

DELAINÉ MEIRELES GOUVÊA BOGGIONE

**IMOBILIZAÇÃO DO BACTERÍÓFAGO UFV-AREG1 PARA APLICAÇÃO
COMO SANITIZANTE, CURATIVO ADESIVO E NANOBIOSENSOR PARA
BIOCONTROLE DE *E. coli* O157:H7**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

B674i
2018 Boggione, Delaine Meireles Gouvêa, 1983-
Imobilização do bacteriófago UFV-AREG1 para aplicação
como sanitizante, curativo adesivo e nanobiosensor para
biocontrole de *E. coli* O157:H7 / Delaine Meireles Gouvêa
Boggione. – Viçosa, MG, 2018.
xv, 85 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.41-52.

1. Bacteriófagos. 2. *Escherichia coli* - Controle biológico.
3. Nanotecnologia. 4. Alimentos - Contaminação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 579.342

DELAINE MEIRELES GOUVÊA BOGGIONE

IMOBILIZAÇÃO DO BACTERIÓFAGO UFV-AREGI PARA APLICAÇÃO
COMO SANITIZANTE, CURATIVO ADESIVO E NANOBIOSENSOR PARA
BIOCONTROLE DE *E. coli* O157:H7

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

APROVADA: 29 de outubro de 2018.



Édilus de Carvalho Castro Penido



Alvaro Vianna Novaes de Carvalho
Teixeira
(Coorientador)



Monique Renon Eller



Nélis José de Andrade



Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

*À minha família,
amigos sinceros,
ao meu companheiro
pelo infinito apoio, amor,
carinho e compreensão e ao
meu filho que me fortalece a cada dia.*

DEDICO

*“A principal meta da educação é criar homens que
sejam capazes de fazer coisas novas,
não simplesmente repetir o que outras gerações já fizeram.
Homens que sejam criadores, inventores, descobridores.
A segunda meta da educação é formar mentes
que estejam em condições de criticar,
verificar e não aceitar tudo que a elas se propõe”.*

Jean Piaget

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar a oportunidade da vida e proporcionar meu crescimento espiritual através dos constantes aprendizados. À minha família, principalmente na figura de minha mãe, que se dedicou intensamente para que eu chegasse até aqui. Ao meu companheiro Igor pelo imenso apoio nas horas mais difíceis fazendo-se presente e tornando a caminhada mais tranquila. E ao meu filho Francisco que se fez presente em nossas vidas nessa caminhada e tem sido para nós uma grande alegria e constantes aprendizados.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de crescimento intelectual nas áreas do curso e pela possibilidade de convívio com outras pessoas que foram essenciais para que isso acontecesse.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À Professora Regina Célia Santos Mendonça pela confiança, amizade e orientação nos momentos precisos e pela oportunidade de crescimento neste curso.

À Universidade Federal de São João del Rei – campus Alto Paraopeba pelo espaço cedido para realização de experimentos.

Aos professores Alvaro Vianna Teixeira de Carvalho pelas sugestões, orientação e participação na banca e Igor José Boggione Santos pela orientação e sugestões no trabalho.

Aos alunos Lucas Campana e Carolina Reciarde que contribuíram nos experimentos finais e se esforçaram para que os resultados fossem satisfatórios.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa por proporcionar a visualização microscópica das microcápsulas. E ao Departamento de Física, particularmente ao Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos, da Universidade Federal de Viçosa pelo uso do espaço.

Aos amigos do LAMPOAH (Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica) que direta ou indiretamente estiveram presentes em minha vida pessoal e acadêmica. Não citarei nomes, mas saibam que estão todos no meu coração

desde meu início no laboratório até o término de mais um ciclo. A todos que passaram pelo laboratório o meu muito obrigado pela amizade e constantes aprendizados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos conhecimentos e atenção dadas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este momento chegasse,

Meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução geral	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Micro-organismos patogênicos – problemas na cadeia alimentar e saúde.....	2
2.2. Bacteriófagos	4
2.2.1. O uso de biomateriais em terapia	6
2.2.2. Fagos em nanosensores	8
2.3. Encapsulamento de fagos.....	9
2.3.1. Microfluídica.....	9
2.3.2. Nanotecnologia e CNTs.....	10
Referências Bibliográficas	13
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. Capítulo I	22
Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices.....	22
Abstract	22
1. Introduction	22
2. Materials and methods	25
2.1. Microorganism	25
2.2. Determination of the diameter of viral particles	25
2.3. Microfluidic device	25
2.4. Production of calcium alginate microcapsules	26
2.5. Retention efficiency (RE) for the Ca-alginate matrix and stability of microcapsules in propylene glycol gel	27
2.6. Characterization of microcapsules containing bacteriophages by confocal microscopy ..	28
2.7. Application of Ca-alginate microcapsules in a propyleneglycol gel and antimicrobial evaluation	28
2.8. Statistical analysis	29
3. Results and discussion.....	30

3.1. Dynamic light scattering (DLS)	30
3.2. Microfluidic device and production of alginate-Ca microcapsules.....	30
3.3. Retention Efficiency (RE).....	33
3.4. Confocal microscopy.....	35
3.5. Stability of microcapsules in the propylene glycol gel and antimicrobial activity	36
4. Conclusion.....	38
References	38
5. Capítulo II	44
Imobilização do bacteriófago UFV-AREG1 em nanotubos de carbono de paredes múltiplas e sua aplicação como nanobiosensor	44
Resumo.....	44
1. Introdução.....	44
2. Materiais e Métodos	46
2.1. Material e micro-organismos	46
2.2. Potencial zeta	46
2.3. Interação fago-CNT.....	47
2.3.1. Delineamento experimental.....	47
2.3.2. Avaliação da viabilidade dos fagos após interação com CNT	48
2.3.3. Análise estatística.....	48
2.4. Análise da estabilidade.....	48
2.5. Efeito antimicrobiano do fago-CNT	48
2.6. Caracterização do fago-CNT por Microscopia Eletrônica de Varredura	49
2.7. Montagem do nanosensor	49
3. Resultados e discussão	52
3.1. Potencial Zeta.....	52
3.2. Delineamento experimental.....	52
3.3. Teste de estabilidade dos bacteriófagos em CNT	54
3.4. Efeito antimicrobiano do fago-CNT sobre <i>E. Coli</i> O157:H7.....	55
3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	56
3.6. Aplicação dos fagos do sensor para detecção de <i>E. coli</i> O157:H7	58
4. Conclusão.....	60
Agradecimentos.....	60
Referências bibliográficas	60
6. Capítulo III	66
Hidrogéis de Polivinil-Álcool (PVA) contendo o bacteriófago UFVAREG1 para aplicação como curativo adesivo para a indústria de alimentos	66

Resumo.....	66
1. Introdução	66
2. Materiais e Métodos	68
2.1. Micro-organismos e materiais utilizados	68
2.2. Preparo do hidrogel de PVA e incorporação do bacteriófago	68
2.3. Avaliação do perfil de intumescimento do hidrogel em solução de fluido corporal simulado	69
2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana do fago pelo método de disco-difusão e em meio líquido	70
2.5. Análise por Espectroscopia de Infravermelho.....	70
2.6. Análises térmicas (DCS e TGA)	71
2.7. Análise estatística.....	71
3. Resultados e discussão	71
3.1. Aspectos visuais dos hidrogéis de PVA.....	71
3.2. Perfil de Intumescimento	72
3.3. Infravermelho	73
3.4. Atividade antimicrobiana	75
3.5. DSC e TGA.....	77
4. Conclusão.....	78
Agradecimentos.....	79
Referências bibliográficas	79
7. Conclusão geral	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figure 1 - Microfluidic device and Alginate-Ca microcapsule production.

Figure 2 - Electron micrograph of phage UFV-AREG1.

Figure 3 - Microfluidic device and production of microcapsules with a flow rate of ($50 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ - $200 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) and ($1000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ - $1500 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) for the dispersed and continuous phase, respectively. (A) device; (B) and (E) droplet formation in the constriction; (C) and (F) formed droplets alginate-Na with phage before contact with the CaCl_2 solution; and (D) and (G) alginate-Ca microcapsules containing the phage after contact with the CaCl_2 solution.

Figure 4 - Size distribution for the alginate microcapsules of figure 3G.

Figure 5 - Scanning confocal microscopy of the alginate-Ca microcapsules containing the bacteriophages labeled by fluorescence. 200X magnification and fluorescence at a 488 nm excitation.

CAPÍTULO II

Figura 1 – Diagrama em blocos do sistema de medição da resistência elétrica da solução.

Figura 2 - Circuito eletrônico do sensor

Figura 3 – Arduíno MEGA.

Figura 4 - Superfície de resposta 3D: (A) a influência da temperatura e do tempo de agitação quando a massa de CNT é fixada igual a 0,025 g, (B) a influência da temperatura e da massa de CNT quando o tempo de agitação é fixado igual a 2 min, (C) a influência da massa de CNT e do tempo de agitação quando a temperatura é fixada igual a 32,5 °C.

Figura 5 – halo de inibição formado pelo fago-CNT em meio contendo *E. coli* O157:H7, onde F.CNT – halo formado pelo fago-CNT; F – halo formado pela microgota do fago livre; e CNT – halo contendo apenas nanotubo de carbono.

Figura 6 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do fago-CNT. A – Aumento de 400X; B – Aumento de 1600X; C – Aumento de 1600X com elemento P destacado em amarelo; D – Aumento de 1600X com elemento N destacado em rosa; e E – Aumento de 1600X destacando os dois elementos N e P juntos.

Figura 7 – gráfico da tensão versus tempo da amostra contendo fago-CNT mais a bactéria *E. coli* O157:H7; fago-CNT mais a bactéria *P. aeruginosa* e fago-CNT sem a presença da bactéria.

CAPÍTULO III

Figura 1 – Hidrogel de PVA. (A) PVA controle e (B) PVA-fago.

Figura 2 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o PVA-controle.

Figura 3 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o PVA-fago.

Figura 4 – Modelo de reticulação química com glutaraldeído. A – PVA (onde R = H ou COCH₃); B – Glutaraldeído; e C – Hidrogel de PVA reticulado.

Figura 5 – Halo de inibição formado pelo hidrogel de PVA. C: PVA-controle e F: PVA-fago.

Figura 6 – Curva de crescimento de *E. coli* O157:H7 expressa em função da densidade ótica (DO) por tempo na temperatura de 37 °C, em fluido corporal simulado (SBF).

Figura 7 – Curvas de DSC dos hidrogéis de PVA-controle e PVA-fago.

Figura 8 – Curvas de TGA para os hidrogéis de PVA-controle e PVA-fago

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 - Stability of the control alginate-Na before injecting into the microfluidic device added to the bacteriophage solution (A1) and of the alginate-Ca microcapsules containing the phages (A2) added to the propylene glycol gel during 21 days of storage at room temperature.

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Delineamento experimental Box-Behnken utilizado na avaliação da interação do bacteriófago UFV-AREG1 com o nanotubo em função dos fatores temperatura, tempo de agitação e massa de CNT.

Tabela 2 – Componentes do sensor.

Tabela 3: Quantificação dos fagos armazenados em CNT nos diferentes ensaios (log de PFU.mL⁻¹).

Tabela 4 – ANOVA gerada pelo software STATISTICA.

Tabela 5 - Teste de estabilidade do fago no nanotubo de carbono analisado por 21 dias.

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Reagentes usados na preparação de 1,0 L de solução de fluido corporal simulado (SBF).

RESUMO

BOGGIONE, Gouvêa Delaine Meireles, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2018. **Imobilização do Bacteriófago UFV-AREG1 para Aplicação como Sanitizante, Curativo Adesivo e Nanobiosensor para Biocontrole de *E. coli* O157:H7.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Igor José Boggione Santos.

O uso indiscriminado de antibióticos e o surgimento de micro-organismos resistentes têm despertado o interesse em metodologias alternativas para o controle de patógenos e deteriorantes em alimentos e em diversas áreas da indústria. A bactéria *Escherichia coli* O157:H7 é um importante patógeno que pode estar presente em alimentos, podendo causar graves infecções intestinais em pacientes. Uma alternativa tanto para detecção deste patógeno em alimentos quanto para o tratamento é o uso de bacteriófagos, vírus específicos que causam lise nas células do hospedeiro. Com este intuito o objetivo deste trabalho foi no Capítulo I incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 via microencapsulação por microfluídica em matriz de alginato-Ca e aplicá-lo em um gel antimicrobiano de propilenoglicol para uso na indústria de alimentos; Capítulo II incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) para aplicação como nanobiosensor; e Capítulo III incorporar o o bacteriófago UFV-AREG1 em hidrogéis de polivinil-álcool para posterior aplicação como curativo adesivo. Resultados do Capítulo I: A técnica de microfluídica se mostrou bastante eficaz na encapsulação do fago, produzindo em média gotas com 200 µm de tamanho e com uma eficiência de retenção de 82,1 % e estabilidade no gel de 21 dias armazenado em temperatura ambiente. Quando aplicado como antimicrobiano, o gel se mostrou eficiente na redução (2,92 logs) da contaminação bacteriana na superfície em comparação com outro agente antimicrobiano químico (álcool gel 70 %). Portanto, é possível microencapsular fagos em matrizes de alginato-Ca e aplicá-las em geis antimicrobianos para uso como sanitizantes na indústria de alimentos. Capítulo II: Para a incorporação do fago em nanotubos, foi obtida a combinação com melhor resposta de interação fago-CNT via delineamento experimental Box-Behnken, sendo que a melhor condição de incorporação foi de 0,01 g de CNT, temperatura de secagem de 32,5 °C e 2 min de agitação. Fago-CNT permaneceram estáveis durante 21 dias de armazenagem a 4 °C. Além disso, o Fago-CNT teve atividade antimicrobiana com uma área de inibição de $2.955 \pm 294 \text{ cm}^2$, quando adicionado em ágar Muller-Hinton com a bactéria e incubado a 37 °C/24 h. O fago-CNT também foi testado como um nanobiosensor para detecção da bactéria. Um sistema de medição da corrente elétrica foi montado e verificou-se que após aplicação da corrente

no sistema houve uma variação da tensão (1,79 V para 2,25 V) após 46 min de contato entre o fago-CNT e a bactéria (10^8 UFC.mL⁻¹), que é referente ao ciclo completo do fago e a consequente lise da célula bacteriana. Portanto, a técnica usada para estabilizar o bacteriófago UFV-AREG1 em MWCNT foi efetiva, bem como a sua aplicação como nanobiosensor na detecção de *E. coli* O157:H7. Capítulo III: O fago também foi incorporado em um hidrogel de PVA e submetido a testes de intumescimento, espectro no infravermelho com Transformada de Fourier, análises térmicas de DSC e TGA e efeito antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7. O intumescimento do filme de PVA-fago (38 %) foi maior ($p < 0,05$) que o PVA-controle (15 %), o que favorece uma maior liberação do fago no meio. O halo de inibição médio (formado pela área de inibição) do hidrogel contendo fago foi de 3,715 cm² contra 2,916 cm² do controle com desvio padrão de 128,7 cm². O halo de inibição do PVA-fago foi mais significativo que o PVA-controle ($p < 0,05$). Resultados esses que corroboram com a atividade antimicrobiana em meio líquido mostrando a curva de crescimento microbiano utilizando o leitor de microplacas. As análises do FTIR mostraram uma região de picos diferentes no PVA-fago não identificada na amostra de PVA-controle, podendo esta ser um indicativo da presença do fago no hidrogel. As análises térmicas (DSC e TGA) também não apresentaram diferenças entre os hidrogéis de PVA-controle e PVA-fago. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para que o hidrogel de PVA adicionado do bacteriófago UFV-AREG1 possa ser utilizado como curativo adesivo pela indústria de alimentos no controle do patógeno *E. coli* O157:H7. Em geral a incorporação do fago UFV-AREG1 em matrizes poliméricas, como o alginato-Na e álcool poli(vinílico) para liberação no meio e aplicação como biocontrole e terapia e sua adição em MWCNT para uso como nanobiosensor se mostrou satisfatória em todos os estudos realizados neste trabalho, demonstrando que o fago tem potencial para ser utilizado para esses fins.

