2011; LEE et al., 2016) devido a destruição de ligações dissulfeto. O efeito protetor das ligações dissulfeto nas proteínas dos fagos é o mesmo encontrado naturalmente em outras proteínas, reforçando a importância de tais ligações na estabilização térmica em outros sistemas biológicos (CALDEIRA e PEABODY, 2007).

Luz

Fagos podem ser inativados exponencialmente por luz ultravioleta a taxas variáveis (ADAMS, 1959) e isto é geralmente devido a danos causados no material genético. Raios UV incluem UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (100 a 280 nm). A radiação UVB causa danos diretos ao DNA com a produção de dímeros de bases pirimídicas (PFEIFER, 1997) e a UVC impede a adsorção dos fagos (HANDELSMAN e STABB, 1996).

2. ENCAPSULAMENTO

O encapsulamento é definido como um processo que aprisiona uma substância dentro de outra, formando partículas com tamanhos que variam de nanômetros a milímetros de diâmetro. A substância encapsulada é denominada material do núcleo, agente ativo, material de preenchimento ou fase interna e que encapsula, de revestimento, membrana, material de parede, matriz ou fase externa (ZUIDAM e SHIMONI, 2010).

Materiais de encapsulamento

A etapa inicial para o encapsulamento é a seleção do material de parede adequado. Substâncias de revestimento podem ser selecionadas a partir de uma variedade de polímeros

naturais ou sintéticos (Tabela 1), dependendo do material a ser revestido e das características desejadas nas cápsulas (CUI et al., 2000).

Tabela 1 - Materiais naturais utilizados para encapsulamento

Origem	Carboidratos	Proteínas	Lipídios
Vegetal	Amido e derivados	Glúten (milho) Isolados de (ervilha, soja)	Ácidos/álcoois graxos Glicerídeos Ceras Fosfolipídios
	Celulose e derivados Exsudados de plantas - Goma arábica - Goma de karaya - Goma mesquite		
	Extratos de plantas - Galactomanana - Soja solúvel		
Marinha	Polissacarídeos - Carragena - Alginato		
Microbiana/animal	Xantana Gelena Dextrano Quitosana	Caseínas Proteínas do soro Gelatina	Ácidos/álcoois graxos Glicerídeos Ceras Fosfolipídios

Fonte: Wandrey et al. (2010) adaptado.

Os principais materiais de parede utilizados incluem carboidratos (derivados de amido e celulose), extratos e exsudados de plantas (diversas gomas e pectina), extratos marinho (alginato e carragena), polissacarídeos de origem animal/microbiano (xantana e quitosana), lipídios (ceras, fosfolipídios e ácidos graxos) e proteínas (glúten, caseína, gelatina, proteínas do soro de leite) (WANDREY et al., 2010).

O material de parede ideal deve ter baixa viscosidade em concentrações elevadas; fácil manipulação durante o processo; baixa higroscopicidade para evitar aglomeração; habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o agente ativo; não ser reativo com o material a ser encapsulado; habilidade de aprisionar o material ativo dentro da estrutura da cápsula e ter baixo custo (SHAHIDI e HAN, 1993).

Alginato

As algas são fonte de diferentes tipos de polissacarídeos que podem ser usados para muitas aplicações industriais. Alginato e carragena são exemplos de materiais de parede úteis para encapsulamento no setor de alimentos (WANDREY et al., 2010). Alginato de sódio é um material comumente usado como suporte, compatível com quase todos os métodos de encapsulamento e geralmente, usado em combinação com outros componentes (BURGAIN et al., 2011).

Alginatos são polímeros pertencentes da família dos polissacarídeos lineares não ramificados. São constituídos por duas unidades monoméricas, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G) (WANDREY et al., 2010). As unidades M e G em alginatos podem ser organizadas em sequências homogêneas ou heterogêneas de forma aleatória. A composição química e a distribuição da sequência no alginato de sódio dependem das espécies de algas e das peças utilizadas na extração (FU et al., 2011). As cadeias lineares são compostas por regiões homopoliméricas de unidades de M e G intercaladas com regiões de sequências mistas de unidades MG (GRASDALEN et al., 1979) (Figura 2).

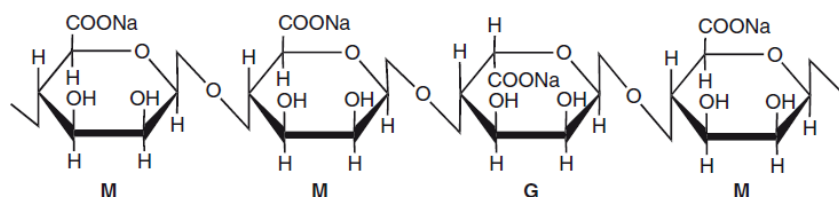


Figura 2 - Principais unidades estruturais de uma cadeia de alginato de sódio. Fonte: Wandrey et al. (2010).

A proporção e o arranjo sequencial das duas unidades estruturais variam muito dependendo do extrato de algas marinhas, do processo de isolamento ou do processo biotecnológico utilizado (Figura 3) (WANDREY et al., 2010).

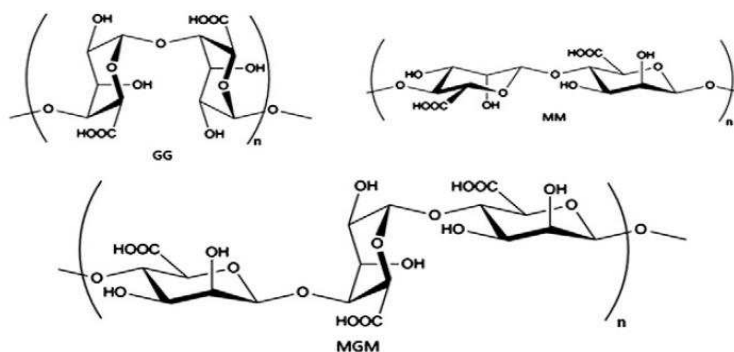


Figura 3 - Fórmula estrutural do alginato. Fonte: Cook et al. (2012).

Alginato de sódio é amplamente usado como agente de gelificação em função de sua capacidade de formar géis em presença de cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} sob condições moderadas. É particularmente adequado para encapsulamento devido às suas condições de GRAS e ausência de toxicidade (GOMBOTZ e WEE, 1998). Devido à presença de grupos de ácido carboxílico nos dois monômeros, o alginato apresenta carga negativa acima de seu pKa (3,3-3,5). O gel é formado por ligação das unidades de G com cátions, resultando em uma rede tridimensional que é mantida por interações iônicas. A estrutura que melhor descreve esta rede é o "modelo caixa de ovos" entre quatro resíduos de ácido gulurônico (Figura 4) (SIMPSON et al., 2004).

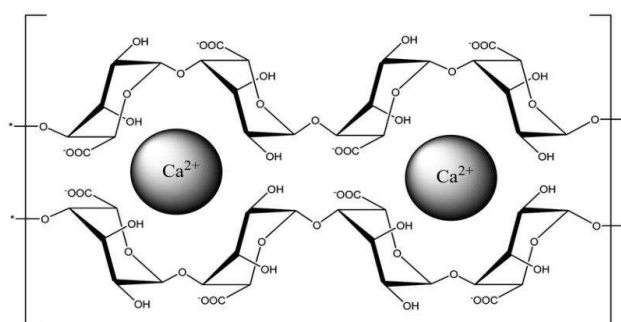


Figura 4 - Modelo caixa de ovos em alginato de cálcio. Fonte: Marriott et al. (2014).

Carragena

Carragena é um polissacarídeo extraído com água ou solução aquosa alcalina a partir de algas marinhas vermelhas comestíveis da classe *Rhodophyceae*. Na indústria de alimentos, a goma carragena tem aplicações como agente gelificante, espessante e estabilizante (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013; KOLESNYK et al., 2015). Esse carboidrato também é amplamente usado como matriz de encapsulamento para liberação controlada seja de forma combinada, principalmente com alginato, ou isoladamente (BURGAIN et al., 2011; KOLESNYK et al., 2015, WANDREY et al., 2010).

A molécula de carragena é um polissacarídeo hidrofílico linear de alto peso molecular constituído por moléculas do dissacarídeo formado por β -D-galactose e 3-6 anidro- α -D-galactose (3,6-AG) unidos por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ e entre si, por ligações $\alpha(1-3)$. As moléculas de galactose e anidro-galactose encontram-se parcialmente substituídas por grupos sulfato, de forma que o polímero é geralmente encontrado na natureza na forma de sais de sódio ou potássio (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013; KOLESNYK et al., 2015; WÜSTENBERG, 2015). A quantidade e a distribuição dos grupos éster sulfato na molécula são responsáveis pelas diferenças físico-químicas observadas entre os diferentes tipos de

carragenas e a proporção desses varia em função da espécie, habitat e estação do ano da colheita das algas (WÜSTENBERG, 2015).

Carragenas podem ser divididas em vários grupos, como λ , κ , ι , ϵ , μ . No entanto, as de aplicação comercial são divididas em três grupos: Kappa (κ), Iota (ι) e Lambda (λ) e são diferenciadas de acordo com a posição e o número de grupos de éster sulfato e pelo o conteúdo de 3,6-AG. κ -carragena contém (25 % a 30 %) de éster sulfato e (28 % a 35 %) de 3,6-AG. ι -carragena contém (28 % a 30 %) de éster sulfato e (25 % a 30 %) de 3,6-AG. λ -carragena contém (32 % a 39 %) de éster sulfato e não contém 3,6-AG (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013; WÜSTENBERG, 2015). Quanto maior o grau de sulfatação, devido à repulsão eletrostática entre as cadeias lineares, menor é a temperatura de solubilização e géis mais fracos (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013). A Figura 5 mostra a estrutura principal dos diferentes tipos de carragena.

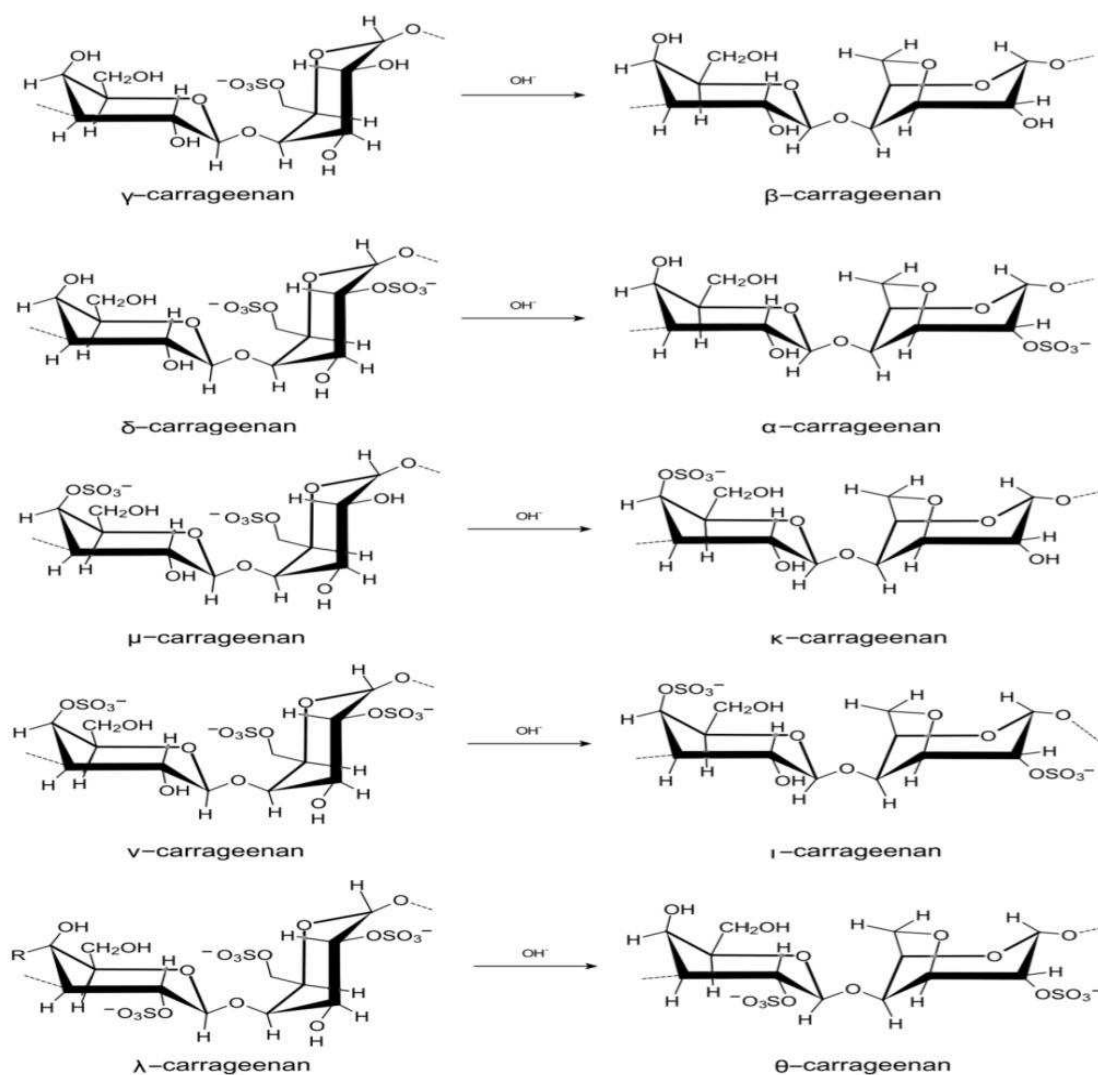


Figura 5 - Principais unidades estruturais das diferentes cadeias de carragena. Fonte: Necas e Bartosikova (2013).

As moléculas de κ -carragena e ι -carragena formam gel na presença de íons potássio ou cálcio, enquanto a λ -carragena não forma gel devido ao alto grau de sulfatação, sendo a espécie mais solúvel. Esse polissacarídeo é capaz de aumentar a viscosidade de uma solução de forma quase exponencial com o aumento da concentração de polímero. Entretanto, em soluções muito ácidas ou em temperaturas elevadas está sujeita a hidrólise, o que leva a uma perda de sua funcionalidade (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013; WÜSTENBERG, 2015). A κ -carragena é capaz de formar cápsulas de diferentes formas e tamanhos pela técnica da extrusão, devido sua capacidade de formar géis helicoidais estáveis na presença de cátions, especialmente potássio e cálcio (BANERJEE e BHATTACHARYA, 2012; BURGAIN et al., 2011; KOLESNYK et al., 2015). Durante a gelificação, ocorre formação de uma estrutura helicoidal da molécula seguida pela agregação entre as cadeias helicoidais por meio de ligações intermoleculares (BANERJEE e BHATTACHARYA, 2012).

Proteínas do soro de leite

O leite de vaca tem uma composição média de 87,2 % (m/m) de água, 3,5 % (m/m) de proteínas, 3,7 % (m/m) de gordura, 4,9 % (m/m) de lactose e 0,72 % (m/m) de minerais (KONTE, 1999; GUETOUACHE et al., 2014). A fração proteica do leite pode ser dividida em duas porções: a fração coloidal, que compreende as caseínas (80 %, m/m) e a fração aquosa, que compreende as proteínas do soro (20 %, m/m) (GUETOUACHE et al., 2014; SZWAJKOWSKA et al., 2011; WONG et al., 1996). Proteínas do soro de leite são formadas basicamente de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glico-macropéptídeos (SZWAJKOWSKA et al., 2011) e são consideradas coprodutos da indústria de laticínios, muitas vezes tendo fins para ração animal ou outros produtos lácteos (SZWAJKOWSKA et al., 2011; TSAKALI et al., 2010).

Proteínas do soro de leite vêm sendo usadas como agentes de encapsulamento pelo baixo custo, fácil obtenção e boa estabilidade (TSAKALI et al., 2010). O uso das proteínas do soro desnaturadas (VIDHYALAKSHMI et al., 2009) ou combinadas com polímeros de carboidratos, especialmente o alginato (CHEN et al., 2014), vem sendo usada para o encapsulamento de bactérias probióticas devido sua capacidade de formar géis estáveis (VIDHYALAKSHMI et al., 2009). Também são usadas no encapsulamento de fármacos e aromas hidrofóbicos (GIROUX e BRITTEN, 2011; SATPATHY e ROSENBERG, 2003), em sistemas de liberação controlada (GUNASEKARAN, KO e XIAO, 2007) e no

encapsulamento de fagos para ensaios gastrointestinais *in vitro* (MA et al., 2016; VONASEK, LE e NITIN, 2014).

A formação de gel pelas proteínas do soro, bem como dos géis formados pelas demais proteínas, pode ser por meio de ligações cruzadas não covalentes (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) e menos frequentemente, por interações covalentes, como ligações dissulfeto (TOTOSAUS et al., 2002). A estabilidade e as características físicas e químicas do gel de proteína influenciam diretamente nas características e propriedades das cápsulas, bem como nas propriedades dos polímeros usados em formulações combinadas (CHEN et al., 2014; TOTOSAUS et al., 2002).

Quitosana

A quitina é a principal fonte de quitosana na natureza, sendo encontrada em alguns micro-organismos e em certos fungos. O principal processo de obtenção da quitosana é por desacetilação alcalina da quitina de crustáceos (WANDREY et al., 2010).

Quitosana é um polissacarídeo linear considerado um copolímero formado de ligações β -(1-4) de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina distribuídos aleatoriamente (Figura 6) (WINTEROWD e SANDFORD, 1995) e a fração de unidades de acetil-glucosamina, indica o grau de acetilação (DA).

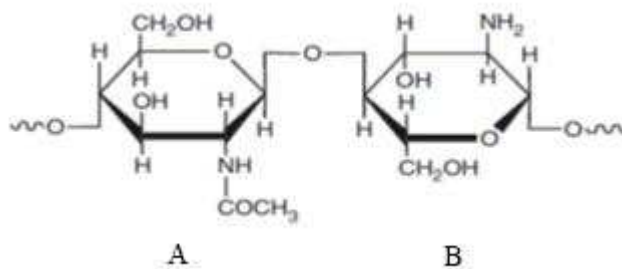


Figura 6 - Principal estrutura química da quitosana, acetilada (A) e desacetilada (B). Fonte: Wandrey et al. (2010).

Quitosana pode ser classificada como um não permanente polieletrólito catiônico, sendo mais multifuncional quimicamente que a quitina, em razão da presença de grupos amino livres e também de sua solubilidade em certas soluções ácidas. Quitosana forma soluções viscosas em meio ácido, não tóxicas e biodegradáveis, sendo capazes de formar filmes, fibras e membranas (MATHUR e NARANG, 1990; MUZZARELLI, 1973). Devido aos resíduos de amina na cadeia, o composto apresenta pKa de 6,3-7,0, sendo insolúvel em pH acima deste pKa (SOGIAS et al., 2010). A quitosana tem sido bastante utilizada no

encapsulamento, principalmente no revestimento de microcápsulas, por ser biodegradável por bactérias do cólon, apresentar biocompatibilidade, hipoalergenicidade e propriedades mucosivas que otimizam a penetração de macromoléculas pelas barreiras intestinais (KANMANI et al., 2011). O aumento da natureza catiônica da quitosana (aumento da capacidade para tamponar o ácido) em relação ao alginato, explica a proteção em ambientes ácidos.

Métodos de encapsulamento

A seleção do método de encapsulamento depende do tipo de agente ativo, das propriedades físico-químicas da matriz, das aplicações do material encapsulado, do mecanismo de liberação necessário e do custo. Esses parâmetros devem ser estudados para cada biomolécula e processo específicos (BURGAIN et al., 2011; HUERTAS, 2010).

Dois tipos principais de encapsulamentos podem ser distinguidos: o tipo reservatório e o tipo matriz. O tipo reservatório forma uma camada ao redor do agente ativo e, pode ser denominado de cápsula. O tipo matriz possui várias câmaras de reservatório em uma partícula e o agente ativo está disperso sobre o material de suporte, bem como na superfície (Figura 7).

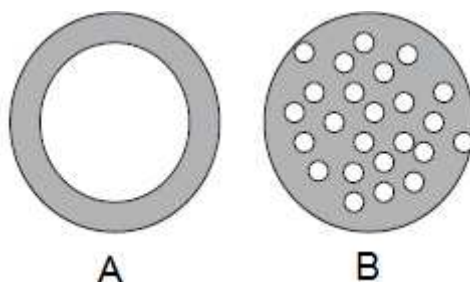


Figura 7 - Encapsulamentos dos tipos reservatório (A) e matriz (B). Agente ativo (branco) e material de parede (cinza). Fonte: Zuidam e Shimoni, (2010) adaptado.

Vários métodos podem ser utilizados para encapsulamento, dentre os quais se destacam os métodos físicos (i): *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão, cocristalização e liofilização; químicos (ii): inclusão molecular e polimerização interfacial; e os físico-químicos (iii): coacervação, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (SANTOS et al., 2000).

O Quadro 2 resume as tecnologias de encapsulamento mais comuns.

Quadro 2 - Visão geral dos processos de encapsulamento

Tecnologia	Etapas do processo	Morfologia	Tamanho da partícula (µm)
<i>Spray-drying</i>	1. Dispersar ou dissolver o agente ativo em solução aquosa de revestimento 2. Atomizar 3. Desidratar	Matriz	10 - 400
Leito fluidizado	1.Fluidificar as partículas 2. Revestimento por pulverização 3. Desidratar ou resfriar	Reservatório	5 - 5 000
Emulsificação	1.Dissolver o agente ativo e emulsificantes em água ou óleo 2. Misturar as fases de óleo e água sob cisalhamento	Matriz	0,2 - 5 000
Coacervação	1. Preparar emulsão O/A com agente ativo lipofílico na fase oleosa 2. Misturar sob condições de turbulência 3.induzir três fases imiscíveis 4. Refrigerar	Reservatório	10 - 800
Esferas por extrusão	1. Dissolver ou dispersar o agente ativo na solução de alginato 2. Gotejar em banho de gelificação	Matriz	200 - 5 000
Co-extrusão	1.Dissolver ou dispersar o agente ativo em óleo 2. Preparar revestimento aquoso ou oleoso 3. Usar um bico concêntrico e pressionar simultaneamente a fase oleosa através do bocal interno e a fase aquosa através de um externo 4. Queda em banho de gelificação ou de resfriamento	Reservatório	150 - 8 000
Complexos de inclusão	1. Misturar o agente ativo, água e material de parede 2. Incubar e secar	Inclusão molecular	0,001 - 0,01
Liofilização	1. Dissolver ou dispersar o agente ativo e o material de parede em água 2. Congelar a amostra 3. Secar sob baixa pressão	Matriz	20 - 5 000

Fonte: Zuidam e Shimoni, (2010) adaptado.

Os mecanismos de liberação mais comuns são térmico, físico e por dissolução. No mecanismo de liberação térmico, o material de parede se funde liberando o agente ativo durante a mudança de temperatura. A liberação física ocorre por ruptura física das cápsulas, normalmente empregado para liberar o agente ativo durante a mastigação. No método de dissolução, o material de parede é solúvel em água (LAKKIS, 2016).

3. GELIFICAÇÃO

Gel pode ser definido como o sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios (ILER, 1979). Uma variedade de sistemas que exibem consistência semissólida como, soluções de polímeros sintéticos ou naturais, surfactantes com polímeros, suspensões coloidais, são denominados de gel (DJABOUROV, 1991; KUMAR e DOUGLAS, 2001). Géis são particularmente usados na indústria de alimentos como agentes texturizantes, e na indústria farmacêutica em cosméticos, tintas e no encapsulamento de drogas para liberação controlada (DJABOUROV, 1991; MALDAL et al., 2010; RAO et al., 2010).

Os mecanismos de formação de géis são diversos, sendo os principais formados por reações químicas, união física ou complexação iônica. Os géis formados por reações químicas (como copolimerização e policondensação) apresentam redes ramificadas de polímeros de cadeias lineares flexíveis covalentemente ligados e cercados por uma grande quantidade de solvente. Esta é a principal forma de gelificação em géis de proteínas e polímeros sintéticos, tal como a poliácridamida (Figura 8a) (ALLEONI, 2006; DJABOUROV, 1991).

Outro método de gelificação é uma cristalização parcial de cadeias lineares ou uma transição helicoidal conformacional que dá origem a géis termicamente reversíveis. Estes são denominados géis físicos (Figura 8b) e são geralmente macios, podendo sustentar grandes deformações, como a gelatina. Entretanto, alguns podem ser fortes e quebradiços como géis de agarose, geralmente formados por biopolímeros em solventes aquosos sob baixas temperaturas (DJABOUROV, 1991; KUMAR e DOUGLAS, 2001).

A terceira forma conhecida de gelificação é a complexação iônica, como ocorre em alginatos e pectinas, formando géis na presença de cálcio (estrutura "caixa de ovos") (Figura 8c).

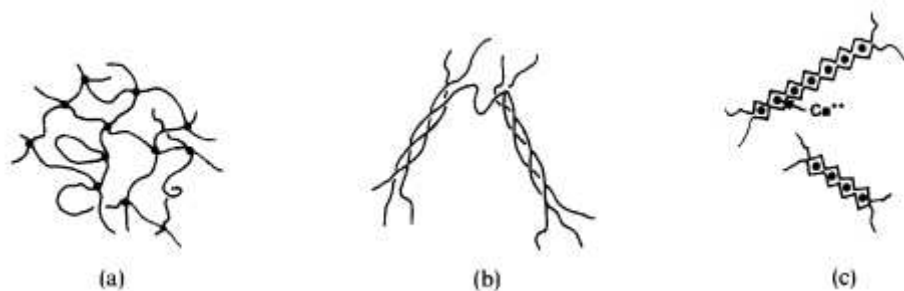


Figura 8 - Estrutura de géis químicos do tipo “redes de pesca” (a), géis de tripla-hélice de gelatina (gel físico) (b) géis com estrutura “caixa de ovos” de pectina e alginato (c). Fonte: Djabourov (1991) adaptado.

