

HUMBERTO MOREIRA HUNGARO

**BIOCONTROLE DE *Salmonella enterica* EM PELE DE  
FRANGO DE CORTE**

Dissertação apresentada a  
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  
2010

HUMBERTO MOREIRA HUNGARO

**BIOCONTROLE DE *Salmonella enterica* EM PELE DE  
FRANGO DE CORTE**

Dissertação apresentada a  
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 EM 10 DE FEVEREIRO DE 2010

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Co-orientadora)

---

Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto  
(Co-orientadora)

---

Prof. Nélio José de Andrade

---

Prof. Wilmer Edgard Luera Peña

---

Prof<sup>a</sup>. Regina Célia Santos Mendonça  
(Orientadora)

*À minha família,  
pelo infinito apoio, amor,  
carinho e compreensão.*

**DEDICO**

ii

"Nas grandes batalhas da vida,  
o primeiro passo para a vitória  
é o desejo de vencer".

( Mahatma Gandhi )

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre guiar meus passos e nunca me deixar sozinho nas horas difíceis; pela saúde, fé, perseverança e oportunidade de fazer as coisas que gosto na vida, porque “tu és o meu pastor e nada me faltará”.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Professora Regina Célia Santos Mendonça pela amizade, carinho, confiança, orientação, oportunidade, atenção e apoio em todos os momentos deste curso.

À Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pela amizade, carinho, conselhos, auxílio e participação na banca examinadora.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela amizade, ensinamentos, sugestões e participação na banca examinadora.

Ao professor Nélio José de Andrade e ao professor Wilmer Edgard Luera Peña pelas sugestões e participação na banca examinadora.

À empresa Nippon Chemical Indústria e Comércio de Saneantes e Detergentes Profissionais Ltda, pela doação dos saneantes utilizados neste experimento.

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação dos micro-organismos utilizados neste experimento.

Ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear da Universidade Federal de Minas Gerais por possibilitar a irradiação das amostras.

Ao Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa, em especial a funcionária Karla, por possibilitar a visualização microscópica dos bacteriófagos.

Aos meus pais, Hélio Hungaro e Eliana Maria Moreira Hungaro, pelo amor incondicional, educação, respeito, confiança, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Aos meus queridos irmãos, Arthur, Alexandre, Hélio e Rodrigo, pelo carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos.

Ao amor da minha vida, Brenda Neres Targino pelo amor, carinho, cumplicidade, incentivo, companheirismo e ajuda na execução do experimento...sem você não conseguiria chegar até aqui, não saberia o que é felicidade, te amo muito.

Ao meu avô, Mozart Pinto Moreira (*in memoriam*), que esteve presente em meus pensamentos em vários momentos.

A Delaine, Michelle e Élide pela amizade, ajuda durante o experimento e por bons momentos compartilhados no laboratório.

Aos amigos que fiz durante esta caminhada, aqui representados por Claudia Vieira, Juan Camilo, Juan Eduardo, Emanuel Faria, José Carlos, Danilo, Orlando, José Alberto Portugal, Mayra, Rafael e Johnson pela amizade, palavras de apoio, conselhos, risadas e por todos os momentos bons e ruins compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), Ana Carolina, Joesse, Arthur, Janaína, Luiz Augusto, Nádia, Patrícia, Daniela, Márcia e Andreza, por dividirem comigo as preocupações, o trabalho, e acreditar que podemos fazer coisas grandiosas com o nosso esforço.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos em especial ao Tomaz por estar sempre de prontidão para consertar os equipamentos durante esta caminhada.

Aos amigos e professores de graduação, Marco Antônio Moreira Furtado e Míriam Aparecida Pinto Vilella, que me impulsionaram para esta caminhada, e que sempre me apoiaram em minhas decisões e escolhas. Aos meus amigos Jonathan Andrade, Marcelo Magalhães, Aline Siqueira, Natalia Calil e Carlos Henrique Fonseca pelo apoio, amizade, companheirismo e por sempre me desejarem o melhor.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram,

Meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

Humberto Moreira Hungaro, filho de Hélio Hungaro e Eliana Maria Moreira Hungaro, nasceu em Rio Novo, Minas Gerais, no dia 11 de Outubro de 1981.

Em Julho de 2000 formou-se em Técnico em Laticínios pelo Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em Dezembro de 2007 graduou-se em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em Março de 2008, ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Características de <i>Salmonella</i> spp. ....	3
2.2 Características de infecções causadas por <i>Salmonella</i> .....	4
2.3 Epidemiologia .....	5
2.4 Contaminação na cadeia produtiva de aves .....	6
2.5 Controle de contaminação microbiana no processamento de aves .....	8
2.5.1 Descontaminação por métodos físicos .....	9
2.5.2 Descontaminação por métodos químicos .....	11
2.5.3 Descontaminação por métodos biológicos .....	14
2.6 Bacteriófagos .....	15
2.6.1 Definição e caracterização .....	15
2.6.2 Utilização em biocontrole .....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1 Micro-organismos .....	19
3.2 Isolamento e purificação de bacteriófagos .....	20
3.3 Propagação, determinação do título e estoque .....	21
3.4 Seleção dos bacteriófagos .....	22
3.5 Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados .....	22
3.6 Análise da morfologia dos bacteriófagos .....	23
3.7 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> dos bacteriófagos .....	23
3.8 Comparação entre métodos de descontaminação .....	24

3.9 Avaliação da atividade de bacteriófagos durante a refrigeração e congelamento. ....	25
3.10 Análise estatística .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 Isolamento e purificação de bacteriófagos.....	28
4.2 Propagação, determinação da titulação e produção de estoque .....	30
4.3 Seleção dos bacteriófagos.....	30
4.4 Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados.....	31
4.5 Análise da morfologia dos bacteriófagos .....	35
4.6 Avaliação da eficácia <i>in vitro</i> dos bacteriófagos.....	35
4.7 Comparação entre métodos de descontaminação de carcaça .....	45
4.8 Avaliação da atividade de bacteriófagos durante a refrigeração e congelamento. ....	50
5. CONCLUSÃO .....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO I .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Placas de lise de bacteriófagos isolados das amostras de fezes de frango.....	28
Figura 2. Intensidade lítica promovida por bacteriófagos selecionados sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis em comparação com o bacteriófago P <sub>22</sub> .....	31
Figura 3. Observação microscópica do bacteriófago de <i>Salmonella</i> BFSE7 isolado de fezes de aves em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140.000 x. ....	35
Figura 4. Redução da absorbância do cultivo de <i>Salmonella</i> adicionado de bacteriófago BFSE7 na concentração de 10 <sup>9</sup> PFU/mL e incubado a 37 °C. ....	36
Figura 5. Determinação da absorbância de cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE7 adicionado nas concentrações iniciais de 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>6</sup> e 10 <sup>9</sup> PFU mL <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C).. ....	37
Figura 6. Determinação da absorbância de cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE16 adicionado nas concentrações iniciais de 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>6</sup> e 10 <sup>9</sup> PFU mL <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). ....	38
Figura 7. Determinação da absorbância de cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE18 adicionado nas concentrações iniciais de 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>6</sup> e 10 <sup>9</sup> PFU mL <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). ....	39
Figura 8. Determinação da absorbância de cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE36 adicionado nas concentrações iniciais de 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>6</sup> e 10 <sup>9</sup> PFU mL <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). ....	40
Figura 9. Determinação da absorbância de cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE43 adicionado nas concentrações iniciais de 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>6</sup> e 10 <sup>9</sup> PFU mL <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C).. ....	41

- Figura 10. Determinação da absorbância de cultivos de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófagos BFSE7, BFSE16, BFSE18, BFSE36 e BFSE43 adicionados na concentração inicial de  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e tratamento controle sem adição de bacteriófagos (C) nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C).....43
- Figura 11. Contagem de *Salmonella* Enteritidis em fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^2$  UFC.cm<sup>-2</sup>, submetidos a tratamentos com mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e armazenados sob refrigeração a 4 °C (A) e congelamento a -20 °C (B) por 3, 10 e 30 dias.. .....53
- Figura 12. Contagem de *Salmonella* Enteritidis em fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^4$  UFC.cm<sup>-2</sup>, submetidos a tratamentos com mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e armazenados sob refrigeração a 4 °C (A) e congelamento a -20 °C (B) por 3, 10 e 30 dias. ....54
- Figura 13. Contagem de *Salmonella* Enteritidis em fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup>, submetidos a tratamentos com mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e armazenados sob refrigeração a 4 °C (A) e congelamento a -20 °C (B) por 3, 10 e 30 dias. ....55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre concentração de bacteriófagos e <i>Salmonella</i> (MOI) utilizada no tratamento de pele de frango armazenada sob refrigeração e congelamento.....	26
Tabela 2. Bacteriófagos isolados de fezes de frango em propriedades da região de Viçosa-MG utilizando <i>Salmonella</i> Enteritidis como hospedeiro. ....	29
Tabela 3. Bacteriófagos isolados de fezes de frango de diferentes propriedades selecionados para utilização no processo de descontaminação e titulação da solução estoque após propagação.....	30
Tabela 4. Teste de especificidade dos bacteriófagos selecionados de fezes de aves utilizando <i>Salmonella</i> Enteritidis em relação a diferentes espécies de micro-organismos de interesse em alimentos. ....	32
Tabela 5. Efeito do tratamento com bacteriófagos utilizados na concentração inicial de $10^9$ PFU mL <sup>-1</sup> sobre a contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis cultivada em diferentes temperaturas.....	44
Tabela 6. Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis dos fragmentos de pele de frango submetidos aos tratamentos com diferentes agentes de descontaminação a 4 °C.....	46
Tabela 7. Contagem de bacteriófagos nos fragmentos de pele de frango durante o período de armazenamento a 4 e -20 °C.....	57

## RESUMO

HUNGARO, Humberto Moreira. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Biocontrole de *Salmonella enterica* em pele de frango de corte**. Orientador: Regina Célia Santos Mendonça. Co-orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto.

Em função da necessidade de formas alternativas de controle de micro-organismos em alimentos e da crescente demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de bacteriófagos na redução de *Salmonella enterica* em pele de frango. Os bacteriófagos foram isolados de fezes de aves de criação extensiva de propriedades na região de Viçosa-MG, utilizando *Salmonella* Enteritidis como hospedeiro. Foram selecionados cinco bacteriófagos para descontaminação de pele de frango, por meio de avaliação do perfil lítico em comparação com bacteriófago P<sub>22</sub>. Os bacteriófagos selecionados foram avaliados quanto à especificidade em relação a várias estirpes de micro-organismos, morfologia e atividade sobre *Salmonella* Enteritidis em meio de cultivo. Os bacteriófagos foram utilizados na descontaminação de pele de frango inoculada com *Salmonella* Enteritidis e comparados com outros métodos de descontaminação. Foram também testados para verificar a redução da contagem de *Salmonella* Enteritidis em amostras de pele de frango armazenadas sob refrigeração e congelamento ao longo de 30 dias de estocagem. Os bacteriófagos de *Salmonella* foram isolados de 24 amostras de fezes de aves em 62,5 % das propriedades avaliadas, e atingiram concentrações de 10<sup>8</sup> a 10<sup>10</sup> PFU mL<sup>-1</sup> após propagação. Os cinco bacteriófagos selecionados apresentaram atividade sobre várias estirpes de *Salmonella enterica*, porém dois desses bacteriófagos foram inespecíficos e lisaram *Escherichia coli* e *Cronobacter muytjensii*. Em relação à morfologia, todos apresentaram cabeça icosaédrica e pequenas caudas o que indica serem da ordem *Caudovirales* e da família *Podoviridae*. O

efeito dos bacteriófagos sobre a contagem de *Salmonella* em meio de cultura foi dependente da concentração de bacteriófago utilizada. As maiores reduções de células viáveis de *Salmonella* de, aproximadamente, 2,5 log UFC mL<sup>-1</sup> foram obtidas nos cultivos adicionados de bacteriófagos na concentração inicial de 10<sup>9</sup> PFU mL<sup>-1</sup> e na temperatura de 25 °C. A redução de *Salmonella* em pele de frango com mistura de bacteriófagos foi de, aproximadamente, 0,92 log UFC.cm<sup>-2</sup>, e equivalente a outros métodos de descontaminação avaliados, tais como tratamentos com solução de dicloroisocianurato a 200 mg.L<sup>-1</sup>, solução de ácido peracético a 112 mg.L<sup>-1</sup>, e solução de ácido láctico a 2 % (v/v). Observou-se uma tendência de diminuição na contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele de frango armazenados sob refrigeração e congelamento à medida que se aumentava a concentração da mistura de bacteriófagos adicionada, e as maiores reduções de, aproximadamente, 2,0 log UFC.cm<sup>-2</sup> foram obtidas com adição da mistura de bacteriófagos na concentração de 10<sup>9</sup> PFU mL<sup>-1</sup>. As reduções na contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele de frango não foram influenciadas pela variação da contaminação dos fragmentos de pele nem pela condição e período de armazenamento. A concentração de bacteriófagos na pele de frango armazenada sob refrigeração e congelamento permaneceu constante durante o período avaliado. Os bacteriófagos selecionados apresentam potencial de utilização como tecnologia complementar no controle de *Salmonella* em carne de aves.

## ABSTRACT

HUNGARO, Humberto Moreira. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February de 2010. **Biocontrol of *Salmonella enterica* in poultry skin.** Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co- advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti e Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto.

According on the need for alternative ways to control microorganisms in food and the growing consumer demand for healthier products, this study aimed to evaluate the activity of bacteriophages to reduce *Salmonella enterica* in poultry skin. Bacteriophages were isolated from feces of poultry of extensive flock in the region of Viçosa-MG, using *Salmonella* Enteritidis as host. We selected five bacteriophages to decontaminate chicken skin, through evaluation of the profile compared with lytic bacteriophage P<sub>22</sub>. Bacteriophages selected were evaluated for specificity against several strains of micro-organisms, morphology and activity on *Salmonella* Enteritidis in the culture medium. Bacteriophages were used in the decontamination of chicken skin inoculated with *Salmonella* Enteritidis and compared with other methods of decontamination. Were also tested to verify the count reduction of *Salmonella* Enteritidis in samples of chicken skin stored at refrigeration and freezing along 30 days of storage. Bacteriophages of *Salmonella* were isolated from 24 samples of poultry feces in 62.5% of the properties and concentrations reached  $10^8$  to  $10^{10}$  PFU mL<sup>-1</sup> after propagation. The five selected phages showed activity against several strains of *Salmonella enterica*, but two of these bacteriophages were not specific and capable of lysing *Escherichia coli* and *Cronobacter muytjensii*. With respect to morphology, all had icosahedral heads and short tails indicating that they are of the order Caudovirales and family Podoviridae. The effect of bacteriophages on the count of *Salmonella* in the culture medium was dependent on the concentration of phage used. The greatest decreases of viable cells of *Salmonella* by approximately 2.5 log CFU

mL<sup>-1</sup> were obtained in cultures added bacteriophages of the initial concentration of 10<sup>9</sup> PFU mL<sup>-1</sup> and at 25 ° C. The reduction of *Salmonella* in chicken skin with a mixture of bacteriophages was approximately 0.92 log UFC.cm<sup>-2</sup>, and equal to other decontamination methods evaluated, such as treatments with dichloroisocyanurate solution at 200 mg.L<sup>-1</sup>, solution of peracetic acid to 112 mg.L<sup>-1</sup>, and lactic acid solution 2% (v / v). We observed a decreasing trend in the count of *Salmonella* from chicken skin fragments stored under refrigeration and freezing as it increased the concentration of the mixture of bacteriophages added, and the largest reductions of approximately 2.0 log UFC.cm<sup>-2</sup> were obtained with the addition of the mixture of bacteriophages at a concentration of 10<sup>9</sup> PFU mL<sup>-1</sup>. Reductions in *Salmonella* counts of chicken skin fragments were not influenced by variation of the contamination of the fragments of skin and the condition and storage period. The concentration of bacteriophage in chicken skin stored under refrigeration and freezing remained constant during the study period. Selected Bacteriophages show promise for use as complementary technology to control *Salmonella* in poultry meat.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2008, o Brasil produziu mais de 10,9 milhões de toneladas de carne de aves e, de acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF, 2009), destaca-se como o terceiro produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, respectivamente. Em relação às exportações de carne de aves, o país assume o primeiro lugar, com 3,6 milhões de toneladas exportadas em 2008 (UBA, 2009). A presença de bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de aves ainda constitui um problema de saúde pública e de grandes prejuízos econômicos tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A elevada incidência destes patógenos na carne de frango é inerente ao processo, devido a encontrarem-se distribuídos em toda cadeia produtiva, desde o nascimento das aves até o produto final.

Medidas de biossegurança centradas no início da cadeia produtiva têm sido utilizadas com o objetivo de produzir aves livres de patógenos, porém o processo é caro e difícil de manter, tendo em vista a suscetibilidade das aves à infecção e a contaminação do ambiente das granjas. Na indústria de processamento de carnes, os processos de descontaminação por agentes físicos, químicos ou biológicos são uma alternativa para reduzir ou eliminar micro-organismos das carcaças. Os métodos tradicionais de descontaminação como, lavagem com água aquecida, aplicação de substâncias químicas, aquecimento por vapor, congelamento e, em alguns casos, radiação ionizante são rotineiramente utilizados na indústria de processamento de aves. O efeito destas técnicas na redução de patógenos é limitado, dependente de fatores como temperatura, tempo de contato e carga microbiana inicial, e pode influenciar nas características sensoriais finais do produto. Além disso, as possibilidades de geração de compostos tóxicos e a seleção de micro-organismos resistentes por meio da utilização de agentes químicos na

descontaminação de carcaças têm sido questionadas. Em função destes fatores, existem sérias dificuldades no comércio internacional de carne de aves, em particular entre os Estados Unidos e a Comunidade Européia, em relação ao uso de substâncias antimicrobianas na descontaminação de carcaças de aves. Nos EUA o uso de descontaminantes químicos, tais como, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, ácido peracético e fosfato trissódico é permitido e constitui uma prática comum na indústria de carnes, enquanto que nos países membros da Comunidade Européia a utilização destes agentes para eliminar a contaminação da superfície de carcaças de aves é proibida.

Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e testadas na descontaminação de carcaças de aves, tais como o uso de bacteriocinas e bacteriófagos específicos para controle de determinado micro-organismo. Estudos experimentais de utilização de bacteriófagos específicos no controle de alguns patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* apresentaram resultados satisfatórios na redução ou eliminação destes micro-organismos de fontes de produção ou no alimento. Este processo de controle de micro-organismos patogênicos apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais, pois os bacteriófagos são específicos para um micro-organismo alvo, têm facilidade de aplicação, capacidade de sobreviver em baixas temperaturas, auto-limitação e não interferem nas características físicas e sensoriais do produto.

Apesar dos resultados positivos na redução de patógenos contaminantes de alimentos por meio da utilização de bacteriófagos e de já existirem no mercado produtos aprovados para uso em alimentos (ex. *Listex P100<sup>TM</sup>* - *EBI Food Safety*), existe a necessidade de melhor compreensão desta tecnologia e de suas limitações, principalmente, aquelas relacionadas à seleção de bacteriófagos com maior capacidade lítica, avaliação das condições de aplicação na indústria de alimentos, possibilidade de desenvolvimento de resistência do hospedeiro bacteriano, efeito de diferentes condições de processamento sobre os bacteriófagos e interações dos mesmos com o alimento. Em função da necessidade de formas alternativas de controle de micro-organismos em alimentos e da crescente demanda dos consumidores por produtos pouco processados e com menor quantidade de aditivos, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de bacteriófagos na redução de *Salmonella* em pele de frango.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características de *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é composto por pequenos bastonetes gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, lactose, urease e oxidase negativos. As células medem de 0,7 a 1,5 µm por 2,5 a 5,0 µm e a maioria dos sorotipos é móvel em função da presença de flagelos peritríquios, com exceção dos sorotipos Pullorum e Gallinarum. A faixa de temperatura de crescimento está entre 7 °C e 47 °C, com ótimo entre 35 °C e 37 °C, o pH de crescimento varia entre 4 e 9, sendo o ótimo de 7, e atividade de água mínima para crescimento é de 0,94. São capazes de produzir gás a partir da fermentação de glicose, de descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina, reduzir nitratos a nitritos, gerar ácido sulfídrico e utilizar citrato como fonte de carbono (BERGEY, 1984; D'AOUST, 2001).

O gênero *Salmonella* foi nomeado em 1885 em homenagem ao médico veterinário Daniel E. Salmon, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), e é composto por 2579 sorotipos, identificados por reações bioquímicas e sorológicas, dos quais, 2.557 pertencem à espécie *S. enterica* e 22 à espécie *S. bongori* (YAN et al, 2003; GRIMONT e WEILL, 2007). Sua nomenclatura é bastante complexa, na qual a estrutura antigênica e os sorotipos são definidos e estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com colaboração do Centro de Pesquisa e Referência do Instituto Pasteur de Paris, na França, e novos sorotipos são listados anualmente pelo esquema *White-Kauffmann-Le Minor scheme* (GRIMONT e WEILL, 2007). Shelobolina et al (2004) relataram a existência de uma nova espécie de *Salmonella* denominada *Salmonella subterranea*, porém este micro-organismo não foi reconhecido como pertencente ao gênero *Salmonella* pelo sistema de nomenclatura *White-Kauffmann-Le Minor scheme* estabelecido pela OMS e

pelo Instituto Pasteur. Segundo este esquema de classificação, o gênero *Salmonella* divide-se em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* apresenta seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (GRIMONT e WEILL, 2007).