ABSTRACT

BOGGIONE, Gouvêa Delaine Meireles, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2018. **Immobilization of Bacteriophage UFV-AREG1 for Application as Sanitizing, Adhesive Dressing and Nanobiosensor for Biocontrol of *E. coli* O157:H7**. Advisor: Regina Célia Santos Mendonça. Co-advisors: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Igor José Boggione Santos.

Indiscriminate use of antibiotics and the emergence of resistant microorganisms have aroused interest in alternative methodologies for the control of pathogens and spoilage in food and in various areas of industry. *Escherichia coli* O157:H7 is an important pathogen that can be present in food and can cause severe intestinal infections in patients. An alternative for both detection of this pathogen in food and for treatment is the use of bacteriophage, specific viruses that cause lysis in host cells. To this end, the objective of our work in Chapter I was to incorporate the UFV-AREG1 bacteriophage through microfluidic microencapsulation into the Ca-alginate matrix and to apply them in a propylene glycol antimicrobial gel for use in the food industry; Chapter II incorporate the UFV-AREG1 bacteriophage into carbon nanotubes of multiple walls (MWCNT) for application as nanobiosensor; and Chapter III incorporate the UFV-AREG1 bacteriophage into polyvinyl alcohol hydrogels for later application as an adhesive dressing. Chapter I results: The microfluidic technique proved to be quite effective in the encapsulation of the phage, producing on average 200 μm droplets and achieving a retention efficiency of 82.1% and gel stability of 21 days stored at room temperature. When applied as antimicrobial, the gel was efficient in reducing (2.92 logs) bacterial surface contamination compared to another chemical antimicrobial agent (70 % alcohol gel). Therefore, it is possible to microencapsulate phages in Ca-alginate matrices and apply them in antimicrobial gels for use as sanitizers in the food industry. Chapter II: For the incorporation of the phage into nanotubes, the combination with the best phage-CNT interaction response was obtained through the Box-Behnken experimental design, with the best incorporation condition being 0.01 g of CNT, drying temperature of 32.5 °C and 2 min stirring. Phage-CNT remained stable for 21 days of storage at 4 °C. In addition, the phage-CNT had antimicrobial activity with an inhibition area of $2.955 \pm 294 \text{ cm}^2$, when added in Muller-Hinton agar with the bacterium and incubated at 37 °C/24 h. The phage-CNT was also tested as a nanobiosensor for the detection of bacteria. An electric current measurement system was assembled, and it was verified that after application of the current in the system there was a variation of the voltage ((1.79 V to 2.25 V) after 46 min

of contact between the phage-CNT and the bacteria (10^8 CFU.mL⁻¹) which is referring to the complete cycle of the phage and the consequent lysis of the bacterial cell. Therefore, the technique used to stabilize the UFV-AREG1 bacteriophage in MWCNT was effective, as well as its application as nanobiosensor in the detection of *E. coli* O157:H7. Chapter III: Phage was also incorporated in the PVA hydrogel and subjected to swelling tests, infrared spectrum with Fourier Transform, DSC and TGA thermal analyzes and antimicrobial effect on *E. coli* O157:H7. The PVA-phage film swelling (38 %) was higher ($p < 0.05$) than the PVA-control (15 %), which favors a greater release of the phage in the medium. The mean inhibition halo (formed by the area of inhibition) of the phage containing hydrogel was 3.715 cm² versus 2.916 cm² of the control with standard deviation of 128.7 cm². The inhibition halo of PVA-phage was more significant than PVA-control ($p < 0.05$). These results corroborate the antimicrobial activity in liquid medium showing the microbial growth curve using the microplate reader. FTIR analyzes showed a region of different peaks in PVA-phage the unidentified in the PVA-control sample, which could be indicative of the presence of the phage in the hydrogel. Thermal analyzes (DSC and TGA) also showed no differences between PVA-control and PVA-phage hydrogels. Further studies should be conducted so that the PVA hydrogel added to the UFV-AREG1 bacteriophage can be used as an adhesive dressing by the food industry in controlling the *E. coli* O157:H7 pathogen. In general, the incorporation of UFV-AREG1 phage into polymer matrices such as Na-alginate and poly (vinyl alcohol) for release into the medium and application as biocontrol and therapy and its addition in MWCNT for use as nanobiosensor was satisfactory in all studies performed in this work, demonstrating that the phage has potential to be used for these purposes.

1. Introdução geral

As contaminações em alimentos causadas por bactérias são a causa de muitos problemas de saúde humana e animal, o que tem gerado grande prejuízo na produção de alimentos, incluindo carnes, ovos e lácteos. (Fao, 2013). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 2016 o consumo de carne bovina chegou a 58,74 milhões de toneladas e com uma estimativa de consumo de 63 milhões de toneladas para 2018 (Beefpoint, 2018). Esse alto consumo de alimentos de origem animal estimula o desenvolvimento de processos mais eficazes para reduzir ou eliminar micro-organismos patogênicos que são veiculados por esses alimentos.

Dentre os principais patógenos veiculados por esses alimentos destacam-se *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157: H7. *Salmonella* não-tifóide e *L. monocytogenes* que representaram cerca de 47 % do total de casos de morte por doenças transmitidas por alimentos no mundo (Scallan *et al.*, 2011). Em 2011, um surto causado por *Salmonella* em carne de peru foi reportado pelo New York Times. A cepa bacteriana era resistente a vários antibióticos (Neuman, 2011).

Na tentativa de combater esses casos são usados antimicrobianos cada vez mais potentes. Porém o uso indiscriminado desses medicamentos tem ocasionado o surgimento de micro-organismos resistentes. Assim, há um grande interesse em metodologias alternativas para o controle de patógenos e deteriorantes em alimentos e em diversas áreas da indústria (Kerry *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2012).

O uso de bacteriófagos é uma alternativa à resistência bacteriana a antibióticos. E com a implementação da terapia fágica e o biocontrole em larga escala, não haveria preocupação com resíduos gerados por antibióticos em alimentos (Tsonos *et al.*, 2014).

Muitas das aplicações de bacteriófagos para controle de micro-organismos têm sido por meio da administração oral, de soluções contendo fagos, cujo tipo depende da terapia utilizada; ou pulverização em superfície dos alimentos ou superfícies para descontaminação, e, em casos mais recentes, incorporados em embalagens de alimentos, denominadas embalagens ativas (Vonasek *et al.*, 2014; Gouvêa *et al.*, 2015). Materiais adicionados em embalagens, microencapsulados e nanoencapsulados são uma alternativa para liberação desse conteúdo a uma taxa controlada e sob a influência de condições específicas do meio como pH, temperatura, atividade de água do alimento, entre outras (Choińska-Pulit *et al.*, 2015; Santos, 2017). Alternativas para encapsular os fagos e aumentar sua estabilidade e liberação em diferentes matrizes, bem como sua utilização em dispositivos para detecção de patógenos vêm se tornando uma realidade. É essencial

criar um microambiente em que o fago não apenas sobreviva a condições extremas como o trato gastrointestinal, mas também ao processamento, condições de armazenamento ou secagem dos alimentos. Desta forma, torna-se essencial desenvolver processos mais precisos que mantenham os fagos viáveis por mais tempo no ambiente no qual sejam aplicados. Estratégias de produção e aplicação devem ser otimizadas para atingir o objetivo desejado (Ma *et al.*, 2008; Choińska-Pulit *et al.*, 2015).

Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi imobilizar o fago UFV-AREG1 em matrizes poliméricas como o alginato-Ca e o álcool poli(vinílico) e em nanotubos de carbono de paredes múltiplas para posterior aplicação como sanitizante, curativo adesivo e nanobiosensor. No Capítulo I, incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 via microencapsulação por microfluídica em matriz de alginato-Ca e aplicá-los em um gel antimicrobiano de propilenoglicol para uso na indústria de alimentos. No Capítulo II o objetivo foi incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) para aplicação como nanobiosensor. No Capítulo III o objetivo foi incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 em hidrogéis de álcool poli(vinílico) para posterior aplicação como curativo adesivo.

2. Revisão de literatura

2.1. Micro-organismos patogênicos – problemas na cadeia alimentar e saúde

É crescente o esforço de setores do governo, da indústria e de acadêmicos para garantir cada vez mais que a cadeia de produtos alimentícios forneça alimentos seguros. Estratégias preventivas na forma de diversos documentos e normas de orientação gerais e específicas dos produtos foram estabelecidas ao longo da última década. No entanto, patógenos veiculados por alimentos contaminados continuam a ser consideravelmente um problema econômico, social e de saúde pública (Hoffmann, 2002; Scallan *et al.*, 2011; Hoffman, 2012; Lopez-Velasco *et al.*, 2015).

Testes microbianos têm sido tradicionalmente feitos na indústria de alimentos para estabelecer o limite aceitável de um agente patogênico e suas toxinas, bem como para cumprir os limites microbiológicos gerais de qualidade e uma correlação antecipada para a estabilidade de vida útil e segurança. Além disso, a vigilância e monitoramento em níveis de produção primária requerem aplicação de métodos de rastreamento para determinar a presença e até mesmo quantificação dos patógenos em amostras de alimentos (Hoorfar, 2011; Lopez-Velasco *et al.*, 2015).

Dentre os principais alimentos contaminados estão os de origem animal que podem veicular os mais diversos tipos de micro-organismos. Para multiplicarem-se, esses micro-organismos necessitam de condições favoráveis, representadas por múltiplos fatores, entre eles a temperatura, que durante o processo de conservação é de fundamental importância para inibir a proliferação microbiana e minimizar as reações químicas que causam a deterioração dos alimentos (Mürmann, 2005).

A principal microbiota de carnes refrigeradas são os micro-organismos psicotróficos. Dentre estes existem vários, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., enterobactérias, corynebactérias e micrococos (Santos Mantilla *et al.*, 2009). Porém outros micro-organismos podem se adaptar nessa temperatura como por exemplo, *Salmonella* sp, *E. coli*, *L. monocytogenes*, dentre outros.

Bactérias do gênero *Salmonella*, por exemplo, são hábeis em adaptar-se, crescer e/ou sobreviver em uma ampla gama de ambientes estressantes, como: pH extracelular de 3,99 até 9,5, nas concentrações de até 4 % de NaCl e temperaturas tão altas como 54 °C ou baixas como 2 °C (Spector e Kenyon, 2012). Esse micro-organismo tem sido a maior causa de doença veiculada por alimentos nos Estados Unidos, sendo 11 % das doenças, 35 % do total de internações, e 28 % das mortes associadas a doenças transmitidas por alimentos a cada ano. E nessas condições a carne de frango tem sido comumente envolvida em surtos alimentares causados por *Salmonella* (Sukumaran *et al.*, 2015). A incidência de salmonelose relacionada a produtos-prontos à base de carne foi relatado como sendo de 24,6 % ((Cdc), 2014; Lee *et al.*, 2015).

Em 2017 o CDC notificou surtos alimentares nos Estados Unidos entre 2016 e 2017 envolvendo alimentos ligados a produtos cárneos, brotos de alfafa, farinha e manteiga de soja e amendoim, sendo que foram relatados um total de 108 casos envolvendo 36 hospitalizações. Dessas hospitalizações nove apresentaram síndrome hemolítica urêmica causada por *E. coli* O157:H7 ((Cdc), 2017). *E. coli* O157:H7 tem sido associada à surtos alimentares envolvendo derivados da carne de porco e vegetais folhosos como alface, espinafre, ervas culinárias, entre outros produtos processados e frescos (Berry e Wells, 2010; Berry *et al.*, 2015; Lopez-Velasco *et al.*, 2015; Honish *et al.*, 2017).

Segundo Shekarforoush e colaboradores (Shekarforoush *et al.*, 2015) “a bactéria *E. coli* O157:H7 é também considerada como um importante agente fecal que pode espalhar-se através do contato direto e do consumo de alimentos contaminados sobrevivendo a 15 % de concentração de soluções como ácido acético, cítrico e láctico.

O consumo de carne malcozida e leite bovino cru são as principais fontes de vários focos. *E. coli* O157:H7, pode levar a colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica, púrpura trombocitopênica e, nos casos graves, a morte. *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica foi identificada pela primeira vez como doença humana no início dos anos 80, sendo citados os ruminantes como reservatórios primários deste micro-organismo. Estudos preliminares indicaram que o gado vinha a ser a única fonte de *E. coli* O157:H7 que causava surtos em seres humanos, no entanto, estudos epidemiológicos demonstraram que a *E. coli* O157:H7 foi difundida em outras fontes de alimento e que um número de rotas de transmissão passou a existir”.

As alterações microbianas nos alimentos dependem da qualidade inicial do mesmo e das condições de armazenamento. Contudo, a microbiota inicial e sua possibilidade de desenvolvimento dependem de todo um conjunto de fatores, inclusive durante o processo de abate e ordenha dos animais que podem levar a contaminação da matéria prima de origem animal, bem como nas distintas etapas da produção dos produtos como a ação incorreta de manipuladores, equipamentos e utensílios não higienizados, usos indiscriminados de determinados aditivos e antimicrobianos e ingredientes em geral (Voidarou *et al.*, 2007; Berry e Wells, 2010; Chekabab *et al.*, 2013).

Alimentos com qualidade microbiológica aceitável são extremamente difíceis de obter quando as etapas de obtenção não são realizadas em condições higiênicas satisfatórias. Os alimentos ricos em proteína e água, como as carnes e derivados do leite, são considerados de alto risco para o desenvolvimento de bactérias patogênicas (Hazelwood e Mclean, 1994).