4. *Escherichia coli* O157:H7 E PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Para a indústria de alimentos, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: deterioradoras e patogênicas. As bactérias deterioradoras podem causar alteração nas características sensoriais dos alimentos, no entanto, não provocam nenhum risco direto ao consumidor (RAWAT, 2015; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2009). Por outro lado, as bactérias patogênicas podem acarretar em algum tipo de toxinfecção alimentar ao homem, mesmo quando presentes em pequeno número em produtos alimentícios contaminados (BEHLING et al., 2010). As bactérias patogênicas podem ser ainda, subdivididas em duas classes: as causadoras de infecções e as causadoras de intoxicações alimentares. Para exercer efeito patogênico, as bactérias causadoras de infecções devem adentrar por via oral no hospedeiro e colonizar os tecidos internos do corpo, sendo a mucosa intestinal o alvo principal. Por outro lado, as bactérias causadoras de intoxicações multiplicam-se no próprio alimento e nele produzem enterotoxinas, que ao serem consumidas causam algum tipo de gastroenterite (BEHLING et al., 2010; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2009).

As bactérias patogênicas veiculadas por alimentos são um caso de saúde pública, uma vez que a globalização e o aumento no consumo de produtos industrializados não seguros podem causar surtos em populações inteiras (PANIZZON et al., 2015; ROASTO, HÖRMAN e HÄNNINEN, 2012). Sendo assim, o controle de bactérias patogênicas é um assunto de grande importância nos dias atuais. Os quatro principais agentes patogênicos alimentares de origem animal são *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, e *Listeria*. Estas bactérias são contaminantes comuns de ruminantes, aves e suínos e, geralmente, estão presentes em seu trato gastrointestinal de forma assintomática (SILLANKORVA et al., 2012).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa e o sorotipo O157:H7, em particular, classificada como produtora da Shiga toxina, é um agente patogênico de intoxicação alimentar bem conhecida (CDC, 2011). Seu principal reservatório compreende ruminantes e, uma vez que podem sobreviver em condições intestinais, se os cuidados adequados não forem tomados durante o abate, os conteúdos dos intestinos e material fecal podem contaminar as carnes (KAPER, 1998). A via comum de transmissão de *E. coli* aos seres humanos é por meio de alimentos contaminados mal cozidos, enquanto a água e o leite cru estão relacionados a contaminação cruzada, por contato direto ou indireto com fezes. Este micro-organismo é altamente virulento e uma ameaça à saúde pública, pois a ingestão de uma concentração tão baixa como 10 células é capaz de causar infecção (CDC, 2011; RUSSELL et al., 2000;

WHICHARD et al., 2003). A terapia com fagos para diminuir os níveis de *E. coli* em animais tem se concentrado, principalmente, em aves e ruminantes (SILLANKORVA et al., 2012). Apesar de alguns resultados bem sucedidos na terapia com fagos em ruminantes, a maioria dos artigos publicados relata que a administração oral de fagos, direta ou adicionados à água potável ou na ração animal, não tem sido bem sucedido na redução dos níveis de *E. coli*, devido a baixa resistência dos fagos em ambiente gástrico ácido (SILLANKORVA et al., 2012).

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Reologia

A reologia é a área da ciência em que se estuda a deformação e o escoamento de fluidos complexos (líquidos e gases) exercidos de alguma tensão ou força externa. Sobre algum tipo de tensão, os materiais sólidos exercem uma resposta elástica e podem resistir a essa força e retornar a sua forma original. No entanto, fluidos deformam e escoam-se quando aplicado alguma tensão (CHHABRA, 2010; NGUYEN e NGUYEN, 2012), sendo utilizado o termo viscosidade e não, elasticidade. A viscosidade de um fluido, seja ele líquido ou gás, é definida como a resistência ao escoamento quando aplicada uma tensão de cisalhamento sob temperatura constante (CHHABRA, 2010).

Para fluidos complexos, o comportamento reológico é determinado pelo equipamento denominado reômetro. O equipamento fornece a curva de fluxo, mostrando a relação entre a taxa de deformação, no eixo das abscissas, e a tensão de cisalhamento, no eixo das ordenadas, sob condições estabelecidas de temperatura e pressão (IBARZ, CASTELL-PEREZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 2009; NGUYEN e NGUYEN, 2012). Os fluidos podem ser divididos em newtonianos, não-newtonianos e viscoelásticos, de acordo com o comportamento reológico.

Fluidos newtonianos apresentam uma relação linear e diretamente proporcional entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, enquanto os fluidos não-newtonianos a viscosidade depende da taxa de deformação. Já os fluidos viscoelásticos, ainda muito pouco compreendidos, são aqueles que apresentam características intermediárias entre fluidos e sólidos, isto é, apresentam comportamento viscoso e elástico simultaneamente (IBARZ, CASTELL-PEREZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 2009). Fluidos não-newtonianos podem ser classificados em dois grupos: independentes e dependentes do tempo, de acordo com a

relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, podendo mostrar uma menor ou maior dependência da duração do cisalhamento, respectivamente. Os fluidos não-newtonianos independentes do tempo são, ainda, subdivididos em dilatantes, pseudoplásticos e plásticos de Bingham, enquanto os dependentes do tempo em tixotrópicos e reopéticos (CHHABRA, 2010; IBARZ, CASTELL-PEREZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 2009).

Fluidos não-newtonianos independentes do tempo são classificados como dilatantes quando se observa um comportamento diretamente proporcional entre a viscosidade aparente e a taxa de deformação, enquanto fluido pseudoplástico, a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de deformação (ALVAREZ e CANET, 2013; CHHABRA, 2010; NGUYEN e NGUYEN, 2012). Já os fluidos do tipo plásticos de Bingham comportam-se como sólidos até uma tensão crítica, absorvendo a energia de tensão sem escoar; alcançado o limiar do estresse crítico, o material passa a escoar. Além disso, os fluidos plásticos de Bingham podem ser comparados aos fluidos newtonianos em tensões de cisalhamento maiores que zero (CHHABRA, 2010). O comportamento reológico de fluidos não-newtonianos independentes do tempo encontra-se representado na Figura 9.

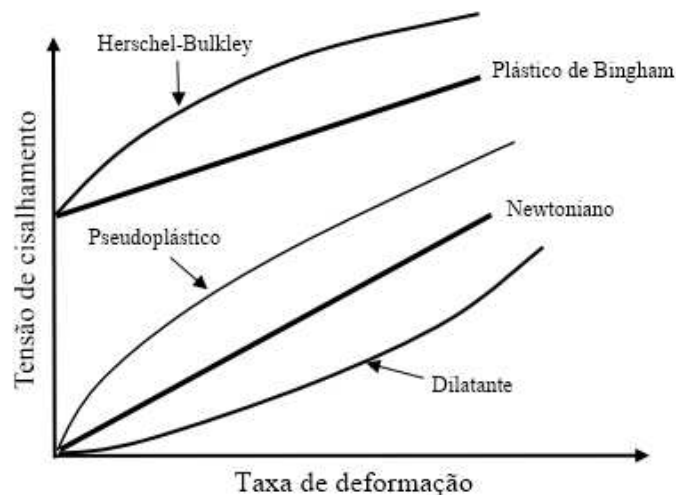


Figura 9 - Comportamento reológico de fluidos não-newtonianos independentes do tempo. Fonte: Nguyen e Nguyen (2012) adaptado.

Um fluido tixotrópico é aquele no qual a viscosidade aparente diminui com o tempo a uma taxa de deformação constante, enquanto os fluidos reopéticos, a viscosidade aparente do fluido aumenta nas mesmas condições (CHHABRA, 2010; POTANIN, 2004). O comportamento reológico de fluidos não-newtonianos dependentes do tempo encontra-se representado na Figura 10.

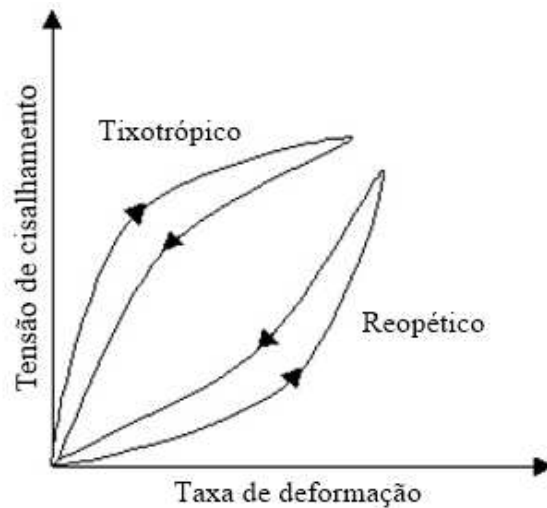


Figura 10 - Comportamento reológico de fluidos não-newtonianos dependentes do tempo. Fonte: Chhabra (2010) adaptado.

De acordo com a característica do fluido, existe uma modelagem matemática apropriada para o estudo do comportamento reológico (Quadro 3).

Quadro 3 - Equações de modelos matemáticos para a caracterização reológica

Modelo matemático	Equação
Newtoniano	$\tau = \mu \dot{\gamma}$
Ostwald-de-Waele	$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad n < 1$
Dilatante	$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad n > 1$
Plástico de Bingham	$\tau = \tau_0 + \mu \dot{\gamma}$
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n$

Fonte: Castro, Covas e Diogo (2001) adaptado. τ : tensão de cisalhamento, μ : viscosidade aparente, $\dot{\gamma}$: taxa de deformação, n : índice de comportamento do escoamento, K : índice de consistência, τ_0 : tensão crítica de cisalhamento.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento que gera imagens de alta resolução e magnificação na faixa de 1 μm a 1 nm, usando elétrons de alta energia, entre 2 e 1000 keV. Dessa forma, se o material for significativamente espesso, os elétrons não são transmitidos através do material, o que fornece informação para a formação da imagem são as partículas (elétrons, raios X e fótons) que emergem da superfície do analito (VERNON-PARRY, 2000).

Em microscopia eletrônica de varredura, a sonda fina de elétrons com energias em torno de 40 keV é focada no analito e é escaneada ao longo de um padrão de linhas paralelas. Com isso, vários sinais são gerados e coletados para formar uma imagem da superfície da amostra. Ocorre a partir da amostra a emissão de elétrons secundários, com energia menor que os elétrons emitidos pela sonda, elétrons de alta energia retrodispersos do feixe primário e raios-X característicos (BOGNER et al., 2007). Essa resposta é coletada por vários detectores para formar a imagem (VERNON-PARRY, 2000). A MEV pode fornecer informações sobre a topografia de superfícies, estrutura cristalina de materiais, composição química e comportamento elétrico da parte superior 1 µm ou mais da amostra (BOGNER et al., 2007; VERNON-PARRY, 2000).

Para a análise de materiais biológicos, é necessário um revestimento com algum material metálico condutor (alumínio, ouro, platina, cromo, tungstênio, tântalo, paládio e outros) sobre a amostra fixada e seca, o que altera a estrutura do material (BOGNER et al., 2007; SAMMONS e MARQUIS, 1997; VERNON-PARRY, 2000). O uso do MEV sob baixo vácuo permite a observação de espécimes que não foram fixados, secos ou revestidos com um material condutor, de forma que a imagem gerada corresponde a morfologia real do espécime (MIYAZAKI et al., 2012; SAMMONS e MARQUIS, 1997)

Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

O microscópio confocal de varredura a laser é capaz de perceber emissão de fluorescência variando de 400 a 750 nm (DEY, 2011; PADDOCK, 1999; TATA e RAJ, 1998) e tem a capacidade de distinguir e descartar a luz emitida de planos diferentes ao plano focal, gerando imagens com melhor foco (TATA e RAJ, 1998). Este microscópio gera imagens com contrastes nos mais diferentes tipos de materiais, se tornando uma ferramenta essencial em diversas áreas. Os equipamentos mais modernos são equipados com sistemas de laser controlados por filtros sintonizáveis acústicos de alta velocidade, que permitem uma regulação muito precisa do comprimento de onda e da intensidade de excitação (DEY, 2011).

As vantagens de usar MCVL incluem alta resolução das imagens e riqueza de detalhes, devido ao agente contrastante. Para o estudo de bacteriófagos, o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), é o corante mais usado na marcação de proteínas (excitação entre 495 e 521 nm) (BAKSHAYESHI et al., 2011; GITIS et al., 2002). Este fluoróforo interage com o grupamento amina livre do aminoácido lisina, presente em grande quantidade no capsídeo de fagos e outras entidades virais (BAKSHAYESHI et al., 2011).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann, H. W. (1998). Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Advances in virus research*, 51, 135-201.
- Ackermann, H. W. (2005). Bacteriophage classification. *Boca Raton, FL: CRC Press* 67-90.
- Ackermann, H. W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsletter*, 38, 35-40.
- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. *Bacteriophages*.
- Albino, L. A. A. (2016). Utilização de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella* sp. 115 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. 2016.
- Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63(3), 291-298.
- Alvarez, M. D., & Canet, W. (2013). Time-independent and time-dependent rheological characterization of vegetable-based infant purees. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 449-464.
- Bakhshayeshi, M., Jackson, N., Kuriyel, R., Mehta, A., van Reis, R., & Zydney, A. L. (2011). Use of confocal scanning laser microscopy to study virus retention during virus filtration. *Journal of membrane science*, 379(1), 260-267.
- Banerjee, S., & Bhattacharya, S. (2012). Food gels: gelling process and new applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(4), 334-346.
- Behling, R. G., Eifert, J., Erickson, M. C., Gurtler, J. B., Kornacki, J. L., Line, E., Radcliff, R., Ryser, E. T., Stawick, B., & Yan, Z. (2010). Selected pathogens of concern to industrial food processors: infectious, toxigenic, toxico-infectious, selected emerging pathogenic bacteria. In *Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment* (pp. 5-61). Springer New York.
- Bogner, A., Jouneau, P. H., Thollet, G., Basset, D., & Gauthier, C. (2007). A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-STEM” imaging. *Micron*, 38(4), 390-401.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P., & Rohwer, F. (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of bacteriology*, 185(20), 6220-6223.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
- Caldeira, J. C., & Peabody, D. S. (2007). Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. *Journal of nanobiotechnology*, 5(1), 10.
- CDC. (2011) CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States, Center for Disease Control and Prevention (CDC).

- Chen, M. Y., Zheng, W., Dong, Q. Y., Li, Z. H., Shi, L. E., & Tang, Z. X. (2014). Activity of encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-whey protein microspheres. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 736-741.
- Chhabra, R. P. (2010). Non-Newtonian fluids: an introduction. In *Rheology of complex fluids* (pp. 3-34). Springer New York.
- Coffey, B., Rivas, L., Duffy, G., Coffey, A., Ross, R. P., & McAuliffe, O. (2011). Assessment of *Escherichia coli* O157: H7-specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments. *International journal of food microbiology*, 147(3), 188-194.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Arriñez-Soriano, J., Cortés, P., MasPOCH, D., & Llagostera, M. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific reports*, 7.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2011). Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*, 12(7), 2834-2840.
- Cui, J. H., Goh, J. S., Kim, P. H., Choi, S. H., & Lee, B. J. (2000). Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-l-lysine microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 210(1), 51-59
- Dey, V. R. N. The Basics of Confocal Microscopy. *Laser Scanning, Theory and Applications*, 978-953.
- Díaz-Muñoz, S. L., & Koskella, B. (2014). Bacteria-phage interactions in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol*, 89(135), 10-1016.
- Djabourov, M. (1991). Gelation-A review. *Polymer International*, 25(3), 135-143.
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 5, 327-349.
- Floyd, R., & Sharp, D. G. (1979). Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH. *Applied and environmental Microbiology*, 38(3), 395-401.
- Gassilloud, B., & Gantzer, C. (2005). Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 912-920.
- Giroux, H. J., & Britten, M. (2011). Encapsulation of hydrophobic aroma in whey protein nanoparticles. *Journal of microencapsulation*, 28(5), 337-343.
- Gitis, V., Adin, A., Nasser, A., Gun, J., & Lev, O. (2002). Fluorescent dye labeled bacteriophages-a new tracer for the investigation of viral transport in porous media: 1. Introduction and characterization. *Water Research*, 36(17), 4227-4234.
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129-136.

- Gombotz, W. R., & Wee, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 194-205.
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Lopez, M. E. S. & Batalha, L. S. (2016). Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT- Food science and Technology*, 67, 159-166.
- Grasdalen, H., Larsen, B., & Smidsrod, O. (1979). A pmr study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research*, 68(1), 23-31.
- Gregoracci, G. B., Dias da Silveira, W., & Brocchi, M. (2006). The biology of bacteriophages.
- Guetouache, M., Guessas, B., & Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10), 115-122.
- Gunasekaran, S., Ko, S., & Xiao, L. (2007). Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 31-40.
- Handelsman, J., & Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The plant cell*, 8(10), 1855.
- Huertas, R. A. P. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63(2), 5669-5684.
- Hungaro, H. M., Lopez, M. E. S., Albino, L. A. A., Mendonça, R. C. S. (2014). Bacteriophage: the viruses infecting bacteria and their multiple applications. *Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier*. 1-12.
- Ibarz, A., Castell-Perez, E., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Newtonian and Non-Newtonian Flow. *Food Engineering-Volume II*, 11.
- ICTV (2012). Virus taxonomy: release. EC 44, Leuven, July 2012.
- Iler, R. K. (1979). The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. *Canada: John Wiley & Sons Inc.*
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochemical Engineering Journal*, 58, 140-147.
- Kaper, J. B. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current opinion in microbiology*, 1(1), 103-108
- Kolesnyk, I., Konovalova, V., & Burban, A. (2015). Alginate/κ-carrageenan microspheres and their application for protein drugs controlled release. *Chemistry & Chemical Technology*, 9(4), 485-492.
- Konte, M. (1999). Le lait et les produits laitiers. Développement de systèmes de productions intensives en Afrique de l'ouest. Université de Nouakchott (RIM) Faculté des Sciences et Technologies des aliments, BP 5026. ISRA/URV-LNERV/FEVRIER: 2-25.

- Kumar, S. K., & Douglas, J. F. (2001). Gelation in physically associating polymer solutions. *Physical review letters*, 87(18), 188301.
- Lakkis, J. M. (2016). Encapsulation and controlled release technologies in food systems. *John Wiley & Sons*.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., & Gantzer, C. (2007). Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1632-1638.
- Lee, H., Ku, H. J., Lee, D. H., Kim, Y. T., Shin, H., Ryu, S., & Lee, J. H. (2016). Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. *PloS one*, 11(12), e0168985.
- Ma, Y. H., Islam, G. S., Wu, Y., Sabour, P. M., Chambers, J. R., Wang, Q. & Griffiths, M. W. (2016). Temporal distribution of encapsulated bacteriophages during passage through the chick gastrointestinal tract. *Poultry Science*, 95(12), 2911-2920.
- Madhusoodanan, J. (2016). Viral Soldiers. *The Scientist*, Issue January 1.
- Mandal, S., Kumar, S. S., Krishnamoorthy, B., & Basu, S. K. (2010). Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 46(4), 785-793.
- Marriott, A. S., Bergström, E., Hunt, A. J., Thomas-Oates, J., & Clark, J. H. (2014). A natural template approach to mesoporous carbon spheres for use as green chromatographic stationary phases. *RSC Advances*, 4(1), 222-228.
- Mathur, N. K., & Narang, C. K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *J. chem. educ*, 67(11), 938.
- Miyazaki, H., Uozaki, H., Tojo, A., Hirashima, S., Inaga, S., Sakuma, K. & Fukayama, M. (2012). Application of low-vacuum scanning electron microscopy for renal biopsy specimens. *Pathology-Research and Practice*, 208(9), 503-509.
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now?. *Letters in applied microbiology*, 51(4), 363-369.
- Muzzarelli, R. A. (1973). Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan. In *Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan*. Pergamon Press.
- Nasser, A. M., & Oman, S. D. (1999). Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research*, 33(7), 1748-1752.
- Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Vet Med*, 58(4), 187-205.
- Nguyen, Q. H., & Nguyen, N. D. (2012). Incompressible non-newtonian fluid flows. In *Continuum Mechanics-Progress in fundamentals and Engineering applications*. InTech.
- Olson, M. R., Axler, R. P., & Hicks, R. E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of virological methods*, 122(2), 147-152.
- Paddock, S. W. (1999). Confocal laser scanning microscopy. *Biotechniques*, 27, 992-1007.

- Panizzon, J. P., Pilz Júnior, H. L., Knaak, N., Ramos, R. C., Ziegler, D. R., & Fiuza, L. M. (2015). Microbial Diversity: Relevance and Relationship Between Environmental Conservation And Human Health. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(1), 137-145.
- Petty, N. K., Evans, T. J., Fineran, P. C., & Salmond, G. P. (2007). Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends in biotechnology*, 25(1), 7-15.
- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and photobiology*, 65(2), 270-283.
- Potatin, A. (2004). Thixotropy and rheopexy of aggregated dispersions with wetting polymer. *Journal of Rheology*, 48(6), 1279-1293.
- Rao, N. R., Kulkarni, U., Deshmukh, A., & Suresh, D. K. (2010). Preparation and characterization of ionotropic cross-linked chitosan microparticles for controlled release of aceclofenac. *International journal of pharmaceutical sciences and drug research*, 2(2), 107-111.
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47-56.
- Raybaudi- Massilia, R. M., Mosqueda- Melgar, J., Soliva- Fortuny, R., & Martín- Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh- cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 8(3), 157-180.
- Roasto, M.; Hörman, A.; Hänninen, M. L (2012). Food-borne Pathogens and Public Health. In: Norrgren, L.; Levensgood, J. *Ecology and Animal Health: Ecosystem Health and Sustainable Agriculture 2*. Uppsala University, p. 271-371.
- Rohwer, F., & Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of bacteriology*, 184(16), 4529-4535.
- Russell, J. B., Diez-Gonzalez, F., & Jarvis, G. N. (2000). Invited review: effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 863-873.
- Sammons, R., & Marquis, P. (1997). Application of the low vacuum scanning electron microscope to the study of biomaterials and mammalian cells. *Biomaterials*, 18(1), 81-86.
- Santos, A. B., Ferreira, V. P., Grosso, C. R. F. (2000). Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de pimenta. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 16(3), 26-30.
- Satpathy, G., Rosenberg, M. (2003). Encapsulation of chlorothiazide in whey proteins: effects of wall-to-core ratio and cross-linking conditions on microcapsule properties and drug release. *Journal of microencapsulation*. 20(2), 227-245.
- Schroeder, C. M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. D., McDermott, P. F., Walker, R. D., & Meng, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 576-581.

- Serwer, P., Wright, E. T., Chang, J. T., & Liu, X. (2014). Enhancing and initiating phage-based therapies. *Bacteriophage*, 4(4), e961869.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 501-547.
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology*, 2012.
- Simpson, N. E., Stabler, C. L., Simpson, C. P., Sambanis, A., & Constantinidis, I. (2004). The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated βTC3 cells. *Biomaterials*, 25(13), 2603-2610.
- Sogias, I. A., Khutoryanskiy, V. V., & Williams, A. C. (2010). Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211(4), 426-433.
- Stanford, K., McAllister, T. A., Niu, Y. D., Stephens, T. P., Mazzocco, A., Waddell, T. E., & Johnson, R. P. (2010). Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 73(7), 1304-1312.
- Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Barłowska, J., Król, J., & Litwińczuk, Z. (2011). Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system—a review. *Anim. Sci. Pap. Rep*, 29(4), 269-280
- Tata, B. V. R., & Raj, B. (1998). Confocal laser scanning microscopy: Applications in material science and technology. *Bulletin of Materials Science*, 21(4), 263-278.
- Tey, B. T., Ooi, S. T., Yong, K. C., Ng, M. Y. T., Ling, T. C., & Tan, W. S. (2009). Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 268.
- Thorne, C. B., & Holt, S. C. (1974). Cold lability of *Bacillus cereus* bacteriophage CP-51. *Journal of virology*, 14(4), 1008-1012.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein- gel induction. *International journal of food science & technology*, 37(6), 589-601.
- Tsakali, E., Petrotos, K., D'Allessandro, A., & Goulas, P. (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In *6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry (FOODSIM 2010)*. CIMO, Braganca, Portugal.
- Vernon-Parry, K. D. (2000). Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, 13(4), 40-44.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., & Subhasree, R. S. (2009). Encapsulation “the future of probiotics”—a review. *Adv Biol Res*, 3(3-4), 96-103.
- Vonasek, E., Le, P., & Nitin, N. (2014). Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, 37, 7-13.

- Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E. (2010). Materials for encapsulation. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 31-100). Springer New York.
- Warren, J. C., & Hatch, M. T. (1969). Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols. *Applied microbiology*, *17*(2), 256-261.
- Whichard, J. M., Sriranganathan, N., & Pierson, F. W. (2003). Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *Journal of food protection*, *66*(2), 220-225.
- Winterowd, J. G., & Sandford, P. A. (1995). Chitin and chitosan. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker*, 441-441.
- Withey, S., Cartmell, E., Avery, L. M., & Stephenson, T. (2005). Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the total environment*, *339*(1), 1-18.
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, *5*(1), 226-235.
- Wong, D. W., Camirand, W. M., Pavlath, A. E., Parris, N., & Friedman, M. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *36*(8), 807-844.
- Wüstenberg, T. (2015). General overview of food hydrocolloids. *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications, First Edition*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-68.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, Springer New York, 3-29.