A identificação da espécie ou sorotipo de *Salmonella* é realizada por meio de métodos de perfil bioquímico e sorológico, resistência a antimicrobianos, produção ou sensibilidade a bacteriocinas, fagotipagem, perfil plasmidial e de restrição a endonucleases. A sorotipagem é fundamentada nas características dos antígenos somáticos (O), que define o sorogrupo; antígenos flagelares (H), que define o sorotipo e antígenos capsulares (K), consistindo a base de classificação do gênero *Salmonella* (GAMA, 2001; YAN et al, 2003).

Os sorotipos predominantes em casos de salmonelose humana são *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis (FERNANDES et al, 2006). Porém, outros sorotipos como, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Newport, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Infantis, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Agona, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Montevideo, e *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Saint Paul, também, estiveram envolvidos em surtos de infecção em humanos (CHIU et al, 2005; ZAIDI et al, 2006).

## **2.2 Características de infecções causadas por *Salmonella***

*Salmonella* sp. pode causar uma variedade de doenças em humanos, desde febre tifóide, bacteremia, gastroenterite e infecções focais. É um dos principais micro-organismos associados com casos de gastroenterite causadas pela ingestão de alimentos em todo o mundo e um importante problema de saúde pública (PAYMENT e RILEY, 2002).

A maioria dos casos de infecção por *Salmonella* sp. ocorre por via oral, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados, porém existem suspeitas de infecções por via membranas mucosas, conjuntivas e pelo trato respiratório superior (QUINN, 1994). O processo de infecção consiste na invasão das células do trato intestinal por meio da indução de rearranjos de actina do enterócito, o que resulta na formação de pseudópodes que engolfam

a bactéria ocasionando a gastroenterite (FORSYTHE, 2002). Outra reação provocada na célula é a produção de citocinas da resposta inflamatória, associadas à inflamação intestinal, diarreia e, em casos crônicos, formação de fibrose com prejuízo da absorção (ZHOU et al, 2001).

A patogênese de *Salmonella* sp. está relacionada com a translocação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica e com a consequente alteração das funções celulares. Sorotipos de *S. enterica* expressam pelo menos dois tipos de sistemas de secreção de proteínas do tipo III, e que estão localizadas em ilhas de patogenicidade designadas por SPI-1 e SPI-2 (*Specific Pathogenicity Island*). A expressão de SPI-1 está associada com o início do processo de infecção do epitélio intestinal e a de SPI-2 ao estabelecimento da infecção sistêmica (SANO et al, 2007; SANTOS et al, 2007).

O sistema de secreção do tipo III é composto por um complexo de 20 proteínas que formam um canal na membrana da célula hospedeira. Uma vez formado, permite a exportação de outras proteínas, incluindo aquelas destinadas à captação da bactéria pela célula hospedeira (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A dose infecciosa mínima de *Salmonella* sp. para o homem varia de 10 a milhões de células e está relacionada com fatores inerentes ao indivíduo, ao sorotipo da espécie envolvida e ao tipo de alimento contaminado (PREBAF, 2008).

De acordo com Forsythe (2002), os sintomas característicos de doenças de origem alimentar causadas por *Salmonella* incluem, diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda e calafrios, algumas vezes, vômitos e dor de cabeça, e o período de incubação pode durar de 12 a 36 horas.

### **2.3 Epidemiologia**

As infecções causadas por *Salmonella* sp. são uma das principais causas de doença diarreica em humanos e constituem um desafio global a saúde pública (FERNANDES et al, 2006; ZAIDI et al, 2006).

O consumo de alimentos de origem animal contaminados, com destaque para ovos, carne, leite e derivados, constituem a principal fonte de salmonelose em humanos (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

A incidência mundial de salmonelose tem se elevado desde a década de 1970, e os principais sorotipos responsáveis pela maioria dos casos de doença são *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis e *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium (WEINBERGER e KELLER, 2005). Acredita-se que ocorram 16 milhões de casos de doenças causadas por *Salmonella* sp. com 500.000 mortes por ano ao redor do mundo (EVEREST et al, 2001).

Nos Estados Unidos, anualmente, são registrados entre 30.000 a 40.000 casos de salmonelose pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), porém, devido a muitos casos não serem relatados, estima-se que a incidência seja de, aproximadamente, 1,4 a 4 milhões de infecções e de 500 a 600 casos fatais a cada ano (USDA, 2009). Em 2007, *Salmonella* sp. foi o micro-organismo de maior prevalência em 17.883 casos de infecção reportados em 10 estados dos EUA (CDC, 2008). No mesmo ano, *Salmonella* sp. foi responsável por 151.995 casos de doença em países da União Européia, perdendo apenas para *Campylobacter* sp. em número de casos de infecção (EFSA, 2009).

No Brasil foram notificados 6062 surtos de doenças de origem alimentar durante 1999 a agosto de 2008, com 117.330 pessoas doentes e 64 mortes. Em 3088 surtos não foi possível identificar o agente etiológico e *Salmonella* sp. foi o principal micro-organismo envolvido nos surtos restantes, responsável por causar 1275 surtos (SVS, 2009).

Devido à característica autolimitante na maioria dos casos de salmonelose, as pessoas acometidas não procuram atendimento médico aos primeiros sinais da doença (FRENZEN, 1999). Na maioria dos casos, o isolamento do agente etiológico ou a pesquisa para confirmação do possível alimento incriminado são negligenciados, o que contribui para a subnotificação e subestimativa da prevalência de salmonelose em humanos (SANTOS, NASCIMENTO e FLORES, 2002).

## **2.4 Contaminação na cadeia produtiva de aves**

*Salmonella* sp. está presente em toda a cadeia produtiva de aves, desde o nascimento até o produto final, o que dificulta o controle e diagnóstico deste micro-organismo (BONI, 2007).

A contaminação das aves pode ocorrer por via vertical, por meio de ovos incubados que contém a bactéria em seu interior, e por via horizontal, por contaminação de indivíduos susceptíveis em contato com material contaminado ou aves portadoras que eliminam *Salmonella* sp. nas fezes (BERCHIERI JR, 2000).

Oliveira e Silva (2000) ao avaliarem a presença de *Salmonella* sp. em casca e gema de ovo observaram que 9,6 % das amostras de casca e 3,2 % das amostras de gema de ovo estavam contaminadas por *Salmonella* sp..

Rocha et al (2003) observaram que 11,1 % dos forros de caixa de transporte e 3 % dos órgãos de pintos de corte de um dia estavam contaminados por *Salmonella* sp., e os sorotipos isolados com maior frequência foram *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*.

Kanashiro et al (2005) ao avaliarem a presença de sorotipos de *Salmonella* sp. em frangos de corte e matrizes comerciais em diversas regiões do Brasil concluíram que há uma alta incidência de *S. enterica* subsp. *enterica*, sorotipo *Enteritidis* em 57,5 % em matrizes e 84 % em frangos.

A presença de *Salmonella* sp. no intestino, na pele e entre as penas das aves pode causar contaminação das carcaças, dependências e equipamentos do frigorífico durante o abate, evisceração e resfriamento, comprometendo a qualidade do produto final para o consumo humano (OLSEN et al, 2003).

Antunes et al (2003), que obtiveram uma incidência de *Salmonella* sp. de 60 % em amostras de carne de aves coletadas na cidade do Porto, em Portugal. Resultados semelhantes foram encontrados por Bada-Alamedji et al (2006) encontraram que 62,5 % das carcaças de frango coletadas em pontos de venda de Dakar, no Senegal, estavam contaminadas com *Salmonella* sp.

Na Espanha, Dominguez, Gomez e Zumalacarregui (2002), encontraram 35,8 % das amostras de carne de frango contaminadas por *Salmonella* spp..

Observou-se uma variação na contaminação de carcaças de frango por *Salmonella* sp. em diferentes estados brasileiros. A contaminação de carcaças de frango por *Salmonella* sp. variou de 15,1 % no Rio Grande do Sul (NASCIMENTO et al, 2003), 13 % em Santa Catarina (MACHADO, TOSIN e LEITÃO, 1994), 5,9 %, 10,4 %, 32 % e 42 % em São Paulo (COSTA et al, 1997; FUZIHARA, FERNANDES e FRANCO, 2000; SANTOS et al, 2000; MATHEUS, RUDGE e GOMES, 2003), 16,9 % em Goiás (MESQUITA et al, 2005) e 9,5 % em Pernambuco (VASCONCELLOS et al, 2005).

## 2.5 Controle de contaminação microbiana no processamento de aves

Algumas medidas de controle são realizadas em fazendas, criadouros de aves e nas indústrias de processamento, na tentativa de reduzir a incidência de micro-organismos patogênicos na carne de frango (CARRILO et al, 2005). Intervenções estratégicas centradas no início da cadeia produtiva, ou seja, nas granjas, têm maior probabilidade de gerar reduções consideráveis na contaminação de carne das aves após o processamento. A modernização e os investimentos em biossegurança permitiram produzir aves livres de micro-organismos patogênicos, porém o processo é caro e de difícil manutenção, considerando que as aves são susceptíveis a infecção e os patógenos podem ser encontrados no meio ambiente das granjas e em abatedouros associados à contaminação cruzada com aves de outras granjas (NEWELL e FEARNLEY, 2003).

Apesar de décadas de esforço, obter animais livres de patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter* envolve controle rigoroso que, na maioria dos casos, é impraticável. Intervenções higiênicas no processamento por si só, não conduzem a produtos seguros, em função do fluxo constante de entrada de micro-organismos na indústria de processamento e inevitável contaminação cruzada (BOLDER, 1997). Portanto, uma maneira de controlar estes micro-organismos é a descontaminação do produto bruto (CORYY et al, 1995).

A descontaminação de carcaças de aves pode auxiliar a reduzir a contaminação cruzada no produto elaborado, e conseqüentemente, os patógenos veiculados por alimentos. Esta descontaminação pode ser realizada durante ou ao final da linha de produção (BOLDER, 1997).

As técnicas de descontaminação dos alimentos não devem influenciar suas características sensoriais ou propriedades nutricionais, elas também devem ser seguras, baratas e de fácil acesso ao público (CORYY et al, 1995).

Várias tecnologias são utilizadas para descontaminação e de carcaças, que podem ser divididas em três tipos principais: física, química e biológica. Algumas das tecnologias de descontaminação podem ser consideradas como métodos tradicionais, por exemplo, tratamentos com sanitizantes, e outras como técnicas emergentes, por exemplo, o uso de bacteriófagos ou enzimas líticas de fagos, que encontram-se em fase de desenvolvimento para a aplicação sobre a carne (HUGAS e TSIGARIDA, 2008).

### 2.5.1 Descontaminação por métodos físicos

Muitos métodos físicos são utilizados para reduzir a contaminação microbiana sobre a superfície da carne. Elas incluem, principalmente, etapas de limpeza, tratamento com água quente ou vapor sob pressão, radiações ionizantes e congelamento.

A lavagem com água é um processo rotineiramente utilizado na indústria de carne e é eficaz para eliminação de contaminantes físicos, como solo, penas e outros detritos. O número de micro-organismos é reduzido em, aproximadamente, um ciclo log, porém *Salmonella* e *Campylobacter* podem ocorrer em carcaças em concentrações mais altas,  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>, e o tratamento com água sob estas condições não contribui para uma remoção total destes patógenos (BOLDER; PUTIRULAN e LIPMAN, 2006). Contudo, melhores resultados podem ser alcançados com o aumento da temperatura da água de lavagem (SOFOS e SMITH, 1998).

A água quente com temperatura entre 80 °C a 85 °C, aplicada sob a forma de spray ou imersão, e o uso de vapor sob pressão apresentam grande potencial de aplicação na indústria de carnes (HUFFMAN, 2002). Em geral, os diferentes estudos realizados em vários tipos de carne e em diferentes condições demonstraram uma redução de um a três ciclos logaritmos nas contagens de bactérias e uma diminuição da contaminação de patógenos (SOFOS e SMITH, 1998). O tratamento com spray de água quente com temperatura entre 55 °C e 60 °C, por meio da lavagem das carcaças de aves de dentro para fora após a evisceração e antes da refrigeração reduziu a contaminação de *Campylobacter* em mais de 0,78 log<sub>10</sub> UFC/carcaça comparado com a pulverização de água a 20 °C (LI; YANG e SWEM, 2002). Porém, a aplicação de uma segunda escalda após depenagem, com água na temperatura de 60 °C, por 28 s, ou 73 °C, por 20 s, não reduziu a contagem de *Campylobacter* na carcaça comparada à primeira escaldagem (BERRANG; DICKENS e MUSGROVE, 2000).

A forma pela qual o calor é aplicado nas carcaças e o local de utilização no processamento, por exemplo, após depenagem, após a evisceração e antes da refrigeração, parecem ter grande impacto sobre a eficácia do tratamento. Em geral, o uso de spray pode causar alguns efeitos indesejáveis se a validação e verificação da metodologia aplicada não forem seguidas. Por

exemplo, altas pressões podem resultar na penetração de bactérias no tecido (SOFOS e SMITH, 1998), e os tratamentos com spray perdem calor facilmente por evaporação. Além disso, a alta umidade na superfície do tecido pode estimular o crescimento de micro-organismos. É freqüente a preocupação quanto às propriedades sensoriais de carcaças tratadas com spray, por exemplo, aparência e cor, e do risco de redistribuição ou propagação de micro-organismos para superfícies de tecidos adjacentes ou equipamentos (SOFOS e SMITH, 1998).

Uma alternativa em substituição ao tratamento com água quente é a aplicação de vapor. A principal vantagem da utilização desta técnica é que o vapor a 100 °C tem uma capacidade térmica maior do que a mesma quantidade de água a essa temperatura e, portanto, é capaz de penetrar em cavidades, fendas e folículos de penas. A utilização de vapor em carcaças de aves por até 20 s à pressão atmosférica reduziu, consideravelmente, a contaminação por *Campylobacter jejuni* e *E. coli*, mas prejudicou a aparência do produto (JAMES et al, 2007). Fatores relacionados ao produto, como, lotes de animais, o tipo de carne, carga microbiana inicial e o tempo de exposição à contaminação podem influenciar a eficácia da descontaminação de tratamentos com água (HUGAS e TSIGARIDA, 2008).

Outra possibilidade de tratamento por método físico de carcaças é a irradiação, cujo efeito depende do tipo de micro-organismo envolvido, do tipo de alimento, da temperatura, da presença de oxigênio e de umidade (FARKAS, 1998). O efeito da radiação ionizante sobre micro-organismos pode estar associado à inativação direta do material genético ou indireta por meio de reações entre os componentes celulares e os radicais livres resultantes da ionização de moléculas de outras substâncias, geralmente água. A radiação facilmente inativa *Campylobacter* em carne de aves com doses de 3 a 5 kGy em aves congeladas e 1,5 a 2,5 kGy nas refrigeradas (FARKAS, 1998). Na maioria dos casos, as taxas de redução microbiana estão no intervalo de dois a três ciclos logaritmos para as formas vegetativas dos principais patógenos em alimentos. No entanto, não ocorre inativação de vírus e toxinas microbianas, que são mais resistentes à radiação. Além disso, a falta de conhecimento do consumidor sobre o processo ainda gera desconfiança e diminuição do consumo de produtos irradiados (HUGAS e TSIGARIDA, 2008).

O congelamento e posterior armazenamento em baixas temperaturas também podem reduzir a contaminação de produtos cárneos. O congelamento a - 20 °C reduziu a contagem de *Campylobacter* em carcaças de frango inoculadas em um ciclo logarítmico (GEORGSSON et al, 2006). Zhao et al (2003) constataram que o número de *Campylobacter* inoculado em asas de frangos reduziu em 1,3 e 1,8 ciclos logarítmicos após armazenamento a - 20 °C e - 30 °C, por 72 h, respectivamente, com novas reduções de 4 ciclos logarítmicos após o armazenamento a - 20 °C, durante 52 semanas.

### **2.5.2 Descontaminação por métodos químicos**

A descontaminação por métodos químicos envolve a aplicação de substâncias químicas em pontos específicos na linha de processamento de carcaças de aves. A redução dos micro-organismos patogênicos é alcançada principalmente por meio do amplo espectro de saneantes e agentes antimicrobianos, como, fosfato trissódico, cloreto de sódio e sulfato de cálcio acidificados, ácidos orgânicos, por exemplo, láctico e acético, cloro e peroxiácidos. (OYARZABAL, 2005; RICKE et al, 2005). Apesar de aprovados para uso no processamento de aves, algumas destas substâncias químicas, não cumprem a demanda crescente dos consumidores por produtos mais naturais e que mantenham as margens de segurança aceitáveis (OLASUPO et al, 2003).

Em geral, a eficácia das substâncias químicas depende da sua capacidade de destruir as membranas e constituintes celulares da bactéria. Esta ação resulta em uma melhoria da qualidade microbiológica e da segurança dos produtos por reduzir o número de bactérias patogênicas e aumentar a vida de prateleira dos produtos sob refrigeração em temperaturas entre 0 e 4 °C, em função da inativação de parte das bactérias deteriorantes (KOUTSOUMANIS, GEORNARAS e SOFOS, 2006).

Os compostos clorados são descontaminantes químicos tradicionais usados no tratamento da carne de aves e carcaças e podem ser usados e aplicados em diferentes formas. A ação antimicrobiana dos compostos clorados, à exceção do dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>), está relacionada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa, que penetra através da membrana celular e oxida os grupos sulfidrílicos de enzimas importantes da via glicolítica.

Além disso, pode ocorrer a formação de compostos clorados tóxicos, danos na membrana celular, reações com DNA, paralisação da síntese protéica e oxidação de substâncias essenciais ao metabolismo celular (ANDRADE, 2008).

PARK, HUNG, e BRACKETT (2002) observaram uma redução de dois ciclos logaritmos na contaminação microbiana de carcaças ao usar 50 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual na água de lavagem.

A pulverização de água clorada com 20 a 50 mg.L<sup>-1</sup> em carcaças de aves em diferentes pontos do processamento, após depenagem, após a evisceração e após remoção do pescoço, reduziu a contagem de mesófilos, coliformes totais e *E. coli* em 0,4 ciclos logaritmos, enquanto a prevalência de contaminação por *Salmonella* foi reduzida entre 20 e 25 % (STOPFORTH et al, 2007). Tratamentos de carcaças de frango por imersão em soluções de hipoclorito de sódio acidificada com ácido cítrico ou fosfórico nas concentrações de 500, 850, 1200 mg.L<sup>-1</sup> por 5 s antes da refrigeração, promoveram redução de aeróbios mesófilos entre 0,76 e 1,03 log UFC.g<sup>-1</sup>), *E. coli* entre 2,29 e 2,31 log UFC.g<sup>-1</sup>, e de coliformes totais entre 0,85 e 1,96 log UFC.g<sup>-1</sup> (KEMP, ALDRICH e WALDROUP, 2000).

Outro composto utilizado na descontaminação de carcaça de aves é o fosfato trissódico em concentrações de 8 a 10 %. A ação antimicrobiana desta substância está relacionada à alta alcalinidade em solução, que provoca a ruptura da membrana celular e extravasamento do conteúdo intracelular, além de poder agir como um surfactante e eliminar bactérias fracamente aderidas na superfície da pele de frango (CAPITA et al, 2002)

A imersão das carcaças em solução de fosfato trissódico (TSP) a 10 % resultou em elevada descontaminação microbiana. Whyte et al (2001) encontraram redução de 1,71 ciclos logaritmos na contagem microbiana por imersão do frango abatido durante 15 s em TSP (pH 12), comparado com uma redução de 0,55 ciclos logaritmos após imersão das carcaças em água. A aplicação de spray de TSP, com concentração entre 8 % e 12 %, em carcaças de aves, imediatamente antes da refrigeração, resultou em redução das populações bacterianas de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* de 0,5 a 0,8 ciclos logaritmos e 70 % de redução da contaminação por *Salmonella* (STOPFORTH et al, 2007). Segundo Bolder, Putirulan e Lipman (2006) os processos químicos de descontaminação apresentam o inconveniente de gerar

grande quantidade de resíduos químicos na indústria, que implicam em gastos no tratamento de efluentes.

O ácido peracético comercial é um sanitizante muito utilizado em indústrias de alimentos e é constituído por uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. É produzido pela reação de ácido acético com peróxido de hidrogênio na presença de um ácido mineral como catalisador, geralmente o ácido sulfúrico. Seu mecanismo de ação é baseado na oxidação de grupos sulfidrilas das enzimas, interferência em processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática (ANDRADE, 2008). A imersão de carne fresca em solução de ácido peracético a  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  por 15 s na temperatura de  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  reduziu a contagem de *E. coli* O157:H7 em  $0,6 \text{ log UFC.g}^{-1}$  e de *Salmonella* Typhimurium em  $1 \text{ log UFC.g}^{-1}$  (ELLEBRACHT et al., 2005). A redução da contagem microbiana pelo ácido peracético pode ser variável e depende do tipo de micro-organismo envolvido e das condições de uso. King et al. (2005) observaram que a pulverização de ácido peracético em carcaças bovinas não reduziu as contagens de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* Typhimurium.

Ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como ácido acético e ácido láctico, são muito utilizados na descontaminação de carne de aves em concentrações e condições de aplicação variadas, e apresentam atividade sobre diversos gêneros de micro-organismos. As reduções nas contagens de micro-organismos por meio da aplicação destas substâncias na carne de aves variam entre 0,2 a 3 ciclos logaritmos (LORETZ, STEPHAN E ZWEIFEL, 2009).

A legislação brasileira permite a utilização de ácido láctico e ácido peracético para controle de micro-organismos na lavagem carcaças em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final (BRASIL, 2004; BRASIL, 2001). Além disso, permite a utilização de composto clorado na água do sistema de pré-resfriamento de carcaça de aves na concentração máxima de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloro livre. Nos EUA é permitida a utilização de composto clorado, fosfato trissódico, e ácido peracético na descontaminação de carcaças de aves (USDA, 2002a; USDA, 2002b; USDA, 2002c; USDA, 2002d). Já nos países membros da Comunidade Européia o uso de substâncias antimicrobianas para eliminar a contaminação da superfície de carcaças de aves é proibido (OJEU, 2009).

### 2.5.3 Descontaminação por métodos biológicos

Algumas bactérias podem produzir bacteriocinas que são compostos protéicos antimicrobianos que possuem um efeito letal ou bacteriostático sobre outros microorganismos e que podem ser utilizadas como processo biológico de descontaminação de carcaças. A mais amplamente estudada é a nisina que é produzida por *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* e é eficaz contra bactérias gram-positivas. Para a descontaminação de carcaça bovina os resultados com uso de nisina não foram satisfatórios, considerando o espectro de atividade reduzido sobre bactérias gram-negativas (BOLDER, 1997). Além disso, outras limitações quanto ao uso de bacteriocinas em carcaças são associadas à baixa produção *in vivo*, a probabilidade da sua inativação por meio de interações com outros componentes dos alimentos e do potencial de desenvolvimento de resistência do micro-organismo alvo (BOLDER, 1997; HUGAS, 1998).

Bacteriófagos são vírus ubiqüitários e com a característica para infectar e, em alguns casos, inativar as bactérias, também têm sido utilizados experimentalmente para reduzir *C. jejuni* e *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em frango (ATTERBURY et al, 2003; GOODE, ALLEN e BARROW, 2003). A principal vantagem da utilização de bacteriófagos como alternativa em biocontrole é a sua especificidade para controlar uma espécie-alvo, sem interação com outros micro-organismos presentes no alimento (GREER, 2005). Além disso, são fáceis de obter e aplicar, não causam quaisquer mudanças sensoriais nos alimentos e são capazes de sobreviver ao resfriamento e congelamento. Contudo, alguns fatores como as interações entre bacteriófagos e seus hospedeiros, o efeito sobre o ambiente e obstáculos presentes no próprio alimento, como estrutura e pH, devem ser melhor estudados e compreendidos.

Outras limitações do uso de bacteriófagos como uma medida de controle da contaminação bacteriana na superfície da carne incluem a transferência de características indesejáveis, por exemplo, genes de virulência, a ocorrência de bactérias mutantes fago resistentes e a capacidade de lisar apenas o hospedeiro específico em função da variedade de hospedeiros (GREER, 2005).

## 2.6 Bacteriófagos

### 2.6.1 Definição e caracterização

Bacteriófagos são vírus específicos de bactérias, sendo parasitas intracelulares obrigatórios por falta de metabolismo próprio. São extremamente hospedeiro-específicos, capazes somente de infectar espécies específicas ou até mesmo grupos dentro de uma mesma espécie, com algumas exceções, tais como fagos de *Listeria* A511, que podem infectar e lisar bactérias pertencentes ao gênero (ZINK e LOESSNER, 1992).

A maioria dos fagos descritos para esta finalidade pertence a ordem Caudovirales, que incluem vírus caudados, com cabeça isométrica contendo DNA de fita dupla. Com base na estrutura da cauda, um critério prático facilmente determinado por meio de microscopia eletrônica, os fagos caudados são divididos em três famílias: *Myoviridae*, com caudas contráteis constituídas por uma bainha e um tubo central; *Siphoviridae*, com caudas longas, não contráteis; e *Podoviridae*, com caudas curtas, não contráteis (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005). A especificidade destes fagos é, em parte, mediada por proteínas associadas à cauda que distintivamente reconhecem moléculas da superfície da bactéria susceptível (HAGENS e LOESSNER, 2007). Em geral, todas as estruturas bacterianas expostas na parede celular constituem receptores de bacteriófagos em bactérias gram-positivas e gram-negativas e, em alguns casos, estruturas acessórias também funcionam como receptores, por exemplo, *pili*, flagelo e cápsula (GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006; SKURNIK e STRAUCH, 2006).

Os fagos podem ser denominados de virulentos ou lisogênicos de acordo com o ciclo de replicação envolvido na infecção do hospedeiro. Os fagos virulentos são capazes de integrar-se no genoma hospedeiro, com o sucesso da infecção sempre ocorre a inativação do hospedeiro e, em geral, apresentam amplo espectro (HAGENS e LOESSNER, 2007). Estes fagos produzem grandes quantidades de partículas virais e redirecionam todas ou quase todas as vias metabólicas do hospedeiro para sua replicação. Nesse ciclo, denominado lítico, segue-se o acúmulo de partículas virais no citoplasma bacteriano com conseqüente liberação após o rompimento da membrana celular. Esse rompimento é facilitado também pelo acúmulo de enzimas, que

enfraquecem a parede e a membrana bacteriana, além da pressão exercida pelo aumento da quantidade de partículas no interior da bactéria (GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006; SKURNIK e STRAUCH, 2006).

Existem também fagos chamados lisogênicos, que integram o material genético ao genoma procarioto após a infecção. Neste estado, há produção de proteínas responsáveis pelo silenciamento da expressão da maior parte dos genes virais bem como pela sua própria automanutenção (SKURNIK e STRAUCH, 2006). Nesse ciclo, o hospedeiro pode apresentar alterações fenotípicas e em alguns casos, até mesmo pode ocorrer o aumento de patogenicidade (FIGUEROA-BOSSI et al, 2001).

Por fim, existe um ciclo controverso conhecido por pseudolisogênico (GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006). Apesar de ser pouco conhecido, acredita-se que seja o mais difundido na natureza. Neste ciclo não há inserção do material genético viral no genoma do hospedeiro, como no ciclo lisogênico, e não há lise da maior parte da população infectada, como ocorre no ciclo lítico. Uma parte da população infectada, no entanto, é lisada e novas partículas virais são liberadas. Diversas explicações vigoram para a existência deste estado, como incapacidade de infecção por inativação enzimática, ou por falta de receptores, ou imunidade promovida por fago lisogênico que passa, com frequência, para ciclo lítico. A incerteza que envolve este processo permite sugerir que este estado represente diversos ciclos biológicos não reconhecidos (WEINBAUER, 2004; GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006).

### **2.6.2 Utilização em biocontrole**

A concepção de inativar micro-organismos patogênicos por meio de fagos foi proposta logo após a sua descoberta, aproximadamente, há 90 anos. Porém com a descoberta dos antibióticos os investimentos e pesquisas em fagoterapia foram reduzidos. Com o aumento do problema de resistência microbiana aos antibióticos, houve um conseqüente aumento no interesse em fagoterapia, mas apenas recentemente, o conceito foi estendido para o campo de segurança de alimentos (HAGENS e LOESSNER, 2007).

O potencial da utilização de bacteriófagos para controlar bactérias de importância para a qualidade e segurança alimentar foi discutido em recentes revisões (HAGENS e LOESSNER, 2007; GARCÍA et al, 2008) e exemplos

destas aplicações foram publicados, principalmente em relação ao controle de *Salmonella* (LEVERENTZ et al, 2001; GOODE, ALLEN e BARROW, 2003; WHICHARD, SRIRANGANATHAN e PIERSON, 2003; FIORENTINI, VIEIRA e BARIONI, 2005; BIELKE et al, 2007b; BIGWOOD et al, 2008), *Campylobacter* (ATTERBURY et al, 2003; GOODE, ALLEN e BARROW, 2003; BIGWOOD et al, 2008), *E. coli* (O'FLYNN et al, 2004), *L. monocytogenes* (DYKES e MOORHEAD, 2002; LEVERENTZ et al, 2003; CARLTON et al, 2005), *Enterobacter sakazakii* (KIM, KLUMPP e LOESSNER, 2007) e *Staphylococcus aureus* (GARCÍA et al, 2007).

A capacidade de atuar sobre determinados grupos específicos de bactérias, sem ultrapassar as fronteiras de espécie ou gênero e, por conseguinte, não afetar micro-organismos desejáveis nos alimentos, e interferir na microbiota normal do trato gastrointestinal são características favoráveis para aplicação de fagos em biocontrole. Além disso, fagos estão, em geral, presentes em altas concentrações em água e alimentos de diferentes origens, podendo ser encontrados em produtos cárneos na ordem de  $10^8$  unidades de fagos viáveis/g (SULAKVELIDZE e BARROW, 2005).

Em outros casos, fagos foram detectados em alimentos associados com contaminações específicas, como por exemplo, fagos de *Brochotrix thermosphacta* em carne (GREER, 1983), fagos infectantes de *Propionibacterium freudenreichii* em queijo suíço (GAUTIER et al, 1995) e fagos de *Campylobacter* no frango cru (ATTERBURY et al, 2003).

Portanto, os fagos são rotineiramente consumidos com os alimentos, em grande quantidade e encontrados normalmente no trato gastrointestinal de seres humanos e animais (BREITBART et al, 2003).

Em relação às limitações no uso dos fagos para controlar bactérias nos alimentos pode-se incluir a limitada gama de hospedeiros, uma exigência de densidade mínima do hospedeiro para replicação do fago ou o efeito inibitório de bactérias não-alvo (WILKINSON, 2001). E ainda, os consumidores podem também questionar a sua utilização em alimentos como uma prática segura.

Outras preocupações foram levantadas quanto aos micro-organismos tornarem-se resistentes a bacteriófagos deixando esta estratégia ineficaz a longo prazo (BARROW, 2001). Estudos demonstraram que as bactérias rapidamente apresentam mutação para tornarem-se resistentes a bacteriófagos *in vitro* em laboratório (ADAMS, 1959). No entanto, ao contrário da resistência

bacteriana aos quimioterapêuticas, como antibióticos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar obstáculos do hospedeiro à infecção. Isto leva a um equilíbrio evolutivo que permite que os fagos e hospedeiros proliferem (CARRILLO et al, 2005). Portanto, medidas técnicas como alternar o uso de diferentes fagos, também em um coquetel ou em aplicações alternadas podem reduzir a incidência de resistência (HAGENS e LOESSNER, 2007).

Um estudo toxicológico em ratos tratados com altas doses de fagos de *Listeria* P100 não revelou nenhum efeito colateral (CARLTON et al, 2005). Em outro estudo em humanos com fagos específicos para *E. coli* também indicou que os fagos são seguros para administração oral (BRUTTIN e BRUSSOW 2005). O FDA recentemente aprovou o uso de fagos anti-listeria como aditivo de alimentos, e reconheceu seu uso como Geralmente Reconhecido como Seguro, GRAS (HAGENS e LOESSNER, 2007).

Assim, a utilização de bacteriófagos no controle de patógenos na produção de alimentos é promissora e vem tornando-se uma realidade. Porém, estes agentes biológicos devem ser investigados com mais critério a fim de aumentar o conhecimento sobre questões relacionadas à especificidade, desenvolvimento de resistência, relação entre bacteriófago/hospedeiro, segurança, efeitos no alimento e no meio ambiente.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Todos os reagentes e equipamentos utilizados neste experimento encontram-se descritos no Anexo I.

#### **3.1 Micro-organismos**

Na realização desta pesquisa foi utilizada estirpe de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076 proveniente do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Este micro-organismo foi utilizado como hospedeiro no processo de propagação dos bacteriófagos específicos e na contaminação induzida de pedaços de pele de frango da região do peito. Foi armazenado um estoque de segurança do micro-organismo em caldo Infuso de cérebro e coração (BHI), contendo 10 % de glicerol como crioprotetor, e congelado a – 20 °C.

Foi utilizado um bacteriófago caudado, com DNA de fita dupla, com atividade sobre *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis (bacteriófago P<sub>22</sub>), proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) no Rio de Janeiro, como controle positivo para comparação lítica dos bacteriófagos. Este bacteriófago foi armazenado sob refrigeração de 4 °C até sua utilização.

### 3.2 Isolamento e purificação de bacteriófagos

Foram coletadas amostras de fezes de aves de criação extensiva em diferentes propriedades da região de Viçosa – MG. As amostras foram compostas por uma mistura de fezes de diferentes aves da mesma propriedade. O número de amostras de fezes de aves coletadas por propriedade variou de acordo com a quantidade de aves da criação. As amostras de fezes de aves foram acondicionadas em embalagem de polietileno de baixa densidade e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), para posterior isolamento de bacteriófagos.

Para o isolamento de bacteriófagos específicos para *Salmonella* foi utilizada metodologia adaptada de Atterbury et al (2005). Um grama de fezes de aves foi diluído 1:10 em tampão SM (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01% gelatina) e ressuspendido por agitação durante 5 min. Esta suspensão foi incubada sob agitação de 150 rpm a 17 ° C, por 24 h, para permitir a eluição do fago para o tampão. Após este período, uma alíquota de 10 mL da solução foi transferida para um tubo de centrifuga esterilizado e submetido a centrifugação a 13.000 g por 5 min para remover detritos em suspensão. Em seguida, a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm, para remover células e restos celulares. Para avaliar a presença de fagos a partir do método de isolamento usado, foi utilizada técnica de microgotas em superfície proposta por Adams (1959), utilizando a estirpe *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como hospedeiro.

A purificação dos fagos foi realizada por meio de metodologia descrita por Grajewski, Kusek e Gelfand (1985). Um volume de 0,5 mL do filtrado de bacteriófagos foi misturado com 10 mL da cultura hospedeira, com aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, cultivada em caldo infuso de cérebro e coração a 37 °C suplementado com 10 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1 mM de CaCl<sub>2</sub> (BHI<sub>S</sub>) por 24 h. O filtrado e a suspensão bacteriana foram reincubados para permitir a propagação do fago por 24 h, e posteriormente centrifugados a 13.000 g por 5 min e filtrados em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Volumes iguais de 0,5 mL de suspensão de fagos e de *Salmonella* cultivada por 12 h a 37 °C foram misturados com três mL de ágar BHI<sub>S</sub> para sobrecamada, contendo 0,7 % de ágar, e espalhados sobre a superfície seca

de placas de Petri contendo ágar BHI. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. Após a incubação, placas de lise individuais foram selecionadas com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur e colocadas dentro de 10 mL de cultura de *Salmonella* Enteritidis crescida em BHI<sub>S</sub> por 24 h, essa mistura foi reincubada a 37 °C por 24h, posteriormente centrifugada a 13.000 g por 5 min e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Para cada fago, três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza do estoque de fagos.

### **3.3 Propagação, determinação do título e estoque**

Para propagação e determinação do título de bacteriófagos foi utilizada metodologia adaptada de Frost, Kramer e Gillanders (1999). No processo de propagação foi utilizada como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, cultivada a 37 °C em caldo BHI<sub>S</sub> por 24 h. Um volume de 1 mL da suspensão bacteriana foi misturado com 100 µL de suspensão estoque de cada bacteriófago isolado, adicionados em 10 mL de caldo BHI<sub>S</sub> recém preparado e incubado a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação a suspensão foi centrifugada a 13000 g por 5 min e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Volumes iguais de 2,5 mL de suspensão filtrada de fago e suspensão de bactéria foram misturados e incubados por 15 min, a 37 °C para permitir a infecção do hospedeiro. Uma alíquota de 1 mL desta mistura foi adicionada em 5 mL de ágar BHI<sub>S</sub> com 0,7 % de ágar, e aplicado sobre a superfície de ágar BHI disposto em placas de Petri, sendo incubados a 37 °C, por 15 a 18 h. As placas foram examinadas para verificar o grau de lise, adicionadas de 5 mL de tampão SM e incubadas a 4 °C, sob agitação de 150 rpm por 15 h, a fim de eluir os fagos para solução. A suspensão foi recolhida, centrifugada a 13000 g por 5 min e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm.

Na determinação da concentração de fagos na suspensão foi utilizado tampão SM para realizar as diluições necessárias, a fim de obter contagem de Unidades Formadoras de Placas (PFU) entre 10 e 100 placas de lise por mL de suspensão (CARRILO et al, 2005). Foram utilizados 500 µL de *Salmonella* Enteritidis, cultivada em caldo BHI<sub>S</sub> a 37 °C, por 24 h, misturados em 5 mL de ágar sobrecamada com 0,7 % de ágar e dispostos sobre a superfície de Agar

base BHI. Foram adicionados sobre a superfície das placas de ágar contendo o hospedeiro, 10 µL das diluições da suspensão de bacteriófagos, sendo as placas de lise determinadas após período de 15 a 18 h de incubação a 37 °C. A suspensão de fagos com concentração determinada foi armazenada a 4 °C com adição de 0,2 % (v/v) de clorofórmio.

O estoque de fagos foi preparado segundo método de Swanstrom e Adams (1951) e armazenados a - 65 °C.

### **3.4 Seleção dos bacteriófagos**

Os bacteriófagos utilizados no presente estudo foram selecionados por meio de avaliação do perfil lítico das suspensões ajustadas para concentração de  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> sobre a estirpe de *Salmonella* Enteritidis. Foram selecionados cinco bacteriófagos originários de diferentes propriedades por meio de comparações do perfil lítico dos bacteriófagos isolados com o do apresentado pelo bacteriófago P<sub>22</sub> (controle).

### **3.5 Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados**

Foram utilizadas diferentes espécies de bactérias de importância em alimentos provenientes da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro para avaliar a especificidade dos bacteriófagos selecionados (*Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Cronobacter muytjensii*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Abony, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Choleraesuis, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*). A atividade lítica dos bacteriófagos selecionados foi avaliada por técnica de microgotas em superfície, proposta por Adams (1959), usando a suspensão de bacteriófagos na concentração de  $10^9$  PFU/mL.

### 3.6 Análise da morfologia dos bacteriófagos

O exame de morfologia dos bacteriófagos foi realizado conforme metodologia adaptada de Oliveira et al (2009). Um volume de 1 mL da suspensão de bacteriófagos a  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> foi centrifugado a 26.000 g por 60 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com solução de acetato de amônio 0,1 M, e novamente, centrifugado a 26.000 g por 60 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 1 mL de água destilada e filtrado em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Um volume de 8 µL desta suspensão foi depositado na superfície de uma tela de microscopia eletrônica, revestida com resina *formvar*. O excesso de amostra foi removido com papel absorvente e adicionou-se uma gota de solução aquosa de acetato de uranila 2 % (p/v) na superfície da tela, deixando em contato por 15 s. O excesso de acetato de uranila foi removido com papel absorvente, a tela lavada com uma gota de água destilada, e em seguida seca em temperatura ambiente, aproximadamente 24 °C, por 24 h. Posteriormente, fez-se a observação em microscópio eletrônico de transmissão em 80 kV.

### 3.7 Avaliação da atividade *in vitro* dos bacteriófagos

Frascos contendo 10 mL de caldo BHI<sub>S</sub> foram inoculados com 1 % (v/v) de *Salmonella* Enteritidis cultivada a 37 °C, por 12 h, e incubados sob agitação de 150 rpm à 12, 25 e 37 °C. Devido ao crescimento lento de *Salmonella* Enteritidis na temperatura de 12 °C, os frascos deste tratamento foram incubados a 37 °C até atingirem leitura de densidade óptica de 0,5 a 600 nm, e então, transferidos para temperatura de 12 °C. Suspensões de bacteriófagos foram adicionadas às culturas para obter concentrações de  $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> após a absorbância medida a 600nm atingir 0,5. Culturas de *Salmonella* sem adição de bacteriófagos foram utilizadas como controle. A atividade dos bacteriófagos foi determinada por medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de tempo, até a leitura permanecer constante. Além da absorbância, foi avaliada a contagem de *Salmonella* ao final do ensaio em todos os tratamentos com bacteriófagos, nas diferentes temperaturas de crescimento pesquisadas. A contagem de *Salmonella* foi realizada na última determinação de absorbância de cada tratamento, por meio

de técnica de microgotas, utilizando três repetições de 20 µL inoculados na superfície de Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram incubadas a 37 °C, e a contagem de colônias realizada após seis a oito horas de incubação.