2.2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que infectam as células bacterianas. A partícula de fago é chamada vírion e seu capsídeo é formado por proteína ou lipídeo-proteína, que reveste o seu genoma. Uma propriedade importante dos fagos é a sua especificidade para o hospedeiro, o que se dá pela presença de um ou mais receptores complementares ao sítio apropriado na superfície celular bacteriana. Após adsorverem e adicionarem seu material genético no hospedeiro, os fagos podem destruir a célula hospedeira quando em ciclo lítico ou incorporar seu material genético ao da bactéria iniciando o ciclo lisogênico. No ciclo lítico ocorre a multiplicação das partículas virais causando lise na bactéria e, conseqüentemente, liberação dessas partículas que podem migrar para outros locais de infecção. No ciclo lisogênico, o DNA do fago é integrado ao cromossomo bacteriano ou

permanece circular na forma de plasmídeo e, em condições de estresse, o ciclo lítico pode ser induzido (Kutter e Sulakvelidze, 2004; Abedon *et al.*, 2011; Szermer-Olearnik, 2014). Os fagos são os únicos agentes antibacterianos capazes de se multiplicar na presença de seu hospedeiro, afetando minimamente bactérias não-alvo ou tecidos corporais (Abedon *et al.*, 2011).

Bacteriófagos têm sido utilizados para tratamento de infecções desde de 1930. Vêm sendo empregado no tratamento de humanos a mais de 90 anos (Abedon *et al.*, 2011; Chhibber *et al.*, 2013; Cooper *et al.*, 2015b). Durante muito tempo, houve um interesse crescente em partículas fágicas com o potencial de aplicação terapêutica devido ao fato de que a utilização indevida de antibióticos durante décadas deu origem à formação de novas estirpes de bactérias resistentes. Em 2005, foi criado o primeiro centro de terapia com bacteriófagos na União Européia chamado de Instituto de Imunologia e Terapia Experimental de Ludwik Hirszfeld.

O uso de fagos de forma segura para tratamento de infecções depende de um extensivo estudo da interação das partículas virais com sistemas *in vivo*. Algumas das vantagens da terapia fágica são: i) fagos são mais seguros e facilmente descobertos em relação aos antibióticos; ii) em títulos elevados de fagos há uma eficiência em morte do hospedeiro; iii) a replicação de fagos pode proporcionar uma "margem de segurança" para atingir a sua eficácia (Abedon e Thomas-Abedon, 2010). Utilizados como antimicrobianos, os fagos são os únicos que aumentam em quantidade na presença do hospedeiro alvo (Abedon, 2014). Portanto, é importante entender a interação fago-bactéria, a farmacocinética de preparações de bacteriófagos, as propriedades físico-químicas, e as propriedades biológicas da preparação (Payne e Jansen, 2001; Szermer-Olearnik, 2014; Keen e Adhya, 2015).

Novos aspectos da aplicação dos bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas em desenvolvimento incluem, por exemplo, fagos recombinantes que causam morte celular bacteriana, e bacteriófagos como adjuvantes na terapia antibiótica. A vantagem de uma terapia combinada é a menor probabilidade de desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes (Lu e Collins, 2007; Labrie *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011).

Embora a prática primária da terapia fágica tenha sido realizada tendo em vista o tratamento de infecções bacterianas em seres humanos, o conceito de remoção de populações bacterianas indesejáveis utilizando bacteriófagos pode ser estendido para animais, plantas, produtos alimentares e outros domínios (Gill, 2011; Gouvêa *et al.*, 2015). Os bacteriófagos têm um grande potencial para o uso como agentes de biocontrole

em alimentos, pois fagos são específicos para procariotos alvo, incapazes de infectar células eucariotas, têm capacidade de auto replicação e presença onipresente na natureza, que os torna excelentes ferramentas para fins de segurança alimentar (Horgan *et al.*, 2010; Mahony *et al.*, 2011; Hungaro *et al.*, 2013). Por exemplo, fagos já foram utilizados para controlar patógenos em vísceras de animais. Fagos patogênicos específicos podem permanecer ativos durante o processo digestivo permitindo a remoção de *E. coli* O157:H7 do sistema digestivo das vacas (Callaway *et al.*, 2008). Fagos específicos de *Salmonella* têm sido mostrados para reduzir o número de agentes patogênicos de aves (Borie *et al.*, 2008; Hungaro *et al.*, 2013). Os fagos foram aplicados diretamente à alimentos frescos contaminados com micro-organismos patogênicos tais como *E. coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes* e demonstraram ser eficazes no controle do crescimento desses agentes. Mostrou-se que os fagos reduziram o número de micro-organismos patogênicos em tomate, espinafre, brócolis e carne moída (Abuladze *et al.*, 2008).

No entanto, ainda assim é possível o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes. Há a possibilidade do fago se tornar um vetor de genes de virulência nas bactérias e de sua resistência a antibióticos. Pode ocorrer a conversão lisogênica e outros fatores negativos, como temperatura, pH, salinidade, íons e compostos alimentares que limitam a ação do fago ou interferem em sua estrutura (cabeça, cauda e envelope) bem como causar alterações em seu DNA (García *et al.*, 2008; Hungaro *et al.*, 2013). Portanto, a caracterização e seleção do bacteriófago são passos importantes para garantir a sua utilização segura e eficaz como agentes de biocontrole.

Em os estudos relacionados anteriormente, os micro-organismos foram inoculados na superfície dos materiais alimentares e, em seguida, a superfície inoculada foi tratada com fagos, tipicamente por pulverização direta sobre a superfície. Em muitas situações, agentes patogênicos alvo podem se localizar ou espalhar através da superfície de produtos alimentares, e também podem estar presentes em qualquer uma ou ambas as superfícies de produtos alimentares. Nesse ínterim, embalagens de alimentos contendo bacteriófagos como agentes antimicrobianos têm sido desenvolvidas e estudadas como alternativas para aumentar sua estabilidade e liberação no alimento, assim como sua encapsulação para tratamentos de infecções por via oral e sua utilização em dispositivos sensores para detecção de patógenos (Dutt *et al.*, 2013; Vonasek *et al.*, 2014; Gouvêa *et al.*, 2015).

2.2.1. O uso de biomateriais em terapia

Novos biomateriais para liberação controlada de fármacos vêm se tornando uma motivação de estudos nos últimos anos na área de saúde, pois esses materiais são atóxicos, biocompatíveis e proporcionam uma melhora na qualidade de vida do paciente. Um exemplo desses biomateriais são os hidrogéis que são redes tridimensionais de polímeros totalmente ou parcialmente hidrofílicos que intumescem em contato com a água o que facilita a liberação do fármaco, dentre outros mecanismos de liberação possíveis. Além do mais, os hidrogéis se tornam mais atrativos quando são biocompatíveis e não-tóxicos para aplicações biomédicas (Azevedo, 2002; Hoffmann, 2002; Hong *et al.*, 2014).

Os geis podem ser classificados de acordo com: a natureza da reticulação (químicos ou físicos); natureza da rede (homopolímero, copolímero, blenda); presença de poros; fonte (naturais ou sintéticos). O intumescimento do gel pela água facilita a transmissão de vapor de água e oxigênio embora também permita a doação de moléculas de água ao corpo. Os hidrogéis foram os primeiros biomateriais projetados para uso no corpo humano (Wichterle e Lim, 1960). Em 1989, Rosiak implementou o uso dos hidrogéis como material básico para a fabricação de curativos (Kokabi *et al.*, 2007).

As aplicações são diversas nas áreas de ciência e tecnologia. Segundo Hoffman (Hoffman, 1995) os hidrogéis já foram utilizados para o microencapsulamento de eletrônicos, liberação controlada de agentes bioativos, membranas bioseparadoras, etc. Atualmente os hidrogéis são indicados como curativos para tratar feridas superficiais e profundas (Jones e Vaughan, 2005).

Os dois tipos de hidrogéis, polímeros naturais ou sintéticos, continuam sendo interessantes para o processo de encapsulação de células e mais recentemente alguns têm sido utilizados no campo de engenharia de tecidos como matriz para reparar e regenerar uma variedade de tecidos (Hoffman, 2012).

Dentre os vários polímeros utilizados como matérias-primas para hidrogéis, o poli(álcool vinílico) chamado de PVA pode ser considerado um bom candidato. O PVA é um polímero semicristalino, hidrofílico, constituído pela repetição dos isômeros (CH_2CHOH) contendo muitas hidroxilas (Hong *et al.*, 2014). Suas propriedades dependem do grau de polimerização e de hidrólise. O grau de hidrólise afeta as propriedades químicas, a capacidade de cristalização e a solubilidade. Devido as suas excelentes propriedades, o PVA é utilizado em diversas aplicações industriais, o que levou a uma variedade de produtos comerciais como processamento de papel e fibras, como estabilizante de emulsão e como matéria-prima para filmes (Aranha e Lucas, 2001). Vem sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica em liberação controlada de

fármacos por sua biocompatibilidade, não-tóxico, estável com produtos químicos, barato e com excelente resistência mecânica (Gu *et al.*, 2014).

Os hidrogéis poliméricos estão bem estabelecidos, embora estudos acerca desses materiais continuem a ser desenvolvidos. PVA foi utilizado para encapsular e liberar controladamente inibidores químicos ditos verdes, devido a facilidade no preparo e por ser barato, em tubulações do processo de produção de petróleo para controlar problemas de escala e corrosão que tem sido cada vez mais grave na indústria petrolífera (Gu *et al.*, 2014). Usado também, associado a quitosana formando blendas, na liberação controlada de insulina (nano-insulina hidrogel) no controle da diabetes (Zu *et al.*, 2012). Hidrogel de PVA criado, utilizando um método gradual de congelamento, para estudar comportamentos de diferenciação de células-tronco (Kim *et al.*, 2015). Estudos para avaliar as propriedades mecânicas e térmicas do hidrogel bem como sua biocompatibilidade e seu uso como implante artificial meniscal, que é um grande desafio na comunidade ortopédica (Curley *et al.*, 2014; Hayes e Kennedy, 2016). PVA inserido em nanosensores para detecção rápida de *E. coli* e um nanobiosensor para detecção de ácido fólico (Chakravarty *et al.*, 2016; Shaibani *et al.*, 2016). Entre outros estudos que avaliam suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e processos de reticulação para o uso como material no processo de liberação controlada de fármacos (Mahdavinia e Etemadi, 2014; Zhang e Ye, 2014; Abudabbus *et al.*, 2016; Masri *et al.*, 2017). Por estes motivos foi proposto o estudo da imobilização do bacteriófago em hidrogel de PVA para aplicação como curativo adesivo.

2.2.2. Fagos em nanosensores

Os biossensores, sistemas biológicos naturais ou geneticamente modificados, são constituídos de materiais biológicos sensíveis como: células, vírus, anticorpos, enzimas, dentre outros, que em contato com o material de interesse ligado a um instrumento apropriado, converte as reações bioquímicas em sinais. O componente biológico (biorreceptor) é responsável pelo reconhecimento de compostos específicos no sistema em questão, o transdutor recebe o sinal da amostra analisada no biorreceptor e o quantifica, gerando o resultado na forma de um sinal (Gaspar, 2010; Oliveira e Pereira, 2016). Os nanobiossensores são desenvolvidos em nano-escala que converterão esses eventos biológicos em sinais processáveis capazes de serem detectáveis e mensuráveis (Gaspar, 2010).

Os bacteriófagos podem ser utilizados como bionanosensores, podendo ser utilizados naturalmente imobilizados em superfícies sensoras ou modificados geneticamente utilizando algum gene de expressão que emita algum sinal sensor em contato com a molécula de interesse.

A evolução e aplicação de bionanosensores para a detecção de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos vem crescendo e particularmente as novas tendências nos últimos anos vêm incluindo novos elementos específicos de bio-reconhecimento como bacteriófagos e lecitina, a utilização de nanomateriais entre outras técnicas, como por exemplo, a microfluídica (Wang *et al.*, 2012).

Sistemas de imobilização de bacteriófagos e sua aplicação como bionanosensores vem sendo pesquisados e desenvolvidos, sendo uma ferramenta muito importante na detecção de patógenos em diversas áreas de interesse (Edgar *et al.*, 2006; Gervais *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2012; Dutt *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

2.3. Encapsulamento de fagos

2.3.1. Microfluídica

De acordo com o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais “a microfluídica pode ser definida como a ciência e engenharia de sistemas com dimensões micrométricas, na qual o comportamento dos fluidos difere da teoria tradicional para domínios macroscópicos. Ela pode ser explorada para uma variedade de aplicações científicas e tecnológicas e, por esse motivo, há a necessidade de maior discussão sobre os efeitos desse escalonamento” (Materiais, 2015).

Os primeiros estágios da área de microfluídica surgiram no final dos anos 70 com o advento das impressoras à jato de tinta. Atualmente, sistemas microfluídicos podem ser utilizados em diferentes áreas incluindo química, biologia, medicina, dentre outras. Dentro das aplicações atuais, podemos utilizar sistemas capazes de separar, detectar, filtrar substâncias, além da fabricação de microválvulas, microbombas, etc. Os sistemas são constituídos de canais que variam de dezenas a centenas de micrômetros, com diversas geometrias e diversos materiais que podem ser utilizados em sua microfabricação como polímeros, vidros, cerâmicas, metais, etc (Madou, 2002; Abgrall e Gue, 2007; Schianti *et al.*, 2013).

O uso de tais dispositivos apresenta uma série de vantagens bastante atrativas do ponto de vista econômico e tecnológico. Primeiro, porque o volume de fluidos no interior destes sistemas é muito pequeno (nanolitros a microlitros), favorecendo o uso de

reagentes caros, ou em quantidade de amostra reduzida. Além disso, várias técnicas de fabricação dos dispositivos são relativamente baratas, permitindo a produção em larga escala de microcápsulas, micropartículas ou microgéis, bem como a integração de múltiplas etapas químicas em um único dispositivo.

A manipulação de fluxos de múltiplas fases através do dispositivo de microfluídica nos permite gerar emulsões de baixa dispersão e de diversos tamanhos. A possibilidade de realizar emulsões simples e emulsões duplas nos possibilita diversas aplicações em diferentes áreas. O alto grau de controle proporcionado por este método e as correntes de fluido completamente distintas tornam a microfluídica uma técnica flexível e promissora (Utada *et al.*, 2005). A produção de emulsões em microescala em dispositivos microfluídicos é o primeiro exemplo de aplicação destes sistemas (Schianti *et al.*, 2013).

Os métodos e aparatos em microfluídica podem ser utilizados para encapsulamento de micro ou nanoestruturas em microgéis poliméricos. Composições de microgéis como display de cristal líquido (LCD) podem ser utilizadas numa variedade de aplicações incluindo dispositivos eletrônicos, dispositivos biotecnológicos, células de combustível, dispositivos de visualização e dispositivos ópticos. Além dos microgéis, podemos utilizar os sistemas para produção de microcápsulas, micropartículas, e até mesmo nanopartículas, que irão depender de como o dispositivo é fabricado e dimensionado (Schianti *et al.*, 2013; Zhao, 2013).