CAPÍTULO 2

Dispositivo de encapsulamento por extrusão com alginato-polímeros gelificantes para uso em sistemas de transporte de moléculas bioativas

RESUMO

O encapsulamento é uma tecnologia para proteção de compostos gastro-sensíveis aplicados em sistemas de administração oral. O bacteriófago (fago) de *Escherichia coli* O157:H7 (UFV-AREG1) foi utilizado como modelo de biomolécula a ser encapsulada. O objetivo deste trabalho foi investigar o encapsulamento de moléculas bioativas por extrusão para sistemas de administração oral, usando materiais poliméricos. Um dispositivo de encapsulamento por extrusão foi montado para produção das esferas carregadas com fagos. Alginato, carragena, quitosana (polissacarídeos) e proteína do soro de leite foram os polímeros base utilizados. O comportamento reológico das soluções encapsulantes foi determinado e o modelo reológico de Ostwald-de-Waele foi ajustado para as curvas experimentais obtidas. A eficiência de encapsulamento de cada formulação foi determinada e as esferas foram caracterizadas morfolologicamente quanto ao tamanho, forma e aparência física. O sistema montado apresentou potencial para imobilizar outras biomoléculas, além dos fagos, para sistemas de liberação controlada. A elevada carga de fagos nas esferas (cerca de 99 %) foi devido às condições brandas durante o processo de encapsulamento, incluindo a produção e dissolução das esferas. Alginato, carragena, proteína do soro e quitosana foram compatíveis com o fago e têm potencial para encapsulamento por extrusão. As formulações apresentaram comportamento de fluido não-newtoniano pseudoplástico. O tamanho, forma e aparência das esferas variaram com o tipo de material de encapsulamento, mas concentração total de polímero não afetou estes parâmetros. O alginato e os demais polímeros contribuíram para o aumento da viscosidade das formulações, com a quitosana tendo maior efeito no valor do índice de consistência (K). A concentração de alginato não influenciou o diâmetro, a forma e o peso das esferas, mas a adição de quitosana nas formulações afetou as características morfológicas devido ao aumento dos valores de K e redução dos valores do índice de comportamento ao escoamento (n). O sistema de encapsulamento montado a partir de equipamentos convencionais foi compatível com polissacarídeos e proteínas para uso em sistemas de transporte de moléculas bioativas.

Palavras-chave: Bacteriófagos, biomoléculas, encapsulamento, entrega oral, polímeros naturais, UFV-AREG1.

1. INTRODUÇÃO

O encapsulamento é um processo que aprisiona uma substância em um material protetor, formando partículas com tamanhos entre nanômetros a milímetros de diâmetro. A substância encapsulada pode ser chamada de material do núcleo, agente ativo, material de preenchimento ou fase interna, e a que encapsula de revestimento, membrana, material de parede, matriz ou fase externa (ZUIDAM e SHIMONI, 2010).

O encapsulamento é uma tecnologia promissora para proteção de substâncias gastro-sensíveis em sistemas de administração oral, já que alguns químicos (especialmente os de caráter orgânico) podem perder, quando administrados oralmente, a viabilidade e/ou estrutura devido ao pH ácido e as enzimas no estômago durante a passagem pelo trato gastrointestinal (AHMAD et al., 2017; FUCIÑOS et al., 2017).

O método físico de encapsulamento por extrusão se destaca dentre os diversos métodos de encapsulamento, tendo o agente ativo disperso na solução encapsulante a qual é gotejada em uma solução gelificante, formando partículas ligeiramente esféricas (LAKKIS, 2016). A importância do encapsulamento por extrusão tem aumentado devido às suas vantagens, incluindo a formação de esferas sob condições brandas de temperatura e pressão, alta eficiência energética, pouca geração de efluentes, versatilidade de escolha do agente ativo e da matriz encapsulante e variedades de forma e texturas das esferas obtidas (LAKKIS, 2016; WANDREY et al., 2010).

Os materiais encapsulantes mais comuns, geralmente de natureza proteica ou polissacarídica, são isolados de matérias-primas de origem animal, vegetal, microbiana, marinha ou sintética (WANDREY et al., 2010). O polímero usado como agente encapsulante deve proteger a biomolécula encapsulada das condições gastrointestinais e permear as barreiras gastrointestinais ou permitir sua liberação no sítio específico do agente ativo (PÉREZ et al., 2016).

Os alginatos são polímeros da família dos polissacarídeos lineares não ramificados, isolados de algas marinhas e constituídos por unidades monoméricas, ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico, organizadas de forma aleatória (WANDREY et al. 2010). O alginato de sódio, um carboidrato capaz de formar géis com cátions bivalentes como Ca^{+2} , Ba^{+2} ou Sr^{+2}

(GOMBOTZ e WEE, 2012), é um material usado como suporte, compatível com quase todos os métodos de encapsulamento e geralmente, combinado com outros componentes (BURGAIN et al., 2011).

Carragena é um polissacarídeo hidrofílico linear de origem marinha constituído por moléculas de dissacarídeo formado por β -D-galactose e 3-6 anidro- α -D-galactose unidos por ligações glicosídicas β (1-4) e, entre si, por ligações α (1-3). Esse carboidrato é, também, usado como matriz de encapsulamento para liberação controlada de forma combinada, principalmente, com alginato, ou isoladamente (BURGAIN et al. 2011; KOLESNYK et al., 2015, WANDREY et al., 2010). A carragena pode formar partículas de diferentes formas e tamanhos devido a sua capacidade de formar géis em presença de cátions, como K^+ e Ca^{2+} (BANERJEE e BHATTACHARYA, 2012).

Quitosana, um polissacarídeo linear, é considerado um copolímero formado por ligações β (1-4) de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina distribuídos aleatoriamente (WANDREY et al., 2010). Esse polissacarídeo forma, em meio ácido, soluções viscosas não tóxicas e biodegradáveis. A matriz de quitosana pode formar filmes e fibras, sendo utilizada no encapsulamento e, principalmente, no revestimento de micropartículas (MATHUR e NARANG, 1990; MUZZARELLI, 1973; KANMANI et al., 2011).

Proteínas do soro de leite são formadas basicamente de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glico-macropéptídeos (SZWAJKOWSKA et al., 2011). Proteínas do soro, desnaturadas ou combinadas com polímeros de carboidratos, especialmente o alginato, tem sido usadas para o encapsulamento (CHEN et al., 2014; VIDHYALAKSHMI et al., 2009). Esse polipeptídeo forma gel por ligações cruzadas não covalentes (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) e, menos frequentemente, por interações covalentes como ligações dissulfeto (TOTOSAUS et al., 2002).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o encapsulamento de moléculas bioativas por extrusão para sistemas de administração oral, usando materiais poliméricos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação da estirpe bacteriana e bacteriófagos

O bacteriófago UFV-AREG1, isolado de água residual de estábulo, apresenta especificidade para *Escherichia coli* O157:H7 (LOPEZ et al., 2016). A sequência genômica do fago UFV-AREG1 está depositada no GenBank sob número de acesso KX009778.3.

Escherichia coli O157:H7 (ATCC 43895) foi utilizada como estirpe hospedeira do fago. O fago foi propagado por técnica de plaqueamento em dupla camada adaptada de Sambrook e Russell (2001). Uma solução de fago (100 μL) foi misturada com 500 μL de *E. coli* em fase de crescimento exponencial em 5 mL de *soft-agar* Brain Heart Infusion (0,7 %) (BHI-Himedia, Índia) pré-aquecida a 45 °C e vertida na superfície de placas com ágar BHI (1,2 %). As placas foram incubadas durante 18-24 h a $37,0 \pm 0,5$ °C. Seis mililitros de tampão SM estéril (0,1 g mL^{-1} de gelatina- Merck, EUA; 100 mmol L^{-1} NaCl- Vetec, Brasil; 8 mmol L^{-1} MgSO_4 - Chemco, Brasil; 50 mmol L^{-1} Tris-HCl- Sigma-Aldrich, EUA, pH 7,5) foram adicionados à superfície de cada placa. Os fagos eluíram para o tampão a 17 °C/*overnight* em uma plataforma agitadora- *shaker* (Sartorius, Alemanha) a 100 rpm. A suspensão de fago foi coletada e centrifugada (20 min, 10 500 rpm, 4 °C; Beckman J2-MC) e o sobrenadante filtrado em membrana com poro de 0,22 μm . O título dos fagos UFV-AREG1 foi determinado em unidades formadoras de placas (UFP). A solução estoque de fagos foi armazenada em tampão SM a 7 °C até a utilização.

2.2. Montagem do sistema de encapsulamento por extrusão

O sistema foi montado com um compressor de ar (Olidef cz, Brasil), uma bomba de seringa (PHD2000, Harvard Apparatus, EUA) e uma agulha (0,80 mm x 25 mm - 21 G, Becton Dickinson, Brasil). A vazão do líquido e o fluxo de ar foram regulados, respectivamente, pela bomba de seringa e compressor de ar.

2.3. Determinação dos parâmetros operacionais

O fluxo de ar do compressor, a vazão do líquido da bomba de seringa e as concentrações das soluções encapsulantes foram testados para obter gotejamento regular e tamanho adequado das esferas. Os fluxos de ar máximo-médio-mínimo, vazões do líquido de 250 a 2 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, as concentrações das soluções de alginato (baixa viscosidade- Sigma-Aldrich, Brasil) de 0,1 a 3,0 g mL^{-1} e as concentrações das formulações de alginato- (carragena- Sigma-Aldrich, EUA; proteína de soro de leite- 80%, Davisco Foods International, EUA; quitosana- peso molecular médio, Sigma-Aldrich, EUA) de 0,8 a 2,5 g mL^{-1} , foram os parâmetros operacionais testados.

2.4. Preparação dos fagos UFV-AREG1 encapsulados

As soluções de encapsulamento foram preparadas como segue: *alginato*: dissolvido em Tris-HCl (pH 7,5 - 8,0) 50 mmol L^{-1} ; *carragena*: dissolvida em água destilada pré-aquecida; *proteína de soro de leite*: reidratada em água destilada, aquecida a 80 - 90 °C

durante 15 min e resfriada a temperatura ambiente; *quitosana*: dissolvida em solução de ácido acético 1,0 % (v/v). As soluções foram agitadas em *shaker* a 250 rpm/*overnight* a temperatura ambiente de $25,0 \pm 0,5$ °C para a dissolução completa dos polímeros.

Esferas carregadas com fagos UFV-AREG1 foram encapsuladas por extrusão, como descrito. Uma suspensão contendo 10^9 UFP mL⁻¹ de fagos foi adicionada em cada formulação (razão de 1:9 mL g⁻¹) e homogeneizada (IKA Ultra Turrax, Alemanha). Essa mistura foi expelida em solução de CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Brasil) 0,1 mol L⁻¹ a $25,0 \pm 0,5$ °C sob agitação com barra magnética. As esferas formadas foram deixadas endurecer durante 30 min na solução de CaCl₂, lavadas em água destilada, filtradas e armazenadas em tubos estéreis (esferas úmidas) a 7 °C durante cinco meses.

2.5. Determinação dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados viáveis

Fagos UFV-AREG1 encapsulados foram liberados dissolvendo 0,1 g de esferas em 0,9 mL de solução contendo 50 mmol L⁻¹ de citrato de sódio (Neon Comercial, Brasil), 0,2 mol L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Neon Comercial, Brasil) e 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 7,5) sob agitação a $25,0 \pm 0,5$ °C. Os títulos dos fagos UFV-AREG1 livres e liberados das esferas foram determinados como descrito anteriormente e expressos em UFP mL⁻¹ e UFP g⁻¹ de esferas úmidas, respectivamente.

2.6. Eficiência de encapsulamento e marcação com fluorescência para evidência visual de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi determinada pelo cálculo do título dos fagos livres e encapsulados. A porcentagem de eficiência de encapsulamento (EE) dos fagos UFV-AREG1 foi calculada como: EE (%) = [(quantidade de fagos liberados das esferas úmidas/quantidade de fagos inicialmente utilizada para preparar as esferas) x 100].

A marcação por fluorescência dos fagos UFV-AREG1 foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Bakhshayeshi et al. (2011). Um total de 1,2 mL da suspensão de fagos (10^9 UFP mL⁻¹), 0,021 g de fluoresceína-5-isotiocianato (FITC- Sigma-Aldrich, EUA) e 5 mL de N, N-dimetilformamida (DMF- Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados em 4 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 9,2). A suspensão de fagos resultante foi dialisada em tampão SM em membrana de diálise (peso molecular limite de 14 000 Da, Sigma-Aldrich, Brasil). O tampão de diálise foi trocado duas vezes a cada 4 h para remover FITC livre. Os fagos UFV-AREG1 marcados foram encapsulados e visualizados em microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 Meta Laser Scanning-Zeiss, Alemanha).

2.7. Caracterização reológica das soluções encapsulantes

O comportamento reológico das soluções encapsulantes foi determinado em reômetro rotacional de cilindros concêntricos (R/S plus SST 2000, Brookfield) utilizando-se o sensor CC45. O equipamento forneceu os dados de tensão de cisalhamento e taxa de deformação por meio do software RHEOCALC V 1.1. As análises reológicas foram obtidas com variação da taxa de deformação de 0 a 300 s⁻¹ (curva ascendente) e de 300 a 0 s⁻¹ (curva descendente) com tempo de 2 min para cada curva. As medições foram realizadas a 25,0 ± 0,5 °C e tomadas a cada 4 s. O modelo reológico de Ostwald-de-Waele ($\tau = Ky^n$) foi ajustado para as curvas experimentais obtidas.

2.8. Caracterização morfológica das esferas

Trinta esferas, por formulação, foram medidas para a caracterização morfológica (aparência, forma e tamanho) em microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha).

2.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado em triplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (DP). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram analisadas com o teste Tukey no software Minitab 16 (Minitab Inc., EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Montagem do sistema de encapsulamento por extrusão

Os componentes básicos utilizados para a montagem do sistema (compressor de ar, bomba de seringa e agulha) foram adequados para o encapsulamento por extrusão dos fagos UFV-AREG1. As esferas foram formadas pela quebra do jato de líquido laminar quando foi aplicado um fluxo de ar adequado ao jato de líquido (Figura 1).

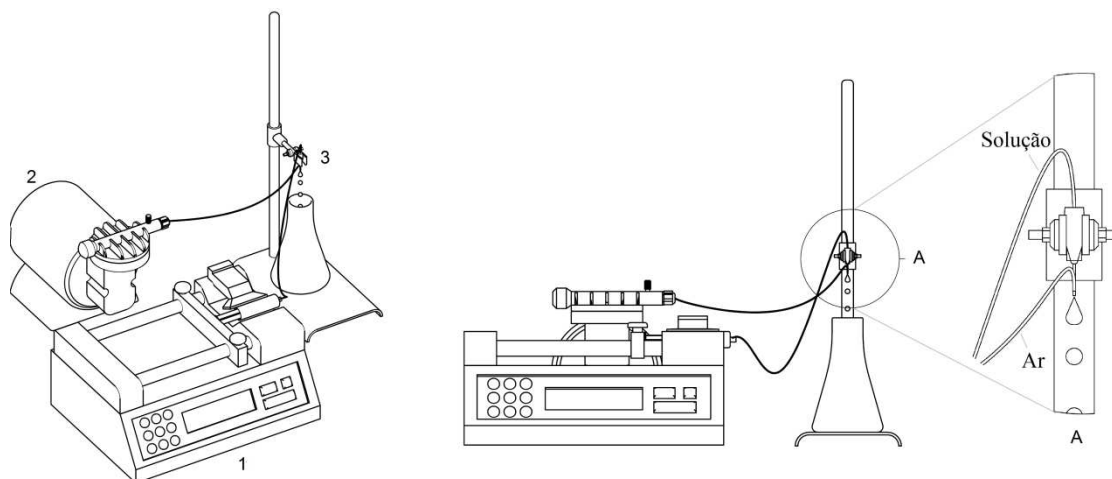


Figura 1 - Esquema do sistema de encapsulamento montado com bomba de seringa (1), compressor de ar (2) e agulha (3). Detalhe do bocal de saída da solução pela agulha (A).

O sistema montado foi eficaz para encapsular fagos UFV-AREG1 em esferas de alginato, alginato-carragenina, alginato-proteína do soro e alginato-quitosana pelo método de extrusão e gelificação induzida por CaCl_2 . O sistema mostra potencial para aplicações na medicina, cosméticos e perfumaria, indústrias de alimentos e biotecnologia e na culinária. Este equipamento pode, também, imobilizar células, enzimas, fármacos, micro-organismos, óleos essenciais e outros (proteínas, carboidratos e lipídios) para sistemas de liberação controlada e em processos de esferificação de alimentos na gastronomia.

O sistema foi compatível com diversos polímeros naturais, operou em temperaturas brandas, manteve a viabilidade das partículas virais devido à baixa tensão de cisalhamento durante a formação das esferas, produziu esferas com ampla gama de tamanhos, otimizou a formação das esferas pelo ajuste da vazão do líquido e fluxo de ar, possibilitou condições estéreis de trabalho, foi de fácil montagem e operação do sistema, produziu maior quantidade de esferas/min em relação a extrusão manual com seringa e tornou acessível a técnica de extrusão sem necessidade de equipamentos comerciais.

3.2. Determinação dos parâmetros operacionais

O tamanho e o número de esferas produzidas por unidade de tempo variaram com a concentração da solução, vazão do líquido e fluxo de ar. O fluxo de ar máximo produziu esferas pequenas e em maior número, independentemente da vazão do líquido ou concentração das soluções (Material suplementar).

A concentração de alginato nas soluções foi um fator relevante que influenciou a formação das esferas. Concentração inferior a 0,5 g mL⁻¹ não produziu esferas e, superior a 3,0 g mL⁻¹, não permitiu a passagem da solução pela agulha devido à elevada viscosidade.

O tamanho homogêneo, a forma esférica regular e a velocidade da produção das esferas, foram os parâmetros observados para selecionar o fluxo de ar, vazão do líquido e as concentrações das formulações encapsulantes. Os melhores resultados foram obtidos com fluxo de ar médio, vazão do líquido de 2 000 µL min⁻¹ e concentrações finais de alginato de 0,75 g mL⁻¹ e 1,0 g mL⁻¹, sozinho ou combinado (razão de 1:1 mL mL⁻¹), em ambas as concentrações, com carragena (1,25 g mL⁻¹), proteína do soro de leite (1,5 g mL⁻¹) e quitosana (0,5 g mL⁻¹) (Tabela 1).

Tabela 1 - Formulações (Form) com diferentes concentrações (g mL⁻¹) de alginato (Alg), carragena (Car), proteína do soro de leite (Prot), quitosana (Qui), total de polímero (Tot) e pH das soluções.

Form	Alg	Car	Prot	Qui	Tot	pH
AL1	0,75	-	-	-	0,75	7,63 ± 0,01
AL2	1,0	-	-	-	1,0	7,62 ± 0,01
AL3	1,5	-	-	-	1,5	7,47 ± 0,01
AL4	2,0	-	-	-	2,0	7,56 ± 0,06
CA1	0,75	1,25	-	-	2,0	7,45 ± 0,05
CA2	1,0	1,25	-	-	2,25	7,38 ± 0,01
WP1	0,75	-	1,5	-	2,25	7,08 ± 0,02
WP2	1,0	-	1,5	-	2,5	7,14 ± 0,01
CH1	0,75	-	-	0,5	1,25	4,58 ± 0,01
CH2	1,0	-	-	0,5	1,5	4,58 ± 0,04

Alginato 0,75 g mL⁻¹ (AL1), Alginato 1,0 g mL⁻¹ (AL2), Alginato 1,5 g mL⁻¹ (AL3), Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹ (CH1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹ (CH2).

3.3. Formação das esferas carregadas com fagos UFV-AREG1

O título inicial do fago UFV-AREG1 antes do encapsulamento estava entre 9,7 e 9,9 log₁₀ UFP mL⁻¹ e as esferas foram preparadas com sucesso em todas as formulações com elevada carga de fagos de 9,6 a 9,9 log₁₀ UFP g⁻¹ de esferas úmidas. O método de extrusão com gelificação do alginato na presença de CaCl₂ apresentou vantagens como elevada carga de fagos UFV-AREG1 nas esferas e manutenção de seu número, com perdas muito baixas no título.

A elevada carga de fagos UFV-AREG1 nas esferas, sem perda significativa no título, foi devido às condições brandas utilizadas durante o processo de encapsulamento, incluindo a

produção e dissolução das esferas. Este resultado é semelhante ao encontrado de baixa redução no título (< 1%) de fagos K encapsulados por extrusão em microesferas de alginato-proteína do soro, em equipamento comercial (TANG et al., 2015).

3.4. Eficiência de encapsulamento e evidência visual do encapsulamento

As eficiências de encapsulamento das formulações foram semelhantes ($p > 0,05$) com média de $99,9 \% \pm 1,1 \%$. O título do fago por esfera variou de 7,8 a $8,7 \log_{10}$ UFP esfera⁻¹ sem diferença ($p > 0,05$) entre as formulações, mostrando que o fago UFV-AREG1 foi eficientemente aprisionado nas dez formulações das matrizes com alginato (Tabela 2).

Tabela 2 - Formulação (Form), produção das esferas (Prod), eficiência de encapsulamento (EE) e título do fago por esfera (Tit) (média \pm DP).

Form	Prod (Esferas min ⁻¹)	EE (%)	Tit (\log_{10} UFP esfera ⁻¹)
AL1	$220 \pm 12^{\text{bcd}}$	$98,7 \pm 1,7^{\text{a}}$	$8,6 \pm 0,9^{\text{a}}$
AL2	$204 \pm 5^{\text{cde}}$	$98,3 \pm 1,7^{\text{a}}$	$8,7 \pm 1,3^{\text{a}}$
AL3	$208 \pm 7^{\text{cde}}$	$99,7 \pm 0,5^{\text{a}}$	$8,2 \pm 0,1^{\text{a}}$
AL4	$234 \pm 8^{\text{b}}$	$100,0 \pm 0,7^{\text{a}}$	$8,1 \pm 0,2^{\text{a}}$
CA1	$213 \pm 19^{\text{bcd}}$	$101,0 \pm 1,7^{\text{a}}$	$7,9 \pm 0,5^{\text{a}}$
CA2	$228 \pm 12^{\text{bc}}$	$99,9 \pm 1,7^{\text{a}}$	$7,9 \pm 0,4^{\text{a}}$
WP1	$266 \pm 10^{\text{a}}$	$101,2 \pm 1,7^{\text{a}}$	$8,1 \pm 0,1^{\text{a}}$
WP2	$241 \pm 6^{\text{b}}$	$100,2 \pm 0,3^{\text{a}}$	$8,4 \pm 0,2^{\text{a}}$
CH1	$194 \pm 13^{\text{de}}$	$101,3 \pm 1,6^{\text{a}}$	$7,8 \pm 0,3^{\text{a}}$
CH2	$189 \pm 12^{\text{e}}$	$98,7 \pm 1,1^{\text{a}}$	$7,8 \pm 0,5^{\text{a}}$

Valores seguidos de mesma letra por coluna não diferem entre si ($p > 0,05$). Alginato 0,75 g mL⁻¹ (AL1), Alginato 1,0 g mL⁻¹ (AL2), Alginato 1,5 g mL⁻¹ (AL3), Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2).

As elevadas eficiências de encapsulamento dos fagos UFV-AREG1 nas dez formulações mostrou que os polímeros alginato, carragena, proteína do soro e quitossana apresentaram boa compatibilidade com o fago, sem efeitos prejudiciais significativos na viabilidade dos mesmos. As eficiências de encapsulamento de fagos UFV-AREG1 podem ser comparadas àquelas dos fagos Felix O1 em microesferas de alginato, $93,3\% \pm 5,7\%$ (MA et al., 2008) e em matriz de alginato-proteína do soro, próximo de 99% (TANG et al., 2013) e a dos fagos K em microesferas de alginato com ou sem carbonato de cálcio, 93% - 95% (MA et al., 2012). Isso mostra que a composição e concentração total de polímero nas esferas não afetaram a eficiência de encapsulamento dos fagos UFV-AREG1.

As proteínas do capsídeo dos fagos UFV-AREG1 foram marcadas via reação dos grupos amina livres nos aminoácidos lisina com FITC (Figura 2a). A fotomicrografia confocal mostrou que fagos UFV-AREG1 estavam inteiramente encapsulados dentro da esfera ao invés de adsorvidos superficialmente, além disso, estavam homogeneamente distribuídos na esfera (Figura 2b).