### 3.8 Comparação entre métodos de descontaminação

Foi realizado um delineamento experimental em blocos casualizados com repetição, sendo sete tratamentos distribuídos em 10 blocos com três repetições por bloco. Cada bloco foi constituído de fragmentos de pele da região do peito de 4 cm<sup>2</sup>, de uma única ave. Esses fragmentos foram descontaminados por irradiação gama a 10 kGy por 2 h, a fim de reduzir ao máximo a contaminação inicial, em aparelho de irradiação gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) da Universidade Federal de Minas Gerais. O processo de descontaminação foi avaliado por meio de teste de esterilidade, no qual os fragmentos de pele de cada bloco foram colocados em caldo BHI, incubados por 48 h a 37 °C. Após a incubação, foram avaliados a turbidez do caldo BHI e o desenvolvimento de micro-organismos, por meio de plaqueamento em ágar BHI.

Os fragmentos de pele foram inoculados com 10<sup>5</sup> UFC.cm<sup>-2</sup> de *Salmonella* Enteritidis, por meio da adição de 0,1 mL de uma suspensão da bactéria, cultivada em caldo BHI<sub>S</sub> a 37 °C, por 24 h, e diluída para concentração desejada utilizando solução fisiológica. Foram coletas três seções de pele, antes de realizar os tratamentos de descontaminação por substâncias químicas e bacteriófagos, para verificar a concentração inicial de inóculo por unidade experimental (tratamento controle).

Na descontaminação, os fragmentos de pele foram imersos em soluções de cloridrato de polihexametileno biguanida a 1 % (v/v) por 15 min; ácido láctico a 2 % (v/v) por 90 s; dicloroisocianurato de sódio a 0,5 % (p/v) por 10 min; sanitizante a base de ácido peracético a 200 mg.L<sup>-1</sup> por 10 min; suspensão composta por mistura de cinco bacteriófagos selecionados em proporções iguais com concentração de 10<sup>9</sup> PFU mL<sup>-1</sup> e água destilada estéril, por 30 min. Os agentes de descontaminação foram preparados no momento de uso e o princípio ativo determinado, por meio de técnica específica para cada descontaminante utilizado. A concentração do princípio ativo dos sanitizantes a base de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético foi determinada por

meio de titulação com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N (ANDRADE E MARTYN, 1992); a determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por meio de titulação ácido-base com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (MORITA E ASSUNPÇÃO, 2007); a concentração de cloridrato de polihexametileno biguanida foi determinada por meio de leitura da absorvância em espectrofotômetro a 237 nm (MESQUITA et al, 1997); e a concentração de bacteriófagos determinada segundo descrito no item 3.3.

A descontaminação foi realizada na temperatura de 4 °C e os fragmentos de pele foram submetidos à contagem de *Salmonella* após os tempos de contato de cada produto. Os fragmentos de pele foram colocados em 10 mL de solução peptonada 0,1 % (p/v) contendo 0,25 % (p/v) de tiosulfato de sódio quando tratados com dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético; solução peptonada 0,1 % (p/v) contendo 2 % (p/v) de Tween 80 quando tratados com cloridrato de polihexametileno biguanida; solução tampão fosfato salina (3,6 mM de fosfato monobásico de potássio, 11,4 mM de fosfato de sódio bibásico e 29 mM de clorato de sódio – pH=7,2 ± 0,2) naqueles tratados com ácido láctico; e solução salina 0,85 % (p/v) nos submetidos aos tratamentos com água, bacteriófagos e controle, homogeneizados e submetidos a diluições em solução correspondente para cada sanitizante utilizado. A contagem de *Salmonella* sp. foi realizada por meio de técnica de microgotas em ágar XLT4. As placas foram incubadas a 37 °C por seis a oito horas e as colônias características (pretas) contadas considerando o limite de contagem de 20 a 80 Unidade Formadoras de Colônias (UFC).

### **3.9 Avaliação da atividade de bacteriófagos durante a refrigeração e congelamento.**

Foram utilizados fragmentos de pele de frango da região do peito de 4 cm<sup>2</sup> descontaminados por irradiação gama a 10 kGy conforme item 3.8 em delineamento fatorial em blocos casualizados, composto por seis blocos. Os fragmentos de pele foram contaminados com *Salmonella* Enteritidis, de acordo com o item 3.8 e tratados com suspensão composta por mistura de cinco bacteriófagos selecionados em proporções iguais, conforme determinado na Tabela 1, a fim de gerar diferentes Multiplicidades de Infecção (MOIs), que corresponde à relação entre a concentração de bacteriófagos e a concentração

de hospedeiro. Foram realizados tratamentos controle, com fragmentos de pele contendo somente a *Salmonella* Enteritidis e fragmentos de pele contendo somente a mistura de bacteriófagos nas concentrações determinadas. As unidades experimentais foram armazenadas refrigeradas a 4 °C e congeladas a - 20 °C e avaliadas quanto a contagem de *Salmonella* Enteritidis e bacteriófagos nos tempos de 3, 10 e 30 dias de armazenamento. Os fragmentos de pele de cada tratamento foram dispostos em tubos contendo 10 mL de solução salina 0,85 % (p/v), para contagem de *Salmonella*; e em 10 mL de solução tampão SM, para determinação da concentração de fagos; homogeneizados e submetidos a diluições seriadas para determinação dos micro-organismos. A contagem de *Salmonella* foi realizada por meio de técnica de microgotas em Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram incubadas a 37 °C por 6 - 8 h e as colônias contadas considerando o limite de contagem de 20 a 80 UFC. Foi realizada uma amostragem de oito colônias crescidas em ágar PCA de cada tratamento por bloco para confirmação de *Salmonella*. Essas colônias foram estriadas em placas de ágar *Salmonella* – *Shigella* (SS) e ágar XLT4, incubadas a 37 °C por 24 h, e observadas quanto ao crescimento de colônias características. A titulação de bacteriófagos foi determinada segundo o item 3.3.

Tabela 1. Relação entre concentração de bacteriófagos e *Salmonella* (MOI) utilizada no tratamento de pele de frango armazenada sob refrigeração e congelamento.

Concentração de inóculo de <i>Salmonella</i> (UFC mL <sup>-1</sup> )	Concentração da mistura de fagos (PFU mL <sup>-1</sup> )		
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
10 <sup>6</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>

### 3.10 Análise estatística

O efeito dos tratamentos com os cinco bacteriófagos em diferentes concentrações e temperaturas de incubação, conforme descrito no item 3.7, sobre a redução de absorvância e de contagem dos cultivos de *Salmonella*

Enteritidis determinados ao final do experimento foi avaliado por meio de Análise de Variância (ANOVA) e comparação das médias de absorvância e das médias de contagem de *Salmonella* Enteritidis dos tratamentos por teste de *Duncan*, ambos ao nível de significância de 5 %.

O efeito dos tratamentos com os diferentes agentes de descontaminação aplicados sobre os fragmentos de pele de frango contaminados com *Salmonella* Enteritidis, conforme descrito no item 3.8, foi avaliado por meio de ANOVA e comparação das médias de contagem de *Salmonella* Enteritidis dos tratamentos por teste de *Duncan*, ambos ao nível de significância de 5 %.

As médias de contagem de *Salmonella* Enteritidis dos fragmentos de pele de frango tratados com bacteriófagos em diferentes concentrações e armazenados sob refrigeração a 4 °C e congelamento a -20 °C, conforme descrito no item 3.9, foram comparadas por teste “*t-pareado*” ao nível de significância de 5 % com o tratamento controle.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA) versão 9.1, licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e purificação de bacteriófagos

A presença de bacteriófagos foi observada por meio da formação de placas de lise sobre a superfície de ágar BHI<sub>S</sub> semi-sólido contendo a cultura de *Salmonella* Enteritidis (Figura 1).

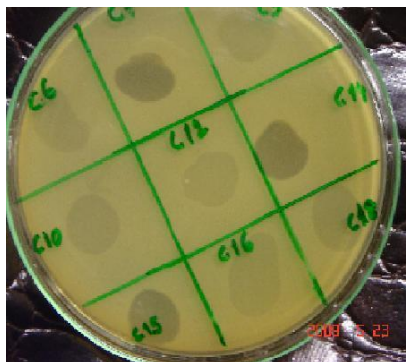


Figura 1. Placas de lise de bacteriófagos isolados das amostras de fezes de frango.

Foram encontrados bacteriófagos específicos para *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) em 10 das 16 propriedades avaliadas, sendo que seis destas apresentavam uma ocorrência de 100 % nas amostras coletadas. Das 45 amostras de fezes de frango avaliadas, 24 (53,3 %) apresentavam bacteriófagos para *Salmonella* Enteritidis (Tabela 2). Estas porcentagens de isolamento são elevadas em comparação com os resultados encontrados por Fiorentin et al (2004). Esses autores encontraram bacteriófagos específicos para *Salmonella* em 4,7 % das 107 amostras de fezes de aves coletadas na região do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Somente um dos bacteriófagos encontrados por esses autores foi isolado de fezes de aves confinadas, os outros foram isolados de fezes de aves criadas em sistema livre. A ampla fonte de alimentação disponível para as aves criadas livre e sua liberdade de circular

em uma área maior pode influenciar na presença de bacteriófagos nestes animais.

Tabela 2. Percentual de bacteriófagos isolados de fezes de frango em propriedades da região de Viçosa-MG utilizando *Salmonella* Enteritidis como hospedeiro.

Propriedades	N° de amostras coletadas	BFSE (%)
A	3	0,0
B	2	0,0
C	5	80,0
D	7	57,1
E	2	0,0
F	4	0,0
G	4	100,0
H	3	0,0
I	2	50,0
J	1	0,0
L	1	100,0
M	1	100,0
N	2	100,0
O	3	100,0
P	3	100,0
Q	2	50,0
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>	<b>53,3</b>

BFSE – Percentual de amostras positivas para presença de bacteriófagos de *Salmonella* Enteritidis.

Callaway (2007) isolou bacteriófagos de fezes de suínos específicos para *Salmonella* Typhimurium em 50 % das propriedades pesquisadas, porém em apenas seis das 360 amostras de fezes coletadas. No presente estudo, foram encontrados bacteriófagos para *Salmonella* Enteritidis em 62,5 % das propriedades avaliadas, e em elevado número de amostras. Higgins et al (2008) isolaram nove bacteriófagos de fezes de frango de corte específicos para *Salmonella* em seis das 17 propriedades pesquisadas, sendo sete isolados de ambientes que apresentavam *Salmonella* e dois de ambientes nos quais não se isolou *Salmonella*. O'Flynn et al (2006) pesquisaram bacteriófagos específicos para *Salmonella* Typhimurium em 100 amostras originárias de fontes variadas e isolaram apenas sete bacteriófagos temperados de fezes de suínos saudáveis e dois bacteriófagos virulentos de fezes de suínos contaminados com *Salmonella*. Elevada incidência de bacteriófagos foi observada por Carey-Smith et al (2006), que isolaram oito bacteriófagos

diferentes em três amostras de água de esgoto, utilizando três sorotipos de *Salmonella*.

Os bacteriófagos são membros normais do ecossistema microbiano do trato de animais e humanos, e sua elevada ocorrência esta relacionada ao tipo de amostra pesquisada, a características de criação dos animais, ao método de isolamento utilizado e à presença do hospedeiro (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005).

#### 4.2 Propagação, determinação da titulação e produção de estoque

Os 24 bacteriófagos isolados de fezes de frango foram propagados em *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) como hospedeiro e alcançaram concentrações entre  $10^8$  e  $10^{10}$  PFU.mL<sup>-1</sup>. Foram armazenados e estocados conforme descrito no item 3.3, e receberam um código de numeração correspondente a bacteriófago isolado para *Salmonella* Enteritidis (BFSE) e o número da amostra coletada.

#### 4.3 Seleção dos bacteriófagos

Dos 24 bacteriófagos isolados de fezes de frango, 14 apresentaram grau de lise sobre *Salmonella* Enteritidis igual ou superior ao bacteriófago P<sub>22</sub> (controle), a partir de soluções estoque com, aproximadamente,  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup>. Destes foram selecionados cinco bacteriófagos, com base em maior intensidade lítica sobre o hospedeiro e origem, para utilização em estudos posteriores de descontaminação de pele de frango (Tabela 3).

Tabela 3. Bacteriófagos isolados de fezes de frango de diferentes propriedades selecionados para utilização no processo de descontaminação e titulação da solução estoque após propagação.

Propriedade	Bacteriófago	Titulação (log PFU.mL <sup>-1</sup> )
C	BFSE7	10,7 ± 0,2
D	BFSE16	10,0 ± 0,5
E	BFSE18	9,8 ± 0,5
N	BFSE36	10,4 ± 0,3
P	BFSE43	10,6 ± 0,2

A intensidade de lise promovida pelos bacteriófagos selecionados sobre a estirpe de *Salmonella* Enteritidis em comparação com o bacteriófago P<sub>22</sub> é mostrada na Figura 2.

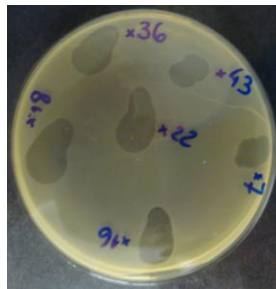


Figura 2. Intensidade lítica promovida por bacteriófagos selecionados sobre *Salmonella* Enteritidis em comparação com o bacteriófago P<sub>22</sub>.

#### 4.4 Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Os cinco bacteriófagos selecionados apresentaram atividade contra mais de um sorovar de *Salmonella*, seis dos oito sorovares de *Salmonella* foram lisados por todos os bacteriófagos avaliados. Apenas *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* não foi lisada por nenhum bacteriófago e *Salmonella* Choleraesuis foi lisada pelos bacteriófagos BFSE18, BFSE16 e P<sub>22</sub> (controle), porém este último resultou na formação de poucas placas de lise (Tabela 4). Resultados diferentes foram encontrados por Callaway (2007) que testou a atividade de bacteriófagos isolados para *Salmonella* Typhimurium em relação a outros 6 sorovares de *Salmonella enterica*, e apenas um bacteriófago apresentou atividade sobre outro sorotipo de *Salmonella* (Derby). Entretanto, O'Flynn et al (2006) avaliaram a capacidade lítica de dois bacteriófagos isolados de fezes de suíno e um bacteriófago controle (Felix 01), e observaram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, nos quais somente um sorovar (*Salmonella* Branderup) de 8 sorovares de *Salmonella enterica* foi resistente aos bacteriófagos testados por estes autores. Bielke et al (2007a) também observaram amplo espectro de ação de dois bacteriófagos isolados para *Salmonella* Enteritidis de esgoto doméstico sobre sete de outros 10 sorovares de *Salmonella* avaliados.

Tabela 4. Teste de especificidade dos bacteriófagos selecionados de fezes de aves, utilizando *Salmonella* Enteritidis, como hospedeiro, em relação a diferentes espécies de micro-organismos de interesse em alimentos.

MICRO-ORGANISMOS	ATCC	BACTERIÓFAGOS					
		7	16	18	36	43	P <sub>22</sub>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	10031	-	-	-	-	-	-
<i>Cronobacter muytjensii</i>	51329	-	+	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	11229	-	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Typhi	6539	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Typhimurium	14028	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis	13076	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Gallinarum	9184	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Pullorum	9120	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Choleraesuis	10708	-	+	+	-	-	+/-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Abony	6017 *	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	13314	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	6538	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	12662 *	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	33560	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	29428	-	-	-	-	-	-

\* - Código correspondente a nomenclatura no *National Collection of Type Cultures* (NCTC);

(-) Resultado de lise negativo; (+) Resultado de lise positivo; (+/-) Resultado de poucas placas de lise.

O amplo espectro de atividade dos bacteriófagos sobre outros sorovares de *Salmonella* observado no presente estudo e por outros autores da literatura pode ocorrer devido à similaridade de estruturas presentes na superfície das bactérias deste gênero. Os bacteriófagos de *Salmonella* podem apresentar especificidade de ligação por um tipo de lipopolissacarídeo (O<sub>12</sub>) encontrado na superfície da maioria das estirpes de *Salmonella* dos grupos A, B e D do sistema *Kauffman-White* (GOODE, ALLEN e BARROW, 2003). Segundo Grimont e Weill (2007), as estirpes de *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Gallinarum, Pullorum, Abony e Typhi, utilizadas neste experimento, apresentam o oligossacarídeo O<sub>12</sub> em sua superfície, enquanto que as estirpes de *Salmonella* Choleraesuis e *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* não são constituídas por esta estrutura.

Os bacteriófagos avaliados não apresentaram atividade lítica sobre as estirpes de bactérias gram positivas utilizadas neste estudo, possivelmente, devido a diferenças entre as estruturas da superfície de bactérias gram positivas e gram negativas responsáveis pela interação com moléculas ligante presentes nas estruturas da cauda de bacteriófagos caudados. Em bactérias gram positivas o reconhecimento bacteriófago-hospedeiro é realizado por estruturas presentes na parede celular da bactéria (peptideoglicano, ácido teicóico e lipoteicóico), já em gram negativas a interação ocorre por meio do lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005). Estas interações são responsáveis, em parte, pela especificidade dos bacteriófagos frente a uma determinada estirpe ou mesmo um gênero de micro-organismos.

Os bacteriófagos BFSE16, BFSE18, BFSE43 e P<sub>22</sub> apresentaram atividade lítica em relação a outros gêneros de micro-organismos da família Enterobacteriaceae (Tabela 4). A similaridade entre estruturas da superfície de bactérias de gêneros da família Enterobacteriaceae, pode ter contribuído para estes resultados (KAUFFMANN, 1966).

Resultados de atividade de bacteriófagos sobre diferentes gêneros de micro-organismos de uma mesma família também foram observados por Callaway (2007). Este autor isolou bacteriófagos utilizando como hospedeiro *E. coli* que apresentaram atividade lítica sobre *Salmonella* Typhimurium. Bielke et al (2007a) observaram que dois bacteriófagos isolados para *Salmonella* Enteritidis de esgoto doméstico também apresentaram capacidade de propagar

em três estirpes de *E. coli* e uma estirpe de *Klebsiella oxytoca*. Entretanto, três bacteriófagos avaliados por O'Flynn et al (2006) foram específicos para estirpes de *Salmonella* e não apresentaram atividade sobre estirpes de *E. coli* e de *Pseudomonas fluorescens*.

Bacteriófagos capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, inclusive diferentes gêneros de micro-organismos, apresentam elevado potencial de utilização em terapia e controle de patógenos em alimentos. Esta característica permite a simplificação e redução de custos do processo de produção da suspensão de bacteriófagos, além de aumentar a segurança, pois os bacteriófagos utilizados contra micro-organismos patogênicos podem ser replicados em bactérias não patogênicas (BIELKE et al, 2007a). Porém, uma melhor seleção dos bacteriófagos faz-se necessária, a fim de evitar problemas de atividade lítica contra bactérias benéficas utilizadas na elaboração de alimentos.

Higgins et al (2008) descreveram um fenômeno no qual bacteriófagos propagados em uma determinada estirpe, em altas concentrações, podem causar lise em outras estirpes sem estabelecer, de fato, a infecção normal do hospedeiro e replicação do bacteriófago. Este fenômeno pode ocorrer devido à atividade de enzimas líticas presentes na suspensão de bacteriófagos, que foram liberadas para o meio após lise da célula hospedeira na etapa de propagação e permaneceram ativas na suspensão. A avaliação dessa condição é importante na escolha de bacteriófagos para terapia e descontaminação que apresentem de fato capacidade de infecção do micro-organismo estudado.

Observou-se que os bacteriófagos BFSE7 e BFSE36 e BFSE43 e P<sub>22</sub>, apresentaram características de especificidade semelhantes, podendo pertencer a um mesmo grupo ou linhagem, já os bacteriófagos BFSE16 e BFSE18 apresentaram características de especificidade diferentes entre si e também em relação aos demais.

A caracterização dos bacteriófagos em relação à atividade lítica e especificidade permitem a seleção e elaboração de um coquetel de bacteriófagos capaz de atuar em uma ampla variedade de sorovares de *Salmonella*, tornando o processo de descontaminação mais eficiente e reduzindo a incidência de resistência do hospedeiro.

#### 4.5 Análise da morfologia dos bacteriófagos

Observou-se por meio de microscopia eletrônica de transmissão que os cinco bacteriófagos isolados de fezes de aves e selecionados para utilização em descontaminação de pele de frango apresentaram morfologia semelhante.

Os cinco bacteriófagos apresentaram cabeça icosaédrica e pequenas caudas (Figura 3). De acordo com as observações microscópicas, os cinco bacteriófagos podem ser classificados com pertencentes à ordem Caudovirales e família Podoviridae. Resultados semelhantes foram encontrados por McLaughlin et al (2006). Esses autores observaram predominância de bacteriófagos de *Salmonella* da família Podoviridae em amostras de efluente de pocilgas nos EUA. Em outro estudo, dois bacteriófagos de *Salmonella* isolados de fezes de suíno foram classificados por O'Flynn et al (2006) como pertencentes a família Siphoviridae. Carey-Smith et al (2006) observaram morfologias diferentes em bacteriófagos de *Salmonella* isolados de água de esgoto, sendo classificados nas famílias Myoviridae e Siphoviridae.