O alginato de sódio é amplamente usado como um agente de gelificação em função de sua capacidade de formar géis com cátions bivalentes, tais como Ca^{+2} , Ba^{+2} ou Sr^{+2} sob condições moderadas e é particularmente adequado para encapsulamento devido às suas condições de GRAS (Reconhecidamente Seguro) e ausência de toxicidade (Gombotz e Wee, 1998). Atualmente muitos grupos de pesquisa têm desenvolvido dispositivos microfluídicos para a produção de partículas monodispersas com o controle preciso de tamanho, forma e composição usando o alginato como o veículo encapsulante e para o sistema de liberação controlada de células, enzimas, drogas e proteínas. Diferentes técnicas microfluídicas desenvolvidas tem sido utilizada na fabricação de partículas monodispersas cada vez menores (Huang *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016).

2.3.2. Nanotecnologia e CNTs

Apesar do início do vislumbamento da possibilidade teórica de se manipular átomos e moléculas terem sido em 1959 por intermédio do físico norte-americano Richard Feynman, a palavra nanotecnologia surgiu apenas em 1974 com o professor Norio Taniguchi e expandindo-se apenas em 1991 com a descoberta dos nanotubos de carbono por Sumio Iijima. A nanotecnologia é o “conjunto de ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação que são obtidas graças as propriedades da matéria organizada a partir de estruturas de dimensões nanométricas”, definição esta proposta pelo antigo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). A nanotecnologia trabalha com materiais que apresenta em pelo menos uma das dimensões tamanho nanométrico e que confere a esse material novas propriedades químicas, físicas ou biológicas diferente das propriedades do material não nanoestruturado, o que possibilita uma aplicação em diversas áreas como medicina, física, química, engenharia dos materiais, alimentos, etc (Santos, 2017).

As pesquisas e aplicações em nanotecnologia têm crescido mais rapidamente do que o conhecimento que se tem sobre ela. É considerada hoje como o propulsor da nova Revolução Industrial podendo, assim, transformar diversos campos à sua volta e atingir todos os setores de produção. Com o tempo ela poderá controlar toda cadeia de produção agrícola, de processamento de alimentos e de saúde (Guazzelli e Perez, 2009). Com grandes avanços na indústria de alimentos a nanociência trará muitos benefícios para o setor e, conseqüentemente, para os consumidores, principalmente na área de embalagens, onde mais se expandiu. Estudos como a produção de nanocompósitos de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens, aplicação de nanopartículas em filmes para embalagens, nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina, etc (Aouada, 2009; De Moura *et al.*, 2014; Lorevice *et al.*, 2014). Os principais estudos da nanotecnologia no setor de alimentos estão relacionados às proteínas do leite envolvendo a nanoencapsulação de compostos bioativos para liberação controlada (Santos, 2017); controle de micro-organismos através do efeito antimicrobiano das nanopartículas sendo necessário baixas concentrações para um alto efeito antimicrobiano (Aouada, 2009; Santos, 2017).

Apesar das pesquisas e do interesse em investir no setor, a inserção dos produtos no mercado ainda é pouca pelo desconhecido potencial toxicológico desses nanomateriais, seu impacto no ambiente e a comercialização e aceitação do consumidor da nova nanoestrutura (Lagaron e Lopez-Rubio, 2011; Handford *et al.*, 2015). A União Européia está para aprovar como uso uma combinação de 22 nanomateriais/campo de aplicações, dentre eles a aplicação de nanotubos de carbono em embalagens de alimentos

(Peters *et al.*, 2014). O interesse em nanomateriais é devido ao seu potencial empregado em diversas áreas científicas e tecnológicas sendo, portanto, muito estudados hoje em sistemas biológicos (Cooper *et al.*, 2015a).

Dentre os nanomateriais mais utilizados nas pesquisas temos os nanotubos de carbono (CNTs) que podem ser tanto de parede simples, que são constituídos por apenas uma camada cilíndrica de grafite, como de paredes múltiplas, constituído de vários cilindros concêntricos de grafite. Essas diferenças se relacionam com a topografia, dimensão e estrutura dos nanotubos que irão definir as diferenças em suas propriedades (Rao *et al.*, 2001). Na obtenção do nanotubo podemos ter, de acordo com a direção correspondente do enrolamento da folha de grafeno, três tipos de CNTs (*armchair*, *zigzag* e quiral) com propriedades diferentes que caracterizarão se o mesmo é condutor ou semicondutor. Possuindo propriedades magnéticas, elétricas, ópticas e mecânicas, os CNTs estão aptos a diversas aplicações (Santos, 2013). Assim, os CNTs têm diversas aplicações devido as suas propriedades únicas. Dentre essas aplicações podemos citar: criação de nanocompósitos utilizando materiais poliméricos; adsorventes de metais pesados em efluentes; remoção de gases prejudiciais ao ambiente; e uso biotecnológico como, por exemplo, biossensores (Iijima *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1998; Thostenson *et al.*, 2001; Baughman *et al.*, 2002; Herbst *et al.*, 2004).

Usados em sistemas biológicos os CNTs podem possuir respostas tóxicas para certas formulações em alguns tecidos ou células, porém, nem todas as respostas fisiológicas podem ser tóxicas. Dependendo do controle do arranjo químico, os CNTs podem ser um alvo contra células cancerígenas, impactar positivamente na catálise enzimática, estimular o desempenho biológico e mecânico quando revestidos de hidroxiapatita, etc (Cooper *et al.*, 2015b). CNTs já são usados na interação superficial com biomoléculas (proteínas, peptídeos e nucleotídeos). Essa interação se estende aos bacteriófagos que tem sido utilizado como sensores virais e dispositivos fotovoltaicos a base de nanotubos de carbono e mais recentemente bacteriófagos ligados aos CNTs afim de melhorar o desempenho para a utilização como um potencial produto curativo (Katz e Willner, 2004; Dang *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2015b).

Portanto, com a nanotecnologia é possível o desenvolvimento de um método rápido, sensível e específico para a detecção de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos que é de grande importância para garantir a segurança alimentar.

Referências Bibliográficas

- (CDC), C. F. D. C. A. P. **Foodborne Outbreak** 2014. *Escherichia coli* 2017.
- ABEDON, S. T. Phage Therapy: Eco-Physiological Pharmacology. **Scientifica**, v. 2014, p. 29, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/581639> >.
- ABEDON, S. T. et al. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66-85, Mar-Apr 2011. ISSN 2159-7073 2159-7081. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278644/> >.
- ABEDON, S. T.; THOMAS-ABEDON, C. Phage therapy pharmacology. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 11, n. 1, p. 28-47, Jan 2010. ISSN 1389-2010.
- ABGRALL, P.; GUE, A. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 17, n. 5, p. R15, 2007. ISSN 0960-1317.
- ABUDABBUS, M. et al. Biological activity of electrochemically synthesized silver doped polyvinyl alcohol/graphene composite hydrogel discs for biomedical applications. **Composites Part B: Engineering**, v. 104, p. 26-34, 2016. ISSN 1359-8368.
- ABULADZE, T. et al. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6230-6238, 2008. ISSN 0099-2240.
- AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 189-199, 7// 2012. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1100316X> >.
- AOUADA, M. R. D. M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. 2009.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli (álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, 2001. ISSN 0104-1428.
- AZEVEDO, M. D. Nanoesferas e a liberação controlada de Fármacos. 20f. **Monografia (Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV-Introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico)-LQES-Laboratório de Química do Estado Sólido-Instituto de Química-UNICAMP**, 2002.
- BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; DE HEER, W. A. Carbon nanotubes--the route toward applications. **science**, v. 297, n. 5582, p. 787-792, 2002. ISSN 0036-8075.
- BEEFPOINT. USDA: Confirma relatório sobre o mercado de carnes. 2018. Disponível em: < <https://www.beefpoint.com.br/usda-confirma-relatorio-sobre-o-mercado-de-carnes-2/> >.
- BERRY, E. D.; WELLS, J. E. *Escherichia coli* O157: H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. In: (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**: Elsevier, v.60, 2010. p.67-117. ISBN 1043-4526.

- BERRY, E. D. et al. Effect of proximity to a cattle feedlot on *Escherichia coli* O157: H7 contamination of leafy greens and evaluation of the potential for airborne transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 1101-1110, 2015. ISSN 0099-2240.
- BORIE, C. et al. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. **Avian Diseases**, v. 52, n. 1, p. 64-67, 2008. ISSN 0005-2086.
- CALLAWAY, T. R. et al. Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli* O157: H7 populations in ruminant gastrointestinal tracts. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 2, p. 183-191, 2008. ISSN 1535-3141.
- CHAKRAVARTY, S. et al. PVA-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of folic acid by fluorescence quenching. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 232, p. 243-250, 2016/09/01/ 2016. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400516304105> >.
- CHEKABAB, S. M. et al. The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157: H7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 1, p. 1-12, 2013. ISSN 1574-6968.
- CHHIBBER, S.; KAUR, T.; SANDEEP, K. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56022, 2013. ISSN 1932-6203.
- CHOIŃSKA-PULIT, A. et al. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 212-221, 10// 2015. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415001685> >.
- COOPER, I. R. et al. Bacteriophage-nanocomposites: An easy and reproducible method for the construction, handling, storage and transport of conjugates for deployment of bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 111-118, 2015/04/01/ 2015a. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701215000597> >.
- CURLEY, C. et al. An evaluation of the thermal and mechanical properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 40, p. 13-22, 2014. ISSN 1751-6161.
- DANG, X. et al. Virus-templated self-assembled single-walled carbon nanotubes for highly efficient electron collection in photovoltaic devices. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 377, 2011. ISSN 1748-3395.
- DAVIS, J. J. et al. The immobilisation of proteins in carbon nanotubes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 272, n. 1-2, p. 261-266, 1998. ISSN 0020-1693.
- DE MOURA, M. R. et al. Preparação de novos nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 24, n. 4, 2014. ISSN 0104-1428.
- DUTT, S. et al. Immobilization of P22 bacteriophage Tailspike protein on Si surface for optimized *Salmonella* capture. **J. Anal. Bioanal. Tech. S**, v. 7, p. 7, 2013.

EDGAR, R. et al. High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 4841-4845, 2006. ISSN 0027-8424.

FAO. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. AGRICULTURE, W. F. A. Rome 2013.

GARCÍA, P. et al. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 479-485, 2008. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x> >.

GASPAR, C. H. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores**. 2010. Faculdade de Ciências e Tecnologia.

GERVAIS, L. et al. Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 125, n. 2, p. 615-621, 2007. ISSN 0925-4005.

GILL, J. J., & YOUNG, R. F. Therapeutic Applications of Phage Biology: History, Practice and Recommendations. In: MILLER, A. A. M. A. P. F. (Ed.). **Trends in Antibacterial Discovery: Answering the Call to Arms**. USA: Caister Academic Press, 2011. p.viii + 460. ISBN 978-1-904455-89-9.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 267-285, 5/4/ 1998. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X97001245> >.

GOUVÊA, D. M. et al. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 85-91, 9// 2015. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815001541> >.

GU, T. et al. A preliminary research on polyvinyl alcohol hydrogel: A slowly-released anti-corrosion and scale inhibitor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 122, p. 453-457, 2014/10/01/ 2014. ISSN 0920-4105. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092041051400254X> >.

GUZZELLI, M. J.; PEREZ, J. Nanotecnologia: a manipulação do invisível. **Porto Alegre: CV Artes Gráficas Ltda**, 2009.

HANDFORD, C. E. et al. Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. **Food Control**, v. 57, p. 24-34, 2015. ISSN 0956-7135.

HAYES, J. C.; KENNEDY, J. E. An evaluation of the biocompatibility properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 894-900, 2016. ISSN 0928-4931.

HAZELWOOD, D.; MCLEAN, A. **Manual de higiene para manipuladores de alimentos**. Varela, 1994. ISBN 858551907X.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.

HOFFMAN, A. S. “Intelligent” polymers in medicine and biotechnology. **Artificial organs**, v. 19, n. 5, p. 458-467, 1995. ISSN 0160-564X. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012. ISSN 0169-409X.

HOFFMANN, F. L., MANSOR, A. P., COELHO, A. R., & VINTURIM, T. M. . **Microbiologia de carcaças e carnes mecanicamente separadas (CMS), obtidas em abatedouro de aves da região de São José do Rio Preto, SP. Higiene Alimentar**. 16: 6 p. 2002.

HONG, H. et al. Facile method to prepare self-healable PVA hydrogels with high water stability. **Materials Letters**, v. 122, p. 227-229, 2014/05/01/ 2014. ISSN 0167-577X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X14002481> >.

HONISH, L. et al. *Escherichia coli* O157: H7 Infections associated with contaminated pork products—Alberta, Canada, July–October 2014. **Canada communicable disease report= Relevé des maladies transmissibles au Canada**, v. 43, n. 1, p. 21-24, 2017. ISSN 1188-4169.

HOORFAR, J. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. **Apmis**, v. 119, p. 1-24, 2011. ISSN 0903-4641.

HORGAN, M. et al. Genome analysis of the *Clostridium difficile* phage Φ CD6356, a temperate phage of the Siphoviridae family. **Gene**, v. 462, n. 1–2, p. 34-43, 8/15/ 2010. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811191000171X> >.

HU, Y.; AZADI, G.; ARDEKANI, A. M. Microfluidic fabrication of shape-tunable alginate microgels: effect of size and impact velocity. **Carbohydr Polym**, v. 120, p. 38-45, Apr 20 2015. ISSN 1879-1344 (Electronic) 0144-8617 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662685> >.

HUANG, S.-B.; WU, M.-H.; LEE, G.-B. Microfluidic device utilizing pneumatic micro-vibrators to generate alginate microbeads for microencapsulation of cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 147, n. 2, p. 755-764, 6/3/ 2010. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400510003497> >.

HUNGARO, H. M. et al. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 75-81, 6// 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001373> >.

IJIMA, S.; AJAYAN, P.; ICHIHASHI, T. Growth model for carbon nanotubes. **Physical review letters**, v. 69, n. 21, p. 3100, 1992.

JONES, A.; VAUGHAN, D. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. **Journal of Orthopaedic nursing**, v. 9, p. S1-S11, 2005. ISSN 1361-3111.

KATZ, E.; WILLNER, I. Biomolecule- functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. **ChemPhysChem**, v. 5, n. 8, p. 1084-1104, 2004. ISSN 1439-4235.

KEEN, E. C.; ADHYA, S. L. Phage Therapy: Current Research and Applications. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases**

Society of America, v. 61, n. 1, p. 141-142, 03/31 2015. ISSN 1058-4838 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481600/> >.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 113-130, 9// 2006. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174006001367> >.

KIM, T. H. et al. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing–thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors. **Biomaterials**, v. 40, p. 51-60, 2015/02/01/ 2015. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961214011776> >.

KOKABI, M.; SIROUSAZAR, M.; HASSAN, Z. M. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 3, p. 773-781, 2007. ISSN 0014-3057.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. CRC Press, 2004. ISBN 0203491750.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 317-27, May 2010. ISSN 1740-1526.

LAGARON, J. M.; LOPEZ-RUBIO, A. Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies. **Trends in food science & technology**, v. 22, n. 11, p. 611-617, 2011. ISSN 0924-2244.