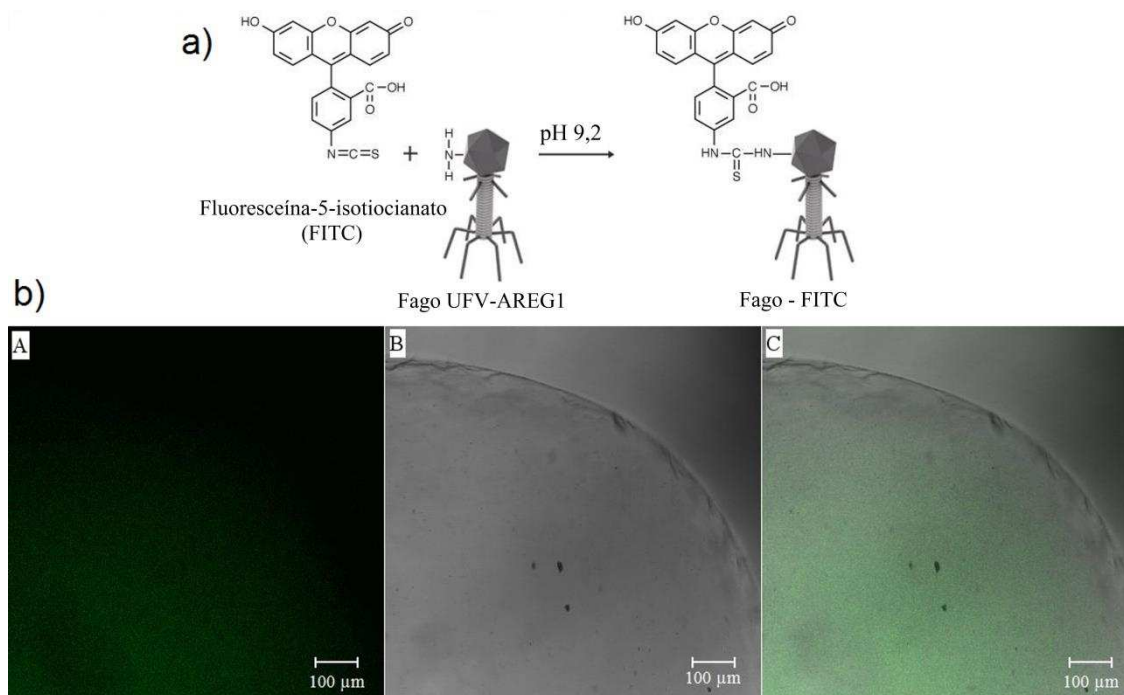


Figura 2 - Reação dos grupos amina livres nos aminoácidos lisina com fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (a). Fotomicrografia confocal de uma esfera de alginato-Ca contendo fagos UFV-AREG1 marcados com FITC (excitação: 490 nm e emissão: 525 nm) (b). Campo fluorescente (A), campo claro (B), sobreposição das fotomicrografias A e B (C). Ampliação de 20X.

A confirmação, pela emissão de fluorescência do FITC, de que os fagos UFV-AREG1 estavam dentro das esferas reforça o resultado de elevada eficiência de encapsulamento dos mesmos. A técnica de fluorescência pode marcar outros fagos e uma diversidade de vírus de mamíferos, pois quase todas estas partículas virais possuem resíduos de lisina em seu capsídeo (BAKSHAYESHI et al., 2011; GITIS et al., 2002). Esta técnica, além de ser uma forma de confirmar o encapsulamento de fagos pelo método de extrusão (PUAPERMPOONSIRI et al., 2009), permite o estudo das dimensões, forma e propriedades físicas de fagos (BAKSHAYESHI et al., 2011), uma vez que o tamanho e a forma dos mesmos não são afetados por esse tipo de marcação fluorescente (GITIS et al., 2002).

3.5. Caracterização reológica das soluções encapsulantes

A relação entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação de todas as formulações usadas para o encapsulamento não foi constante, dessa forma, possuem comportamento reológico de fluido não-newtoniano. As formulações CA1, CA2, CH1 e CH2 apresentaram tixotropia, diminuindo sua viscosidade mesmo sob taxa de deformação constante ($300 \text{ s}^{-1}/5 \text{ min}$). As demais formulações podem ser classificadas como fluidos não-newtonianos independentes do tempo, por terem propriedades reológicas independentes do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento (Figura 3).

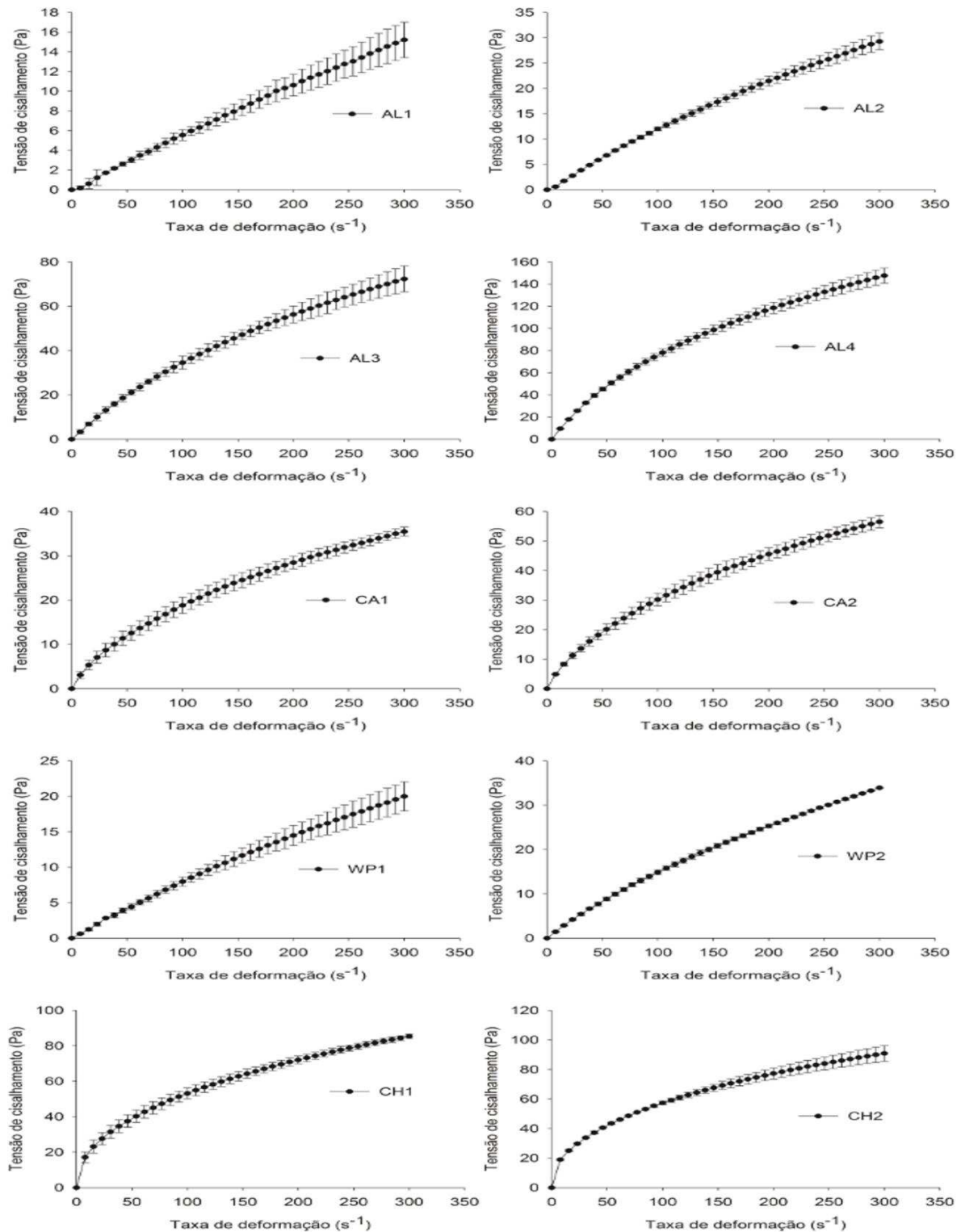


Figura 3 - Reogramas com valores médios de tensão de cisalhamento (τ , Pa) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) por formulação a 25 °C (após a quebra da tixotropia). Rampa ascendente e descendente. Linhas: Modelo de Ostwald-de-Waele. Alginato 0,75 g mL⁻¹ (AL1), Alginato 1,0 g mL⁻¹ (AL2), Alginato 1,5 g mL⁻¹ (AL3), Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹ (CH1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹ (CH2).

O comportamento não-newtoniano pseudoplástico de todas as formulações ocorre pelo fato de que em repouso, as moléculas das soluções se encontram em um estado desordenado e, em elevadas taxas de deformação, ficam aproximadamente alinhadas, diminuindo a viscosidade aparente. A ordenação aumenta com essa força e, conseqüentemente, a viscosidade aparente diminui (SCHRAMM, 2006). Emulsões, suspensões e dispersões são exemplos (HAMINIUK, 2005).

Os valores do índice de comportamento ao escoamento (n) de todas as formulações foram menor que a unidade, evidenciando comportamento não-newtoniano e pseudoplástico das soluções, com viscosidade aparente diminuindo com o aumento da taxa de deformação aplicada (Tabela 3, Figura 4).

Tabela 3 - Formulação, Modelo de Ostwald-de-Waele e Soma dos Quadrados dos Desvios (SQD).

Formulação	Ostwald-de-Waele ($\tau = K\dot{\gamma}^n$)		SQD
	K (Pa.s ^{n})	n	
AL1	0,0776	0,93	146,11
AL2	0,2545	0,83	40,81
AL3	1,3232	0,71	4208,14
AL4	4,3672	0,62	1232,08
CA1	1,1626	0,60	96,75
CA2	1,8934	0,60	198,14
WP1	0,1576	0,85	61,55
WP2	0,4252	0,77	13,02
CH1	7,0565	0,44	275,22
CH2	7,689	0,44	5907,82

τ : tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$: taxa de deformação (s⁻¹); K : índice de consistência (Pa.s ^{n}); n : índice de comportamento ao escoamento (adimensional).

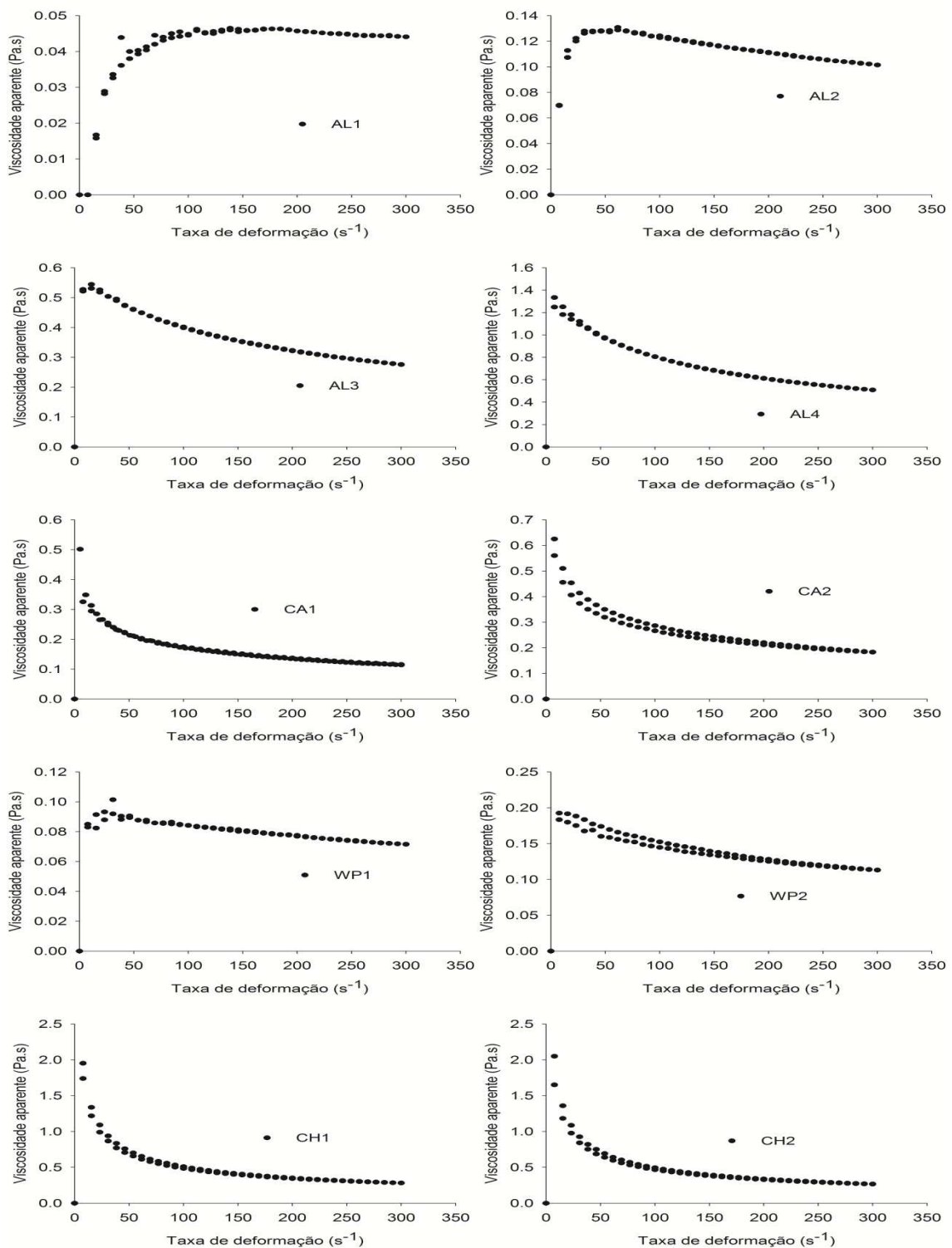


Figura 4 - Curvas de viscosidade aparente (μ_a) por formulação a 25 °C (após a quebra da tixotropia). Rampa ascendente e descendente. Alginato 0,75 g mL⁻¹ (AL1), Alginato 1,0 g mL⁻¹ (AL2), Alginato 1,5 g mL⁻¹ (AL3), Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2).

O comportamento não-newtoniano e pseudoplástico das soluções com valores de n menores que 1 indica o grau de pseudoplasticidade e, quanto menor este valor, mais pseudoplástico é o material (CHHABRA and RICHARDSON, 2008). A redução do valor de n para uma mesma concentração de alginato (0,75 ou 1,0 g mL⁻¹) foi observada quando carragena, proteína do soro e quitosana foram adicionados às formulações, sendo que a adição de quitosana levou a maior redução no valor de n , indicando maior pseudoplasticidade nessas formulações. Os menores valores de n para as formulações com quitosana (CH1 e CH2) podem estar relacionados com a maior dificuldade de passagem das soluções pela agulha e formação de esferas com formatos mais irregulares. Soluções de polímeros apresentam, normalmente, valores de n entre 0,3 e 0,7, mas isto depende de fatores como concentração e peso molecular do polímero (CHHABRA, 2010). Soluções com n próximo de 1 estão mais sujeitas de apresentar comportamento de fluido newtoniano, como a solução AL1.

O valor do índice de consistência (K) para uma mesma concentração de alginato (0,75 ou 1,0 g mL⁻¹) aumentou com a adição de carragena, proteína do soro e quitosana às formulações. O valor de K também aumentou com o aumento da concentração de alginato nas formulações para uma mesma concentração de carragena (1,25 g mL⁻¹), proteína do soro (1,5 g mL⁻¹) e quitosana (0,5 g mL⁻¹) (Tabela 3).

A constante K está relacionada com a própria viscosidade do produto, ou seja, com a resistência ao fluxo. O aumento no valor de K para uma mesma concentração de alginato devido à adição de carragena, proteína do soro e quitosana, indica aumento na viscosidade das soluções. As soluções com maiores valores de K (CH1 e CH2) apresentaram maior resistência à passagem pela agulha, mostrando que o aumento da viscosidade da solução dificulta a extrusão. De forma semelhante, para uma mesma concentração de carragena, proteína do soro e quitosana, o valor de K aumenta com o aumento da concentração de alginato. Logo, o alginato e os demais polímeros contribuíram para o aumento da viscosidade das formulações, sendo que a quitosana foi a que mais influenciou no valor de K . No entanto, a viscosidade das soluções não afetou a eficiência de encapsulamento do fago UFV-AREG1.

3.6. Caracterização morfológica das esferas

O tipo de material de encapsulamento influenciou ($p < 0,05$) no tamanho, forma e aparência das esferas devido às variações na pseudoplasticidade e viscosidade das formulações encapsulantes (Tabela 4, Figura 5).

Tabela 4 - Formulação, peso úmido (mg), diâmetro (mm) e volume (mm³) das esferas (média \pm DP).

Formulação	Peso úmido	Diâmetro	Volume
AL1	1,51 \pm 0,05 ^c	1,39 \pm 0,09 ^c	1,43 \pm 0,26 ^c
AL2	1,94 \pm 0,15 ^c	1,47 \pm 0,12 ^c	1,68 \pm 0,41 ^c
AL3	2,11 \pm 0,09 ^c	1,44 \pm 0,07 ^c	1,58 \pm 0,23 ^c
AL4	2,17 \pm 0,00 ^c	1,54 \pm 0,06 ^c	1,93 \pm 0,25 ^c
CA1	2,04 \pm 0,06 ^c	1,52 \pm 0,09 ^c	1,85 \pm 0,31 ^c
CA2	2,16 \pm 0,16 ^c	1,43 \pm 0,14 ^c	1,56 \pm 0,47 ^c
WP1	1,64 \pm 0,00 ^c	1,47 \pm 0,11 ^c	1,69 \pm 0,38 ^c
WP2	1,66 \pm 0,02 ^c	1,40 \pm 0,09 ^c	1,46 \pm 0,26 ^c
CH1	4,91 \pm 0,50 ^b	1,86 \pm 0,21 ^b	3,46 \pm 1,19 ^b
CH2	7,42 \pm 0,40 ^a	2,32 \pm 0,31 ^a	6,81 \pm 3,02 ^a

Valores seguidos de mesma letra por coluna não diferem entre si ($p > 0,05$). Alginato 0,75 g mL⁻¹ (AL1), Alginato 1,0 g mL⁻¹ (AL2), Alginato 1,5 g mL⁻¹ (AL3), Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 (CA2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2).

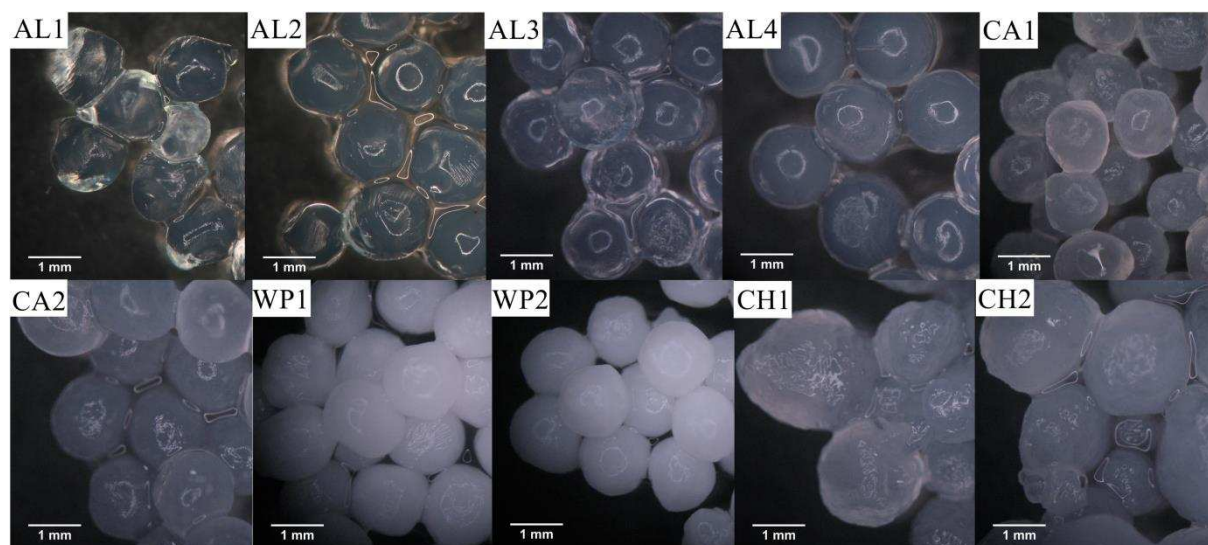


Figura 5 - Microscopia óptica das esferas úmidas mostrando tamanho, forma e aparência. Alginato 0,75 g mL⁻¹ (AL1), Alginato 1,0 g mL⁻¹ (AL2), Alginato 1,5 g mL⁻¹ (AL3), Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2), Alginato 0,75 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH1), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2).

As esferas produzidas com alginato (AL1, AL2, AL3 e AL4) apresentaram coloração transparente, tamanho uniforme e forma globular com o aumento da concentração desse polímero. Esferas com superfícies externas arredondadas, tamanho uniforme e coloração

esbranquiçada foram obtidas com a adição de carragena nas formulações com alginato (CA1 e CA2). Esferas de coloração branca, tamanho uniforme e geralmente esférico foram produzidas com a adição de proteína do soro nas formulações com alginato (WP1 e WP2). O tamanho médio semelhante ($p > 0,05$) das esferas das formulações AL1, AL2, AL3, AL4, CA1, CA2, WP1 e WP2 mostra que a concentração de alginato não afetou o peso, diâmetro e a forma das mesmas. A adição de quitosana nas formulações com alginato (CH1 e CH2) afetou as características morfológicas das esferas. Ambas as formulações apresentaram esferas significativamente maiores que das demais formulações, além de diversidade de tamanho, coloração bege e forma tendendo a esférico. Esferas com características semelhantes às obtidas foram relatadas no encapsulamento de fagos Felix O1 em alginato revestido com quitosana, resultando em microesferas com superfícies externas arredondadas e tamanho variando de 740 - 810 μm (MA et al., 2008) e no encapsulamento de fagos K em alginato, produzindo esferas com geometria esférica, superfície lisa e tamanho uniforme ($900 \pm 28 \mu\text{m}$) (MA et al., 2012).

A concentração total de polímero nas formulações não afetou as dimensões, forma e tamanhos das esferas produzidas pelo sistema. As esferas das formulações WP2, WP1 e CA2 continham as maiores concentrações totais de polímero (2,5%, 2,25% e 2,25%, respectivamente), no entanto, as esferas que apresentaram maiores diâmetros foram as das formulações CH1 e CH2, cujas concentrações de polímero se encontram entre as menores. A falta de efeito da concentração total de polímero nas dimensões, forma e tamanhos das esferas produzidas pelo sistema diferem de outros autores, que demonstraram que quanto maior a concentração total de polímero, maior o diâmetro e maior a distribuição de tamanhos das microesferas produzidas (TANG et al., 2013; 2015). O aumento da concentração de alginato aumentou o diâmetro e a variação de tamanho de microesferas (SHI et al., 2013) e microesferas de alginato-proteína do soro contendo fagos K com maior concentração total de polímero (5,8%), também apresentaram maior diâmetro ($880 \pm 80 \mu\text{m}$) e distribuição mais ampla de tamanhos (TANG et al., 2015).

Esferas com quitosana (CH1 e CH2) apresentaram relação entre viscosidade aparente e tamanho, formando esferas com maior diâmetro, maior variação de tamanho e formatos mais irregulares por constituírem uma das soluções mais viscosas. A maior variabilidade das esferas das formulações com quitosana pode também ser explicada pela dificuldade de passagem das soluções pelo calibre da agulha utilizada (21 G), pois aquelas com maiores calibres facilitariam a passagem de soluções encapsulantes de maior viscosidade. Isto não foi

estudado, pois a configuração do sistema de encapsulamento foi padronizada visando produzir esferas de tamanhos menores e uniformes. A produção de esferas com diâmetro de 1,39 a 2,32 mm obtida com a agulha de calibre 21 G pode ser alterada com o uso de agulhas de outros calibres, como relatado na produção de esferas de alginato-proteína de ervilha com agulhas 20 G e 27 G, resultando em esferas com diâmetros de 2,17 mm e 1,75 mm, respectivamente (KLEMER et al., 2011). A força de arraste ou tensão interfacial e vazão podem, também, aumentar a variabilidade de forma e tamanho das esferas com quitosana.

4. CONCLUSÃO

O sistema de encapsulamento por extrusão, montado a partir de equipamentos convencionais, é compatível com polissacarídeos e proteínas produzindo esferas com elevada carga de fagos, indicando que a combinação do sistema de encapsulamento, matrizes poliméricas e parâmetros do processo, garantem condições propícias para o encapsulamento de biomoléculas para uso em sistemas de transporte. Além disso, as características químicas e reológicas das soluções encapsulantes têm impacto na produção e nas características morfológicas das esferas. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar o potencial dos fagos encapsulados para a fagoterapia como moduladores da microbiota em ambientes gastrointestinais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, M., Qureshi, S., Maqsood, S., Gani, A., & Masoodi, F. A. 2017. Micro-encapsulation of folic acid using horse chestnut starch and β -cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behavior & antioxidant potential during GI tract conditions. *Food Hydrocolloids*, 66:(1) 154-160.
- Bakhshayeshi, M., Jackson, N., Kuriyel, R., Mehta, A., van Reis, R., & Zydney, A. L. 2011. Use of confocal scanning laser microscopy to study virus retention during virus filtration. *Journal of Membrane Science*, 379(1): 260-267.
- Banerjee, S., & Bhattacharya, S. 2012. Food gels: gelling process and new applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4): 334-346.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4): 467-483.