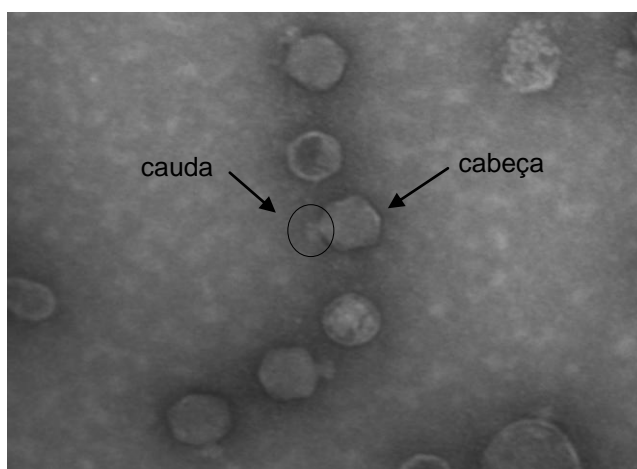


Figura 3. Observação microscópica do bacteriófago de *Salmonella* BFSE7, isolado de fezes de aves, em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140.000 x.

#### 4.6 Avaliação da eficácia *in vitro* dos bacteriófagos

O efeito da adição de bacteriófagos sobre a turbidez de cultivos de *Salmonella* é ilustrado na Figura 4.

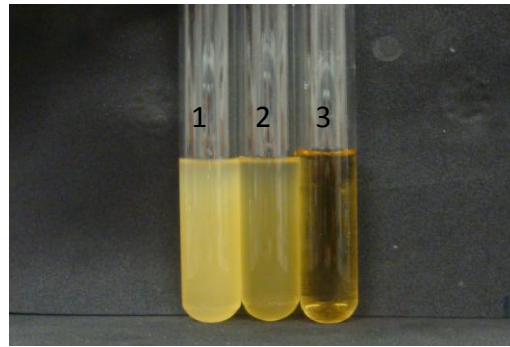


Figura 4. Redução da absorbância do cultivo de *Salmonella*, adicionado do bacteriófago BFSE7 na concentração de  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> e incubado a 37 °C (1 – Cultivo controle; 2 – Cultivo com bacteriófago; 3 – Meio de cultura sem inoculo).

Observou-se que nenhum dos cinco bacteriófagos adicionados nas concentrações iniciais de  $10^3$  e  $10^6$  PFU.mL<sup>-1</sup> aos cultivos de *Salmonella* incubados à 12, 25 e 37 °C reduziram a absorbância medida em espectrofotômetro à 600 nm em comparação com o controle sem adição de bacteriófagos, por outro lado para uma concentração inicial de  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> nas temperaturas de incubação avaliadas, foi possível observar redução da absorbância dos cultivos (Figura 5 a 9). Essa redução indicou a lise celular e diminuição das células em suspensão no meio de cultivo causada pela liberação de novos bacteriófagos e conclusão do ciclo de infecção. Observou-se a necessidade de concentrações de bacteriófagos elevadas para se obter efeitos de redução nas medidas de absorbância de cultivos de *Salmonella*.

A retomada do crescimento de *Salmonella* observada após 9,25 h de incubação a 37 °C e 13 h de incubação a 25 °C na presença do bacteriófago BFSE7 (Figuras 5A e 5B) indica a presença de células resistentes ao fago ou a alteração de ciclo de infecção lítico para lisogênico. Resultados semelhantes foram observados por O'Flynn et al (2004) e Kim, Klumpp e Loessner (2007) que atribuíram a retomada do crescimento microbiano em cultivos de micro-organismos na presença de bacteriófagos a mutações do micro-organismo e desenvolvimento de resistência.

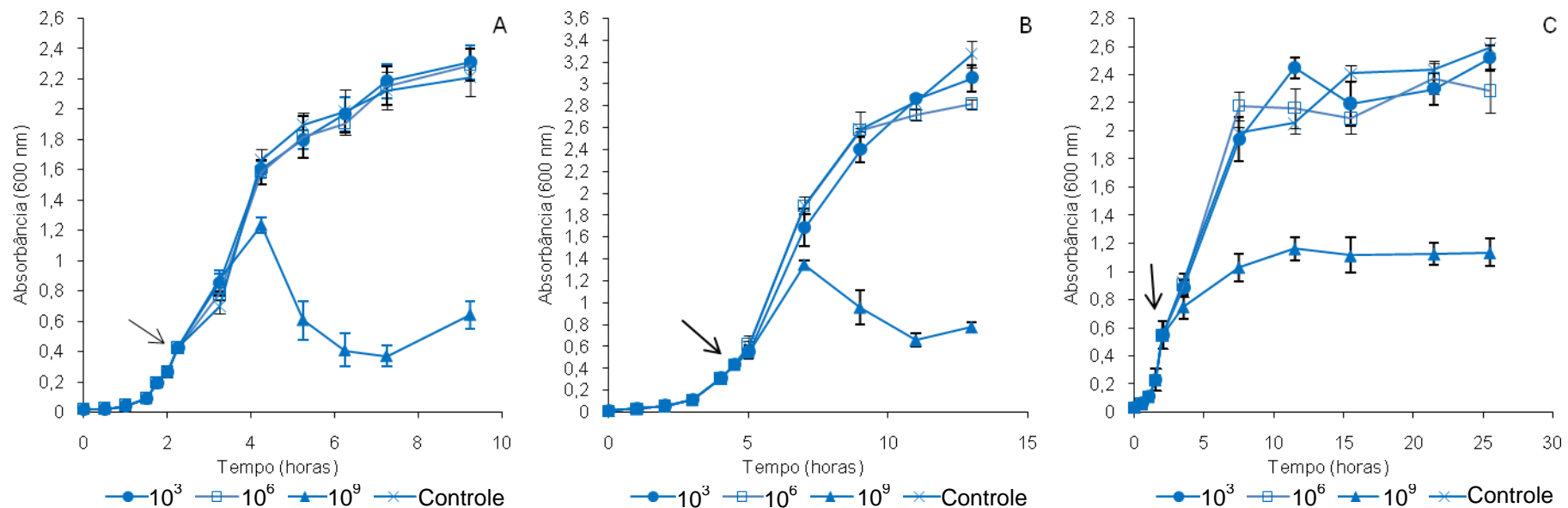


Figura 5. Determinação da absorbância de cultivo de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE7, adicionado nas concentrações iniciais de  $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> e incubado nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). Valores médios de absorbância medidos a 600 nm, acompanhado do desvio padrão.

↘ - Ponto de adição de bacteriófago.

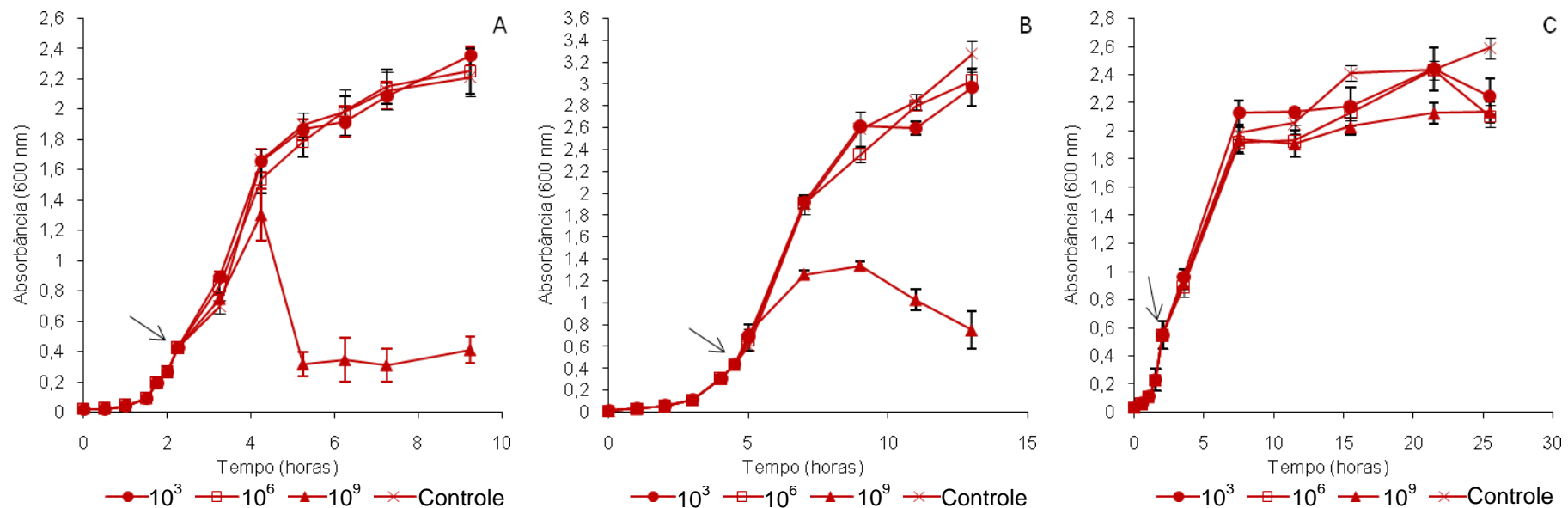


Figura 6. Determinação da absorbância de cultivo de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE16, adicionado nas concentrações iniciais de  $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> e incubado nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). Valores médios de absorbância medidos a 600 nm, acompanhado do desvio padrão.

↙ - Ponto de adição de bacteriófago.

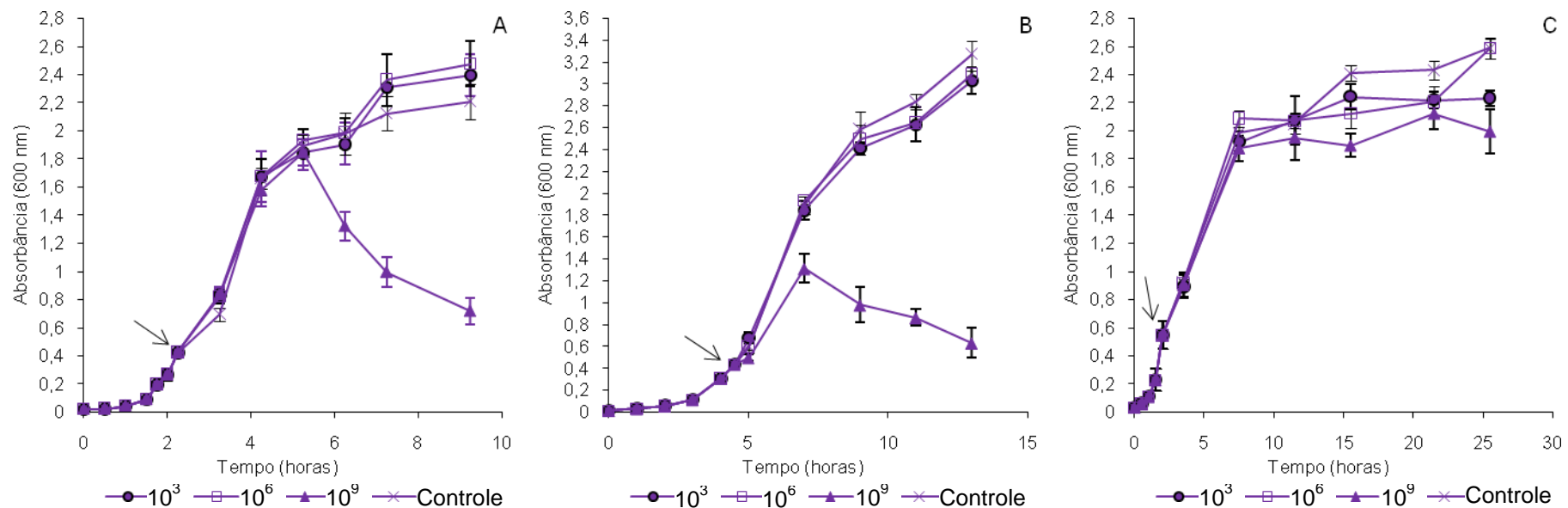


Figura 7. Determinação da absorbância de cultivo de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE18, adicionado nas concentrações iniciais de  $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> e incubado nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). Valores médios de absorbância medidos a 600 nm acompanhado do desvio padrão.

↙ - Ponto de adição de bacteriófago.

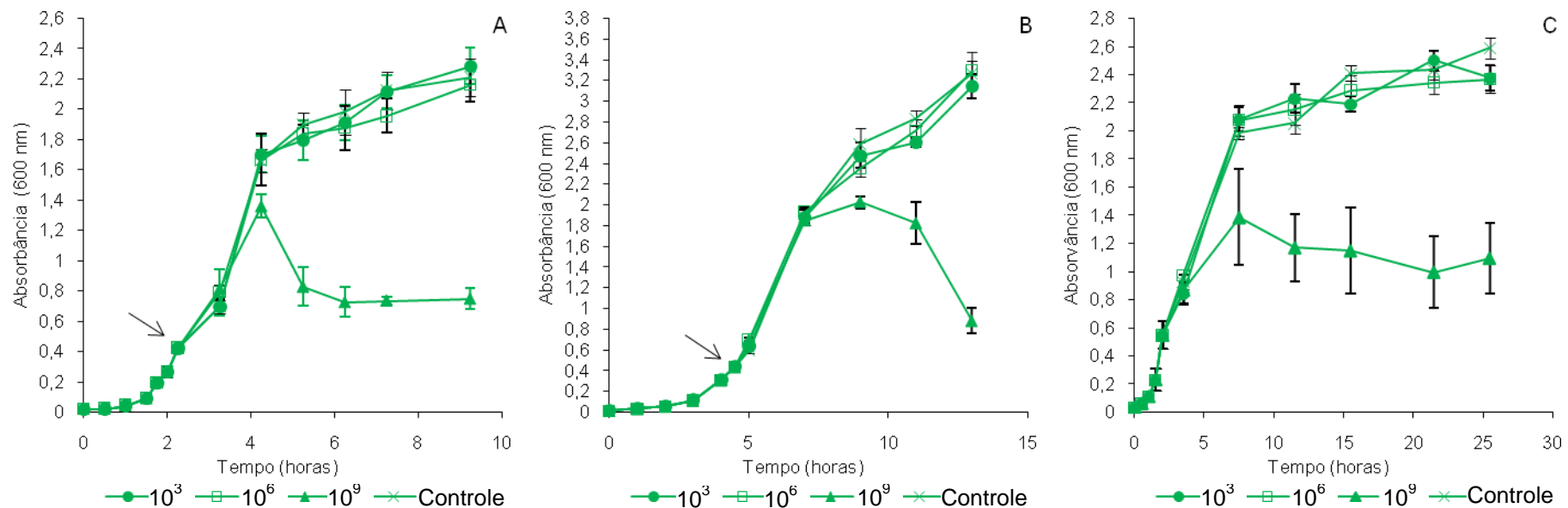


Figura 8. Determinação da absorbância de cultivo de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE36, adicionado nas concentrações iniciais de 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> PFU mL<sup>-1</sup> e incubado nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). Valores médios de absorbância medidos a 600 nm acompanhado do desvio padrão.

↙ - Ponto de adição de bacteriófago.

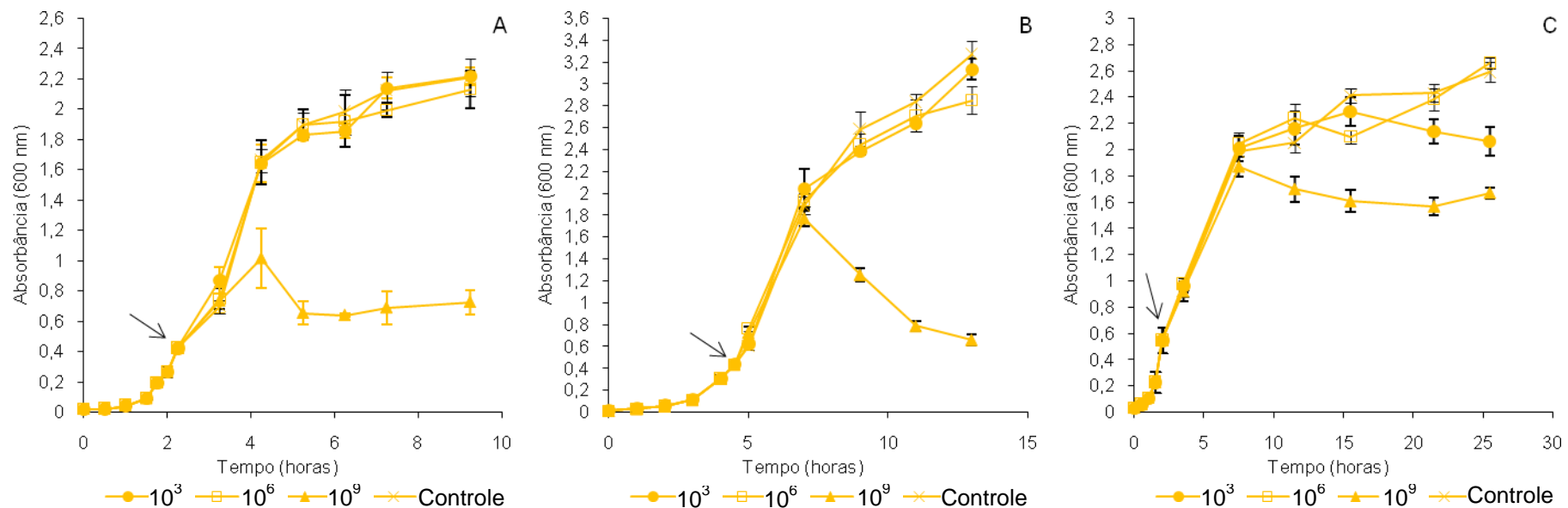


Figura 9. Determinação da absorbância de cultivo de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófago BFSE43, adicionado nas concentrações iniciais de  $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e incubado nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). Valores médios de absorbância medidos a 600 nm acompanhado do desvio padrão.

↖ - Ponto de adição de bacteriófago.

Observou-se que a redução da absorbância do cultivo de *Salmonella* adicionado do bacteriófago BFSE18 na concentração inicial de  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e incubado a 37 °C ocorreu mais tardiamente em comparação com os demais cultivos adicionados dos bacteriófagos BFSE7, BFSE16, BFSE36 e BSFE43 (Figura 10A). Entretanto, os valores de absorbância de todos os cultivos de *Salmonella* adicionados de bacteriófagos foram próximos entre si após 9,2 h de incubação e não diferiram estatisticamente ao nível de significância de 5 %. Esse comportamento se repetiu com o cultivo de *Salmonella* adicionado do bacteriófago BFSE36 e incubado a 25 °C (Figura 10B), e após 13 h de incubação as reduções de absorbância de todos os cultivos de *Salmonella* adicionados de bacteriófagos foram consideradas iguais estatisticamente ao nível de significância de 5 %. Nos cultivos de *Salmonella* a 12 °C adicionados dos bacteriófago BFSE16 e BFSE18 nas concentrações iniciais de  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> não foram observadas reduções de absorbância, em relação ao tratamento controle. Já os cultivos de *Salmonella* adicionados dos bacteriófagos BFSE7 e BFSE36 apresentaram reduções de absorbância semelhantes e superiores à do cultivo adicionado do bacteriófago BFSE43 (Figuras 10C). Esses resultados indicam diferenças no processo de infecção desses bacteriófagos de acordo com a temperatura de incubação do cultivo de *Salmonella* e que a melhor atividade ocorreu em temperaturas de incubação próximas à ótima de crescimento, visto que na temperatura de incubação de 12 °C a redução de absorbância foi inferior aos valores encontrados quando os cultivos foram incubados a 25 e 37 °C. Essa influência da temperatura na atividade dos bacteriófagos sobre o micro-organismo hospedeiro é explicada por Kutter e Sulakvelidze (2005) em função da dependência de atividade metabólica do hospedeiro pelos bacteriófagos em seu processo de morfogênese para síntese de estruturas e replicação do material genético. Em condições ótimas de crescimento, a maior atividade metabólica do hospedeiro favorece o processo de replicação dos bacteriófagos e lise celular.