LEE, H.; KIM, J. E.; MIN, S. C. Quantitative risk assessments of the effect of an edible defatted soybean meal-based antimicrobial film on the survival of *Salmonella* on ham. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 30-38, 8// 2015. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877415000849> >.

LIU, L. et al. Preparation of monodisperse calcium alginate microcapsules via internal gelation in microfluidic-generated double emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 404, p. 85-90, 8/15/ 2013. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979713004037> >.

LIU, M. et al. On-chip preparation of calcium alginate particles based on droplet templates formed by using a centrifugal microfluidic technique. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 466, p. 20-27, 3/15/ 2016. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197971530388X> >.

LOPEZ-VELASCO, G. et al. Factors affecting cell population density during enrichment and subsequent molecular detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce contaminated during field production. **Food Control**, v. 54, p. 165-175, 8// 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000729> >.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. D.; MATTOSO, L. H. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. **Química Nova**, p. 931-936, 2014. ISSN 0100-4042.

LU, T.; COLLINS, J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 11197 - 11202, 2007.

MA, Y. et al. Microencapsulation of Bacteriophage Felix O1 into Chitosan-Alginate Microspheres for Oral Delivery. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4799-4805, 2008. Disponível em: < <https://aem.asm.org/content/aem/74/15/4799.full.pdf> >.

MADOU, M. J. **Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization, Second Edition**. Taylor & Francis, 2002. ISBN 9780849308260. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=9bk3gJeQKBYC> >.

MAHDAVINIA, G. R.; ETEMADI, H. In situ synthesis of magnetic CaraPVA IPN nanocomposite hydrogels and controlled drug release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 45, p. 250-260, 2014/12/01/ 2014. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493114005931> >.

MAHONY, J. et al. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 157-163, 4// 2011. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166910001965> >.

MANDAL, H. S. et al. Carbon nanotube thin film biosensors for sensitive and reproducible whole virus detection. **Theranostics**, v. 2, n. 3, p. 251, 2012.

MASRI, C.; CHAGNON, G.; FAVIER, D. Influence of processing parameters on the macroscopic mechanical behavior of PVA hydrogels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 769-776, 2017. ISSN 0928-4931. MATERIAIS, C. C. N. D. P. E. E. E. 2015.

MÜRMAN, L., MALLMANN, C. A., & DILKIN, P. **Temperaturas de armazenamento de alimentos em estabelecimentos comerciais na cidade de Santa Maria, RS.** . *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 5 p. 2005.

NEUMAN, W. **Cargill Issues Meat Recall after Turkey Tied to Illness**. *The New York Times*. New York 2011.

OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar-Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016. ISSN 1984-6835.

PAUL, V. D. et al. Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 195, August 31 2011. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-195> >.

PAYNE, R. J.; JANSEN, V. A. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. **J Theor Biol**, v. 208, n. 1, p. 37-48, Jan 7 2001. ISSN 0022-5193 (Print) 0022-5193.

PETERS, R. et al. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. **EFSA Supporting Publications**, v. 11, n. 7, p. 621E, 2014. ISSN 2397-8325.

RAO, C. N. R. et al. Nanotubes. **ChemPhysChem**, v. 2, n. 2, p. 78-105, 2001. ISSN 1439-4235.

REN, P.-W. et al. Monodisperse alginate microcapsules with oil core generated from a microfluidic device. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, n. 1, p. 392-395, 3/1/ 2010. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979709014489> >.

SANTOS, I. J. B. **Parâmetros Termodinâmicos da Interação de Ácido Húmico com Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas, Argilas, Óxidos e Albumina Soro Bovina**. 2013. 143 (Doctor Scientie). Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SANTOS, I. J. B. E. D. S., C. R. O Impacto da Nanotecnologia na Indústria de Alimentos. In: AL, F. E. M. E. (Ed.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos: sustentabilidade, desafio e inovação**. UFV-Rio Paranaíba, v.Único, 2017. cap. Capítulo 1, p.404. ISBN 978-85-93848-00-1.

SANTOS MANTILLA, S. P. et al. Bactérias deteriorantes em filés de frango embalados em ar, vácuo e irradiados: parâmetros bacteriológicos de desenvolvimento e prazo comercial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, 2009. ISSN 1517-6398.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 16-22, Jan 2011. ISSN 1080-6040.

SCHIANTI, J. N. et al. Scaling up of Rifampicin Nanoprecipitation Process in Microfluidic Devices. **Progress in Nanotechnology and Nanomaterials** v. 2, n. 4, p. 101-107, 2013.

SHAIBANI, P. M. et al. The detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) with the pH sensitive hydrogel nanofiber-light addressable potentiometric sensor (NF-LAPS). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 176-183, 2016/04/01/ 2016. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400515307176> >.

SHEKARFOROUSH, S. S. et al. Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 303-309, 5// 2015. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813015001191> >.

SINGH, A.; POSHTIBAN, S.; EVOY, S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. **Sensors**, v. 13, n. 2, p. 1763-1786, 2013.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 455-481, 3// 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691100439X> >.

SUKUMARAN, A. T. et al. Reduction of Salmonella on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 8-15, 8/17/ 2015. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515002287> >.

SZERMER-OLEARNIK, B. B., J. . Bacteriophages – nanoparticles of wide application range. **CHEMIK**, v. 9, n. 68, p. 5, 2014.

THOSTENSON, E. T.; REN, Z.; CHOU, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites science and technology**, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001. ISSN 0266-3538.

TSONOS, J. et al. Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 460-469, 7/16/ 2014. ISSN 0378-1135.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513005002> >.

UTADA, A. S. et al. Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 537-541, April 22, 2005 2005. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/308/5721/537.abstract> >.

VOIDAROU, C. et al. Aerobic and Anaerobic Microbiology of the Immersion Chilling Procedure During Poultry Processing. **Poultry Science**, v. 86, n. 6, p. 1218-1222, June 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://ps.oxfordjournals.org/content/86/6/1218.abstract> >.

VONASEK, E.; LE, P.; NITIN, N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. **Food Hydrocolloids**, v. 37, n. 0, p. 7-13, 6// 2014. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13003081> >.

WANG, Y.; YE, Z.; YING, Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 3449-3471, 2012.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117, 1960. ISSN 1476-4687.

ZHANG, Y.; YE, L. Structure and property of polyvinyl alcohol/precipitated silica composite hydrogels for microorganism immobilization. **Composites Part B: Engineering**, v. 56, p. 749-755, 2014. ISSN 1359-8368.

ZHAO, C.-X. Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 11–12, p. 1420-1446, 11/15/ 2013. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13001476> >.

ZU, Y. et al. Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 82-87, 2012/01/01/ 2012. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813011003813> >.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Imobilizar o bacteriófago UFV-AREG1 em matrizes de alginato-Ca, em hidrogéis de álcool polivinílico (PVA) e em nanotubo de carbono para aplicação como sanitizantes, curativos adesivos e nanobiosensor, respectivamente para biocontrole de *E. coli* O157:H7.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a técnica de microfluídica no microencapsulamento de bacteriófagos UFV-AREG1 e a estabilidade, liberação e eficiência de encapsulação;
- Avaliar sua liberação e eficiência quando adicionados em gel de propilenoglicol para aplicação em superfícies e mãos de manipuladores de alimentos;

- Avaliação da liberação controlada do fago adicionado em hidrogéis de PVA para posterior aplicação como curativo adesivo;
- Desenvolver um nanobiosensor usando os bacteriófagos imobilizados em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) para detecção de patógenos e deterioradores de alimentos pela variação da resistividade do meio.

4. Capítulo I

Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices¹

Delaine M. G. Boggione^a; Laís S. Batalha^a; Marco T. P. Gontijo^a; Maryoris E. S. Lopez^b; Alvaro V. N. C. Teixeira^c; Igor J. B. Santos^d; Regina C. S. Mendonça^a

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Córdoba, Colombia.

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Brazil.

^d Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Alto Paraopeba – Ouro Branco, Brazil.

Abstract

The indiscriminate use of antibiotics and the emergence of resistant microorganisms have become a major challenge for the food industry. The purpose of this work was to microencapsulate the bacteriophage UFV-AREG1 in a calcium alginate matrix using microfluidic devices and to study the viability and efficiency of retention. The microcapsules were added to gel of propylene glycol for use as an antimicrobial in the food industry. The technique showed the number of the phage encapsulation, yielding drops with an average 100-250 μm of diameter, $82.1 \pm 2\%$ retention efficiency and stability in the gel matrix for 21 days. The gel added to the microencapsulated phage showed efficiency (not detectable on the surface) in reducing bacterial contamination on the surface at a similar level to antimicrobial chemicals (alcohol 70 %). Therefore, it was possible to microencapsulate bacteriophages in alginate-Ca and apply the microcapsules in gels for use as sanitizers in the food industry.

Keywords: Microfluidic device; Calcium alginate; Microencapsulation; Bacteriophage UFV-AREG1

1. Introduction

The indiscriminate use of antibiotics and the emergence of resistant microorganisms have aroused interest in alternative methodologies to control pathogens and spoilage microbes in foods and in different areas of the food industry. Among these

¹ Artigo publicado na revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* - Volume 158, 1 October 2017, Pages 182-189. Received 5 April 2017, Revised 21 June 2017, Accepted 27 June 2017, Available online 28 June 2017.

methodologies, the use of bacteriophages, bacteriocins and essential oils, which can be widely used in food packaging, stands out [1, 2].

Recently, many studies have examined the most effective processes to reduce or eliminate pathogenic microorganisms that appear in commodities of animal origin. These processes include the implementation of food safety systems, good agricultural and manufacturing practices, consistent and continuous training, and multidisciplinary research. Among these pathogens, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 are the most important. *E. coli* O157:H7 has been associated with outbreaks involving lettuce, spinach, culinary herbs and other fresh products [3]. According to Shekarforoush and co-workers [4] *E. coli* is considered an important agent which can spread through direct contact and by consumption of contaminated foodstuff, surviving to a 15 % concentration of acetic, citric and lactic acid. This bacterium can cause hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome (HUS), thrombocytopenic purpura and, occasionally, death.

The use of bacteriophages has become a promising therapy, especially due to bacterial resistance to antibiotics, which represents an important factor in public health due to the mortality caused by multiresistant bacteria. Furthermore, it also decreases concerns about antibiotic residues in foods and the compulsory retention period by humans [5].

The main applications of bacteriophages have been by oral administration of solutions containing the phages in therapy, or by spraying foods or equipment surfaces for decontamination [6, 7]. Another emergent technique is the application of encapsulated bacteriophages.

Essentially, encapsulation consists of a process in which the material to be encapsulated is maintained inside the encapsulating material to minimize lesions or losses. These losses can occur during passage through the gastrointestinal tract, during industrial processes and others, which can minimize the antimicrobial effect of bacteriophages. The encapsulation also permits the controlled liberation of viral particles under the influence of specific conditions [8].

In this context, the methods and equipment of microfluidics can be used for the encapsulation of micro and nanostructures in polymeric microgels [9, 10]. The system is constituted by channels ranging from tens to hundreds of micrometers, with different geometries and the most varied materials, such as polymers, glass, ceramics, metals, etc [10, 11]. The manipulation of multiple-phase flow in the device allows low polydisperse

emulsions to be generated, which may be single or double emulsions, of several diameters, expanding the fields of application. The higher degree of control offered by this method and the completely distinct fluid streams make microfluidics a very promising and versatile technique [12]. The microfluidic device can be utilized to produce microcapsules, microparticles and even nanoparticles, depending on the manufacture and design of the equipment [10].

Polymers that are purchased from natural sources of renewable resources are even more interesting because they have a low cost, water solubility, biocompatibility, biodegradability, ability to gel and good availability. Sodium alginate is a natural non-branched polysaccharide (extracted from brown seaweed and some bacteria) formed by two types of polyuronic acid, β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G) bound by (1 \rightarrow 4) -glycosidic bonds, of varied composition and sequence. These monomers are epimers with different orientations in the polymer chain, and the G unit is responsible for allowing cross-ionic bonding. The gel is formed by connecting the units of guluronic acid with cations, resulting in a three-dimensional network that is maintained by ionic interactions [13-16].

Sodium alginate is widely used as a gelling agent due to its ability to form gels with divalent cations, such as Ca^{+2} , Ba^{+2} or Sr^{+2} . The use of alginate is appropriate for encapsulation owing to its GRAS (Generally Recognized As Safe) aspect and absence of toxicity [17]. Because of the relatively mild gelling process, Ca-alginate particles have found numerous applications as encapsulation vehicles and delivery systems for cells, proteins, enzymes and drugs, as well as useful tools for the controlled release of drugs in biomedical science and pharmaceutical engineering [18].

Based on these premises, the aim of this work was to microencapsulate the bacteriophage UFV-AREG1 in a matrix of calcium alginate, using microfluidic devices. The microcapsules produced by the device were added to a propylene glycol gel for application in the sanitization of food surfaces, evaluating the antimicrobial effect. To our knowledge, there is no work in the literature about the encapsulation of bacteriophages using microfluidics for possible applications in the food industry; thus, this is an initiative to increase phage stability and viability during storage.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

The bacterium *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) was acquired from the Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) collection. The bacteriophage UFV-AREG1, isolated from cowshed wastewater, showed specificity for enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 (ATCC43895), *E. coli* 0111 (CDC 011ab) and *E. coli* (ATCC 23229). The genome sequence of the bacteriophage UFV-AREG1 is available under the accession number KX009778.3 in GenBank [19].

2.2. Determination of the diameter of viral particles

Dynamic light scattering technique is a method of investigation in the macromolecular system, characterized by being a noninvasive method and allowing small volumes to be used.

The technique was used to determine the average hydrodynamic radius (R_h) and size distribution of viral particles. The equipment used was Dynamic Light Scattering (DLS), Static Light Scattering (SLS) (Brookhaven Co. – USA) and light scattering Zetasizer (Zetasizer Nano S – Malvern – UK). In order to obtain homogeneous samples, a filtration was made using syringes with a hydrophilic 13 mm cellulose acetate membrane (Analitica, USA) with 0.22 μm pore size. All measures were made under controlled temperature (25.0 ± 0.5 °C). The experiment were performed at angles ranging from 30° to 135°, at intervals of 15°. The technique is appropriate for determination of structures of 10–1000 nm. The second-order cumulant model was adjusted using the data, from which was obtained the average relaxation rate of decay of this correlation ($\bar{\Gamma}$). The measurement was done three times, and the average diameter of particles was reported by the linear adjustment of a graph $\bar{\Gamma}$ versus q^2 , where q represents the scattering vector module. The slope obtained by this adjustment is self-diffusion coefficient, D , of the structures. The hydrodynamic radius was calculated using the Stokes-Einstein equation.

2.3. Microfluidic device

The device function was to produce emulsions with low-size dispersion from immiscible liquids.