- Chen, M. Y., Zheng, W., Dong, Q. Y., Li, Z. H., Shi, L. E., & Tang, Z. X. 2014. Activity of encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-whey protein microspheres. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5): 736-741.
- Chhabra, R. P. 2010. Non-Newtonian fluids: an introduction. In *Rheology of complex fluids* (pp. 3-34). Springer New York.
- Fuciños, C., Míguez, M., Fuciños, P., Pastrana, L. M., Rúa, M. L., & Vicente, A. A. 2017. Creating functional nanostructures: Encapsulation of caffeine into α -lactalbumin nanotubes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 40: 10-17.
- Gitis, V., Adin, A., Nasser, A., Gun, J., & Lev, O. 2002. Fluorescent dye labeled bacteriophages-a new tracer for the investigation of viral transport in porous media: 1. Introduction and characterization. *Water Research*, 36(17): 4227-4234.
- Gombotz, W. R., & Wee, S. F. 2012. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 194-205.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochemical Engineering Journal*, 58: 140-147.
- Klemmer, K. J., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T. 2011. Pea protein- based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(11): 2248-2256.
- Kolesnyk, I., Konovalova, V., & Burban, A. 2015. Alginate/ κ -carrageenan microspheres and their application for protein drugs controlled release. *Chemistry & Chemical Technology*, 9(4): 485-492.
- Lakkis, J. M. (2016). Encapsulation and controlled release technologies in food systems. *John Wiley & Sons*.
- Lopez, M. E. S., Batalha, L. S., Vidigal, P. M. P., Albino, L. A. A., Boggione, D. M. G., Gontijo, M. T. P. & Mendonca, R. C. S. 2016. Genome sequence of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacteriophage UFV-AREG1. *Genome Announcements*, 4(5): e00412-16.
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Sabour, P. M., Huang, X., & Xu, Y. 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26(2): 434-440.
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A., & Sabour, P. M. 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15): 4799-4805.
- Mathur, N. K., & Narang, C. K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67(11): 938.

- Muzzarelli, R. A. 1973. Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan. In *Natural Chelating Polymers; alginic acid, chitin and chitosan*. Pergamon Press.
- Pérez, Y. A., Urista, C. M., Martínez, J. I., Nava, M. D. C. D., & Rodríguez, F. A. R. 2016. Functionalized Polymers for Enhance Oral Bioavailability of Sensitive Molecules. *Polymers*, 8(6): 214.
- Puapermpoonsiri, U., Spencer, J., & van der Walle, C. F. 2009. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(1): 26-33.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schramm, G. 2006. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. Artliber Ed.
- Shi, L. E., Li, Z. H., Li, D. T., Xu, M., Chen, H. Y., Zhang, Z. L., & Tang, Z. X. 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117(1): 99-104.
- Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Barłowska, J., Król, J., & Litwińczuk, Z. 2011. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers immune system—a review. *Animal Science Papers and Reports*, 29(4): 269-280.
- Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J. R., Sabour, P. M., & Wang, Q. 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Research International*, 52(2): 460-466.
- Tang, Z., Huang, X., Sabour, P. M., Chambers, J. R., & Wang, Q. 2015. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1): 263-270.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. 2002. A review of physical and chemical protein- gel induction. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(6): 589-601.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., & Subhasree, R. S. 2009. Encapsulation “the future of probiotics”-a review. *Advances in Biological Research*, 3(3-4): 96-103.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E. 2010. Materials for encapsulation. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 31-100). Springer New York.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer New York.

Material suplementar

Resultados mais relevantes para determinação dos parâmetros operacionais mostrando as diferenças no formato e tamanho das esferas ao variar a concentração das soluções, vazão do líquido e fluxo de ar.

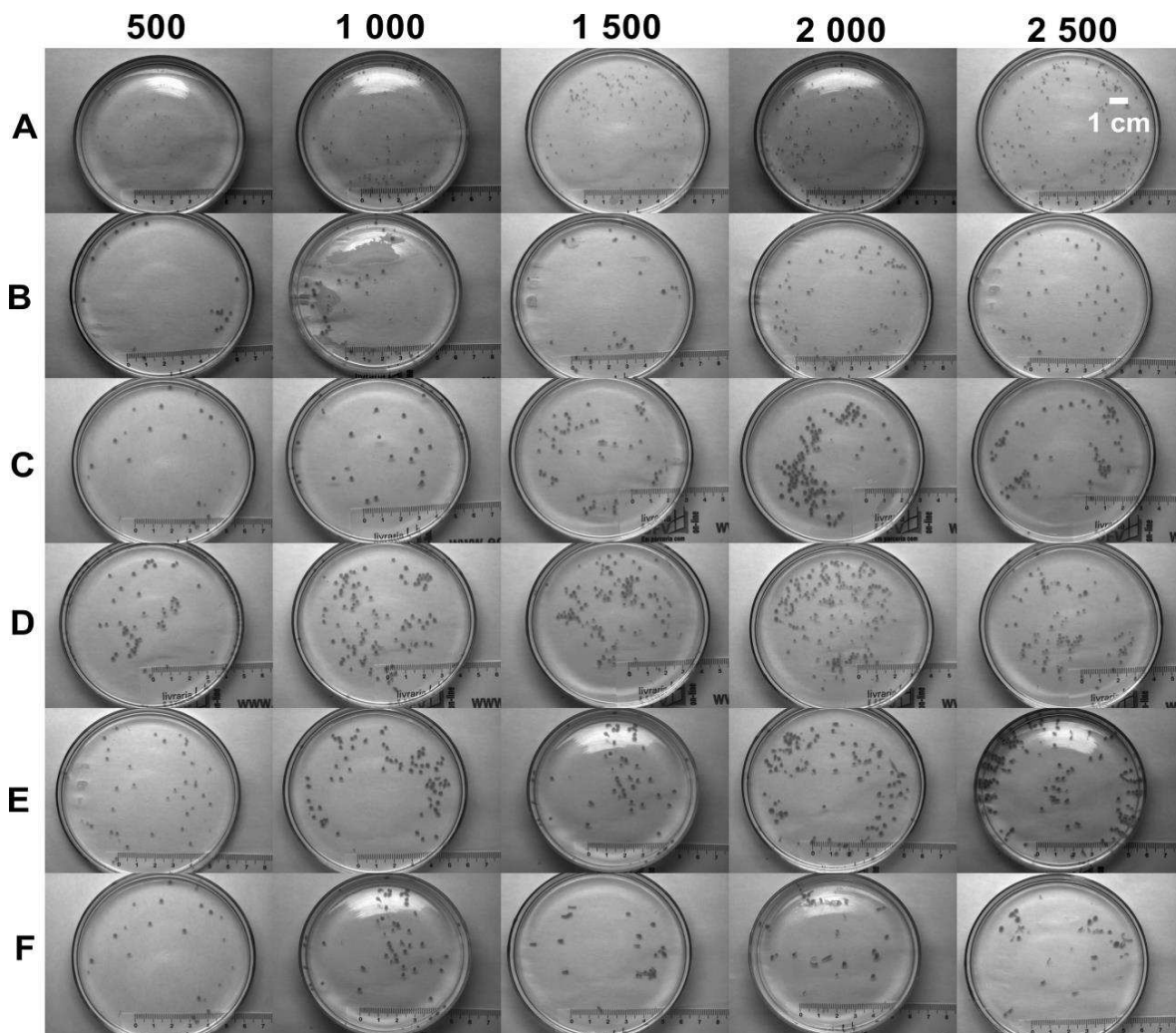


Figura S1 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato de 0,5 g mL^{-1} (A), 1,0 g mL^{-1} (B), 1,5 g mL^{-1} (C), 2,0 g mL^{-1} (D), 2,5 g mL^{-1} (E) e 3,0 g mL^{-1} (F).

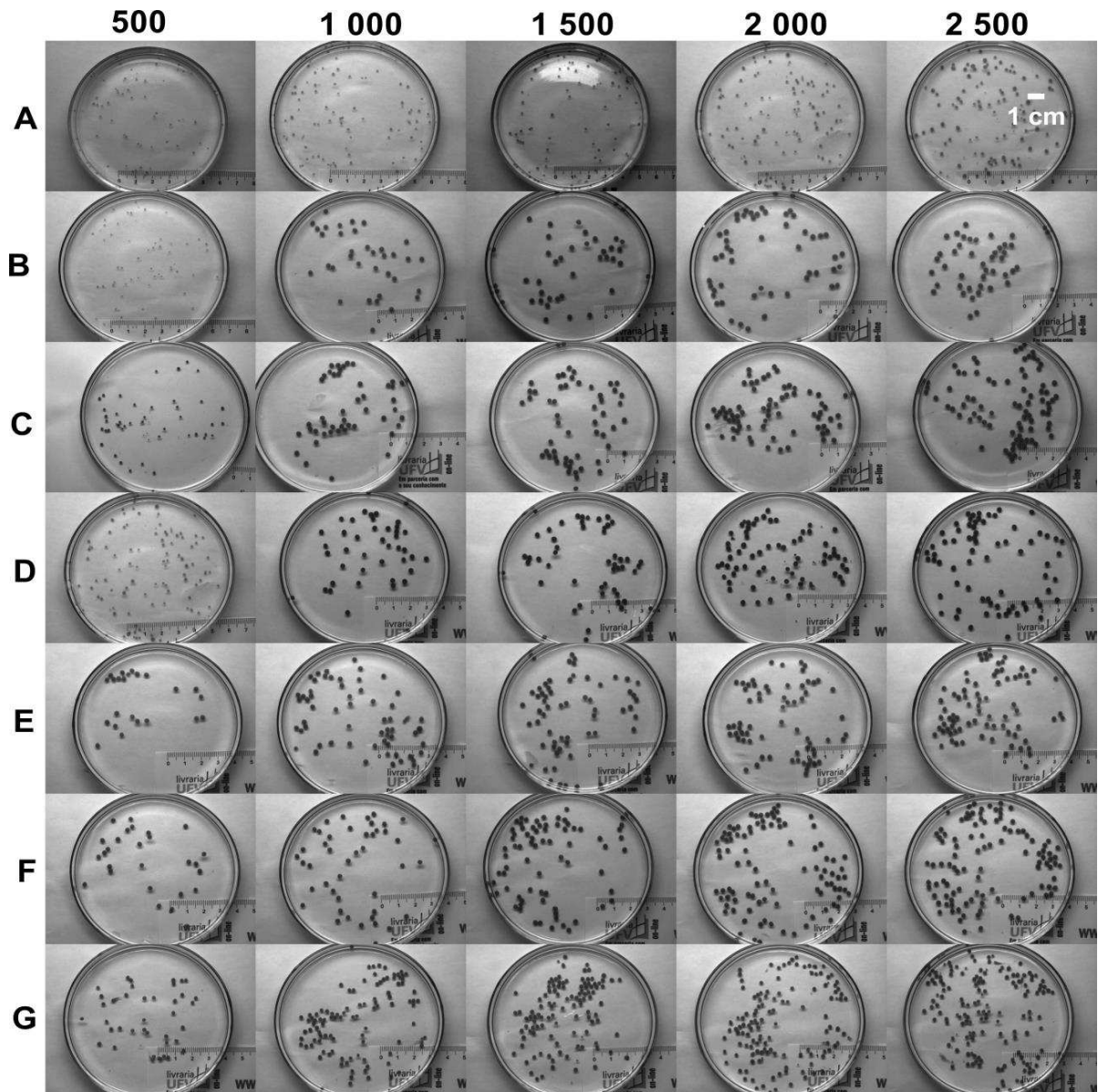


Figura S2 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 0,05 g mL^{-1} (A), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 0,25 g mL^{-1} (B), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 0,5 g mL^{-1} (C), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 0,75 g mL^{-1} (D), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 1,0 g mL^{-1} (E), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 1,25 g mL^{-1} (F), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Carragena 1,5 g mL^{-1} (G).

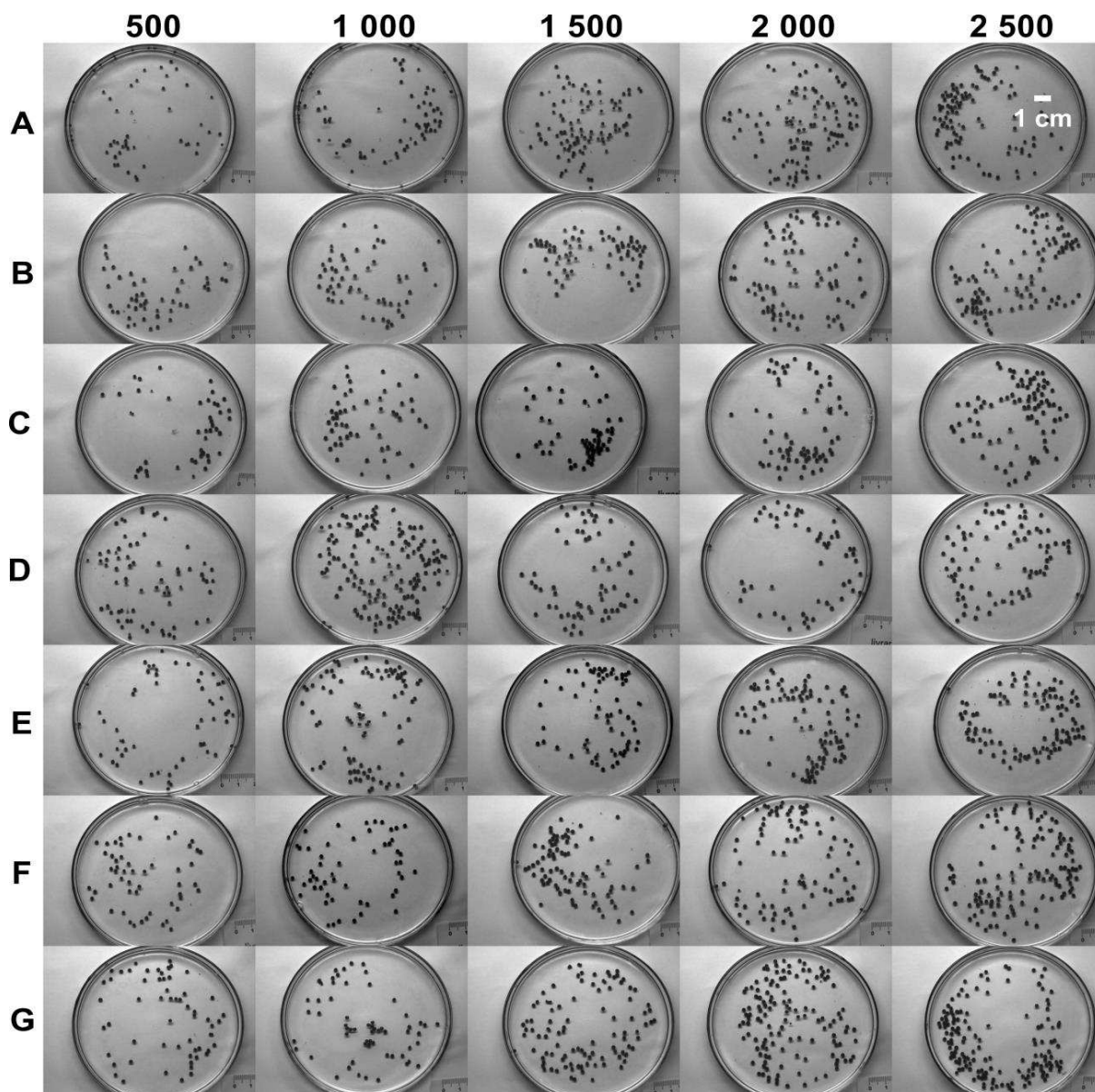


Figura S3 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,05 g mL^{-1} (A), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,25 g mL^{-1} (B), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,5 g mL^{-1} (C), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,75 g mL^{-1} (D), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 1,0 g mL^{-1} (E), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 1,25 g mL^{-1} (F), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Proteína do soro 1,5 g mL^{-1} (G).

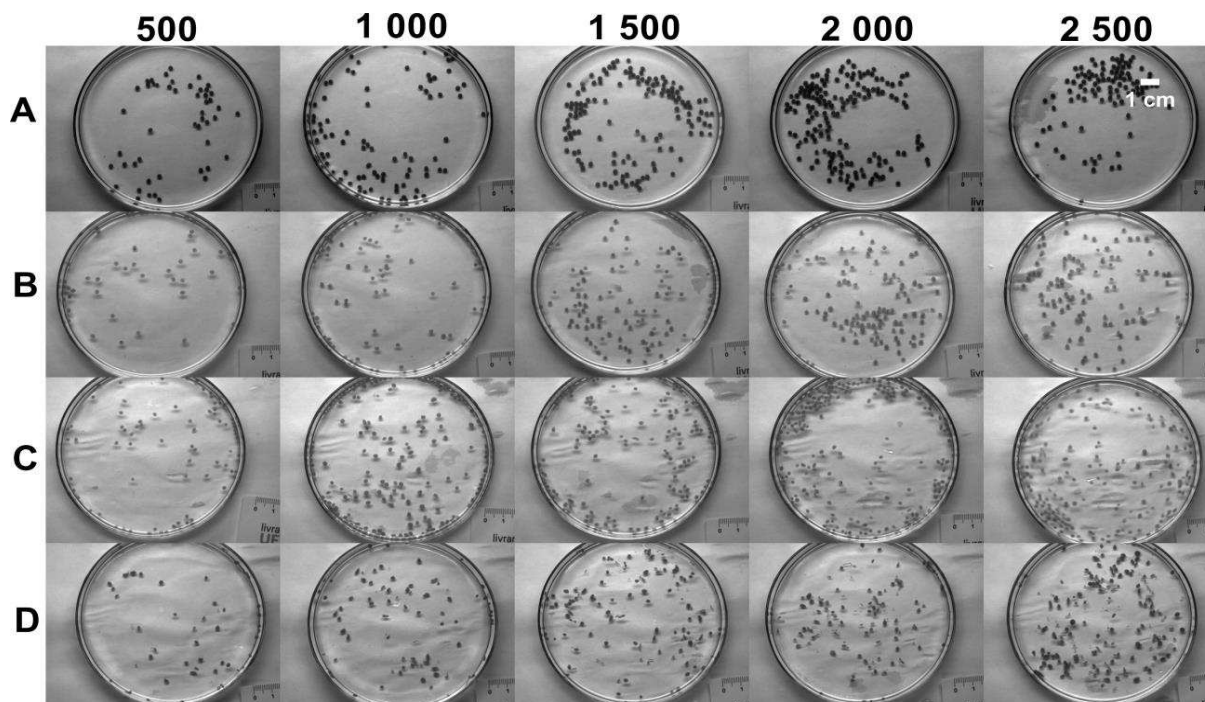


Figura S4 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato 0,75 g mL^{-1} -Quitossana 0,05 g mL^{-1} (A), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Quitossana 0,25 g mL^{-1} (B), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Quitossana 0,5 g mL^{-1} (C), Alginato 0,75 g mL^{-1} -Quitossana 0,75 g mL^{-1} (D).

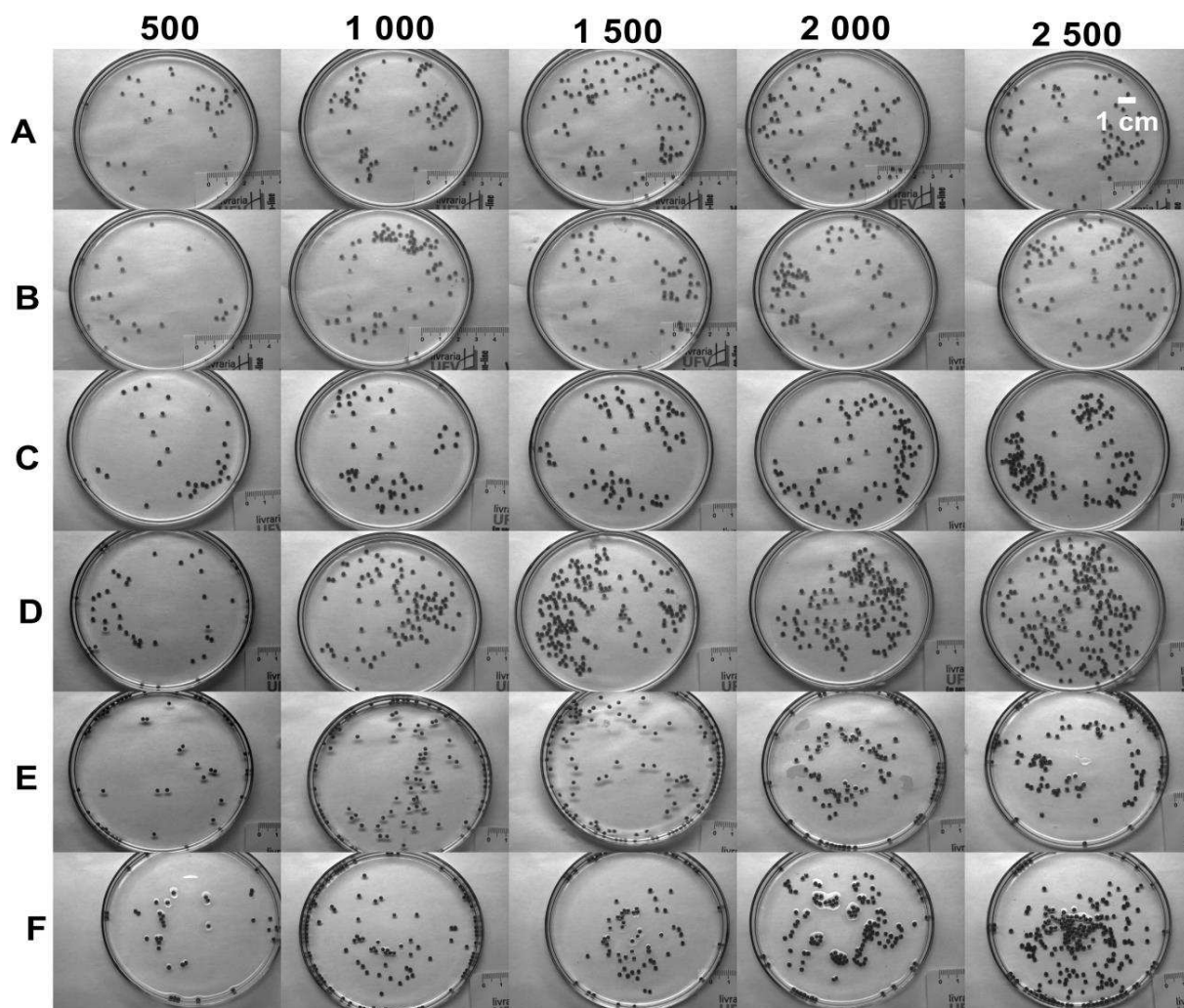


Figura S5 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato 1,0 g mL^{-1} -Carragena 0,05 g mL^{-1} (A), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Carragena 0,25 g mL^{-1} (B), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Carragena 0,75 g mL^{-1} (C), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Carragena 1,0 g mL^{-1} (D), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Carragena 1,25 g mL^{-1} (E), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Carragena 1,5 g mL^{-1} (F).

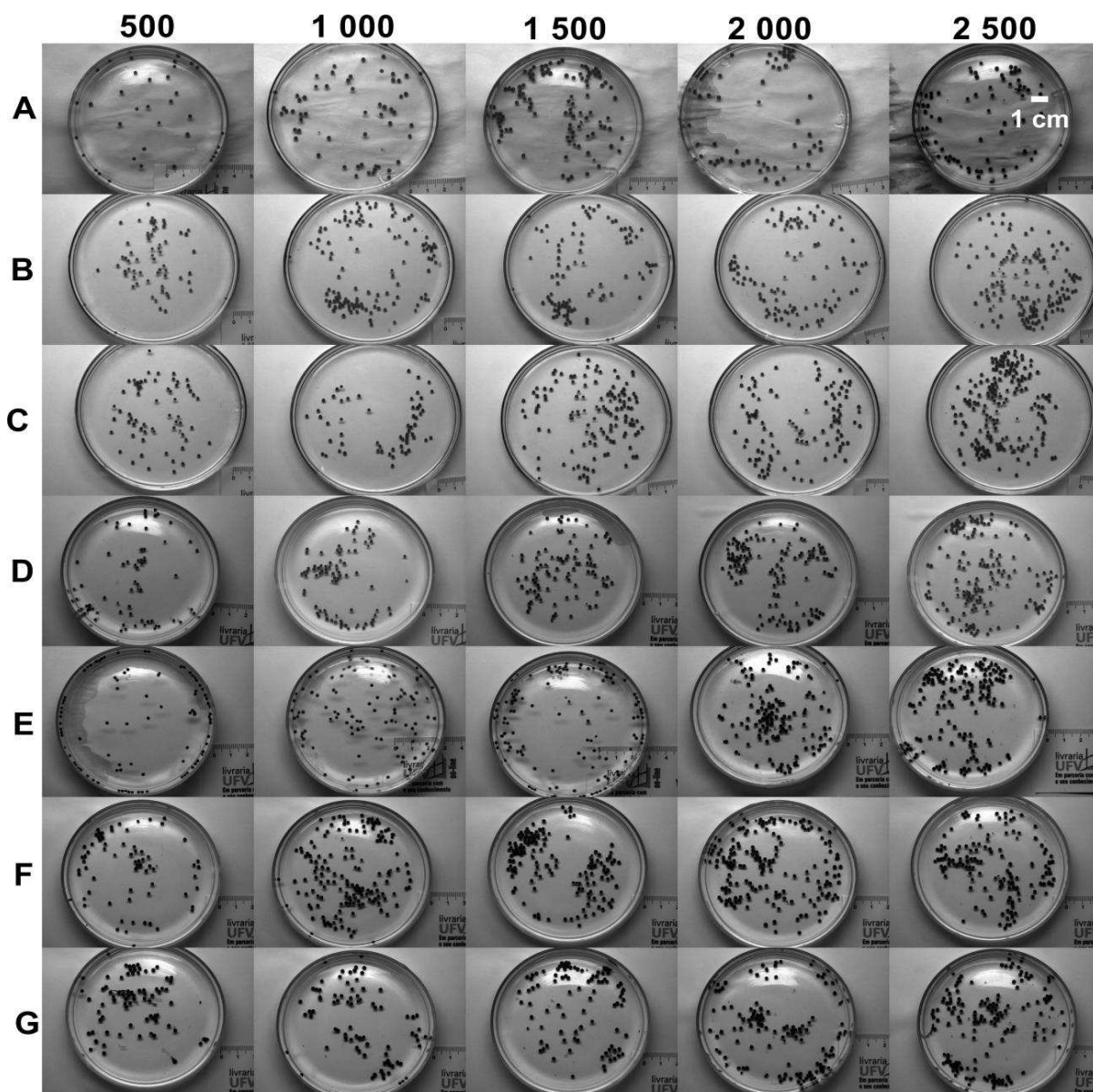


Figura S6 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,05 g mL^{-1} (A), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,25 g mL^{-1} (B), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,5 g mL^{-1} (C), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 0,75 g mL^{-1} (D), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 1,0 g mL^{-1} (E), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 1,25 g mL^{-1} (F), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Proteína do soro 1,5 g mL^{-1} (G).