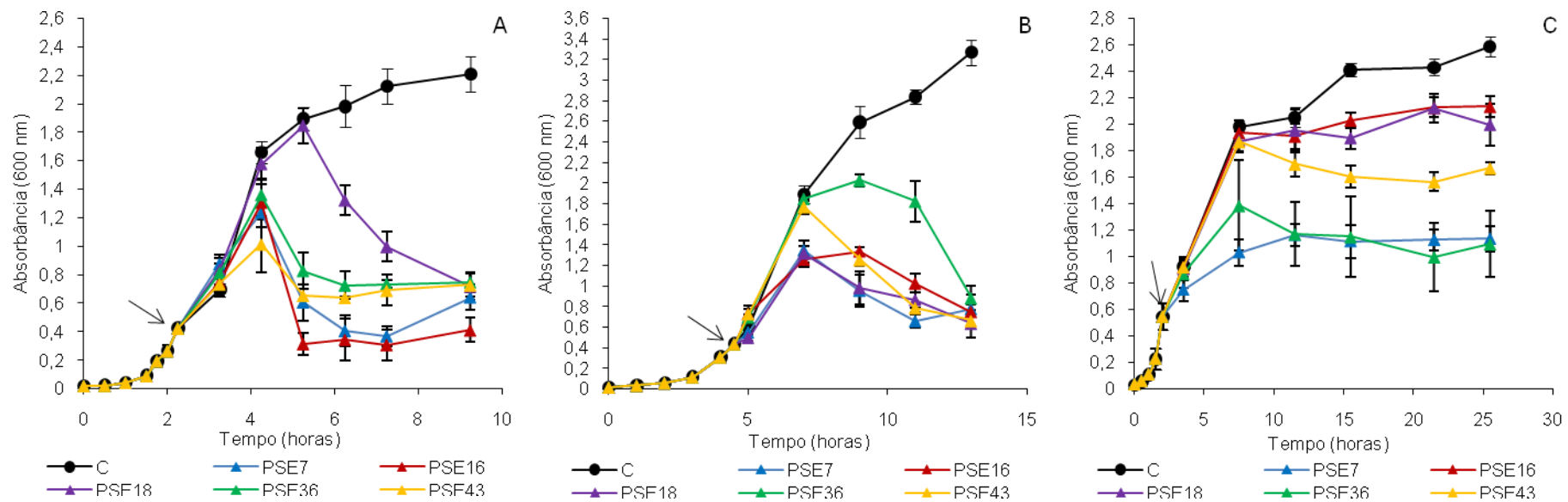


Figura 10. Determinação da absorbância de cultivos de *Salmonella* Enteritidis na presença de bacteriófagos BFSE7, BFSE16, BFSE18, BFSE36 e BFSE43, adicionados na concentração inicial de  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> e tratamento controle sem adição de bacteriófagos (C) incubados nas temperaturas de 37 °C (A), 25 °C (B) e 12 °C (C). Valores médios de absorbância medidos a 600 nm acompanhado do desvio padrão.  
 ↗ - Ponto de adição da mistura de bacteriófagos.

Observou-se que a população de células viáveis de *Salmonella* na presença dos diferentes bacteriófagos nas concentrações iniciais de  $10^3$  e  $10^6$  PFU.mL<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente do tratamento controle ao nível de significância de 5 % pelo teste *t-pareado*. Esses resultados indicam a baixa atividade dos bacteriófagos em lisar as células de *Salmonella* quando adicionados aos cultivos nas concentrações de  $10^3$  e  $10^6$  PFU.mL<sup>-1</sup>, também observada nas determinações de absorvância.

Embora tenha ocorrido redução de absorvância dos cultivos de *Salmonella* a 37 °C adicionados dos bacteriófagos BFSE7, BFSE18, BFSE36 e BFSE43, as contagens de células viáveis de *Salmonella* não diferiram estatisticamente em comparação com o controle pelo teste *t-pareado* ao nível de significância de 5 % (Tabela 5). Já nas temperaturas de incubação de 25 e 12 °C, todos os cultivos de *Salmonella* adicionados de bacteriófagos apresentaram reduções significativas no número de células viáveis em comparação com o controle. Não foi possível comparar a eficiência entre tratamentos com bacteriófagos a diferentes temperaturas, pois o tempo de incubação dos cultivos de *Salmonella* foi diferente.

Tabela 5. Efeito do tratamento com bacteriófagos utilizados na concentração inicial de  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis cultivada em diferentes temperaturas.

Bacteriófago	Contagem (log UFC.mL <sup>-1</sup> )		
	37 °C	25 °C	12 °C
Controle	9,4 ± 0,1	10,4 ± 0,2	10,2 ± 0,3
BFSE7	9,0 <sup>ns</sup> ± 0,5	8,6 ± 0,1	8,4 ± 0,1
BFSE16	7,3 ± 0,2	7,9 ± 0,7	8,9 ± 0,1
BFSE18	8,8 <sup>ns</sup> ± 1,0	7,9 ± 0,5	9,3 ± 0,3
BFSE36	8,6 <sup>ns</sup> ± 0,6	8,2 ± 0,2	9,1 ± 0,1
BFSE43	8,6 <sup>ns</sup> ± 0,4	9,2 ± 0,2	8,4 ± 0,3

<sup>ns</sup> - Não significativo pelo teste *t-pareado* ao nível de probabilidade de 5 %.

Ao se comparar o efeito dos tratamentos com bacteriófagos sobre o cultivo de *Salmonella* na temperatura de 37 °C pelo teste de *Duncan* ao nível de significância de 5 % observou-se a formação de dois grupos de médias, BFSE16 e BFSE7, BFSE18, BFSE36 e BFSE43. A maior redução de contagem de *Salmonella* foi observada no tratamento com bacteriófago BFSE16, que reduziu a contagem em 2,1 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

Em relação aos tratamentos com bacteriófagos na temperatura de 25 °C observou-se a formação de dois grupos de médias, BFSE7, BFSE16, BFSE18 e BFSE36; e BFSE7 e BFSE43. As maiores reduções de contagem de *Salmonella* foram observadas na presença dos bacteriófagos BFSE16 com redução média de 2,50 log UFC.mL<sup>-1</sup>, BFSE18 com redução média de 2,47 log UFC.mL<sup>-1</sup>, BFSE36 com redução média de 2,16 log UFC.mL<sup>-1</sup> e BFSE7 com redução média de 1,75 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Apesar da variação, estas médias foram consideradas iguais entre si ao nível de significância de 5 %.

Na temperatura de 12 °C observou-se que os tratamentos com bacteriófagos não apresentaram diferenças entre si em relação à redução da contagem de *Salmonella* ao nível de significância de 5 % pela ANOVA. As reduções do número de células viáveis nestes tratamentos variaram entre 0,85 a 1,77 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

O efeito dos bacteriófagos sobre a contagem de *Salmonella* em meio de cultura foi dependente da concentração de bacteriófago utilizada. As maiores reduções de células viáveis de *Salmonella* foram obtidas nos cultivos adicionados de bacteriófagos na concentração inicial de 10<sup>9</sup> PFU.mL<sup>-1</sup> e na temperatura de 25 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Kim, Klumpp e Loessner (2007) que observaram melhor atividade de bacteriófagos sobre cultivos de *Enterobacter sakazakii* ao serem adicionados na concentração de 10<sup>9</sup> PFU.mL<sup>-1</sup>. Entretanto, esses autores observaram diferenças de atividade entre os bacteriófagos em relação à temperatura de incubação, um dos bacteriófagos utilizados apresentou melhor atividade na temperatura de 37 °C e o outro a 24 °C. A influência da temperatura de incubação sobre a atividade de bacteriófagos também foi demonstrada por O'Flynn et al (2004) que observaram diminuição da atividade de bacteriófagos em cultivo de *E. coli* a 12 °C, em razão desse micro-organismo não crescer nesta temperatura. Essa diminuição de atividade de bacteriófagos em baixas temperaturas pode ser explicada por alterações fisiológicas do micro-organismo e condição de stress (KIM, KLUMPP e LOESSNER, 2007).

#### **4.7 Comparação entre métodos de descontaminação de carcaça**

O tratamento dos fragmentos de pele de frango com irradiação gama a 10 kGy por 2 h foi suficiente para eliminar a microbiota natural da pele de frango

que estava contaminada com, aproximadamente,  $10^5$  UFC.cm<sup>-2</sup> de micro-organismos aeróbios mesófilos. A contagem de células viáveis de *Salmonella* observada nos fragmentos de pele do tratamento controle apresentou resultado próximo ao inóculo planejado de  $10^5$  UFC.cm<sup>-2</sup> (Tabela 6).

Observou-se por meio de Análise de Variância (ANOVA) que pelo menos dois dos tratamentos utilizados apresentaram diferenças entre si em relação a contagem de *Salmonella* ao nível de significância de 5 %. As médias de contagem de *Salmonella* Enteritidis dos diferentes tratamentos de descontaminação foram agrupadas em quatro grupos (a, b, c e d) por meio do teste de *Duncan* ao nível de significância de 5 % (Tabela 6).

Tabela 6. Contagem de *Salmonella* Enteritidis dos fragmentos de pele de frango submetidos aos tratamentos com diferentes agentes de descontaminação a 4 °C.

Tratamento	Princípio ativo (mg.L <sup>-1</sup> )	TC (min)	Contagem (Log UFC.cm <sup>-2</sup> )	CV (%)
Controle	-	-	5,5 <sup>a</sup>	6,4
Água	-	30	5,3 <sup>b</sup>	9,6
Dicloroisocianurato	200,5 ± 37,3	10	4,7 <sup>c</sup>	3,7
Ác. peracético	112,3 ± 23,6	10	4,7 <sup>c</sup>	5,6
Cloridrato de Biguanida	769,1 ± 26,4	15	2,8 <sup>d</sup>	18,6
Ácido láctico	2,0* ± 0,1	90***	4,7 <sup>c</sup>	6,1
Mistura de Bacteriófagos	9,5** ± 0,3	30	4,6 <sup>c</sup>	7,0

Médias de contagem de *Salmonella* (Log UFC.cm<sup>-2</sup>) acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Duncan* ao nível de significância de 5 %.

\* - unidade em % (p/v); \*\* - unidade em log PFU.mL<sup>-1</sup>; \*\*\* - unidade em segundos; TC – Tempo de contato; CV – Coeficiente de variação.

A contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele tratados com água foi inferior, em média, 0,2 Log UFC.cm<sup>-2</sup> em relação à contagem do tratamento controle, possivelmente, devido à lixiviação dos micro-organismos da pele para água.

O tratamento de descontaminação dos fragmentos de pele de frango com solução de dicloroisocianurato de sódio na concentração de 200,5 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual total reduziu a contagem de *Salmonella*, em média, 0,84 Log UFC.cm<sup>-2</sup>, em comparação com o tratamento controle. Esse resultado foi similar ao encontrado por Fabrizio et al (2002) que reduziram 0,8 Log UFC.mL<sup>-1</sup> na contagem de *Salmonella* Typhimurium em carcaças de frango ao aplicarem

hipoclorito de sódio na concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup> por 15 s. Porém, esses autores não observaram redução na contagem de *Salmonella* ao aplicar a mesma concentração de hipoclorito de sódio na água do *chiller* e deixar as carcaças imersas por 45 min. Russel e Axtell (2005) observaram um aumento de 34 % na contagem de *Salmonella*, em relação ao controle, após imersão de carcaças de frango em água com 50 mg.L<sup>-1</sup> de cloro. Em outro estudo, Özdemi e Pamuk (2006) demonstraram a redução de 1,4 ciclos logaritmos na contagem de *Salmonella* Typhimurium em pele de frango tratada com hipoclorito de sódio acidificado na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, resultados de descontaminação superiores foram observados por Northcutt et al (2007). Ao aplicar hipoclorito na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> por 0,1 a 0,3 min na forma de spray em carcaças de frango contaminadas artificialmente, esses autores obtiveram uma redução na contagem de *Salmonella* de 2,4 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Um recente estudo mostrou que a aplicação de spray de água clorada nas concentrações de 20 a 50 mg.L<sup>-1</sup> em diferentes pontos do processamento de carcaça de frango, tais como depenagem, evisceração e degola, reduziu a prevalência de *Salmonella* em 20 a 25 % (STOPFORTH et al, 2007). Portanto, percebe-se que a redução de *Salmonella* em produtos cárneos por aplicação de substâncias a base de cloro é influenciada pelas condições de aplicação, tipo de alimento envolvido, concentração do princípio ativo na solução utilizada e tempo de contato.

O cloro é uma opção para descontaminação de carcaças de frango, contudo o uso isolado desta substância requer concentrações de 200 mg.L<sup>-1</sup> para redução substancial da população bacteriana, ou até 400 mg.L<sup>-1</sup> para inativação de *Salmonella*, pois o excesso de matéria orgânica (sangue, gordura e restos de alimentos) no sistema de pré-resfriamento provoca a redução da concentração de cloro livre e diminui a eficiência na eliminação de micro-organismos (BOLDER, 1997). A legislação brasileira permite a concentração máxima de cloro livre de 5 mg.L<sup>-1</sup> na água do sistema de pré-resfriamento por imersão (BRASIL, 1998). Nos EUA o uso de cloro é permitido em concentrações superiores, sendo o hipoclorito de sódio permitido nas concentrações de 500 a 1200 mg.L<sup>-1</sup> por meio de aspersão durante 15 s ou imersão por 8 s, e máximo de 150 mg.L<sup>-1</sup> na água do sistema de pré-resfriamento (USDA, 2002b). O dióxido de cloro é permitido na concentração

máxima de 50 mg.L<sup>-1</sup> na água de lavagem de carcaças, a fim de manter uma concentração residual de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> (USDA, 2002a).

A solução de concentração média de 112,3 mg.L<sup>-1</sup> de ácido peracético reduziu, em média, 0,81 Log UFC.cm<sup>-2</sup> a contagem de *Salmonella* nos fragmentos de pele em comparação com o controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Bauermeister et al (2008b), que demonstraram redução de 1,1 ciclos logaritmos na contagem de *Salmonella* em carcaças de frango tratadas com ácido peracético na concentração de 85 mg.L<sup>-1</sup>, e apenas 0,24 ciclos logaritmos nas carcaças tratadas com solução de cloro a 30 mg.L<sup>-1</sup>. Em outro estudo, Bauermeister et al (2008a) demonstraram a dose-dependência e maior eficiência na redução de *Salmonella* Typhimurium de tratamentos de carcaças de frango com ácido peracético nas concentrações de 25, 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup>, em comparação com cloro na concentração de 30 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, King et al (2005) não observaram redução na contagem de *Salmonella* em carcaças bovinas tratadas com spray de solução de ácido peracético a 200 mg.L<sup>-1</sup> por 15 s. A resolução RDC nº 2 de 08 de janeiro de 2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) aprova o uso de ácido peracético para controle de micro-organismos na lavagem de ovos, carcaças, peixes e crustáceos e hortifrutícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final. Nos EUA o ácido peracético é permitido na concentração máxima de 220 mg.L<sup>-1</sup> para descontaminação de carcaça de aves na forma de spray, lavagem por 15 s ou na água do *chiller* (USDA, 2002c).

O tratamento com solução de cloridrato de polihexametileno biguanida (PHMB) na concentração de 769,08 mg.L<sup>-1</sup> reduziu, em média, a contagem de *Salmonella* nos fragmentos de pele de frango em 2,7 Log UFC.cm<sup>-2</sup> e apresentou atividade superior aos demais descontaminantes avaliados, provavelmente, em função da elevada concentração de princípio ativo utilizada. A maior eficiência de PHMB em comparação com outros sanitizantes também foi observada por Cox, Bailey e Berrang (1994) ao eliminar *Salmonella* Typhimurium na casca dos ovos por pulverização de PHMB na concentração de 350 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, Mesquita et al (1997) observaram reduções de 0,2 a 1,7 ciclos logaritmos na contagem de micro-organismos psicrotróficos, 0,3 a 1,3 ciclos logaritmos na contagem de aeróbios mesófilos e redução de 100 % na enumeração de coliformes termotolerantes ao utilizar soluções de PHMB nas

concentrações de 33 e 50 mg.L<sup>-1</sup> para descontaminação de tecidos musculares e vísceras de frango.

O tratamento com ácido láctico na concentração de 2,0 % reduziu, em média, a contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele de frango em 0,83 Log UFC.cm<sup>-2</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Anang et al (2007) que reduziram a contagem de *Salmonella* Enteritidis em peito de frango em 0,8 a 1,7 Log UFC.g<sup>-1</sup> por imersão em solução de ácido láctico a 0,5 a 2 % por 10 a 30 min. Resultados superiores de redução da contagem de *Salmonella* em peito de frango foram obtidos por outros autores com ácido láctico. Hwang e Beuchat (1995) demonstraram a redução de 2,0 Log UFC.cm<sup>-2</sup> de *Salmonella* em peitos de frango tratados por imersão em solução de ácido láctico a 1 % durante 30 min na temperatura de 25 °C. Li et al (1997) observaram redução de 1,6 ciclos logaritmos na contagem de *Salmonella* em carcaças de frango tratadas com spray de ácido láctico a 1 % por 90 s. Xiong et al (1998) reduziram 2,2 Log UFC.mL<sup>-1</sup> de *Salmonella* Typhimurium em peito de frango ao utilizar spray de ácido láctico na concentração de 1 a 2 % por 0,5 min. Yang, Li e Slavik (1998) observaram redução de 1,8 ciclos logaritmos na contagem de *Salmonella* Typhimurium em carcaça de frango ao utilizar spray de ácido láctico a 2 % por 0,3 min. A resolução RDC n° 7 de 02 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) aprova a extensão de uso de ácido láctico como coadjuvante de tecnologia, na função de agente de controle de micro-organismos na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de açougue em quantidade suficiente para obter o efeito desejado.

O tratamento com a mistura de bacteriófagos na concentração de 9,46 PFU.mL<sup>-1</sup> reduziu a contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele de frango, em média, 0,92 Log UFC.cm<sup>-2</sup>. Resultados superiores de redução de *Salmonella* foram obtidos por Bigwood et al (2008) ao utilizar bacteriófago em baixas e elevadas MOI (10 ou 10<sup>4</sup>) para reduzir a contagem de *Salmonella* em carne crua e cozida contaminadas com menor que 10<sup>2</sup> e 10<sup>4</sup> UFC.cm<sup>-2</sup>, armazenadas em diferentes temperaturas. Esses autores observaram redução da contagem de *Salmonella* de 2 a 3 Log UFC.cm<sup>-2</sup> a 5 °C e valores maiores do que 5,9 Log UFC.cm<sup>-2</sup> a 24 °C, após aplicação de bacteriófagos em elevadas concentrações na superfície da carne contaminada com 10<sup>4</sup> UFC.cm<sup>-2</sup> de *Salmonella* e armazenadas por 24 h. Em adição, Bielke et al (2007b) demonstraram a atividade de bacteriófagos que infectam múltiplos gêneros

sobre carcaça de frango contaminada com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, por meio de aplicação de um spray de bacteriófagos na concentração de  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup>. Esses autores observaram redução de 90 % na prevalência de *Salmonella* nas carcaças de frango contaminadas com  $1,1 \times 10^2$  UFC por carcaça, em relação ao tratamento controle. Em outro estudo, a prevalência de *Salmonella* inoculada em carcaças de frango foi reduzida de 100 % (controle) para 7 % após a aplicação de bacteriófagos na concentração de  $10^8$  PFU.mL<sup>-1</sup> por pulverização (HIGGINS et al, 2005).

A eficiência da utilização de bacteriófagos na redução da contaminação de micro-organismos em alimentos depende de diversos fatores, tais como, concentração utilizada, tempo de contato, temperatura, pH e matriz do alimento, e deve ser avaliada para cada tipo de alimento e condição de processamento (GUENTHER et al, 2009).

Apesar da baixa redução da contagem de *Salmonella*, em comparação com outros resultados encontrados na literatura, o tratamento com bacteriófagos foi equivalente a outros tratamentos de descontaminação, comumente utilizados na indústria de carnes. Entretanto, o tratamento com bacteriófagos apresenta vantagens sobre os demais, por não modificar as características sensoriais do alimento, não gerar compostos tóxicos na carne, não poluir o meio ambiente, além de ser uma forma natural de controle de micro-organismos (HAGENS e LOESSNER, 2007; GREER, 2005).

Além disso, existem sérias dificuldades no comércio internacional de carne de aves, em particular entre os Estados Unidos e a Comunidade Européia, pelas diferenças nas operações de abate (MORENO, 2006). A utilização de substâncias químicas para eliminar a contaminação da superfície de carcaças de aves é proibida nos países membros da Comunidade Européia (OJEU, 2009). Porém, a implantação de formas alternativas de controle de patógenos em carne de aves é necessária, a fim de diminuir a ocorrência de doenças de origem alimentar causadas por este tipo de alimento.

#### **4.8 Avaliação da atividade de bacteriófagos durante a refrigeração e congelamento.**

Apesar da baixa contaminação dos fragmentos de pele de frango com  $10^2$  UFC.cm<sup>-2</sup> de *Salmonella*, a adição da mistura de bacteriófagos nas

concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> não foi capaz de eliminar esse micro-organismo patogênico das amostras ao longo do período de 30 dias de armazenamento, tanto sob condições de refrigeração quanto de congelamento. Embora tenham sido observadas reduções na contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele de frango adicionados da mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$  e  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> e armazenados por 10 dias sob refrigeração, a grande variação das médias de contagem de *Salmonella* entre repetições contribuiu para que os demais resultados fossem considerados não significativos pelo teste *t-pareado* (Figura 11A). Resultados semelhantes foram observados por Bigwood et al (2008) nos quais nove das 12 comparações realizadas entre os tratamentos com bacteriófagos e controle não foram significativas, em condições em que *Salmonella* estava em baixas concentrações em carne crua e cozida. No presente estudo, observaram-se reduções entre 1,2 a 2,2 Log UFC.cm<sup>-2</sup> na contagem de *Salmonella* nos fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^2$  UFC.cm<sup>-2</sup> armazenados por 3 e 10 dias sob condições de congelamento (Figura 11B).