Two cylindrical concentric capillary tubes were used. The hydrophobic treatment was applied with 10 % (v/v) solution of octadecyltrimethoxysilane in toluene. The dispersion of liquids in the device was controlled by the shear force to release the drops, producing water/oil emulsion (w/o) as shown in Fig. 1. The connections were made

to set the entries of the dispersed and continuous liquid phase in the device, which were placed in syringes; the region where the emulsion formed is called constriction. The syringes were connected to syringe pumps (PHD 4400 Programmable - Harvard Apparatus, USA), which controlled the entry of the liquid. The experiment was monitored by an optical microscope, which was connected to an image-capture CMOS camera connected to the computer.

2.4. Production of calcium alginate microcapsules

For the calcium alginate matrix, 1.5 % (w/v) of sodium alginate (Vetec, Brazil) was added to purified water. The mixture was homogenized in a magnetic stirrer until complete dissolution of alginate. The phage solution 10^6 PFU·mL⁻¹ (1:10 v/v) was added to the mixture. After this procedure, the solution was filtered through nylon filters (Analytica, USA) of 0.45 µm within the syringe and this was the dispersed phase. Sunflower oil with SPAN 80 (Sigma-Aldrich, USA) (0.3 % w/v) added was also filtered, and this was the continuous phase. The syringes were coupled to the flow pump and the microfluidic device. Flow rates were controlled to verify the formation and detachment of droplets in a regular manner, and to determine the desired size of the microcapsules. For the dispersed phase 50-100 µL·h⁻¹ was used, and 1000-1500 µL·h⁻¹ for the continuous phase. The droplets produced were collected in a CaCl₂ solution (Vetec, Brazil) (0.1 mol·L⁻¹) to form the alginate-Ca microcapsules (Fig. 1). After a few minutes of cation exchange (approximately 20 min), alginate-Ca microcapsules were obtained.

After formation of the microcapsules, the excess oil and the CaCl₂ solution were removed with Pasteur pipette and the microcapsules washed with water to remove oil residues. The water was withdrawn with the pipette, leaving only the microcapsules, which were stored in 1.5 mL microtubes and reserved in refrigeration temperature for evaluation of retention efficiency and subsequent addition in propylene glycol gel.

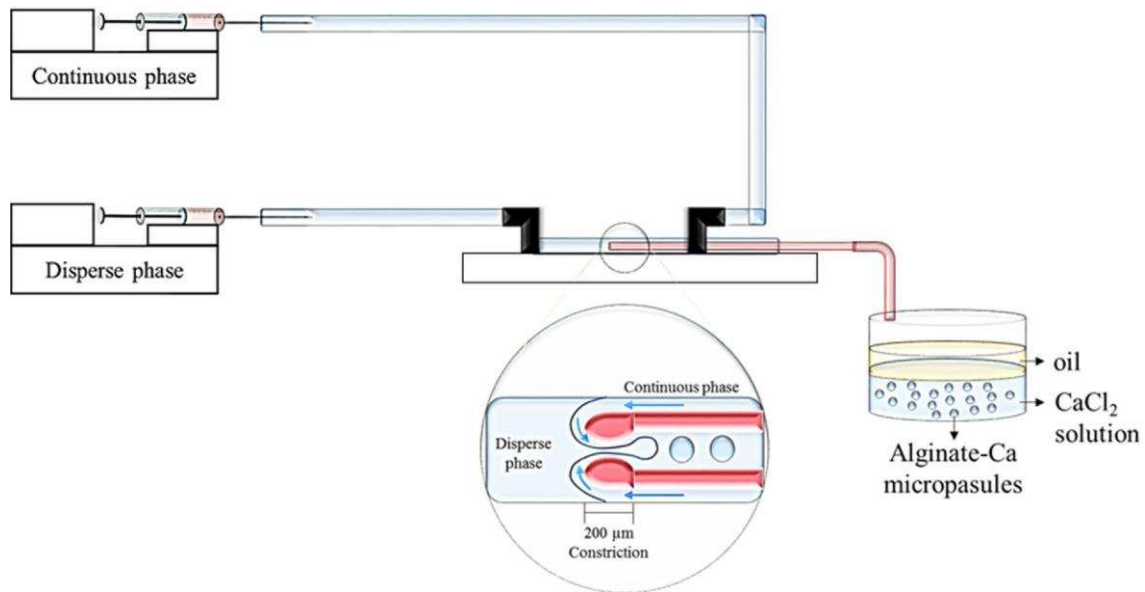


Fig. 1. Microfluidic device and Alginat-Ca microcapsule production.

2.5. Retention efficiency (RE) for the Ca-alginate matrix and stability of microcapsules in propylene glycol gel

For retention efficiency of the bacteriophages in Ca-alginate the titration of microencapsulated bacteriophages was determined. The dissolution of the microcapsules for releasing the bacteriophage was performed as described by Liu and co-workers [20]. The microcapsules were suspended in Broken-Microsphere Solution (MBS) containing sodium citrate (Neon, Brazil) $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, sodium bicarbonate (Neon, Brazil) $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and Tris-HCl (Sigma-Aldrich, USA) $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.5 for a few minutes until total dissolution of the microcapsules for phage release. The bacteriophages released from microcapsules were serially diluted using SM buffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl - Sigma-Aldrich, USA [pH 7.5], $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl - Vetec, Brazil, $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ \cdot $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Chemco, Brazil, 0.01% gelatin - Merck, USA) to obtain from 10 to 100 plaque-forming units (PFU). On a plate containing agar BHI base (Brain Heart Infusion - Himedia, India + agar 1.2 % - Himedia, India) 100 mL of bacterial culture in log phase and 100 μL of phage suspension dilution were added to a tube containing agar overlay (Brain Heart Infusion broth - Himedia, India + agar 0.6 % - Himedia, India) and poured on the plates. The plates were incubated at $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / 18 - 24 h.

The retention efficiency (RE) of bacteriophages in alginate microcapsules was determined by equation 1 per Gomes and co-workers [21], adapted to bacteriophages.

$$\text{RE} = \frac{\text{entrapped quantity of bacteriophages}}{\text{original quantity of bacteriophages}} \times 100 \quad (1)$$

Where "entrapped quantity of bacteriophages" is the concentration of bacteriophages present in the microcapsules and the "original quantity of bacteriophages" indicates the concentration of bacteriophages initially used to make the microcapsules of alginate.

The stability was assessed for 21 days (0, 7, 14 and 21 days). To determine the stability of microcapsules added to the propylene glycol gel, the titration proceeded as described above. After incubation for 18 - 24 h / 37 °C, the lysis plaques were counted and expressed as plate forming units (PFU·mL⁻¹).

2.6. Characterization of microcapsules containing bacteriophages by confocal microscopy

The characterization was performed to assess the homogeneity of phage solution within the microparticles and stability. Before encapsulation, the UFV-AREG1 phage was labeled with fluorescein isothiocyanate, fluorescence emitted at 488 nm (FITC, Sigma-Aldrich, USA). The UFV-AREG1 bacteriophage was labeled with isothiocyanate using the procedure described by Bakhshayeshi and co-workers with modifications [22]. Briefly, 1.2 ml of phage suspension in concentration of 10⁶ PFU·mL⁻¹ in 0.1 M borate buffer pH 9.2 was mixed with 0.021 g of FITC and 5 mL of N,N-dimethylmethanamide (also known as dimethylformamide or DMF - Sigma-Aldrich, USA). The resulting mixture was left overnight at 4 °C. Dialysis of the mixture was carried out to remove excess of fluorophore. The buffer was changed every four hours.

Next, the same phage sample was encapsulated per the methodology described in Section 2.4 and visualized by confocal microscopy (Confocal Microscope - LSM 510 Meta Laser Scanning - Zeiss, Germany) at the Núcleo de Microscopia e Microanálise, Universidade Federal de Viçosa. Through fluorescence radiation of the marked phages the homogeneity of the distribution of the phage around the microcapsules was verified.

2.7. Application of Ca-alginate microcapsules in a propyleneglycol gel and antimicrobial evaluation

The gel was prepared using the following ingredients: 2 % (w/v) hydroxymethyl cellulose (Mapric, Brazil); 5 % (w/v) propylene glycol (Mapric, Brazil); 0.1 % (w/v) EDTA (Mapric, Brazil); 0.2 % (w/v) methylparaben (Mapric, Brazil). The volume was completed to 100% with deionized water. With the water under heating and stirring the hydroxymethyl cellulose was sprayed, then propyleneglycol, EDTA, and methyl paraben

were added. The system was kept under stirring until a temperature of 70 °C. After reaching that temperature, the heat was turned off. Under stirring, the microtube (1.5 mL) containing alginate microcapsules with phage, was added and mixed in solution. The solution was stored in appropriate containers for further use. Alcohol Gel 70 % purchased commercially was also used as an antimicrobial in comparison to the manufactured gel and a control surface containing only bacteria, without the use of antimicrobials.

To evaluate the stability of the microcapsules in the gel, to a tube containing 1.0 mL of gel with microcapsules, more phage was added to 4.0 mL of MBS solution for total dissolution and release of phage. From this stock solution, 1.0 mL was transferred to a tube containing 4.0 mL of SM buffer, proceeding to serial dilution.

To evaluate the antimicrobial efficiency of the gel with microcapsules, alcohol gel and surface control, microbiological analyses were performed in vitro using *E. coli* O157:H7. The pre-activated bacteria at a concentration of 10^4 CFU· mL⁻¹ were added to a previously sterilized laboratory bench area divided into three parts, allowing the bacteria to act for 20 min, which is the average generation time of *E. coli*. Next, to first part gel with microcapsules was applied, to the second part alcohol gel 70 %, and to the third nothing was applied.

The swab technique is considered a standard methodology for microbiological analysis by the American Public Health Association (APHA). The swab technique is used to evaluate surfaces and handlers' hands in the food industry. Sterilized swabs were moistened in tubes containing 10 mL of 0.85 % saline solution and rubbed over the analyzed areas. After collection, the part touching the swab shaft was broken on the inside of the tube edge, plunging the swab with material collected into saline 0.85 %. This was homogenized and decimal dilutions proceeded. The diluent was then analyzed by 0.1 mL aliquots plated on agar plates in EMB (Eosin Methylene Blue – Himedia, India) selective for *E. coli*. The EMB plates were incubated at $37 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}/24 - 48 \text{ h}$. The results were expressed as CFU/unit. The control surfaces without the use of antimicrobial agents were also assessed.

2.8. Statistical analysis

For alginate-Ca matrix, a completely randomized design was adopted with three replications. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) with F test. When there was a significant difference in the F test at 5 % probability, the Tukey test was applied. The results were evaluated using the Minitab 16® program.

3. Results and discussion

3.1. Dynamic light scattering (DLS)

Dynamic light scattering was used to characterize the phage particles. The average diameter of the particles was 107 ± 1 nm by the linear adjustment of a graph $\bar{\Gamma}$ versus q^2 (Fig. S1). This result was confirmed by transmission electronic microscopy (Fig. 2), which showed the icosahedral head (114 by 86 nm) and contractile tail (117 by 23 nm) of the bacteriophage. These morphological parameters allowed the UFV-AREG1 phage to be included in the Caudovirales order and Myoviridae family [19].

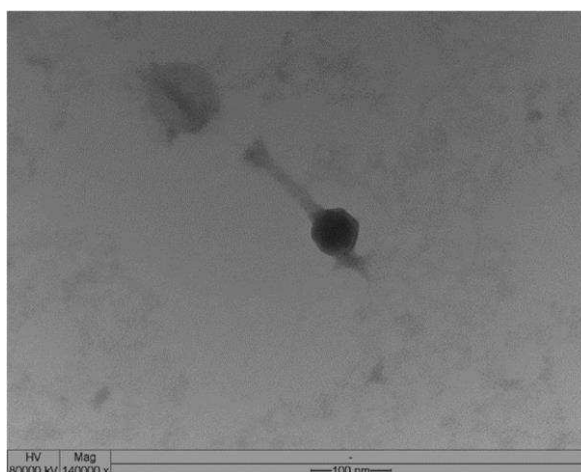


Fig. 2. Electron micrograph of phage UFV-AREG1.

3.2. Microfluidic device and production of alginate-Ca microcapsules

The size of the microcapsules was determined using the ImageJ program. The side of the square should have the same length as the diameter. We did this for several drops and obtained the mean value of the diameter and the standard deviation of the same. The average diameter of the alginate-Ca microcapsules ranged from 100 to 250 μm (Fig. 3). By statistical data, the size of the alginate particles of Fig. 3G was calculated, where about 40 particles were analyzed corresponding to a diameter of 251 μm with a standard deviation of 24.3 % (Fig. 4), showing that the system is not homogeneous, because the distribution of the particles is relatively wide as a consequence of the coalescence before the contact with the Ca^{+2} , because in the production the sizes are quite regular.. However, according to their size, the capsules are classified as nanoparticles or microparticles, ranging from (0.01-0.2) nm and (1–100) μm [23], and our microcapsules are in the order of micrometers and can be considered satisfactory for applications in antimicrobial gels, in which the microcapsules are added and homogenized in the solution in an unnoticeable

visibility. As the gel is for cleaning the hands/surfaces, larger microcapsules can generate a sensation that would be unpleasant on the hands of manipulators, for example.

Encapsulation using microfluidic devices allows the production of low polydisperse emulsions in this work, which are formed by a controlled flow. The device and the formation of the capsules can be observed in Fig. 3 (A - G). By optical microscopy it was possible to observe the droplet formation coming out of constriction, with a circular shape and with homogeneous diameters in a flow of $50 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ of the dispersed phase and $1000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ of the continuous phase; however, by the end of the capillary to be collected droplets have undergone coalescence and increased in size. This justifies the size variation when falling into the CaCl_2 solution. Preliminary tests were performed to achieve the appropriate flow combination. In higher flow rates of the dispersed phase ($200 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ and $1500 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively) there is the formation of larger microcapsules, as shown in Fig. 3 (E-G). Variations in flow rates demonstrate that there can be difference in the average diameter of the droplets.

The droplets of sodium alginate were collected in a 0.1 M solution of CaCl_2 (Fig. 1D), forming the calcium alginate microcapsules containing the microencapsulated bacteriophage. Once in contact with the chloride ions in solution, the capsules did not remain in a homogeneous size and, due to the impact of the fall, the capsules suffered a small deformation (Figs. 3D–G). The distance from the outlet capillary to the collection of drops in CaCl_2 solution may have caused the deformation and the size difference of the microcapsule, because the drops in the capillary outlet pooled, and then fell into the chloride solution.