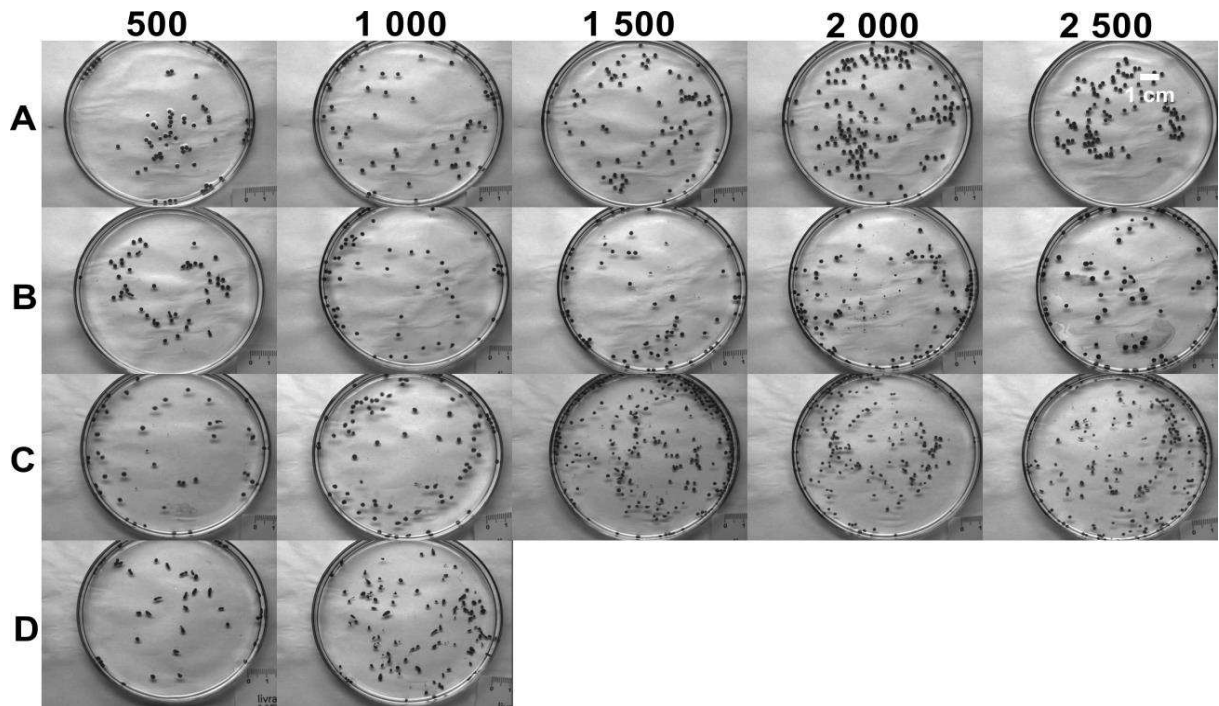


Figura S7 - Esferas produzidas no sistema de encapsulamento. Vazão do líquido: 500 a 2500 $\mu\text{L min}^{-1}$, fluxo de ar médio e concentrações de Alginato 1,0 g mL^{-1} -Quitossana 0,05 g mL^{-1} (A), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Quitossana 0,25 g mL^{-1} (B), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Quitossana 0,5 g mL^{-1} (C), Alginato 1,0 g mL^{-1} -Quitossana 0,75 g mL^{-1} (D).

CAPÍTULO 3

Caracterização e liberação controlada de fagos UFV-AREG1 para modular a microbiota intestinal de animais

RESUMO

O uso de bacteriófagos (fagos) para modular a microbiota intestinal de animais reduz o risco de contaminação de alimentos por micro-organismos causadores de doenças de origem alimentar. No entanto, a viabilidade dos fagos é baixa em ambiente gastrointestinal. O objetivo deste trabalho foi investigar as características de proteção e liberação *in vitro* dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em esferas de alginato-polímeros preparadas por método de extrusão. Fagos de *Escherichia coli* O157:H7 (UFV-AREG1) foram caracterizados quanto à viabilidade em diferentes temperaturas, luzes e pH. Alginato, carragena, quitosana e proteína do soro de leite foram os polímeros base para o encapsulamento. Testes *in vitro* (fluido gástrico simulado-FGS, fluido intestinal simulado-FIS e sais biliares) foram realizados simulando as soluções gastrointestinais as quais os fagos são expostos quando administrados oralmente. A viabilidade dos fagos encapsulados foi avaliada durante o armazenamento e após a secagem das esferas. O título dos fagos UFV-AREG1 livres reduziu a um nível indetectável 5 min após exposição em pH abaixo de 3,4 e após 150 s em FGS (pH 2,5), indicando que os mesmos foram sensíveis a ambientes ácidos. No entanto, a viabilidade dos fagos UFV-AREG1 foi mantida em esferas de alginato-proteína do soro, com redução de somente 0,04 ciclos \log_{10} no título dos mesmos, em pH 2,5 após 2 h de exposição. Sais biliares não afetaram a estabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres ou encapsulados, mesmo incubados por 3 h em soluções de bile a 1 % e 2 %. O perfil de liberação dos fagos foi semelhante ao incubar as esferas diretamente em FIS (pH 6,8) e ao serem tratadas previamente em FGS e depois em FIS, com liberação rápida dos fagos UFV-AREG1 nos tempos iniciais e gradual nos tempos seguintes. A viabilidade dos fagos encapsulados foi mantida quando armazenados em refrigeração na forma úmida durante cinco meses. O processo de secagem sem agentes protetores reduziu o título dos fagos a um nível não detectável, indicando que os fagos UFV-AREG1 encapsulados foram sensíveis à desidratação. As esferas produzidas a partir de materiais poliméricos mantêm os fagos UFV-AREG1 biologicamente ativos e com potencial para fagoterapia, uma vez que encapsulados, permanecem viáveis em ambiente gastrointestinal para modular a microbiota de animais.

Palavras-chave: Encapsulamento, entrega oral, *Escherichia coli* O157:H7, fagoterapia, microbiota intestinal, microfluídica, polímeros naturais.

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli O157:H7 enterohemorrágica é um dos agentes patogênicos mais importantes causadores de doenças veiculadas por alimentos. Essa bactéria é anaeróbica facultativa Gram-negativa, em forma de bastonete e a estirpe O157:H7, produz a toxina Shiga (LIM et al., 2010). A família *Enterobacteriaceae* causa, aproximadamente, 9 000 infecções e 600 mortes por ano (CDC, 2013). Quatro surtos de *E. coli* O157:H7 foram relatados nos Estados Unidos nos anos de 2016 e 2017 ligados a produtos cárneos, brotos de alfafa, farinha e manteiga de soja e amendoim, com um total de 108 casos relatados e 36 hospitalizações, das quais nove agravaram-se para a síndrome hemolítica urêmica, atingindo em torno de 30 estados (CDC, 2017).

A contaminação humana com *E. coli* O157:H7 geralmente leva ao porte assintomático ou diarreia sanguinolenta e, em casos mais graves, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (BERRY e WELLS, 2010, LIM et al., 2010) e ocorre, principalmente, por água e alimentos contaminados e transferência entre indivíduos e animais, especialmente bovinos (LIM et al., 2010). As estirpes de *E. coli* O157:H7 estão comumente presentes em uma vasta gama de hospedeiros assintomáticos como bovinos e outros ruminantes, além de porcos, cavalos, animais de estimação e aves. A maioria dos casos de infecções por *E. coli* O157:H7 está associada à carne mal cozida e leite não pasteurizado (BERRY e WELLS, 2010) e mais recentemente, a produtos derivados da carne de porco e vegetais folhosos (BERRY et al., 2015, HONISH et al., 2017). Produtos alimentares de origem animal podem ser contaminados pelo conteúdo intestinal durante o abate ou a ordenha, pois este patógeno pode sobreviver em condições gastrointestinais (BERRY e WELLS, 2010; CHEKABAB et al., 2013).

O uso de fagos vem se tornando uma realidade promissora no combate a microorganismos resistentes a antibióticos isolados de animais, humanos e alimentos (GOUVÊA et al., 2016, MENG et al. 1998, SCHROEDER et al., 2002). A terapia com fagos para diminuir a colonização de *E. coli* O157:H7 em animais vivos, tem sido desenvolvida, principalmente, para bovinos e aves, mas a administração direta dos mesmos em água ou no alimento para animais pode não ser bem sucedida (SILLANKORVA et al., 2012). Fatores físico-químicos, como temperatura, acidez, salinidade e conteúdo iônico podem afetar a viabilidade dos fagos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (JONCZYK et al., 2011) devido a danos nos

elementos estruturais, perdas de lipídeos e alterações estruturais no material genético (ACKERMANN et al., 2004).

O encapsulamento de fagos para administração oral é uma estratégia para a redução de patógenos entéricos em animais, diminuindo o risco de contaminação microbiana no início da cadeia de processamento de alimentos (COLOM et al., 2017). Além disso, o encapsulamento protege os fagos do pH baixo do estômago e da atividade dos sais biliares e enzimas intestinais (COLOM et al., 2017; STANFORD et al., 2010). Normalmente são usadas matrizes poliméricas como materiais encapsulante e o alginato de cálcio na sua forma pura ou combinado com outros polímeros, incluindo outros carboidratos, proteínas e lipídios, é um dos polímeros mais estudados e com mecanismo de ação elucidada para administração oral (WANDREY et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi investigar as características de proteção e liberação *in vitro* dos fagos UFV-AREG1 encapsulados, a fim de apresentar uma alternativa para reduzir patógenos entéricos em animais, visando diminuir o risco de contaminação de produtos de origem animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização dos fagos UFV-AREG1

Viabilidade dos fagos em temperatura ambiente e de refrigeração

Suspensões (1,0 mL) com aproximadamente 10^8 UFP mL⁻¹ de fagos UFV- AREG1 em tampão SM foram estocadas em microtubos em refrigeração ($7,0 \pm 0,5$ °C) e em temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5$ °C) por 0, 1, 2, 4, 7 e 14 dias.

Viabilidade dos fagos em luz ultravioleta (UV) e fluorescente

Suspensões (5,0 mL) com aproximadamente 10^8 UFP mL⁻¹ de fagos UFV- AREG1 em tampão SM foram expostas às luzes ultravioleta (G20TB, Starlux, China) a 50 cm de distância durante 0, 5, 10 e 15 min e fluorescente (T5, Empalux, Brasil) a 185 cm de distância durante 0, 7 e 14 dias, em placas de Petri (100 mm x 15 mm) abertas.

Viabilidade de fagos em diferentes valores de pH

A viabilidade dos fagos UFV-AREG1 foi avaliada em solução de NaCl 0,2 g mL⁻¹ ajustada com solução de HCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) 1,0 mol L⁻¹ em pH 2,0; 2,5; 2,8;

3,2; 3,6; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 durante 5 min. Suspensões (100 µL) com aproximadamente 10^9 UFP mL⁻¹ de fagos UFV-AREG1 em tampão SM foram adicionadas em 9,9 mL de solução de NaCl pré-aquecida (37 °C).

2.2. Resistência de fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados ao fluido gástrico simulado

Fluido gástrico simulado (FGS) foi preparado dissolvendo 3,2 mg mL⁻¹ de pepsina (Sigma-Aldrich, Brasil) em 2,0 mg mL⁻¹ de NaCl, pH 2,5 (US Pharmacopeial Convention, 2004; Tang et al., 2015). Esferas úmidas contendo fagos UFV-AREG1 (0,1 g) das formulações de AL4 (Alginato 2,0 g mL⁻¹), CA2 (Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹), WP2 (Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹) e CH2 (Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹) (BATALHA et al., 2017) foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,9 mL de FGS pré-aquecido (37 °C) e incubados a $37,0 \pm 0,5$ °C durante 120 min. A incubação sob condições gastrointestinais foi terminada dissolvendo-se as esferas para a determinar o título dos fagos liberados (1) ou transferindo as esferas para FIS (pH 6,8) (2).

Suspensões (100 µL) de fagos UFV-AREG1 livres foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 9,9 mL de FGS pré-aquecido (37 °C) e o título determinado a partir de alíquotas (100 µL) tomadas a cada 15 s durante 5 min.

2.3. Estabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados em sais biliares

Fagos UFV-AREG1 encapsulados (0,1 g) foram adicionados a tubos de ensaio contendo 0,9 mL de fluido biliar simulado pré-aquecido (37 °C) (Sigma-Aldrich, Nova Zelândia) a 1,0 mg mL⁻¹ ou 2,0 mg mL⁻¹ e incubados a $37,0 \pm 0,5$ °C por 1 h e 3 h (MA et al., 2012).

Suspensões de fagos livres (100 µL) foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 9,9 mL de fluido biliar simulado a 1,0 mg mL⁻¹ ou 2,0 mg mL⁻¹ pré-aquecido (37 °C) e incubados a $37,0 \pm 0,5$ °C durante 1 h e 3 h. Água destilada (pH 7,0) foi utilizada como controle para os fagos livres e encapsulados.

2.4. Liberação dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em fluido intestinal simulado

Fluido intestinal simulado (FIS) foi preparado dissolvendo 10 mg mL⁻¹ de pancreatina (Sigma-Aldrich, EUA) em solução de KH₂PO₄ 50 mmol L⁻¹, pH 6,8 (US Pharmacopeial Convention, 2004; Tang et al., 2015). Um total de 0,1 g esferas frescas (1) ou esferas previamente incubadas por 120 min em FGS (2) foram adicionadas em microtubos contendo

0,9 mL de FIS pré-aquecido (37 °C). As amostras foram incubadas a $37,0 \pm 0,5$ °C com agitação a 200 rpm.

2.5. Produção de esferas secas carregadas com fagos UFV-AREG1

Uma vez que as partículas fágicas podem ser sensíveis ao congelamento e liofilização (CLARK, 1962), a secagem ao ar à temperatura ambiente foi adotada como método de secagem. Esferas úmidas contendo fagos UFV-AREG1 foram secas ao ar durante 24 h à temperatura ambiente de $23,0 \pm 0,5$ °C e armazenadas em tubos estéreis a 7 °C.

2.6. Determinação dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados viáveis

A preparação da estirpe bacteriana e dos fagos foi realizada como descrito anteriormente. Fagos UFV-AREG1 encapsulados foram liberados dissolvendo 0,1 g de esferas em 0,9 mL de solução contendo 50 mmol L⁻¹ de citrato de sódio (Neon Comercial, Brasil), 0,2 mol L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Neon Comercial, Brasil) e 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 7,5) a $25,0 \pm 0,5$ °C sob agitação. O título dos fagos UFV-AREG1 livres e liberados das esferas foi determinado em unidades formadoras de placas (UFP) e expressos em UFP mL⁻¹ e UFP g⁻¹ de esferas úmidas, respectivamente. As esferas secas foram reidratadas em tampão SM durante 15 min antes da dissolução.

2.7. Caracterização morfológica das esferas contendo fagos UFV-AREG1

A morfologia e o tamanho das esferas úmidas e secas foram determinados utilizando microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha). Os efeitos de FGS e FIS sobre as esferas foram analisados e visualizados por microscopia óptica, a partir de esferas coletadas após incubação por 120 min em FGS e 6 h em FIS. Trinta esferas de cada formulação foram medidas para determinar o tamanho médio e os dados apresentados como a média \pm desvio padrão (DP). A morfologia da superfície das esferas foi observada utilizando microscópio eletrônico de varredura (TM 3000, Hitachi High-Tech, Japão) a 10 kV.

2.8. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado em triplicata e os resultados apresentados em média \pm desvio padrão (DP). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram analisadas com o teste Tukey no software Minitab 16 (Minitab Inc., EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos fagos UFV-AREG1

As temperaturas de armazenamento não afetaram o título dos fagos UFV-AREG1, com redução de apenas 0,46 ciclos \log_{10} a 7 °C (Figura 1a).

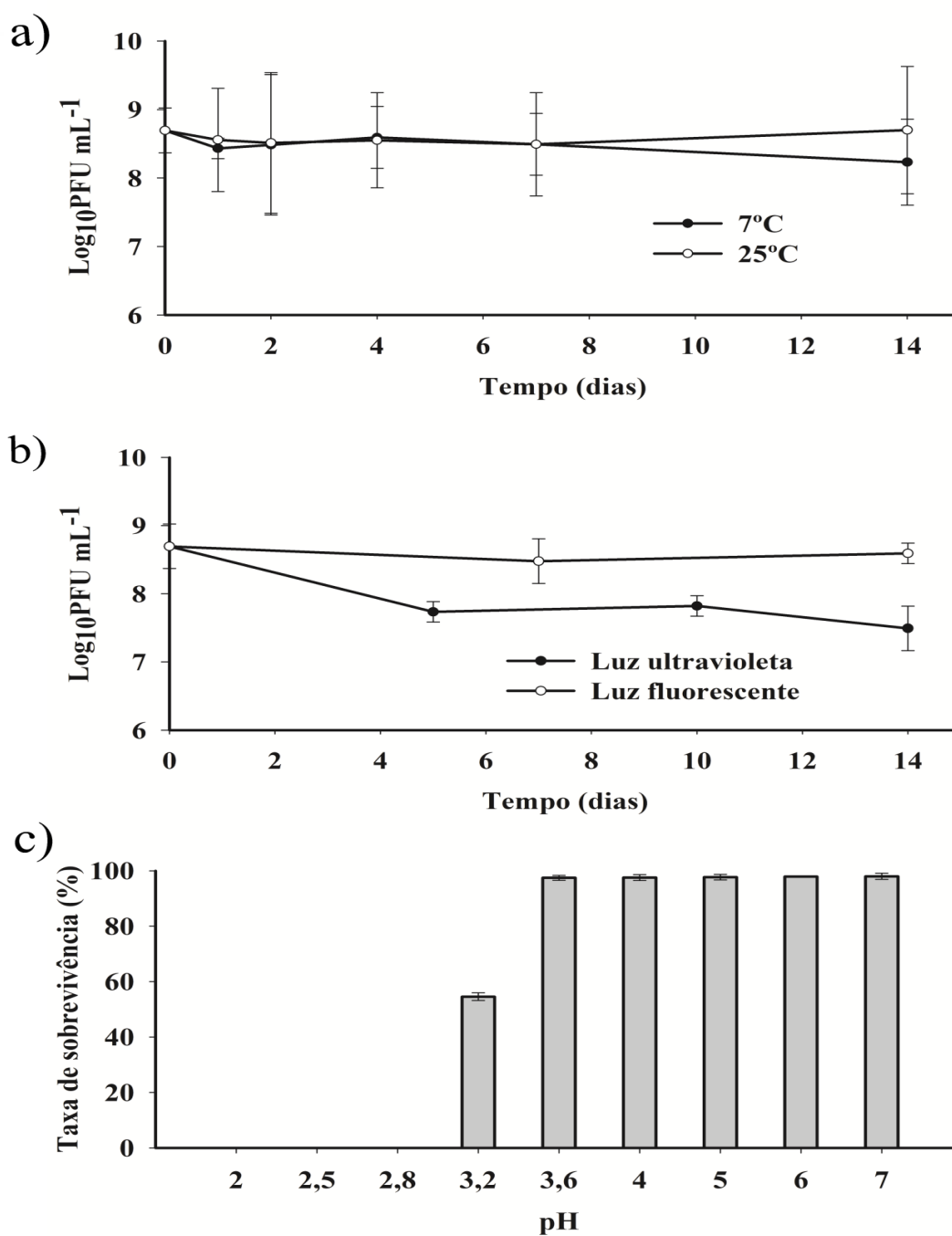


Figura 1 - Viabilidade dos fagos UFV-AREG1 em diferentes temperaturas de armazenamento (a), em diferentes tipos de luz (b) e pH (c). Limite de detecção, $<10^3$ UFP mL^{-1} .

A viabilidade semelhante dos fagos UFV- AREG1 nas duas temperaturas de armazenamento mostra que a estrutura (capsídeo e cauda) dos mesmos foi conservada (ACKERMANN et al., 2004). A perda de viabilidade dos fagos em baixas temperaturas pode estar relacionada a mudanças no comportamento das caudas em fagos da ordem dos *Caudovirales*, inibindo sua capacidade de infectar o hospedeiro (THORNE e HOLT, 1974) e a redução do título dos fagos em temperaturas negativas (-20 °C) se deve à destruição das partículas virais pelos cristais de gelo formados durante o congelamento (WARREN e HATCH, 1969). A variabilidade do estresse térmico sobre os fagos é devido à diversidade de ambientes em que podem ser encontrados, com relação direta com a temperatura ótima de crescimento do hospedeiro, que de modo geral, podem ser psicrotópicos, mesófilos ou termófilos (COFFEY et al., 2011). A exposição a temperaturas de -22 a 60 °C dos fagos de *E. coli* O157:H7 (e11/2 e e4/1c) em caldo LB por 1h não afetou o título de cada fago. No entanto, o título dos fagos foi reduzido após exposição a 70 ou 80 °C (COFFEY et al. 2011). Temperaturas em torno de 70 °C ou acima são capazes de inativar fagos que infectam bactérias mesófilas (COFFEY et al., 2011; LEE et al., 2016) por desnaturação das proteínas do capsídeo e que, a proteção dos fagos contra a desnaturação térmica está relacionada com a formação de ligações dissulfeto entre as proteínas (CALDEIRA e PEABODY, 2007).

O título do fago UFV-AREG1 reduziu 1,20 ciclos \log_{10} após 15 min de exposição à luz UV e apenas 0,10 ciclos \log_{10} quando exposto por duas semanas à luz fluorescente (Figura 1b). A perda de viabilidade dos fagos exposto à luz visível e UV está relacionada a danos causados nos ácidos nucleicos. Os fagos podem ser inativados exponencialmente por luz UV a taxas variáveis devido a alterações no DNA (ADAMS, 1959). A radiação UVB causa danos diretos ao DNA com a produção de dímeros de bases pirimídicas (PFEIFER, 1997) e a UVC impede a adsorção dos fagos (HANDELSMAN e STABB, 1996). O título de fagos de *Xanthomonas* suspensos em tampão e expostos a radiação UV (UVA + B) não foi afetado até a dose de 4 mJ/cm² e acima deste valor, o fago foi rapidamente inativado. A dose de 8 mJ/cm² foi suficiente para reduzir viabilidade da suspensão de fagos em 80% (IRIARTE et al., 2007).

Após a adição do fago, o pH das soluções finais foram 1,9; 2,5; 2,9; 3,4; 4,8; 6,0; 6,7; 6,8 e 6,8, cujos valores estão dentro da faixa encontrada no trato gastrointestinal de animais. Os fagos UFV-AREG1 ($9,89 \pm 0,85$ UFP mL⁻¹) foram sensíveis a ambientes ácidos com redução do título a um nível não detectável após 5 min de incubação em pH abaixo de 3,4. Em pH 3,4, a queda no título foi de 4,5 ciclos \log_{10} ($5,39 \pm 1,38$ UFP mL⁻¹) e acima de pH 3,4, a maior redução no título foi de 0,25 ciclos \log_{10} (Figura 1c). Os fagos UFV-AREG1

foram sensíveis a ambientes ácidos e a diminuição do título a um nível indetectável em valores baixos de pH pode ser devido a processos de agregação (LANGLET et al., 2007). Este resultado foi semelhante ao observado em fagos Felix O1, que foram inativados após 5 min de incubação em pH abaixo de 3,7 (MA et al., 2008). A concentração de íons de hidrogênio (H^+) no meio permite a agregação de fagos, pois em pH próximo ou abaixo do ponto isoelétrico (PI) das proteínas do capsídeo, ocorre neutralização das interações eletrostáticas (repulsão) predominando as interações atrativas (Van der Waals e interações hidrofóbicas) que favorece o contato entre os fagos resultando em agregação. A agregação de fagos é um fenômeno reversível, no entanto, é interpretada como inativação na determinação do título. Os fagos são quantificados por contagem de unidades infecciosas (unidades formadoras de placas ou UFP) (OLSON et al., 2004, DAWSON et al., 2005) e uma unidade pode ser constituída por uma partícula viral individual ou por um único agregado (contendo várias partículas virais individuais). Logo, a agregação pode explicar a redução no título quando o $pH \leq PI$ das proteínas dos fagos visto que, o aumento no número de fagos agregados reduz o número de placas de lise formadas em comparação com o número de placas de lises que seriam formadas se os fagos estivessem individualizados.

A sensibilidade ao pH é um dos fatores mais importantes para a manutenção da viabilidade dos fagos administrados oralmente (LY-CHATAIN, 2014). O encapsulamento deve proteger os fagos de ácidos e enzimas presentes no fluido gástrico e liberá-los no ambiente alcalino do intestino. Dessa forma, o presente trabalho selecionou quatro formulações (AL4, CA2, WP2 e CH2) para os ensaios *in vitro* por apresentarem as maiores concentrações de polímeros e eficiências de encapsulamento de fagos UFV-AREG1 semelhantes.