Nos fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^4$  UFC.cm<sup>-2</sup>, tratados com mistura de bacteriófagos e armazenados a 4 °C observou-se reduções na contagem de *Salmonella* entre 0,8 e 1,8 Log UFC.cm<sup>-2</sup> (Figura 12A). Na condição de congelamento a -20 °C, observou-se que apenas os fragmentos de pele de frango adicionados da mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^8$  PFU.mL<sup>-1</sup> armazenados por 3 dias e  $10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup> armazenados por 3 e 10 dias apresentaram reduções estatisticamente significativas da contagem de *Salmonella* de 0,7 e 1,3 Log UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente, em comparação com o tratamento controle (Figura 12B). Reduções semelhantes nas contagens de *Salmonella* foram encontradas nos fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup>, adicionados da mistura de bacteriófagos e armazenados sob refrigeração, com valores variando entre 0,8 e 1,6 Log UFC.cm<sup>-2</sup> (Figura 13A). Já as reduções na contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele armazenados a -20 °C variaram entre 1,2 e 2,0 Log UFC.cm<sup>-2</sup> nos períodos de armazenamento de 3 e 10 dias (Figura 13B) e foram semelhantes aos valores encontrados para os fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^2$  UFC.cm<sup>-2</sup> e adicionados da mistura de bacteriófagos. Esses resultados indicam que a atividade da mistura de bacteriófagos sobre a redução da contagem de *Salmonella* não é

influenciada pela carga microbiana presente nos fragmentos de pele de frango. Em contraste, Bigwood et al (2008) observaram maior atividade de suspensão de bacteriófagos em condições de altas concentrações de hospedeiro e MOI. Esses autores encontraram reduções superiores a dois ciclos logaritmos na contagem de *Salmonella* em amostras de carne crua e cozida contaminadas com  $10^4$  UFC.cm<sup>-2</sup> após 24 h de incubação a 5 °C, enquanto que 75 % das amostras contaminadas com  $< 100$  UFC.cm<sup>-2</sup> não apresentaram redução em comparação com o controle.

Embora tenha ocorrido redução na contagem de *Salmonella* nos fragmentos de pele contaminados com  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup> adicionados da mistura de bacteriófagos após 30 dias de armazenamento a -20 °C em comparação com os resultados obtidos nos períodos de 3 e 10 dias, observou-se que não houve diferenças significativas em comparação com o controle nesse período em todas as condições de contaminação avaliadas (Figuras 11B, 12B e 13B). Esses resultados parecem indicar que houve redução da contagem bacteriana mais provavelmente devido a danos na célula microbiana pelo método de congelamento e pelo armazenamento, do que pela atividade lítica da mistura de bacteriófagos, visto que a contagem de *Salmonella* nos fragmentos de pele do tratamento controle também reduziu com o prolongamento do tempo de armazenamento para 30 dias, tanto para as condições de refrigeração como de congelamento.

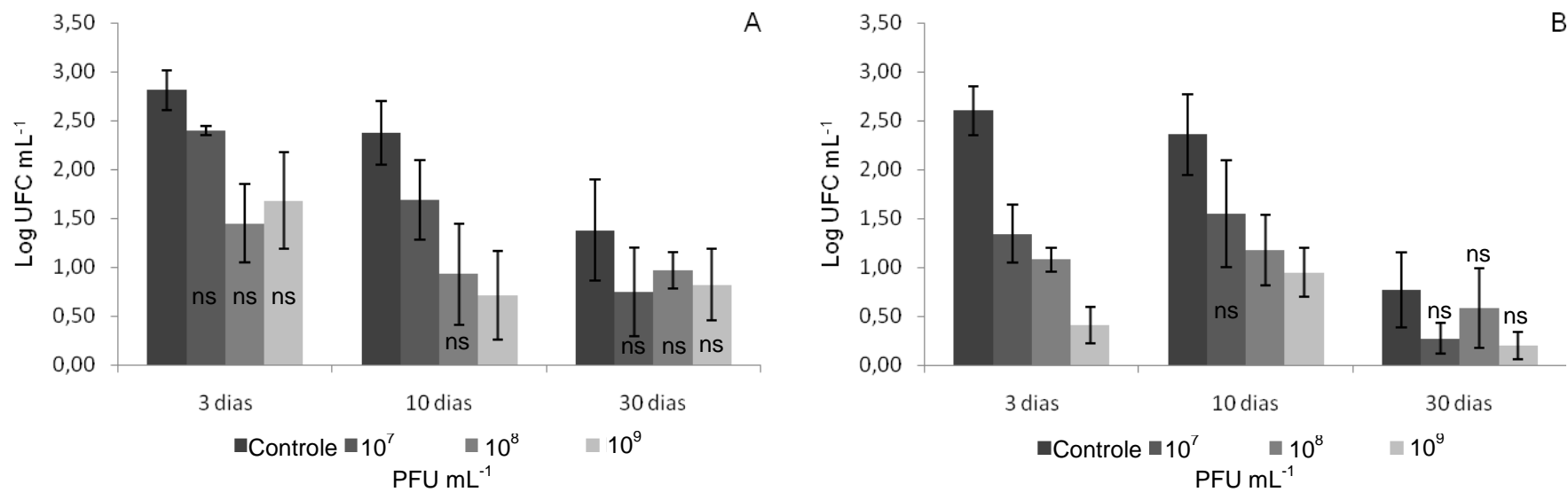


Figura 11. Contagem de *Salmonella* Enteritidis em fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^2$  UFC.cm<sup>-2</sup>, submetidos a tratamentos com mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e armazenados sob refrigeração a 4 °C (A) e congelamento a -20 °C (B) por 3, 10 e 30 dias. Valores médios de Log UFC.cm<sup>-2</sup> acompanhados do desvio padrão. <sup>ns</sup> - Resultados não significativos em comparação com o controle ao nível de probabilidade de 5 % pelo teste *t*-pareado.

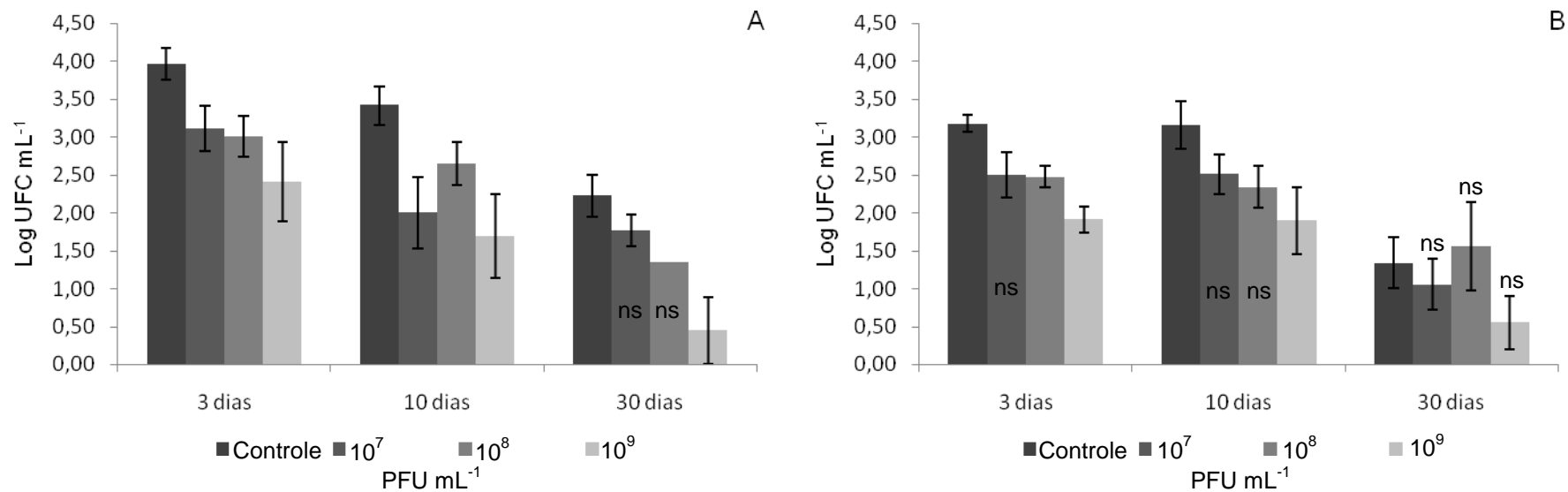


Figura 12. Contagem de *Salmonella* Enteritidis em fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^4$  UFC.cm<sup>-2</sup>, submetidos a tratamentos com mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e armazenados sob refrigeração a 4 °C (A) e congelamento a -20 °C (B) por 3, 10 e 30 dias. Valores médios de Log UFC.cm<sup>-2</sup> acompanhados do desvio padrão. <sup>ns</sup> - Resultados não significativos em comparação com o controle ao nível de probabilidade de 5 % pelo teste *t*-pareado.

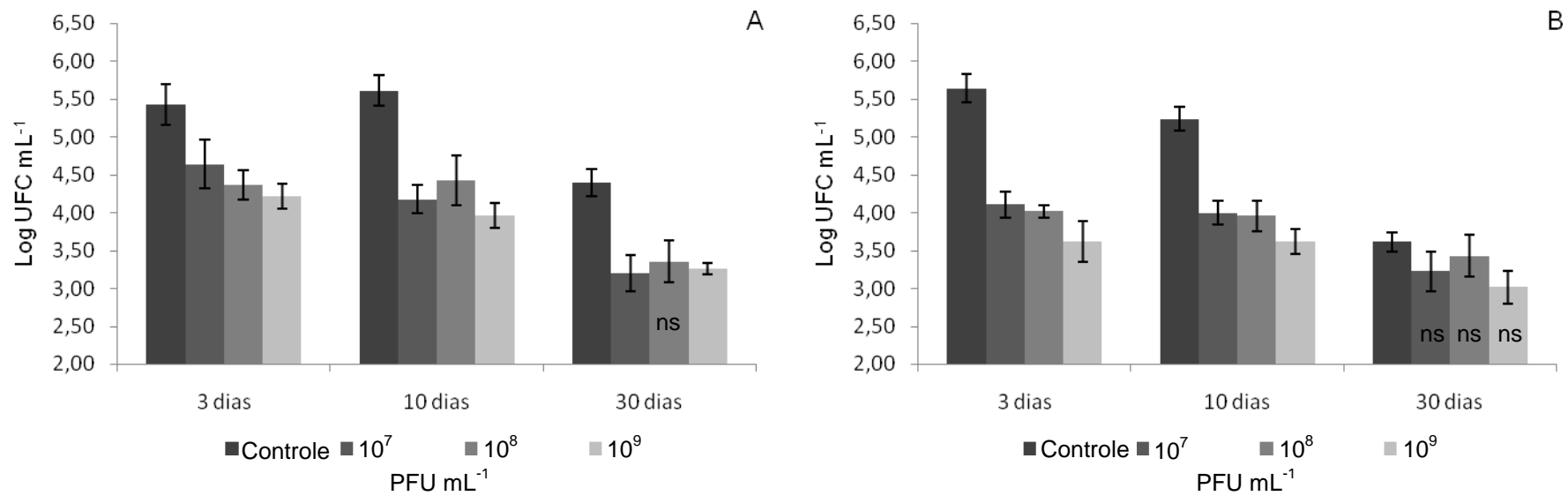


Figura 13. Contagem de *Salmonella* Enteritidis em fragmentos de pele de frango contaminados com  $10^6$  UFC.cm<sup>-2</sup>, submetidos a tratamentos com mistura de bacteriófagos nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  PFU mL<sup>-1</sup> e armazenados sob refrigeração a 4 °C (A) e congelamento a -20 °C (B) por 3, 10 e 30 dias. Valores médios de Log UFC.cm<sup>-2</sup> acompanhados do desvio padrão. <sup>ns</sup> - Resultados não significativos em comparação com o controle ao nível de probabilidade de 5 % pelo teste *t*-pareado.

Observou-se uma tendência de diminuição na contagem de *Salmonella* dos fragmentos de pele de frango à medida que se aumentava a concentração da mistura de bacteriófagos, e as maiores reduções de, aproximadamente, 2,0 Log UFC.cm<sup>-2</sup> foram obtidas com adição da mistura de bacteriófagos na concentração de 10<sup>9</sup> PFU.mL<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes foram encontrados por Goode et al (2003) que observaram redução maior que 2 Log UFC.cm<sup>-2</sup> na contagem de *Salmonella* Enteritidis ao aplicar suspensão de bacteriófago nas concentrações de 7,1 Log PFU.mL<sup>-1</sup> e 8,1 Log PFU.mL<sup>-1</sup> em pedaços de pele de frango contaminados com 3,7 Log UFC.cm<sup>-2</sup> e incubados a 4 °C por 48 h, enquanto que ao aplicar suspensão de bacteriófago na concentração de 3 Log PFU.mL<sup>-1</sup> em fragmentos de pele contaminados com 3 Log UFC.cm<sup>-2</sup> a redução foi menor que 1 Log UFC.cm<sup>-2</sup>. Estes autores observaram ainda que em fragmentos de pele contaminados com *Salmonella* em concentrações < 2 Log UFC.cm<sup>-2</sup> e tratados com bacteriófagos em altas concentrações o micro-organismo não foi recuperado nas amostras. Essa relação direta entre a concentração de bacteriófagos e a redução na contagem de hospedeiro também foi observada por outros autores. Guenther et al (2009) demonstraram que a aplicação de suspensão com bacteriófagos na concentração de 10<sup>8</sup> PFU.g<sup>-1</sup> ou mL em produtos prontos para o consumo contaminados com *Listeria monocytogenes* foi mais efetiva que a suspensão com bacteriófagos na concentração de 10<sup>6</sup> PFU.g<sup>-1</sup> ou mL. Atterbury et al (2003) observaram que as maiores reduções na contagem de *Campylobacter jejuni* em pele de frango, de 1,1 a 1,3 ciclos logaritmos para as amostras armazenadas a 4 °C e de 2,3 a 2,5 ciclos logaritmos nas amostras armazenadas a -20 °C, foram obtidas com aplicação de suspensão de bacteriófagos na maior concentração estudada, de 10<sup>7</sup> PFU por fragmento. Esses autores observaram que a redução da contagem de *Campylobacter jejuni* não foi influenciada pelo prolongamento do tempo de armazenamento de 1 para 5 dias.

Na avaliação dos fragmentos de pele inoculados somente com bacteriófagos, observou-se por meio de análise de regressão em nível de significância de 5 %, que o armazenamento sob refrigeração a 4 °C ou congelamento a -20 °C não influenciaram as concentrações de bacteriófagos durante o período avaliado (Tabela 7). Resultados semelhantes foram encontrados por Fiorentini et al (2005) que observaram estabilidade na concentração de bacteriófagos, aplicados em cortes de frango contaminados

com *Salmonella*, durante o armazenamento por 3, 6, 9, 12 e 15 dias a 5 °C. Em outro estudo, Bigwood et al (2008) observaram redução menor que 10 % do valor inicial na concentração de bacteriófagos de *Salmonella*, utilizados na descontaminação de carne armazenada a 5 °C por 24 h.

Tabela 7. Contagem de bacteriófagos nos fragmentos de pele de frango durante o período de armazenamento a 4 e -20 °C.

Inóculo (PFU.cm <sup>-2</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Contagem (PFU.cm <sup>-2</sup> )
10 <sup>7</sup>	4	3	6,20 ± 0,76
		10	6,47 ± 0,46
		30	6,61 ± 0,32
	-20	3	7,04 ± 0,08
		10	6,89 ± 0,29
		30	6,92 ± 0,13
10 <sup>8</sup>	4	3	7,68 ± 0,28
		10	7,67 ± 0,38
		30	7,97 ± 0,23
	-20	3	8,23 ± 0,21
		10	7,90 ± 0,59
		30	7,80 ± 0,23
10 <sup>9</sup>	4	3	8,87 ± 0,19
		10	8,82 ± 0,23
		30	8,77 ± 0,26
	-20	3	9,52 ± 0,41
		10	9,51 ± 0,48
		30	9,02 ± 0,22

Essa manutenção da concentração de bacteriófagos no alimento após aplicação e armazenamento também foi observada em trabalhos com outros micro-organismos. Atterbury et al (2003) observaram estabilidade da concentração de bacteriófagos de *Campylobacter jejuni* inoculados em pele de frango ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 e -20 °C. Guenther et al (2009) observaram elevada estabilidade dos bacteriófagos de *Listeria monocytogenes* utilizados para descontaminar diversos produtos prontos para o consumo, na maioria dos produtos ocorreu redução de 0,6 Log PFU.g<sup>-1</sup> ou mL após 6 dias de estocagem a 6 °C. Porém estes autores observaram redução de até 2 Log PFU.g<sup>-1</sup>, quando os bacteriófagos foram aplicados em produtos vegetais armazenados a 20 °C por 6 dias, e atribuíram esses resultados a imobilização dos bacteriófagos pela matriz do alimento.

A inexistência de variação na redução da contagem de *Salmonella* nos fragmentos de pele de frango e na concentração de bacteriófagos em função do tempo de armazenamento encontrada no presente estudo e em trabalhos com outros micro-organismo na literatura pode ser explicada, pois em baixas temperaturas, os bacteriófagos se ligam à célula hospedeira, injetam seu material genético, mas não conseguem se replicar até as condições ficarem favoráveis ao desenvolvimento do micro-organismo (ATTERBURY et al, 2003). Essa explicação foi reforçada por Goode, Allen e Barrow (2003) que demonstraram, por meio de testes com *E. coli* k12 e bacteriófago P<sub>1</sub>, que a infecção do hospedeiro por bacteriófagos ocorre na pele de frango armazenada sob refrigeração e não na superfície do meio de cultivo no momento do plaqueamento.

Portanto, observou-se que a aplicação de bacteriófagos sobre a superfície de peles de frango contaminadas com *Salmonella* e armazenadas sob refrigeração e congelamento reduziu a contagem do micro-organismo. Além disso, os bacteriófagos permaneceram estáveis e viáveis ao longo do período de armazenamento.

## 5. CONCLUSÃO

Bacteriófagos líticos para *Salmonella* Enteritidis podem ser isolados de amostras de fezes de aves de criação extensiva, multiplicar no hospedeiro em condições laboratoriais e atingir altas concentrações pelas metodologias utilizadas. Os cinco bacteriófagos selecionados para utilização em biocontrole apresentaram atividade contra outras estirpes de *Salmonella*, porém dois desses bacteriófagos foram inespecíficos e lisaram *Escherichia coli* e *Cronobacter muytjensii*. Essa grande variedade de hospedeiros, inclusive diferentes gêneros de micro-organismos pode ser uma vantagem na utilização de bacteriófagos em terapia e controle de patógenos em alimentos devido ao amplo espectro de ação. Porém, a inespecificidade em relação ao gênero torna-se uma desvantagem na utilização de bacteriófagos no desenvolvimento de métodos de identificação de micro-organismos em amostras de alimentos.

O tratamento com mistura de cinco bacteriófagos, utilizado na redução de *Salmonella* Enteritidis em pele de frango, apresentou atividade equivalente a outros métodos de descontaminação pesquisados e comumente utilizados na indústria de aves, portanto, pode ser uma tecnologia complementar para controle deste micro-organismo patogênico na indústria de aves.

A aplicação da mistura de bacteriófagos reduziu a contagem de *Salmonella* em pele de frango armazenadas sob refrigeração e congelamento, e a concentração de bacteriófagos na pele de frango permaneceu constante durante o período de armazenamento.

Estes fatores demonstraram o potencial de utilização dos bacteriófagos em alimentos refrigerados e congelados como uma ferramenta de biopreservação, a fim de reduzir a contaminação por micro-organismos e aumentar a vida de prateleira dos produtos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF – Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango. **Produção mundial de carne de frango**. Disponível em: [www.abef.com.br](http://www.abef.com.br). Acesso em: 06 jun 2009.

ADAMS, M.H. **Bacteriophages**. New York: Interscience, 1959, p. 450-451.

ANANG, D.M.; RUSUL, G.; BAKAR, J.; LING, F.H. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C. **Food Control**, v. 18, p. 961–969, 2007.

ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 1ed. São Paulo: Editora Varela, 2008. v. 1. 410 p.

ANDRADE, N.J.; MARTYN, M.E.L. **Higiene industrial (Análises físico-químicas de água, detergentes e sanitizantes)**. Viçosa: Editora UFV, 1992. 41p.

ANTUNES, P.; REU, C.; SOUZA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 97-103, 2003.

ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, P.L.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 6302–6306, 2003.

ATTERBURY, R.J.; DILLON, E.; SWIFT, C.; CONNERTON, P.L.; FROST, J.A.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4885–4887, 2005.

BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEDI, M.; AKAKPO, A.J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 510-515, 2006.

BARROW, P.A. The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animal models of human infection. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 677–682, 2001.