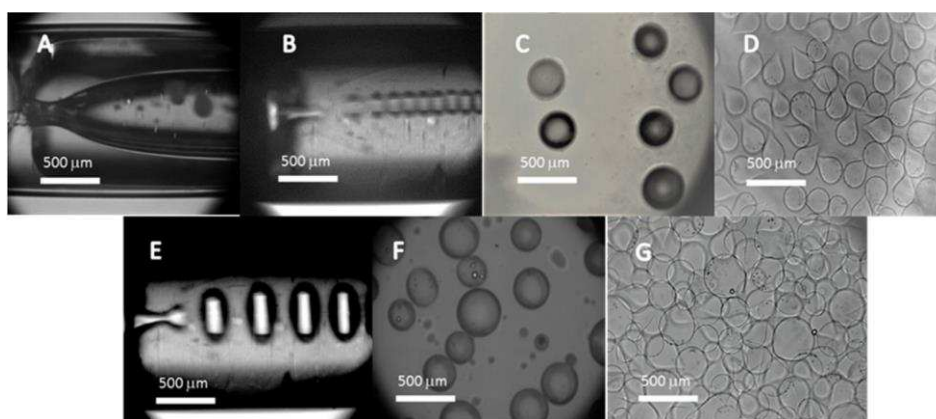


Fig. 3. – Microfluidic device and production of microcapsules with a flow rate of ($50 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ - $200 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) and ($1000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ - $1500 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) for the dispersed and continuous phase, respectively. (A) device; (B) and (E) droplet formation in the constriction; (C) and (F) formed droplets alginate-Na with phage before contact with the CaCl_2 solution; and (D) and (G) alginate-Ca microcapsules containing the phage after contact with the CaCl_2 solution.

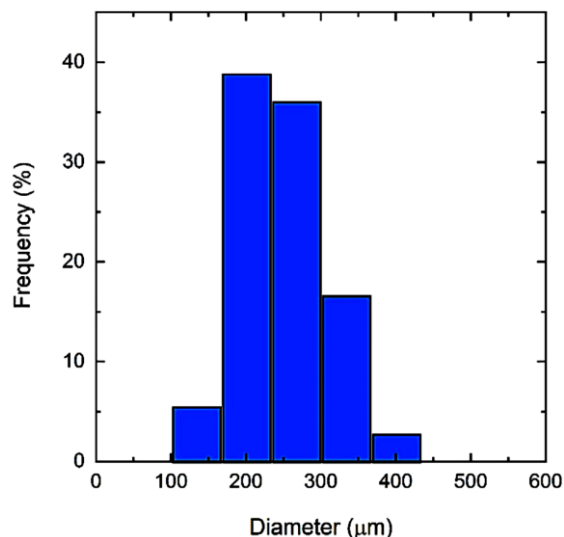


Fig. 4. Size distribution for the alginate microcapsules of Fig. 3G.

Hu and co-workers report in their work that several types of alginate microgels, such as hemi-spherical, mushroom-like, disk-like, and red blood cell-like, among others, were prepared by adjusting the flow rate of the microfluidics and the gelation conditions. Besides flow rate, a unique external ionic crosslinking (gelation bath) was designed. The morphology of the microgel can be finely tuned continuously by simply varying the gelation conditions. A key advantage of this procedure for preparing microgels is that the morphology of the alginate microgels can be tuned continuously by simply changing height, as can the viscosity of the gelation bath by varying the content of glycerol and owing to the interplay between the viscous and elastic forces during the subsequent gelation process [24].

Hu and co-workers employed simple capillary devices to evaluate the effect of flow rate and the impact on the formation of alginate-Ca capsules, which formed nonspherical microcapsules after falling into the surfactant solution. This morphology is influenced by the contact speed, the droplet size and the concentration of the alginate solution. They concluded that depending on the concentration of the alginate solution, the droplets presented different rheological properties and thus showed different morphologies [25].

C.-H. Yeh [26] using T junction microfluidic devices established flow rates of $0.05 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ for the dispersed and continuous phase, respectively, in the microencapsulation of nanoparticles in an alginate matrix, producing emulsions of $200 \pm 10 \text{ } \mu\text{m}$ diameter homogeneously distributed and they verified that increasing sample flow rate (under fixed oil flow rate) contributes to an increase in the emulsion sizes and that increasing oil flow rates leads to a decrease in the emulsion sizes. The work

developed by Nisisako and contributors [27], also in a T junction device, produced droplets of 100 μm , increasing the flow rate of the continuous phase. Increasing the flow of the continuous phase the droplet size diminished. Changes in the flow rate also established the number of droplets produced by the device. Maintaining the dispersed phase flow constant and varying the continuous phase flow, a higher or lower production of droplets was obtained. These authors showed that the droplet production rate is a function of the flow of the continuous phase and, consequently, the production rate can be linearly increased.

Huang and contributors [28] proposed an in situ method of alginate microcapsule production of controlled diameter, which can be an intelligent delivery system. The method resulted in two different diameters of alginate microcapsule produced and separated in microfluidic devices. The particles showed relative size homogeneity. They also noted that in both particles the size could be changed. Their results showed that the size droplets are equivalent to the channel diameter and can be adjusted by varying the flow speed of the continuous phase in relation to the dispersed phase. Since the separation efficiency is high in this system, both droplet sizes have low polydispersity and have elevated reproductivity. Ren and contributors [29] also developed a microfluidic device to produce monodispersed alginate microcapsules with double emulsion for the encapsulation of pharmaceuticals and active chemical products. The average capsule diameter was 117 and 255 μm for the internal and external diameters, respectively.

Our work showed that there was variation of the particle size when they were collected in the CaCl_2 solution. The size can be influenced by the coalescence occurring at the end of the collection tube and the deformity by the height of the tube until the solution influenced by the rheological properties of the sample analyzed. The parameters and careful handling of the equipment need to be adjusted so that the formation of the alginate-Ca microcapsules maintains a low deformity and low size dispersion.

3.3. Retention Efficiency (RE)

The average initial concentration of the bacteriophage (expressed in $\text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) added to the solution of sodium alginate-Na, before injecting into the microfluidic device, was $2.0 \times 10^6 \text{ PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$. The final concentration of the phage retained in the capsules was $1.4 \times 10^5 \text{ PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$. Therefore, the retention efficiency using the microfluidic device to encapsulate the UFV-AREG1 in the calcium alginate microcapsules was $(82.1 \pm 2) \%$. Huang and co-workers proposed a device to microencapsulate chondrocyte cells, showing

efficiency of (94 ± 2) % viability of the cell after encapsulation. The device was capable of producing alginate microspheres or microencapsulating in a simple, continuous, controllable and homogeneous way, showing less contamination [30].

Liu and co-workers, using a microfluidic device to produce double emulsion of calcium alginate microcapsule, obtained a diameter of 323 μm and 227 μm for the external and internal emulsions, respectively. The same authors used bovine serum albumin protein as a model to encapsulate, and they obtained positive results for the encapsulation, determining that the methodology is viable for the encapsulation and to carry drugs and active chemical products [31].

In another study using flow-focusing microfluidic devices to microencapsulate ascorbic acid in solid lipidic microcapsules to develop fortified foods, the retention efficiency in the lipidic matrix ranged from (74 to 96 %) per the initial composition on the matrix. The results showed a huge potential for microencapsulation to avoid ascorbic acid degradation in food products and, furthermore, can mask the acidic flavor of the compound [32].

Biocontrol using bacteriophages is a promising method with advantages compared to other methods. The phage is self-limiting, that is, it replicates only in the presence of the bacterium to which it has affinity; it also does not act in the selection of resistant microorganisms, can be administered in a single dose, is easy to use, is safe for humans, plants and animals, and phages are ubiquitous and diverse. However, bacteriophages can recover the replication in conditions of temperature abuse, or even exhibit a passive activity that cause reductions without the need for the bacteriophage to replicate and complete their life cycle. The ratio of host cells and phages denominated as “multiplicity of infection (MOI)” appears to be of great relevance to the successful application of this technology. Thus, it would be necessary to have lower concentrations than for other antimicrobial agents [33, 34].

Bacteriophages fit into the classification of natural antimicrobials, and their effectiveness in controlling bacterial pathogens in the agro-food industry has led to the development of different phage products already approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the United States Department of Agriculture (USDA) [35].

For these issues mentioned earlier, the phages encapsulation is a technique with the possibility of reducing viral death during passage through the gastrointestinal tract, as well as an alternative to control the release of these particles, and microfluidic devices

have been shown to be efficient in the encapsulation of phages as well as other drugs, cells, food ingredients, etc.

3.4. Confocal microscopy

By the confocal microscopy technique, the bacteriophages were observed in the interior of microcapsules in a homogeneous way, due to the presence of isothiocyanate (FITC) used to mark the phages. The results are demonstrated in Fig. 5. The high dispersion of sizes may have been caused by the presence of the phage favoring coalescence.

As shown in Fig. 5, the labeling phage was present inside the microcapsules. These results show that the scanning confocal microscopy technique was efficient in demonstrating the presence of the phages. The retention efficiency test was also applied to the microcapsules with the labeled phage to confirm the results of microscopy. The marking methodology was proposed by Gitis and co-workers [36] and reproduced by Bakhshayeshi and contributors [22]. In both works, the conclusion was that the bacteriophages were marked in free amino groups on the lysine amino acid residues of their capsid proteins, using FITC or another coloring agent. Thus, this technique has a wide range of viruses for application, including mammal viruses and bacteriophages, due to the presence of the lysine amino acid in the capsid of these groups, allowing viral particles with different dimensions, shapes and physicochemical properties to be studied [22].

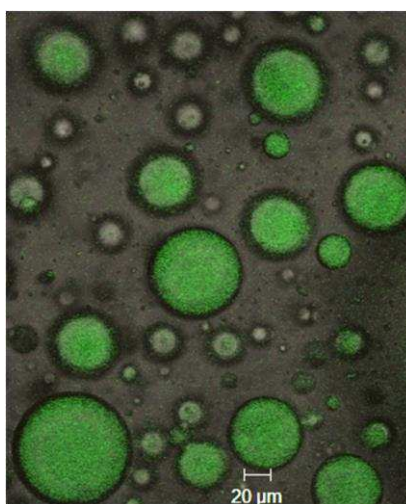


Fig. 5. Scanning confocal microscopy of the alginate-Ca microcapsules containing the bacteriophages labeled by fluorescence. 200X magnification and fluorescence at 488 nm excitation.

3.5. Stability of microcapsules in the propylene glycol gel and antimicrobial activity

The microcapsule stability results are presented in Table 1. For 21 days of storage at room temperature, the bacteriophages retained in the alginate microcapsules added to the gel remained viable, with no statistically different results from the control solution (alginate-Na 1.5 % before injecting into the microfluidic device added to 10^6 PFU·mL⁻¹ solution of bacteriophages). This initial solution was used to produce the alginate-Ca microcapsules containing the bacteriophages and, after encapsulation, the capsules were added to the propylene glycol gel. The results demonstrate that the phages added in the alginate-Na solution were encapsulated in the alginate-Ca microcapsules and remained stable for 21 days after the microcapsules were added to the propylene glycol gel. This demonstrates that alginate is a good polymer to be used in encapsulation processes of materials, not affecting the stability and viability of the encapsulated material. Furthermore, the alginate can be added to other polymer-based gels that are very stable, without affecting the structure of the alginate. The gel form presents as a stable suspension, being quite suitable for formulations of topical use. Gels are indicated for the delivery of water-soluble active substances and liposomes. They are most used in oily and mixed skins [37-39].

Table 1

Stability of the control alginate-Na before injecting into the microfluidic device added to the bacteriophage solution (A1) and of the alginate-Ca microcapsules containing the phages (A2) added to the propylene glycol gel during 21 days of storage at room temperature.

Bacteriophage concentration (Log PFU·mL ⁻¹)				
Samples	1 day	7 days	14 days	21 days
A1	7.00	7.20	7.48	7.54
A2	6.00	6.18	6.48	6.54

Using the bacteriophages in the polymeric matrix of calcium alginate and agar-agar to immobilize phages specific for *Pseudomonas aeruginosa*, Balcão and co-workers [40] demonstrated the maintenance of lytic viability of the viral particles after immobilization in the biopolymeric matrix, confirmed by the presence of lysis plaques in the bacterial growth medium. The authors produced the gel without any encapsulation device. Tang and co-workers [41] used alginate microspheres coated with whey protein

for preparation of a dry powder containing the K bacteriophage for oral administration to remain viable until the intestine. Their study showed that the encapsulated phage remained viable in simulated gastric fluid at pH 2.5 after 2 hours of incubation. The encapsulated phage was completely released in the simulated intestinal juice within 2 hours. They concluded that the microspheres could be a vehicle to transport the K bacteriophage by oral administration to control *Staphylococcus aureus*. Therefore, encapsulation, as demonstrated in our work, protects the viral particles, makes them stable and viable for various applications in the food industry.

The antimicrobial activity of the microencapsulated bacteriophages added to propylene glycol gel showed efficiency (not detectable on the surface) when applied to surfaces contaminated with *E. coli* O157:H7. The antimicrobial efficiency results were compared to an alcohol solution 70 % applied to the same surface (not detectable in surface). Another surface without the application of any antimicrobial agents was used to compare the results. The bacterial growth on the surface without the application of antimicrobial agents was 4.92 log. It was observed that between the propylene glycol gel and the alcohol 70 % there was no statistical difference in the antibacterial activity. Comparing with the control surface, the propylene glycol gel and the alcohol 70 % were effective in sanitizing the surfaces. The initial inoculation of the surface was 10^4 CFU·mL⁻¹.

Using bacteriophages as antimicrobial agents in relation to other chemicals in the hygienization process of chicken skin contaminated with *Salmonella* sp., Hungaro et al. [42] observed that both bacteriophages and chemicals were efficient in reducing bacterial contamination. In that study, the phages were in solution and later sprayed over the chicken skin surface. Using cellulose acetate film incorporated with bacteriophages as an application in food packing, Gouvêa and co-workers [7] observed the antibacterial effect of the film containing the phages specific for *Salmonella typhimurium* in liquid medium and diffusion in solid medium, inhibiting bacterial growth. Bacteriophages incorporated in whey protein films applied in liquid medium and on food surfaces were released in the medium, causing antimicrobial effect after 6 h. The liberation was efficient both in liquid medium and on food surfaces [6].

In our work, we can observe that the microencapsulated active principle (phage) remained stable during the 21 days of analysis of the gel; lytic activity of phage proved to be efficient after the application of the gel to the surface; and the microcapsules were ruptured via rubbing the gel, releasing phage to infect the bacterial cell. The

bacteriophage, being an organic antimicrobial agent, shows different behavior from a chemical antimicrobial. As a virus, it needs the host to replicate, and therefore it must initially find the host in the environment, then infecting it and causing bacterial lysis (host death). Thus, the time of action of the bacteriophage is more dynamic. The chemical antimicrobial agent acts on the host immediately, eliminating it, but if there is a new infection, the antimicrobial chemical does not continue to act. In the case of bacteriophage the process is better because it finds the host, infects it, replicates itself, causes lysis and releases new phage particles into the medium, restarting a new cycle. Within 24 h the multiplication process is still occurring because new virus particles are still being released to infect the host. Where the host is present, the bacteriophage is also able to restart a new cycle of replication and cell lysis.