3.2. Resistência dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados ao fluido gástrico simulado

O título dos fagos UFV-AREG1 livres não foi detectável após 150 s de exposição em FGS (pH 2,5) (Figura 2a), confirmando a necessidade de serem protegidos por encapsulamento em matrizes que assegurem sua viabilidade na passagem pelo trato gastrointestinal.

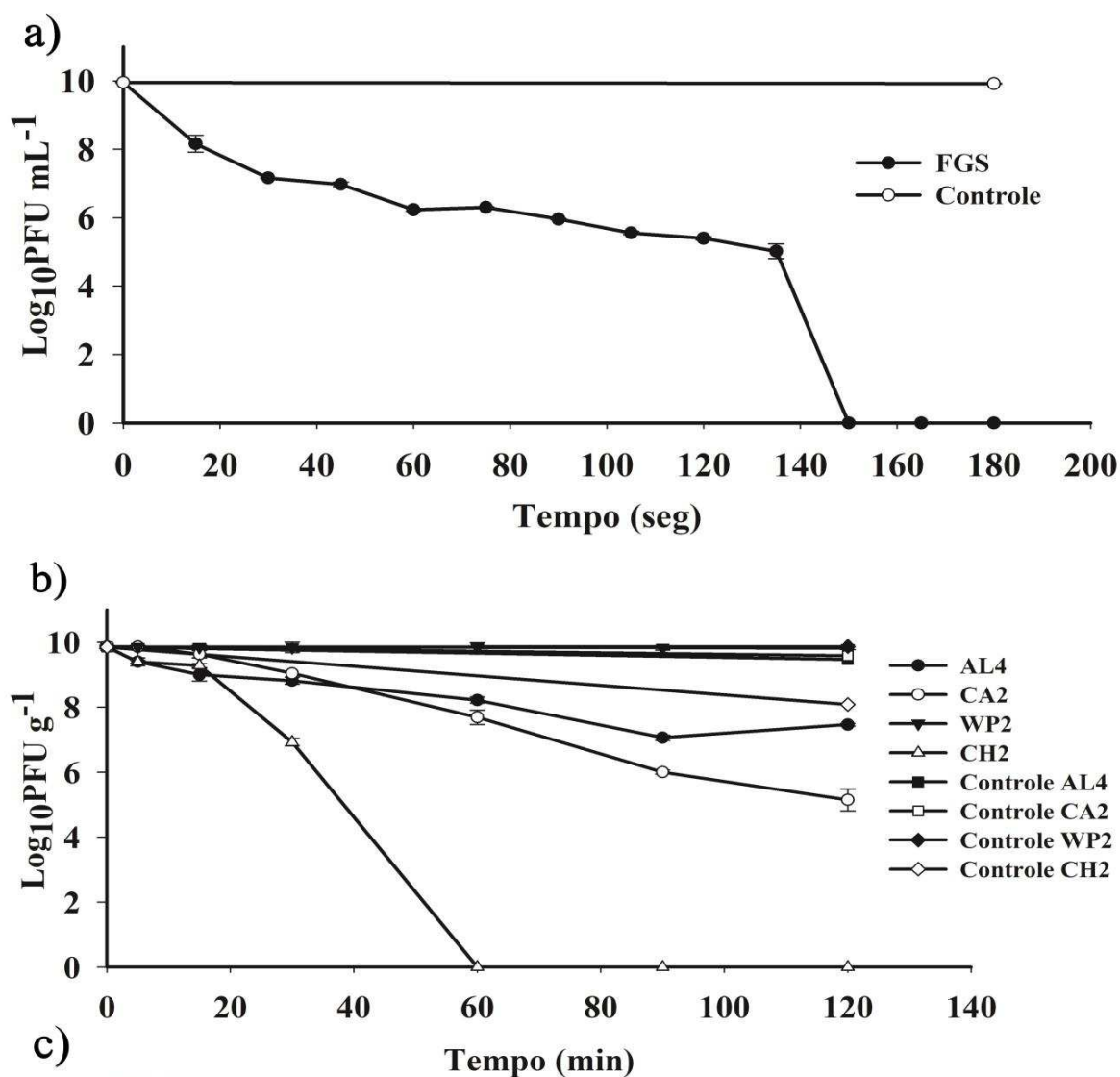


Figura 2 - Viabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres após exposição em FGS (pH 2,5) e em água destilada (pH 7,0) a 37 °C durante 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 e 180 s. Tratamentos com fagos indetectáveis ($<10^3$ UFP mL⁻¹) foram considerados como zero (a). Viabilidade dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em esferas de Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2) e Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹ (CH2) após exposição em FGS (pH 2,5) e em água destilada (pH 7,0) a 37 °C durante 0, 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min. Tratamentos com fagos indetectáveis ($<10^3$ UFP g⁻¹) foram considerados como zero (b). Micrografias ópticas das esferas de Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2) e Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitosana 0,5 g mL⁻¹ (CH2) após exposição em FGS (pH 2,5) a 37 °C (c).

A redução no título dos fagos UFV-AREG1 em condições gástricas se deve a presença de H^+ no meio que favorece o contato e a agregação das partículas virais (LANGLET et al., 2007). Este resultado foi semelhante ao encontrado para fagos de *Vibrio vulnificus*, que perderam a viabilidade após 2 min de exposição em FGS em pH abaixo de 2,7 (KOO et al., 2000).

O título dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em AL4, CA2, WP2 e CH2 durante 120 min de exposição em FGS (pH 2,5) é apresentado na Figura 2b, mostrando a proteção proporcionada por cada formulação. O mecanismo sugerido para proteção dos fagos por encapsulamento baseia-se em evitar ou retardar o contato direto dos fagos com o meio ácido, assim, a taxa de difusão dos prótons (H^+) para o interior das esferas está inversamente relacionada com a proteção do fago (MA et al., 2008; TANG et al., 2013). O comportamento dos fagos UFV-AREG1 não encapsulados e encapsulados mostrou que os mesmos foram protegidos do fluido gástrico pelo encapsulamento. A menor proteção aos fagos UFV-AREG1 foi dada pelas esferas compostas por alginato-quitosana (CH2), com redução do título a um nível indetectável após 60 min de exposição em FGS. Isto pode ser devido à degradação da quitosana por hidrólise ácida resultando em diminuição no peso molecular médio, viscosidade e perda de resistência mecânica, uma vez que o ácido atua como um catalisador que divide as cadeias do polímero (SZYMAŃSKA e WINNICKA, 2015). Além disso, o contato dos fagos com o meio ácido pode ter sido causado pela solubilidade da quitosana em pH abaixo de seu pKa (6,3-7,0), em virtude dos resíduos amina na cadeia (SOGIAS et al., 2010). Este resultado é semelhante ao observado para o título de fagos Felix O1 encapsulados em microesferas de alginato revestidas com quitosana, que reduziu 2,58 ciclos \log_{10} após 60 min de incubação em FGS (pH 2,4) (MA et al., 2008). O título de fagos K encapsulados em microesferas de mesma composição, reduziu a um nível indetectável após 90 min de incubação em FGS (pH 2,5) (MA et al., 2012). E o encapsulamento de bactérias probióticas em microesferas de alginato-quitosana forneceu apenas uma proteção parcial contra a acidez do estômago (KRASAEKOOPT et al., 2004). O título dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em esferas de alginato-carragena (CA2) reduziu 4,71 ciclos \log_{10} após 120 min de exposição em FGS. O contato das partículas virais com o FGS pode ser devido à despolimerização da carragena por hidrólise em meio ácido (STANLEY, 2011), levando a redução no título. Os títulos dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em esferas de alginato (AL4) e alginato-proteína do soro (WP2) reduziram 2,39 e 0,04 ciclos \log_{10} , respectivamente. O tamanho dos poros da matriz de alginato varia de 5 a 200 nm (ANDRESEN et al., 1977; KLEIN et al., 1983) sendo

suficientemente pequeno para oferecer proteção aos fagos UFV-AREG1 (cabeça: 114 x 86 nm e cauda: 117 x 23 nm) (LOPEZ et al., 2016). Além disso, o alginato apresenta característica de gel em pH abaixo de seu pKa (3,3-3,5) em virtude da protonação dos grupamentos carboxílicos (LI et al., 2009), resultando em um efeito tampão (COOK et al., 2011) e garantindo a proteção dos fagos em ambiente gástrico pelo encapsulamento com alginato (NARAYANI e RAO, 1996; RAO e RAO, 1997). A diminuição do efeito letal da acidez gástrica nos fagos UFV-AREG1 encapsulados em alginato-proteína do soro pode ocorrer por dois mecanismos. A proteína desnaturada carrega cargas negativas em pH neutro e, quando o ácido é adicionado, as cargas negativas interagem com os prótons (H^+), neutralizando parcialmente o microambiente dentro de uma esfera. Ainda, quando o pH é inferior ao ponto isoelétrico da proteína do soro de leite (PI ~ 5,2), a proteína fica carregada positivamente e pode interagir com as moléculas de alginato carregadas negativamente para formar uma rede mais densamente reticulada, capaz de reduzir a permeação de ácidos (TANG et al., 2015).

A concentração total de polímero foi outro fator que afetou a proteção dos fagos UFV-AREG1 em ambiente ácido simulado. As esferas com maior teor de polímero (WP2) proporcionaram melhor proteção aos fagos que às esferas com menor concentração de polímero (CH2). Uma elevada concentração de polímero resultou na formação de uma rede mais densa, capaz de reduzir a taxa de difusão de ácido para o interior das esferas.

O tamanho da esfera também afetou a proteção fagos dos UFV-AREG1 em condições gástricas. O tamanho das esferas da formulação CH2 foi maior que das demais formulações (AL4, CA2 e WP2), no entanto, foi a matriz que proporcionou menor proteção aos fagos UFV-AREG1 contra a digestão gástrica simulada. Este resultado foi contrário do encontrado para células *Bifidobacterium longum* encapsuladas em alginato, cujas esferas de tamanho grande (2,63 mm) proporcionaram mais proteção às células contra o efeito de ácido que as de tamanho pequeno (1,03 mm) (LEE e HEO, 2000).

A integridade física das esferas permaneceu visualmente intacta após 120 min em FGS em pH 2,5 (Figura 2c). As esferas de alginato-polímeros não se desintegraram em ambiente ácido, mas apresentaram ligeiro inchaço após o período de incubação, diferentemente do que se têm relatado, que em pH ácido, a rede de gel de alginato tem a propriedade de encolhimento reduzindo o tamanho dos poros (VANDENBERG et al, 2001; GEORGE e ABRAHAM, 2006, PASPARAKIS e BOUROPOULOS, 2006). Incrementos no diâmetro de 4,55% para a formulação AL4, 25,17% para a CA2, 27,86% para a WP2 e 6,47%

para a CH2 foram observados, o que pode ter permitido a entrada de fluido gástrico no interior das esferas e seu contato com os fagos UFV-AREG1, reduzindo o título. Este inchamento não conduziu a qualquer destruição física das esferas, embora não se possa concluir a respeito da degradação dos polímeros, uma vez que foi demonstrado que nem todas as formulações foram gastrorresistentes. As esferas de alginato-proteína do soro tiveram maior inchamento devido à repulsão eletrostática fraca entre os íons Ca^{2+} e as cargas positivas nas cadeias proteicas, causadas pela protonação dos grupos amina em pH baixo (HÉBRARD et al., 2006).

3.3. Estabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados em sais biliares

A estabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados não foi afetada após exposição a sais biliares (Tabela 1). O título dos fagos livres reduziu apenas 0,4 ciclos \log_{10} em solução com 2 % de bile após 3h de incubação a 37 °C. O título dos fagos encapsulados foi completamente mantido após 1h e 3h de incubação em ambas as concentrações biliares.

Tabela 1 - Estabilidade dos fagos UFV-AREG1 livres e encapsulados após tratamento em diferentes concentrações de bile e tempos de incubação (Ti)

Formulação	Ti	Fago inicial*	Concentração de bile		
			0 g/100 mL	1 g/100 mL	2 g/100 mL
Fago livre		9,95 ± 0,33	9,92 ± 0,45 ^{Aa}	9,79 ± 0,45 ^{ABa}	9,80 ± 0,89 ^{Aa}
AL4		9,86 ± 0,85	9,43 ± 1,05 ^{Ca}	9,41 ± 1,00 ^{Ca}	9,32 ± 0,63 ^{Ba}
CA2	1h	9,86 ± 0,85	9,30 ± 0,15 ^{Cb}	9,63 ± 0,80 ^{BCa}	9,62 ± 1,08 ^{ABa}
WP2		9,85 ± 0,93	9,99 ± 1,34 ^{Aa}	9,97 ± 1,33 ^{Aa}	9,85 ± 1,17 ^{Aa}
CH2		9,85 ± 0,93	8,75 ± 1,35 ^{Da}	8,79 ± 0,80 ^{Da}	8,48 ± 1,03 ^{Cb}
Fago livre		9,95 ± 0,33	9,92 ± 0,63 ^{Aa}	9,66 ± 0,93 ^{ABCb}	9,55 ± 0,55 ^{ABb}
AL4		9,86 ± 0,85	9,47 ± 0,33 ^{Ca}	9,51 ± 0,93 ^{BCa}	9,35 ± 0,55 ^{Ba}
CA2	3h	9,86 ± 0,85	9,59 ± 0,89 ^{BCa}	9,72 ± 1,03 ^{ABa}	9,67 ± 0,15 ^{Aa}
WP2		9,85 ± 0,93	9,87 ± 1,10 ^{ABa}	9,72 ± 0,55 ^{ABa}	9,85 ± 0,89 ^{Aa}
CH2		9,85 ± 0,93	8,08 ± 0,15 ^{Ea}	8,18 ± 0,63 ^{Ea}	8,00 ± 0,15 ^{Da}

* Em \log_{10} UFP g^{-1} ou \log_{10} UFP mL^{-1} . Médias por coluna, com mesma letra (A a E), não diferem entre si ($p > 0,05$). Médias por linha, com mesma letra (a e b), não diferem entre si ($p > 0,05$).

Os sais biliares, surfactantes aniônicos presentes no trato gastrointestinal e formados a partir do colesterol no fígado (LIEBERMAN e MARKS, 2013), não afetaram a viabilidade dos fagos UFV-AREG1 e, portanto, não devem ser uma barreira durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Este resultado foi semelhante ao encontrado para fagos de *Vibrio vulnificus*, Felix O1 e K, que foram muito tolerantes à bile (KOO et al., 2000; MA et al.,

2008, TANG et al., 2013, 2015). Dessa forma, a bile não parece inibir a sobrevivência dos fagos ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal, não sendo um aspecto relevante para a administração oral dos fagos UFV- AREG1.

3.4. Liberação de fagos UFV-AREG1 encapsulados em fluido intestinal simulado

O ideal nas aplicações via oral é que as esferas forneçam proteção aos fagos das condições gástricas adversas e permitam sua liberação no local desejado. Em meio ácido (fluido gástrico) as esferas com alginato protegem fagos dos efeitos ácidos e das enzimas proteolíticas presentes no estômago e quando em meio neutro-alcalino (fluido intestinal), o alginato começa a inchar e liberar os fagos aprisionados (Figura 3a).

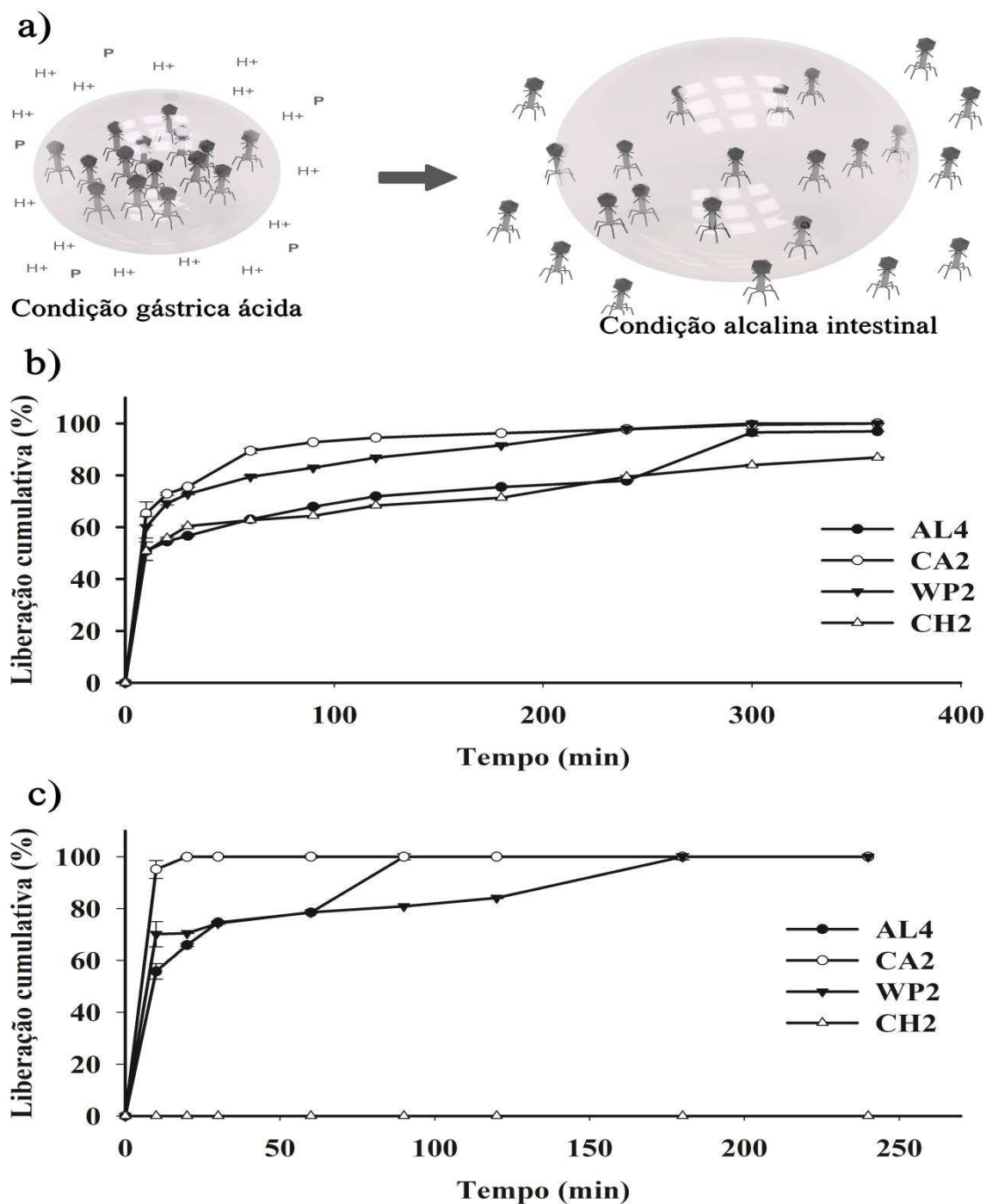


Figura 3 - Esquema de liberação dos fagos UFV-AREG1 a partir das esferas alginato-polímeros em condições gastrointestinais - Pepsina (P) (a). Liberação dos fagos UFV-AREG1 encapsulados a partir das esferas de Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2) e Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2) em FIS (pH 6,8) a 37 °C durante 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min (b). Liberação dos fagos UFV-AREG1 encapsulados a partir das esferas de Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2) e Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2) em FIS (pH 6,8) a 37 °C após exposição em FGS (pH 2,5) por 120 min. Tratamentos com fagos indetectáveis (<10³ UFP g⁻¹) foram considerados como zero (c).

O perfil de liberação dos fagos em FIS (pH 6,8) mostrou que o número de fagos liberados aumentou gradualmente de 5,59 (AL4), 7,45 (CA2), 7,17 (WP2) e 5,95 (CH2) \log_{10} UFP g^{-1} aos 30 minutos, até uma liberação quase completa de 9,81 e 9,85 \log_{10} UFP g^{-1} após 5h de incubação para as formulações CA2 e WP2, respectivamente; e de 9,56 e 8,56 \log_{10} UFP g^{-1} após 6h de incubação para as formulações AL4 e CH2, respectivamente (Figura 3b). O comportamento das esferas de alginato-polímeros ao longo da incubação em FIS destacando o inchamento da rede de alginato e aumento do diâmetro das esferas é apresentado na Figura 4.

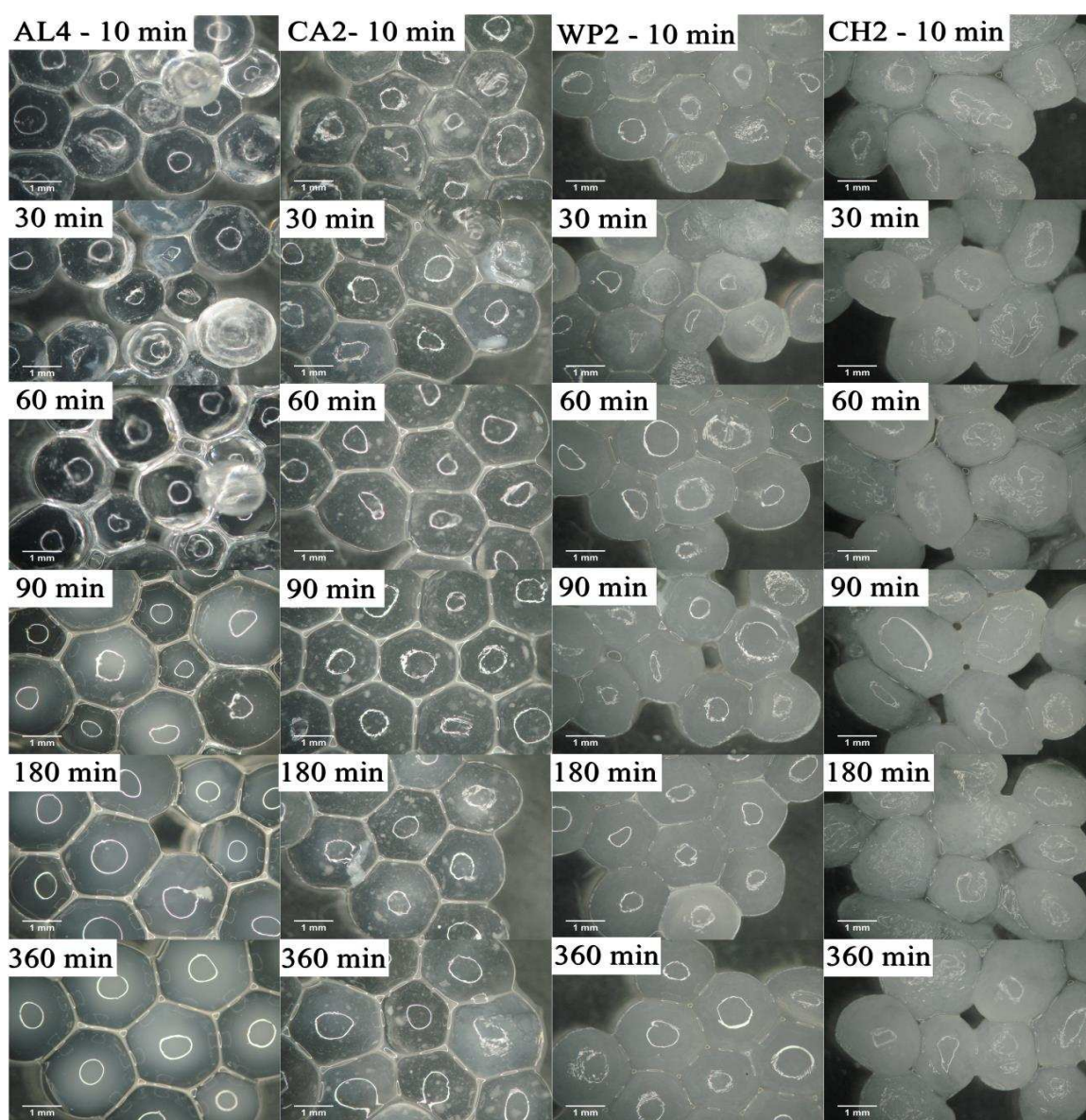


Figura 4 - Micrografias ópticas das esferas de Alginato 2,0 $g mL^{-1}$ (AL4), Alginato 1,0 $g mL^{-1}$ -Carragena 1,25 $g mL^{-1}$ (CA2), Alginato 1,0 $g mL^{-1}$ -Proteína do soro 1,5 $g mL^{-1}$ (WP2) e Alginato 1,0 $g mL^{-1}$ -Quitossana 0,5 $g mL^{-1}$ (CH2) em FIS (pH 6,8) a 37 °C durante 10, 30, 60, 90, 180 e 360 min.

Em pH 6,8, os íons de cálcio ligados às moléculas de alginato começam a dissociar-se devido à troca de Ca^{2+} ligados aos grupos carboxila e íons fosfato do meio, resultando em inchaço e eventual desintegração do gel de alginato (KIKUCHI et al., 1999), permitindo a liberação dos fagos UFV-AREG1 das esferas. Aos 10 min de incubação em FIS, mais de 50 % dos fagos já haviam sido liberados das esferas de todas as formulações, exibindo uma liberação inicial rápida seguida de uma liberação lenta nas horas seguintes. Este resultado é semelhante ao encontrado para o perfil de liberação de cafeína encapsulada em hidrogel de proteína de soro, que apresentou liberação rápida durante a primeira hora, seguida de liberação prolongada durante 120 min (GUNASEKARAN et al., 2007). Já para a liberação de cerca de 50 % de fagos K em microesferas de alginato, observou-se certo tempo de latência (4h-6h), aparentemente causado por um processo inicial de inchamento (MA et al., 2012). A liberação dos fagos da rede de alginato é modulada por um processo de inchaço-dissolução (MA et al., 2012).