BAUERMEISTER, L.J.; BOWERS, J.W.J.; TOWNSEND, J.C.; MCKEE, S.R. The microbial and quality properties of poultry carcasses treated with peracetic

- acid as an antimicrobial treatment. **Poultry Science**, v. 87, p. 2390–2398, 2008a.
- BAUERMEISTER, L.J.; BOWERS, J.W.; TOWNSEND, J.C.; MCKEE, S.R. Validating the efficacy of peracetic acid mixture as an antimicrobial in poultry chillers. **Journal Food Protection**, v. 71, n. 6, p. 1119-1122, 2008b.
- BERCHIERI JUNIOR, A. Salmoneloses aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p. 185-195, 2000.
- BERGEY, D.H. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 1<sup>a</sup> ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984, 964 p., v. 1.
- BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A.; MUSGROVE, M.T. Effects of hot water application after defeathering on the levels of *Campylobacter*, coliform bacteria, and *Escherichia coli* on broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 79, n. 11, p. 1689–1693, 2000.
- BIELKE, L.; HIGGINS, S.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE, D.; HARGIS, B.M. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. **Poultry Science**, v. 86, p. 2536–2540, 2007a.
- BIELKE, L.R.; HIGGINS, S.E.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 10, p. 754-757, 2007b.
- BIGWOOD, T.; HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.V.; HEINEMANN, J.A. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. **Food Microbiology**, v. 25, p. 400–406, 2008.
- BOLDER, N.M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 221–227, 1997.
- BOLDER, N.M.; PUTIRULAN, F.F.; LIPMAN, L.J.A. Chemical carcass decontamination to control *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry meat. In: **XII European Poultry Conference**, 2006. Verona, Italy.
- BONI, H.F.K. **Ocorrência de *Salmonella* spp. na cadeia avícola da região central de Mato Grosso do sul**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Mato grosso do Sul, 2007. 42p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 nov., 1998. Seção 1. p. 226.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 2 de 08 de janeiro de 2004. Aprova o uso do ácido peracético como coadjuvante de tecnologia na função de agente de controle de micro-organismos na lavagem de ovos, carcaças e ou partes de animais de açougue, peixes e crustáceos e hortifrutícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan., 2004. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 7, de 02 de janeiro de 2001. Aprova a extensão de uso ácido láctico (INS 270) como coadjuvante de tecnologia, na função de agente de controle de microorganismos na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de abate açougue na em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 jan., 2001. Seção 1.

BREITBART, M.; HEWSON, I.; FELTS, B.; MAHAVY, J.M; NULTON, J.; SALAMON, P.; ROHWER, F.E. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 6220–6223, 2003.

BRUTTIN, A.; BRUSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2874–2878, 2005.

CALLAWAY, T.R. Use of naturally-occurring bacteriophage to reduce *Salmonella* in swine prior to harvest. **Research report**, 2007. Disponível em <<http://www.pork.org>>. Acesso em 10 dez 2009.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C.; MORENO, B. Review: Trisodium phosphate (TSP) treatment for decontamination of poultry. **Food Science Technology International**, v. 8, p. 11-24, 2002.

CAREY-SMITH, G.V.; BILLINGTON, C.; CORNELIUS, A.J.; HUDSON, J.A.; HEINEMANN, J.A. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp.. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, p. 182–186, 2006.

CARLTON, R.M.; NOORDMAN, W.H.; BISWAS, B.; DE MEESTER, E.D.; LOESSNER, M.J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301–312, 2005.

CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R. J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P. L.; DILLON, E.; SCOTT A., CONNERTON, I. F. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6554–6563, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiça e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1-5, 2005.

CDC - Center for Diseases Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 States, United States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, n. 14, p. 361-392, 2008.

CHIU, T.H.; CHEN, T.R.; HWANG, W.Z.; TSEN, H.Y Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 259-265, 2005.

CORRY, J.E.; JAMES, C.; JAMES, S.J.; HINTON, M. *Salmonella*, *Campylobacter* and *Escherichia coli* O157:H7 decontamination techniques for

- the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 187–196, 1995.
- COSTA, F.N.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; TAVECHIO, A.T. Sorovares de *Salmonella* isoladas de carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio em Jaboticabal, estado de São Paulo, em 1996. **Revista de Ciência Veterinária**, v. 4, p. 97-100, 1997.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BERRANG, M.E. Chemical treatment of *Salmonella*-contaminated fertile hatching eggs using an automated egg spray sanitizing machine. **Journal Applied Poultry Research**, v. 3, p. 26-30, 1994.
- D'AOUST, J.Y. ***Salmonella species***. Hardcover, New Jersey. 2001.
- DOMINGUEZ, C.; GOMEZ, I.; ZUMALACARREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 165-168, 2002.
- DYKES, G.A.; MOORHEAD, S.M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 71–81, 2002.
- EFSA - European Food Safety Authority. **The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007**. The EFSA Journal, 2009. Disponível em: <[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale1178620753812\\_1211902269834.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1211902269834.htm)>. Acesso em: 20 abr. 2009.
- ELLEBRACHT, J.W.; KING, D.A.; CASTILLO, A.; LUCIA, L.M.; ACUFF, G.R.; HARRIS, K.B. Evaluation of peroxyacetic acid as a potential pre-grinding treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef trimmings. **Meat Science**, v. 70, p. 197–203, 2005.
- EVEREST, P.; WAIN, J.; ROBERTS, M.; ROOK, G.; DOUGAN, G. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 316-320, 2001.
- FABRIZIO, K.A.; SHARMA, R.R.; DEMIRCI, A.; CUTTER, C.N. Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. **Poultry Science**, v. 81, p. 1598–1605, 2002.
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 189–204, 1998.
- FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; MELO, L.C.V. *Salmonella* sorovars isolated from humans in São Paulo State, Brasil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 179-184, 2006.
- FIGUEROA-BOSSI, N.; UZZAU, S.; MALORIOL, D.; BOSSI, L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 260–271, 2001.
- FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W.JR. use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 4, p. 255 - 260, 2005.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W.JR; BARROS, S. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of Salmonellae lytic bacteriophages isolated from free-range layers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 2, p. 121 - 128, 2004.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRENZEN, P.D. *Salmonella* cost estimate update using FoodNet data. **Food Safety**, v. 22, n. 2, p. 10-15, 1999.

FROST, J.A.; KRAMER, J.M.; GILLANDERS, S.A. Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. **Epidemiology and Infection**, v. 123, p. 47–55, 1999.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1749-1753, 2000.

GAMA, N.M.S.Q. **Salmonella spp em aves de postura comercial**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp-Jaboticabal, São Paulo, 2001.

GARCÍA, P.; MADERA, C.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1232–1239, 2007.

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

GAUTIER, M.; ROUAULT, A.; SOMMER, P.; BRIANDET, R. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2572–2576, 1995.

GEORGSSON, F.; ORKELSSON, A. E.; GEIRDSO´TTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N.J. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food Microbiology**, v. 23, p. 677–683, 2006.

GOODE, D.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5032–5036, 2003.

GRAWJEWSKI, B.A.; KUSEK, J.W.; GELFAND, H.M. Development of a bacteriophage typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Epidemiology and Infection**, v. 104, p. 403–414, 1985.

GREER, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1102–1111, 2005.

GREER, G.G. Psychrotrophic *Brochothrix thermosphacta* bacteriophages isolated from beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 245–251, 1983.

GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G. **Modern bacteriophage biology and biotechnology**. Kerala: Research Signpost (in press), 2006. 36p.

GRIMONT, H.F.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* sorovars**, 9 ed. Institut Pasteur. 2007.

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

HIGGINS, J.P.; ANDREATTI FILHO, R.L.; HIGGINS, S.E.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Evaluation of *Salmonella*-lytic properties of bacteriophages isolated from commercial broiler houses. **Avian Diseases**, v. 52, p. 139–142, 2008.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GUENTHER, K.L.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 84, p. 1141–1145, 2005.

HUFFMAN, R.D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**, v. 62, n.3, p. 285–294, 2002.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, s. 1, p. S139–S150, 1998.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43–52, 2008.

HWANG, C.A.; BEUCHAT, L.R. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage micro-organisms on chicken skin. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 19–23, 1995.

JAMES, C.; JAMES, S. J.; HANNAY, N.; PURNELL, G.; BARBEDO-PINTO, C.; YAMAN, H.; ARAUJO, M.; GONZALEZ, M.L.; CALVO, J.; HOWELLD, M.; CORRY, J.E.L. Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 195–203, 2007.

KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M. Sorovars of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens and commercail breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**, São Paulo, v. 7, p. 195-198, 2005.

KAUFFMANN, F. **The bacteriology of *Enterobacteriaceae***. Munksgaard-Copenhagen: Scandinavian University Books, 1966. 400p.

KEMP, G.K.; ALDRICH, M.L.; WALDROUP, A.L. Acidified sodium chlorite antimicrobial treatment of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p.1087–1092, 2000.

- KIM, K.P.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.J. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 195–203, 2007.
- KING, D.A.; LUCIA, L.M.; CASTILLO, A.; ACUFF, G.R.; HARRIS, K.B.; SAVELL J.W. Evaluation of peroxyacetic acid as a post-chilling intervention for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef carcass surfaces. **Meat Science**, v. 69, p. 401–407, 2005.
- KOUTSOUMANIS, K.P.; GEORNARAS, I.; SOFOS, J.N. Microbiology of land animals. In: HUI, Y.H. (Ed.). **Handbook of Food Science Technology and Engineering**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, p. 521–524, 2006.
- KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. United States of America: CRC Press, 2005. 510p.
- LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.J.; FUCHS, Y.; CAMP, M.J.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1116–1121, 2001.
- LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; CAMP, M.J.; JANISIEWICZ, W.J.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4519–4526, 2003.
- LI, Y.; SLAVIK, M.F.; WALKER, J.T.; XIONG H. Pre-chill spray of chicken carcasses to reduce *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 605-607, 1997.
- LI, Y.; YANG, H.; SWEM, B.L. Effect of high-temperature inside– outside spray on survival of *Campylobacter jejuni* attached to prechill chicken carcasses. **Poultry Science**, v. 81, n. 9, p. 1371–1377, 2002.
- LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey, **Food Control**, 2009. doi:10.1016/j.foodcont.2009.11.007.
- MACHADO, R.A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M.F.F. Occurrence of *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 239-244, 1994.
- MATHEUS, D.P.; RUDGE, A.C.; GOMES, S.M.M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Revista de Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 111-115, 2003.
- MCLAUGHLIN, M.R.; BALAA, M.F.; SIMS, J.; KING, R. isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 522-528, 2006.
- MESQUITA, A.J.; CARVALHO, R.N.; REZENDE, C.S.M.; COUTO, M.V.; MESQUITA, A.Q.; BUENO, V.F.F. Isolamento de *Salmonella* spp. em carcaças de frango resfriadas de abatedouros de aves do Estado de Goiás, Brasil. XIV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. **Anais**. Goiânia. 2005. P.251.

MESQUITA, A.J.; LAGE, M.E.; OLIVEIRA, G.R.; PRADO, C.S. Atividade antimicrobiana e quantificação de cloridrato de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) em tecidos musculares e vísceras de frangos. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 57, n. 1, p. 65-78, 1997.

MORENO, B. **Higiene e inspección de carnes** – I. Espanha: Ediciones Díaz de Santos S.A., 2006. 624p.

MORITA, T.; ASSUNPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes & solventes: padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 630p.

NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; FITTÉL, A.P.; KELLERMANN, A.; STRECK, A.F.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R. Prevalência de *Salmonella* sp. Em produtos de origem avícola no período de Maio de 1995 a Abril de 1996. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, Brasil: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

NEWELL, D.G.; FEARNLEY, C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4343–4351, 2003.

NORTHCUTT, J.; SMITH, D.; INGRAM, K.D.; HINTON, A.; MUSGROVE, M. Recovery of bacteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions. **Poultry Science**, v. 86, p. 2239–2244, 2007.

O'FLYNN, G.; COFFEY, A.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P. The newly isolated lytic bacteriophages *st104a* and *st104b* are highly virulent against *Salmonella enterica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 251–259, 2006.

O'FLYNN, G.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3417–3421, 2004.

OJEU. Decisão do conselho de 18 de dezembro de 2008 que rejeita a proposta da Comissão relativa ao regulamento do Conselho que dá execução ao Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito à utilização de substâncias antimicrobianas para eliminar a contaminação da superfície das carcaças de aves de capoeira. **Official Journal of the European Union**, L 42, p. 13–15, 2009.

OLASUPO, N.A.; FITZGERALD, D.J.; GASSON, M.J.; NARBAD, A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 448–451, 2003.

OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA, R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *Escherichia coli* strains, **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1919–1927, 2009.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 655-661, 2000.

OLSEN, J.E.; BROWN, D.J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 826-835, 2003.

OYARZABAL, O.A. Review: reduction of *Campylobacter* spp. by commercial antimicrobials applied during the processing of broiler chickens: a review from the United States perspective. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1752–1760, 2005.

ÖZDEMI, H.; PAMUK, S. Acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and populations of *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on chicken-breast skin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, p. 110–117, 2006.

PARK, H.; HUNG, Y.C.; BRACKETT, R.E. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 77–83, 2002.

PAYMENT, P.; RILEY, M.S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call to action. **American Academy of Microbiology**. Washington, DC, 2002. Disponível em: <<http://www.asm.org>>. Acesso em: 06 jun 2009.

PREBAF – Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da resistência bacteriana em frango – Relatório do monitoramento e da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* e *Salmonella* isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2008. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 10 jan 2010.

QUINN, P.J. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolf Publishing, England. 1994.

RICKE, S.C.; KUNDINGER, M.M.; MILLER, D.R.; KEETON, J.T. Alternatives to antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and foodborne pathogen response. **Poultry Science**, v. 84, p. 667–675, 2005.

ROCHA, P.T.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; LOULY, P.R.; NASCIMENTO, M.N. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 672-676, 2003.

RUSSEL, S.M.; AXTELL, S.P. Monochloramine versus sodium hypochlorite as antimicrobial agents for reducing populations of bacteria on broiler chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 758–763, 2005.

SANO, G.; TAKADA, Y.; GOTO, S.; MARUYAMA, K.; SHINDO, Y.; OKA, K.; MATSUI, H.; MATSUO, K. Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8224-8232, 2007.

SANTOS, F.B.O.; D'SOUZA, D.H.; JAYKUS, L.; FERKET, P.R.; SHELDON, B.W. Genotypes, serotypes, and antibiotic resistance profiles of *Salmonella*

isolated from commercial north Carolina turkey farms. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1328-1333, 2007.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; FLORES, M.L. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, Brasil, v. 16, p. 93-99, 2002.

SANTOS, S.M.S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 39-42, 2000.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and u(vi)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-ph, nitrate- and u(vi)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2959–2965, 2004.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 5–14, 2006.

SOFOS, J.N.; SMITH, G.C. Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 171–188, 1998.

STOPFORTH, J.D.; O'CONNOR, R.; LOPES, M.; KOTTAPALLI, B.; HILL, W. E.; SAMADROUP, M. Validation of individual and multiple-sequential interventions for reduction of microbial populations during processing of poultry carcasses and parts. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1393–1401, 2007.

SULAKVELIDZE, A.; BARROW, P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages: **Biology and Applications**. Boca Raton : CRC Press, 2005. pp. 335–380.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em :<[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id\\_area=962](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=962)>. Acesso em: 06 jun. 2009.

SWANSTROM, M.; ADAMS, M. Ágar layer method for production of high titer phage stocks. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 78, p. 372-375, 1951.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4 ed. Atheneu: São Paulo, 2005. 717 p.

UBA – União Brasileira de Avicultura. **Produção e Exportação de carne de frango em 2008**. Disponível em: <http://www.uba.org.br>. Acesso: 06 jun 2009.

USDA - U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **The use of chlorine dioxide as an antimicrobial agent in poultry processing in the United States**. USDA-FSIS, Office of International Affairs, 2002a. Disponível em <<http://www.fsis.usda.gov>>. Acesso em 10 dez. 2009.

USDA - U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **The use of acidified sodium chlorite as an antimicrobial agent in poultry processing in the United States.** USDA-FSIS, Office of International Affairs, 2002b. Disponível em <<http://www.fsis.usda.gov>>. Acesso em 10 dez. 2009.

USDA - U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **The use of peroxyacids as an antimicrobial agent in poultry processing in the United States.** USDA-FSIS, Office of International Affairs, 2002c. Disponível em <<http://www.fsis.usda.gov>>. Acesso em 10 dez. 2009.

USDA - U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **The use of trisodium phosphate as an antimicrobial agent in poultry processing in the United States.** USDA-FSIS, Office of International Affairs, 2002d. Disponível em <<http://www.fsis.usda.gov>>. Acesso em 10 dez. 2009.

USDA – United States Research Service. **Salmonellosis.** Disponível em: <[http://www.ers.usda.gov/data/foodborneneillness/salm\\_intro.asp](http://www.ers.usda.gov/data/foodborneneillness/salm_intro.asp)>. Acesso em 06 jun 2009.

VASCONCELLOS, A.M.M.; NASCIMENTO, K.F.; DUARTE, D.A.M.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R. Incidência de *Salmonella* sp. em carcaças resfriadas de frango produzidas no Estado de Pernambuco. XIV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. **Anais.** Goiânia. 2005. P.270.

WEINBAUER, M.G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 127-181, 2004.

WEINBERGER, M.; KELLER, N. Recent trends in the epidemiology of non-typhoid *Salmonella* and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 513-521, 2005.

WHICHARD, J.M.; SRIRANGANATHAN, N.; PIERSON, F.W. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and largeplaque variants of bacteriophage *Felix O1* in liquid culture and on chicken frankfurters. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 220–225, 2003.

WHYTE, P.; COLLINS, J.D.; MCGILL, K.; MONAHAN, C.; O' MAHONY, H. Quantitative investigation of the effects of chemical decontamination procedures on the microbiological status of broiler carcasses during processing. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 179–183, 2001.

WILKINSON, M.H.F. Predation and the presence of decoys: an inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or Bdellovibrios in dense and diverse ecosystems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 208, p. 27–36, 2001.

XIONG, H.; LI, Y.; SLAVIK, M.F.; WALKER, J.T. Spraying chicken skin with selected chemicals to reduce attached *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 272–275, 1998.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J.W.; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

YANG, Z.; LI, Y.; SLAVIK, M.F. Use of antimicrobial spray applied with an inside–outside birdwasher to reduce bacterial contamination on prechilled chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 829–832, 1998.

ZAIDI, M.B.; MCDERMOTH, P.F.; CRAY-FERDOGA, P.; LEON, V.; CANCHE, C.; HUBERT, S.K.; ABBOTT, J.; LEON, M.; ZHAO, S.; HEADRICK, M.; TOLLEFSON, L. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases asymptomatic children and raw retail meats in Yucatan, Mexico. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, p. 21-28, 2006.

ZHAO, T.; EZEIKE, G.O.I.; DOYLE, M.P.; HUNG, Y.C.; HOWELL, R.S. Reduction of *Campylobacter jejuni* on poultry by low-temperature treatment. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 652–655, 2003.

ZHOU, D.; CHEN, L.M.; HERNANDEZ, L.; SHEARS, S.B.; GALÁN, J.E. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 248-259, 2001.

ZINK, R.; LOESSNER, M.J. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 296–302, 1992.

## ANEXO I

### Reagentes e Equipamentos

Foram utilizados neste experimento os seguintes reagentes e equipamentos:

- Acetato de amônio  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Acetato de uranila (Sigma Aldrich, Alemanha).
- Ácido láctico (Chr. Hansen, Brasil).
- Ágar Infuso de Cérebro e Coração - BHI (Merck, Alemanha).
- Ágar padrão para Contagem - PCA (Difco, Sparks, EUA).
- Ágar Salmonella-Shigella - SS (Merck, Alemanha).
- Ágar XLT4 (Difco, Sparks, EUA).
- Ágar-ágar marca (Himedia, Índia).
- Agitador (Bio Braun Biotech International)
- Água peptonada (Difco, Sparks, EUA).
- Aparelho de irradiação gama (Nordion, IR214, GB 127).
- Banho-maria (Fanem).
- Caldo Infuso de Cérebro e Coração - BHI (Mbiolog, Belo Horizonte, Brasil).
- Centrífuga (Sigma, 3K30, rotor 12111H)
- Cloreto de cálcio  $\text{CaCl}_2$  (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Cloreto de sódio -  $\text{NaCl}$  (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Clorofórmio (Impex, São Paulo, Brasil).
- Espectrofotômetro (Biospectro, SP-22).
- Estufa de cultura (Fanem, 002 CB).
- Estufa tipo B.O.D (Fanem, 347 CD).
- Fosfato de sódio dibásico (Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil).
- Fosfato monobásico de potássio (Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil).
- Gelatina bacteriológica (Difco, Sparks, EUA).
- Glicerol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Membrana de acetato de celulose (Sartorius Biolab Products, Alemanha).

- Microscópio eletrônico de Transmissão (Zeiss, EM109).
- Sanitizante a base de ácido peracético - NIPPO-LAT 2000 (Nippon Chemical, São Paulo, Brasil).
- Sanitizante a base de cloridrato de polihexametileno biguanida - NIPPO-LAT IB (Nippon Chemical, São Paulo, Brasil).
- Sanitizante a base de dicloroisocianurato de sódio - NIPPO-CLOR (Nippon Chemical, São Paulo, Brasil).
- Sulfato de magnésio  $MgSO_4$  (Chemco, Campinas, Brasil).
- Tela de microscopia eletrônica de cobre de 200 mesh e diâmetro de 3mm coberta com formvar-carbono (Koch Electron Microscopy, Brasil).
- Tiosulfato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Tris HCl (Sigma Aldrich, Alemanha).
- Tween 80 (Cinética, São Paulo, Brasil).