Observou-se o intumescimento e fragilização das esferas ao longo das 6h de incubação em FIS, com incrementos nos diâmetros de 55,19 % (AL4), 67,13 % (CA2), 52,14 % (WP2) e de 18,91 % (CH2), que permitiram a liberação dos fagos UFV-AREG1. O tamanho dos poros da rede de gel de alginato é suficientemente pequeno para aprisionar os fagos até o inchaço do gel, que resulta em aumento dos poros da rede e permite a saída dos fagos.

A concentração total de polímero influenciou o perfil de liberação dos fagos encapsulados. A formulação WP2 (maior teor de polímeros- 2,5%) ofereceu melhor proteção aos fagos UFV-AREG1 em FGS e proporcionou a mais rápida taxa de liberação dos fagos. Este resultado foi diferente do encontrado para microesferas de alginato-proteína do soro com maior concentração de polímero, que aumentou a proteção contra o meio ácido, mas reduziu a taxa de liberação (TANG et al., 2013). Também, em microesferas a base de alginato com elevada concentração de polímero, houve retardamento da liberação do componente encapsulado (ARICA et al., 2005; SONI et al., 2010).

As variações no pH afetam as matrizes formadas por proteínas devido à presença de grupos ácidos (carboxílicos) e básicos (aminos) nas cadeias polipeptídicas, que aceitam ou liberam prótons em resposta às alterações no pH do meio (HÉBRARD et al., 2010). A liberação mais rápida dos fagos UFV-AREG1 a partir das esferas de WP2 pode estar relacionada ao seu ponto isoelétrico (PI), uma vez que o gel de proteína de soro de leite intumescer rapidamente a pH acima de seu PI (~ 5,2). Outro fator para liberação mais rápida

dos fagos a partir das esferas de WP2 envolve o mecanismo de degradação das partículas à base de proteínas por desagregação hidrolítica por enzimas digestivas do trato gastrointestinal (HÉBRARD et al., 2010; TANG et al., 2013). O mecanismo de ruptura que permite a liberação dos fagos a partir das esferas de alginato-proteína do soro inclui inchaço da esfera, aumento da porosidade e permeação das enzimas de digestão (SAMTLEBE et al., 2016). Assim, a proteína de soro pode ser degradada por enzimas pancreáticas contidas no FIS, desintegrando a rede alginato-proteína do soro e liberando os fagos. Este resultado é semelhante ao relatado para células de levedura em presença de pancreatina, que apresentaram liberação acelerada a partir de microesferas de alginato-proteína do soro quando expostas em FIS (HÉBRARD et al., 2010).

O título dos fagos UFV-AREG1 sobreviventes tratados previamente em SFG (pH 2,5) durante 120 min e, posteriormente, transferidos para FIS (pH 6,8) foi de 7,46, 5,15 e 9,82 \log_{10} UFP g^{-1} nas esferas de AL4, CA2 e WP2, respectivamente. O título dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em CH2 foi indetectável após 120 min de exposição em FGS e, por isso, não houve contagem de fagos viáveis detectáveis quando incubados em FIS (Figura 3c). O tempo de liberação dos fagos das esferas foi menor quando tratadas previamente em FGS e depois em FIS, uma vez que os títulos iniciais nas esferas também foram menores. Os fagos UFV-AREG1 sem a exposição prévia em FGS, foram liberados quase completamente após 6h de incubação em FIS, enquanto os expostos em FGS e depois em FIS estavam completamente liberados após 3h de incubação (Figura 5).

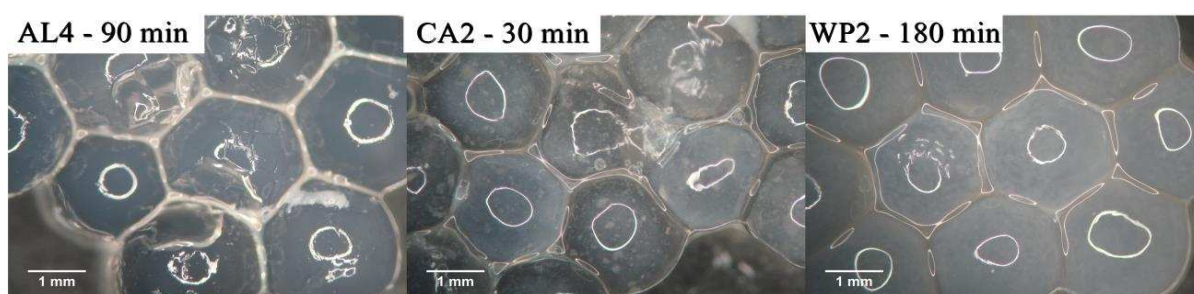


Figura 5 - Micrografias ópticas das esferas de Alginato $2,0 \text{ g mL}^{-1}$ (AL4), Alginato $1,0 \text{ g mL}^{-1}$ -Carragena $1,25 \text{ g mL}^{-1}$ (CA2), Alginato $1,0 \text{ g mL}^{-1}$ -Proteína do soro $1,5 \text{ g mL}^{-1}$ (WP2) em FIS (pH 6,8) a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ após exposição em FGS (pH 2,5) durante 120 min a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O perfil de liberação dos fagos foi semelhante ao incubar as esferas diretamente em FIS e ao serem tratadas previamente em FGS e depois em FIS. Após 10 min de incubação, 55,76 %, 95,12 % e 70,13 % dos fagos UFV-AREG1 já haviam sido liberados das esferas de

AL4, CA2 e WP2, respectivamente. Aos 30 min, as esferas de CA2 já haviam liberado completamente os fagos para o meio. Aos 90 min, completou-se a liberação dos fagos a partir das esferas de AL4. Após incubação por 3h, os fagos UFV-AREG1 foram completamente liberados das esferas da formulação WP2. As esferas estavam aparentemente intactas após exposição em FGS, mas a rede de gel de alginato-polímeros foi fragilizada e, quando introduzidas em FIS, incharam e desintegraram-se mais facilmente. As propriedades de inchamento são muito importantes para sistemas de entrega via oral, podendo influenciar as propriedades de liberação dos fagos. Todas as formulações deste estudo foram capazes de liberar os fagos encapsulados quando expostas em fluido intestinal simulado, deixando-os livres para infectar os agentes patogênicos alvos.

3.5. Estabilidade dos fagos encapsulados UFV-AREG1 durante o armazenamento

O título dos fagos UFV-AREG1 foi mantido durante 5 meses em esferas úmidas armazenadas a 7 °C (Figura 6), com reduções de apenas 0,74, 0,70, 0,72 e 1,60 ciclos \log_{10} UFP g^{-1} nas esferas de AL4, CA2, WP2 e CH2, respectivamente.

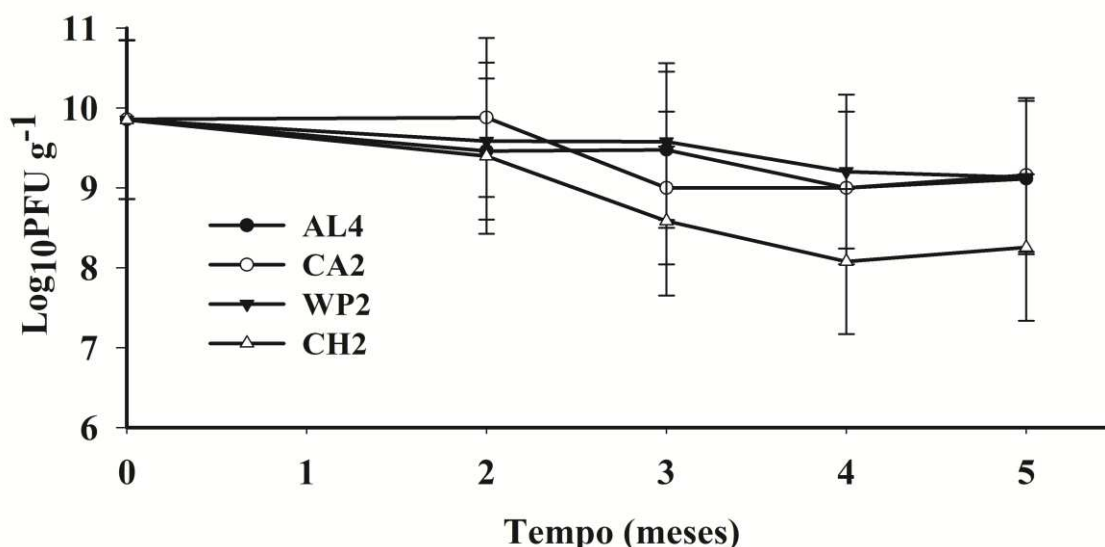


Figura 6 - Estabilidade dos fagos UFV-AREG1 encapsulados em esferas de Alginato 2,0 $g mL^{-1}$ (AL4), Alginato 1,0 $g mL^{-1}$ -Carragena 1,25 $g mL^{-1}$ (CA2), Alginato 1,0 $g mL^{-1}$ -Proteína do soro 1,5 $g mL^{-1}$ (WP2) e Alginato 1,0 $g mL^{-1}$ -Quitossana 0,5 $g mL^{-1}$ (CH2) durante 5 meses de armazenamento a 7 °C.

As esferas de alginato-polímeros ofereceram boa proteção aos fagos UFV-AREG1 durante o armazenamento na forma úmida, evidenciando que o encapsulamento em polímeros mantém a estabilidade das partículas virais por longos períodos de tempo. Este resultado é semelhante ao relatado para a viabilidade dos fagos Felix O1 e K, que foi mantida por 6

semanas em microesferas úmidas armazenadas a 4 °C (MA et al., 2008; TANG et al., 2013, 2015). E a viabilidade de *Lactobacillus bulgaricus* encapsulado em microesferas de alginato-proteína do soro foi preservada após 30 dias de armazenamento a 4 °C (SHI et al., 2013).

3.6. Efeito da secagem sobre os fagos encapsulados UFV-AREG1

O processo de secagem sem agentes protetores reduziu o título dos fagos UFV-AREG1 a um nível não detectável ($<10^2$ UFP g^{-1}). As esferas foram geralmente esféricas com superfície enrugada, sem fissuras ou furos visíveis (Figura 7). A redução dos diâmetros das esferas das formulações AL4, CA2, WP2 e CH2 após secagem foram de 52,60 %, 48,25 %, 55,0 % e 46,55 %, respectivamente, evidenciando o elevado teor de água contido nas mesmas (Tabela 2).

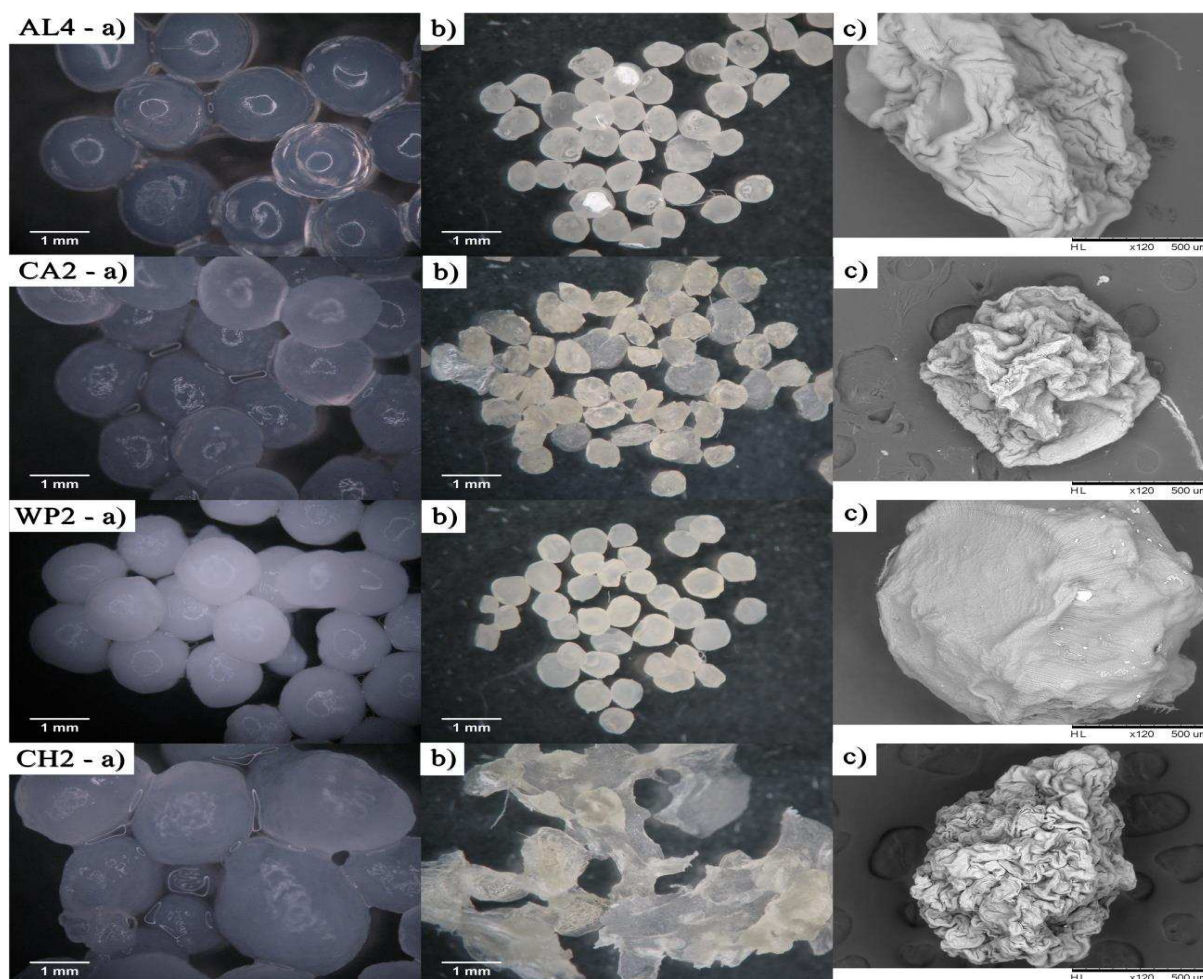


Figura 7 - Micrografias ópticas das esferas de Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2) e Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2) antes (a) e após secagem (b). Micrografia eletrônica de varredura da estrutura superficial externa das esferas de Alginato 2,0 g mL⁻¹ (AL4), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Carragena 1,25 g mL⁻¹ (CA2), Alginato 1,0 g mL⁻¹-Proteína do soro 1,5 g mL⁻¹ (WP2) e Alginato 1,0 g mL⁻¹-Quitossana 0,5 g mL⁻¹ (CH2) (c).

Tabela 2 - Formulação, peso seco (mg), diâmetro (mm) e volume (mm³) das esferas secas

Formulação	Peso seco*	Diâmetro	Volume
AL4	54,3 ± 3,8	0,73 ± 0,07	0,20 ± 0,06
CA2	48,1 ± 4,4	0,74 ± 0,09	0,22 ± 0,08
WP2	75,3 ± 3,1	0,63 ± 0,07	0,13 ± 0,04
CH2	40,2 ± 3,2	1,24 ± 0,27	1,14 ± 0,76

* Equivalente a 1 g de esferas úmidas.

Os fagos UFV-AREG1 encapsulados em esferas de alginato-polímeros sem agentes protetores foram sensíveis à desidratação, evidenciando a necessidade de pesquisar agentes para revestimento que aumentem a estabilidade dos fagos encapsulados durante a secagem. Os materiais mais utilizados como agentes protetores incluem a trealose, leite desnatado, maltodextrina, sacarose, glicerol, lactose, maltose, entre outros (MA et al., 2012; TANG et al., 2015). A estabilização de biomoléculas por sua incorporação em soluções de carboidratos e/ou proteínas antes da secagem é uma forma de preservação (LODATO et al, 1999; MA et al., 2008, 2012; TANG et al., 2013, 2015). Vários mecanismos de proteção por materiais de revestimento foram propostos (MIAO et al., 2008; PATIST e ZOERB, 2005), no entanto, o modo de atuação depende do sistema biológico e do processo de desidratação. No caso de fagos, a preservação da estrutura das proteínas do capsídeo durante a desidratação parece ser essencial para manter sua viabilidade (MA et al., 2012). Para isso, os materiais de revestimento devem substituir as moléculas de água por meio da formação de ligação de hidrogênio com as proteínas, estabilizando a estrutura nativa das mesmas, na ausência de água (CROWE et al., 1987). A preparação de fagos em uma forma seca é desejável para o armazenamento por período prolongado, conveniência de transporte e para facilitar a utilização dos mesmos.

4. CONCLUSÃO

O encapsulamento em esferas de alginato, alginato-carragena, alginato-proteína do soro e alginato-quitosana aumentou a sobrevivência dos fagos UFV-AREG1 expostos em fluido gástrico simulado. As características químicas das matrizes, a concentração total de polímero e o tamanho das esferas foram fatores importantes na resistência dos fagos nos testes *in vitro*. A matriz de alginato-proteína do soro proporcionou maior proteção aos fagos durante a exposição em fluido gástrico e mais rápida liberação em fluido intestinal, enquanto a matriz de alginato-quitosana ofereceu menor proteção aos fagos. Os fagos UFV-AREG1 foram

sensíveis à desidratação, evidenciando a necessidade de pesquisar agentes protetores que aumentem a estabilidade dos mesmos durante a secagem. O encapsulamento de fagos UFV-AREG1 apresentou potencial para uso em sistemas de administração oral como agentes fagoterápicos, sendo capazes de modular a microbiota patogênica intestinal em sistemas biológicos e, assim, reduzir possíveis contaminações no início da cadeia de processamento de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann, H. W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsletter*, 38, 35-40.

Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. *Bacteriophages*.

Andresen, I.L., Skipnes, O., Smidsrod, O., Ostgaard, K., & Hemmer, P.C. (1977). Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater, *ACS Symp. Ser.* 48, 361-381.

Arica, B., Çaliş, S., Atilla, P., Durlu, N.T., Cakar, N., Kaş, H.S., & Hincal, A.A. (2005). In vitro and in vivo studies of ibuprofen-loaded biodegradable alginate beads. *Journal of microencapsulation*, 22(2), 153-165.

Berry, E. D., & Wells, J. E. (2010). *Escherichia coli* O157:H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Advances in food and nutrition research*, 60, 67-117.

Berry, E. D., Wells, J. E., Bono, J. L., Woodbury, B. L., Kalchayanand, N., Norman, K. N., Norman, K. N., Suslow, T. V., López-Velasco, G., & Millner, P. D. (2015). Effect of proximity to a cattle feedlot on *Escherichia coli* O157: H7 contamination of leafy greens and evaluation of the potential for airborne transmission. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), 1101-1110.

Caldeira, J. C., & Peabody, D. S. (2007). Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. *Journal of nanobiotechnology*, 5(1), 10.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States (2013). Disponível em:< <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>> Acesso em: 07 de fevereiro 2017.

CDC. *Escherichia coli* (2017). Disponível em:< <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>> Acesso em: 26 de julho de 2017.

Chekabab, S. M., Paquin-Veillette, J., Dozois, C. M., & Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS microbiology letters*, 341(1), 1-12.

Clark, W. A. (1962). Comparison of several methods for preserving bacteriophages. *Applied microbiology*, 10(5), 466-471.

- Coffey, B., Rivas, L., Duffy, G., Coffey, A., Ross, R.P., & McAuliffe, O. (2011). Assessment of *Escherichia coli* O157:H7- specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments. *International journal of food microbiology*, 147(3), 188-194.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Aríñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D., & Llagostera, M. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific reports*, 7, 41441.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2011). Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*, 12(7), 2834-2840.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., & Wistrom, C. A. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242(1), 1.
- Dawson-Hughes, B., Heaney, R. P., Holick, M. F., Lips, P., Meunier, P. J., & Vieth, R. (2005). Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporosis International*, 7(16), 713-716.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. *Journal of controlled release*, 114(1), 1-14.
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Lopez, M. E. S. & Batalha, L. S. (2016). Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT- Food science and Technology*, 67, 159-166.
- Gunasekaran, S., Ko, S., & Xiao, L. (2007). Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 31-40.
- Handelsman, J., & Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The plant cell*, 8(10), 1855.
- Hébrard, G., Blanquet, S., Beyssac, E., Remondetto, G., Subirade, M., & Alric, M. (2006). Use of whey protein beads as a new carrier system for recombinant yeasts in human digestive tract. *Journal of biotechnology*, 127(1), 151-160.
- Hébrard, G., Hoffart, V., Beyssac, E., Cardot, J. M., Alric, M., & Subirade, M. (2010). Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. *Journal of microencapsulation*, 27(4), 292-302.
- Honish, L., Punja, N., Nunn, S., Nelson, D., Hislop, N., Gosselin, G., Stashko, N., & Dittrich, D. (2017). *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with contaminated pork products- Alberta, Canada, July-October 2014. *Canada Communicable Disease Report*, 43(1), 21.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1704-1711.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200.
- Kikuchi, A., Kawabuchi, M., Watanabe, A., Sugihara, M., Sakurai, Y., & Okano, T. (1999). Effect of Ca²⁺-alginate gel dissolution on release of dextran with different molecular weights. *Journal of Controlled Release*, 58(1), 21-28.

- Klein, J., Stock, J., & Vorlop, K. D. (1983). Pore size and properties of spherical Ca- alginate biocatalysts. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 18(2), 86-91.
- Koo, J., DePaola, A., & Marshall, D. L. (2000). Effect of simulated gastric fluid and bile on survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage. *Journal of food protection*, 63(12), 1665-1669.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8), 737-743.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., & Gantzer, C. (2007). Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1632-1638.
- Lee, H., Ku, H. J., Lee, D. H., Kim, Y. T., Shin, H., Ryu, S., & Lee, J. H. (2016). Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. *PloS one*, 11(12), e0168985.
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 869-873.
- Li, X. Y., Jin, L. J., Uzonna, J. E., Li, S. Y., Liu, J. J., Li, H. Q. & Xu, Y. P. (2009). Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): in vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 129(1), 132-136.
- Lieberman, M., Marks, A. D., & Peet, A. (2013). Marks basic medical biochemistry. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1), 5-14.
- Lodato, P., Segovia de Huergo, M., & Buera, M. P. (1999). Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), 215-220.
- Lopez, M. E. S., Batalha, L. S., Vidigal, P. M. P., Albino, L. A. A., Boggione, D. M. G., Gontijo, M. T. P. & Mendonca, R. C. S. (2016). Genome sequence of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacteriophage UFV-AREG1. *Genome announcements*, 4(5), e00412-16.
- Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy, mini review. *Name: Frontiers in Microbiology*, 5, 51.
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Sabour, P. M., Huang, X., & Xu, Y. (2012). Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food hydrocolloids*, 26(2), 434-440.
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A., & Sabour, P. M. (2008). Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and environmental microbiology*, 74(15), 4799- 4805.

- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M. P., & Joseph, S. W. (1998). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157: NM isolated from animals, food, and humans. *Journal of food protection*, 61(11), 1511-1514.
- Miao, S., Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Roos, Y., & Ross, R. P. (2008). Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Science and Technology*, 88(1), 19-30.
- Narayani, R., & Panduranga Rao, K. (1996). Polymer-coated gelatin capsules as oral delivery devices and their gastrointestinal tract behaviour in humans. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 7(1), 39-48.
- Olson, M. R., Axler, R. P., & Hicks, R. E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of virological methods*, 122(2), 147-152.
- Pasparakis, G., & Bouropoulos, N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *International journal of pharmaceutics*, 323(1), 34-42.
- Patist, A., & Zoerb, H. (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 107-113.
- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and photobiology*, 65(2), 270-283.
- Rao, J. K., & Rao, K. P. (1997). Controlled release of FITC-BSA from polymer coated gelatin microspheres. *Journal of bioactive and compatible polymers*, 12(2), 127-139.
- Samtlebe, M., Ergin, F., Wagner, N., Neve, H., Küçükçetin, A., Franz, C. M. & Atamer, Z. (2016). Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: Encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 334-340.
- Schroeder, C. M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. D., McDermott, P. F., Walker, R. D., & Meng, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 576-581.
- Shi, L. E., Li, Z. H., Li, D. T., Xu, M., Chen, H. Y., Zhang, Z. L., & Tang, Z. X. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 99-104.
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology*, 2012.
- Sogias, I. A., Khutoryanskiy, V. V., & Williams, A. C. (2010). Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211(4), 426-433.
- Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 427-434.

- Stanford, K., McAllister, T. A., Niu, Y. D., Stephens, T. P., Mazzocco, A., Waddell, T. E., & Johnson, R. P. (2010). Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 73(7), 1304-1312.
- Stanley, N. (2011): FAO Corporate document repository. Chapter 3: Production, properties and uses of carrageenan. FMC Corporation, Marine Colloids Division 5 Maple Street, Rockland Maine 04841, USA.
- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine drugs*, 13(4), 1819-1846.
- Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J. R., Sabour, P. M., & Wang, Q. (2013). Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food research international*, 52(2), 460-466.
- Tang, Z., Huang, X., Sabour, P. M., Chambers, J. R., & Wang, Q. (2015). Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 263-270.
- Thorne, C. B., & Holt, S. C. (1974). Cold lability of Bacillus cereus bacteriophage CP-51. *Journal of virology*, 14(4), 1008-1012.
- U.S. Pharmacopeial Convention. (2004). The United States pharmacopeia, 27th ed., p. 2728. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Vandenberg, G. W., Drolet, C., Scott, S. L., & De la Noüe, J. (2001). Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *Journal of Controlled Release*, 77(3), 297-307.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E. (2010). Materials for encapsulation. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 31-100). Springer New York.
- Warren, J. C., & Hatch, M. T. (1969). Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols. *Applied microbiology*, 17(2), 256-261.