4. Conclusion

The UFV-AREG1 bacteriophage was encapsulated in the calcium alginate matrix by the microfluidic technique using the capillary device with a retention efficiency close to 90 % of viral capsules in the capsules. The encapsulation was confirmed by confocal microscopy. Thereby, the capsules were applied in a propylene glycol gel, in which the bacteriophage remained viable for the 21 days of analysis. The antimicrobial gel application on contaminated surfaces was efficient to reduce bacterial contamination in relation to an antimicrobial chemical agent. Hence, it was possible to microencapsulate the phages in the alginate-Ca matrix and apply the capsules to antimicrobial gels to use as sanitizers in the food industry.

Acknowledgements

The research group thanks the Nucleus of Microscopy and Microanalysis (NMM) of the Federal University of Viçosa (UFV) for the images. They are also grateful to the Laboratory of Microfluidic and Complex Fluids (LMFFC) of the Department of Physics of UFV for the space, equipment and other contributions and to the Brazilian research agency (FAPEMIG) for financial support in the project number APQ02232-12. No member of the group has any conflict of interest.

References

[1] J.P. Kerry, M.N. O'Grady, S.A. Hogan, Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review, *Meat Science*, 74 (2006) 113-130.

- [2] M. Ahmad, S. Benjakul, T. Prodpran, T.W. Agustini, Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils, *Food Hydrocolloids*, 28 (2012) 189-199.
- [3] G. Lopez-Velasco, A. Tomas-Callejas, A.O. Sbodio, X. Pham, P. Wei, D. Diribsa, T.V. Suslow, Factors affecting cell population density during enrichment and subsequent molecular detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce contaminated during field production, *Food Control*, 54 (2015) 165-175.
- [4] S.S. Shekarforoush, S. Basiri, H. Ebrahimnejad, S. Hosseinzadeh, Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat, *International Journal of Biological Macromolecules*, 76 (2015) 303-309.
- [5] J. Tsonos, D. Vandenheuvel, Y. Briers, H. De Greve, J.-P. Hernalsteens, R. Lavigne, Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters, *Veterinary Microbiology*, 171 (2014) 460-469.
- [6] E. Vonasek, P. Le, N. Nitin, Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release, *Food Hydrocolloids*, 37 (2014) 7-13.
- [7] D.M. Gouvêa, R.C.S. Mendonça, M.L. Soto, R.S. Cruz, Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging, *LWT - Food Science and Technology*, 63 (2015) 85-91.
- [8] A. Choińska-Pulit, P. Miłucha, P. Śliwka, W. Łaba, A. Skaradzińska, Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications, *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2015) 212-221.
- [9] C.-X. Zhao, Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 1420-1446.
- [10] J.N. Schianti, N.N.P. Cerize, A.M. Oliveira, S. Derenzo, M.R. Góngora-Rubio, Scaling up of Rifampicin Nanoprecipitation Process in Microfluidic Devices, *Progress in Nanotechnology and Nanomaterials* 2(2013) 101-107.
- [11] M.J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*, Second Edition, Taylor & Francis 2002.
- [12] A.S. Utada, E. Lorenceau, D.R. Link, P.D. Kaplan, H.A. Stone, D.A. Weitz, Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device, *Science*, 308 (2005) 537-541.
- [13] N.E. Simpson, C.L. Stabler, C.P. Simpson, A. Sambanis, I. Constantinidis, The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 cells, *Biomaterials*, 25 (2004) 2603-2610.

- [14] V. Nedovic, A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic, B. Bugarski, An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science*, 1 (2011) 1806-1815.
- [15] S. Martins, B. Sarmiento, E.B. Souto, D.C. Ferreira, Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile, *Carbohydrate Polymers*, 69 (2007) 725-731.
- [16] G. Lawrie, I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks, L. Grøndahl, Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 2533-2541.
- [17] W.R. Gombotz, S. Wee, Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31 (1998) 267-285.
- [18] M. Liu, X.-T. Sun, C.-G. Yang, Z.-R. Xu, On-chip preparation of calcium alginate particles based on droplet templates formed by using a centrifugal microfluidic technique, *Journal of Colloid and Interface Science*, 466 (2016) 20-27.
- [19] M.E.S. Lopez, L.S. Batalha, P.M.P. Vidigal, L.A.A. Albino, D.M.G. Boggione, M.T.P. Gontijo, D.M.S. Bazolli, R.C.S. Mendonça, *Escherichia* phage UFV-AREG1, complete genome, GenBank, 2016.
- [20] X.D. Liu, W.Y. Yu, Y. Zhang, W.M. Xue, W.T. Yu, Y. Xiong, X.J. Ma, Y. Chen, Q. Yuan, Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources, *Journal of Microencapsulation*, 19 (2002) 775-782.
- [21] C. Gomes, R.G. Moreira, E. Castell-Perez, Microencapsulated antimicrobial compounds as a means to enhance electron beam irradiation treatment for inactivation of pathogens on fresh spinach leaves, *J Food Sci*, 76 (2011) E479-488.
- [22] M. Bakhshayeshi, N. Jackson, R. Kuriyel, A. Mehta, R. van Reis, A.L. Zydney, Use of confocal scanning laser microscopy to study virus retention during virus filtration, *Journal of Membrane Science*, 379 (2011) 260-267.
- [23] A.N. Martin, P. Bustamante, *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, Lea & Febiger 1993.
- [24] Y. Hu, Q. Wang, J. Wang, J. Zhu, H. Wang, Y. Yang, Shape controllable microgel particles prepared by microfluidic combining external ionic crosslinking, *Biomicrofluidics*, 6 (2012) 026502-026502-026509.

- [25] Y. Hu, G. Azadi, A.M. Ardekani, Microfluidic fabrication of shape-tunable alginate microgels: effect of size and impact velocity, *Carbohydr Polym*, 120 (2015) 38-45.
- [26] C.-H. Yeh, Q. Zhao, S.-J. Lee, Y.-C. Lin, Using a T-junction microfluidic chip for monodisperse calcium alginate microparticles and encapsulation of nanoparticles, *Sensors and Actuators A: Physical*, 151 (2009) 231-236.
- [27] T. Nisisako, T. Torii, T. Higuchi, Droplet formation in a microchannel network, *Lab on a Chip*, 2 (2002) 24-26.
- [28] K.-S. Huang, Y.-S. Lin, C.-H. Yang, C.-W. Tsai, M.-Y. Hsu, In situ synthesis of twin monodispersed alginate microparticles, *Soft Matter*, 7 (2011) 6713-6718.
- [29] P.-W. Ren, X.-J. Ju, R. Xie, L.-Y. Chu, Monodisperse alginate microcapsules with oil core generated from a microfluidic device, *Journal of Colloid and Interface Science*, 343 (2010) 392-395.
- [30] S.-B. Huang, M.-H. Wu, G.-B. Lee, Microfluidic device utilizing pneumatic microvibrators to generate alginate microbeads for microencapsulation of cells, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147 (2010) 755-764.
- [31] L. Liu, F. Wu, X.-J. Ju, R. Xie, W. Wang, C.H. Niu, L.-Y. Chu, Preparation of monodisperse calcium alginate microcapsules via internal gelation in microfluidic-generated double emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 404 (2013) 85-90.
- [32] T.A. Comunian, A. Abbaspourrad, C.S. Favaro-Trindade, D.A. Weitz, Fabrication of solid lipid microcapsules containing ascorbic acid using a microfluidic technique, *Food Chemistry*, 152 (2014) 271-275.
- [33] M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Humana Press 2009.
- [34] D.M. Knipe, P. Howley, *Fields Virology*, Wolters Kluwer Health, 2013.
- [35] S.M. Sillankorva, H. Oliveira, J. Azeredo, *Bacteriophages and Their Role in Food Safety*, *International Journal of Microbiology*, 2012 (2012) 13.
- [36] V. Gitis, A. Adin, A. Nasser, J. Gun, O. Lev, Fluorescent dye labeled bacteriophages—a new tracer for the investigation of viral transport in porous media: 1. Introduction and characterization, *Water Research*, 36 (2002) 4227-4234.
- [37] G. Leonardi, P. Maia Campos, Estabilidade de formulações cosméticas, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 3 (2001) 154-156.
- [38] G.R. Leonardi, L. Matheus, *Cosmetologia aplicada*, São Paulo (SP): Medfarma, (2004).

- [39] N.M. Corrêa, F.B.C. Júnior, R.F. Ignácio, G.R. Leonardi, Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41 (2005).
- [40] V.M. Balcão, A.R. Moreira, C.G. Moutinho, M.V. Chaud, M. Tubino, M.M.D.C. Vila, Structural and functional stabilization of phage particles in carbohydrate matrices for bacterial biosensing, *Enzyme and Microbial Technology*, 53 (2013) 55-69.
- [41] Z. Tang, X. Huang, P.M. Sabour, J.R. Chambers, Q. Wang, Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration, *LWT - Food Science and Technology*, 60 (2015) 263-270.
- [42] H.M. Hungaro, R.C.S. Mendonça, D.M. Gouvêa, M.C.D. Vanetti, C.L.d.O. Pinto, Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents, *Food Research International*, 52 (2013) 75-81.

Material Suplementar

A Figura S1 mostra o resultado do espalhamento de luz dinâmico para a solução do bacteriófago UFV-AREG1 em tampão SM. O espalhamento foi utilizado para determinar o raio hidrodinâmico médio (RH) e a largura da distribuição de tamanho das partículas virais.

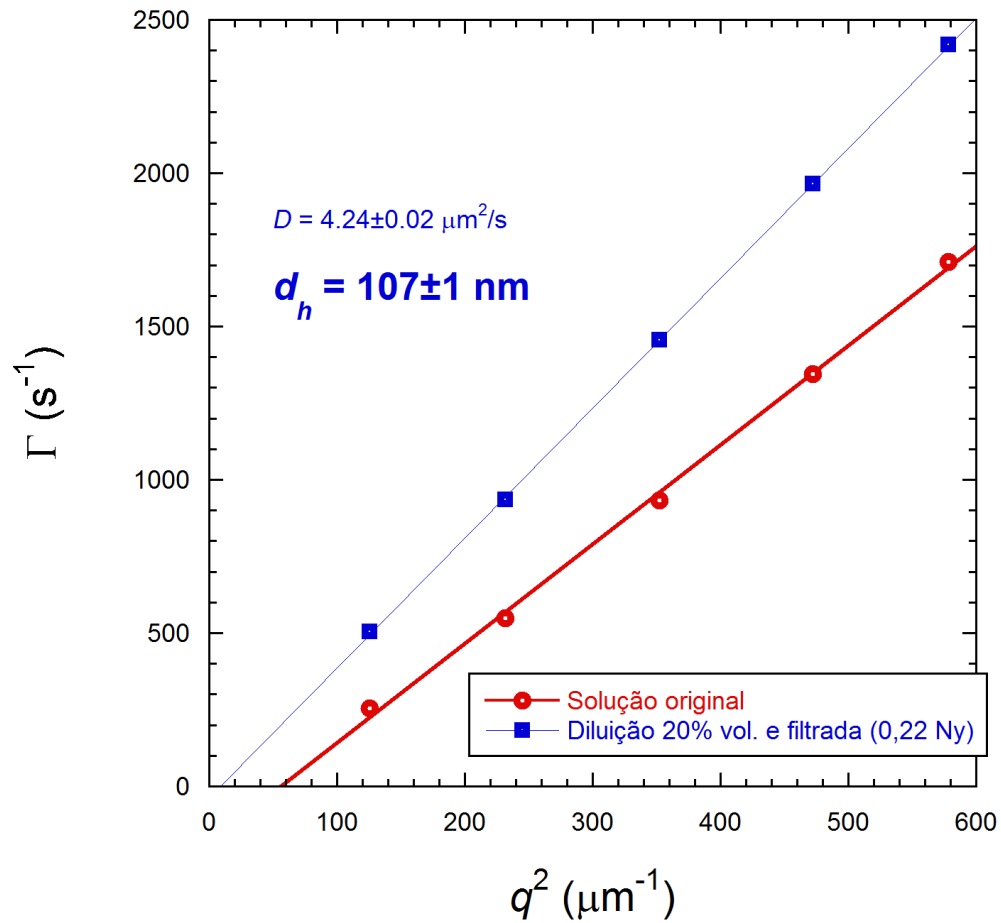


Figura S1 – Gráfico de $\bar{\Gamma}$ versus q^2 da solução de fago em tampão SM.

5. Capítulo II

Imobilização do bacteriófago UFV-AREG1 em nanotubos de carbono de paredes múltiplas e sua aplicação como nanobiosensor

Resumo

A bactéria *Escherichia coli* O157:H7 é um importante patógeno veiculado por alimentos, podendo causar graves infecções intestinais em pacientes. Uma alternativa tanto para sua detecção quanto para o tratamento é o uso de bacteriófagos. Este estudo propõe o biocontrole utilizando o bacteriófago UFV-AREG1, específico para *E. coli* O157:H7, testando sua estabilidade em nanotubos de carbono (CNTs) e sua aplicação como nanobiosensor para detecção dessa bactéria. Para isso, a imobilização do fago no MWCNT foi realizada via delineamento experimental Box-Behnken, sendo as melhores condições 0,01 g de CNT, 32,5 °C e 2 min de agitação. Soluções de fago-CNT foram armazenados a 4 °C e analisados em intervalos de 1, 7, 14 e 21 dias para determinar a estabilidade do fago. Não houve alteração na quantidade de vírus viáveis nos CNTs, os quais inibiram a bactéria gerando áreas de inibição de $2.955 \pm 294 \text{ cm}^2$. Logo após um circuito eletrônico foi montado para medir a resistividade na amostra analisada quando o fago-CNT entra em contato com a bactéria. Houve uma variação na resistividade após 40 min de análise quando o fago completou seu ciclo e lisou a célula bacteriana, o que gerou a diferença de tensão (0,4 V), o que não ocorreu quando o meio não tinha a bactéria nem fago-CNT, quando o meio foi analisado na presença de outra bactéria (*Pseudomonas aeruginosa* + fago-CNT) e quando no meio havia presença apenas de fago-CNT (sem a bactéria). Portanto, a técnica usada para estabilizar o bacteriófago UFV-AREG1 em CNT foi efetiva, bem como a sua aplicação como nanobiosensor na detecção de *E. coli* O157:H7.

Palavras-chave: *E. coli* O157:H7, Bacteriófago, MWCNT, Nanobiosensor.

1. Introdução

É crescente o esforço de setores do governo, da indústria e de acadêmicos para garantir cada vez mais que a cadeia de produtos alimentícios forneça alimentos seguros. Estratégias preventivas na forma de diversos documentos e normas de orientação foram estabelecidos ao longo da última década. No entanto, doenças transmitidas por alimentos

contaminados com patógenos conhecidos continuam a ser consideravelmente uma grande preocupação em casos de saúde individual, social e econômico [1, 2].

Testes microbianos têm sido tradicionalmente feitos na indústria de alimentos para estabelecer o limite aceitável de um agente patogênico e suas toxinas, bem como para cumprir os limites microbiológicos gerais de qualidade e uma correlação antecipada para a estabilidade de vida útil e segurança. Além disso, a vigilância e monitoramento em níveis de produção primária requerem aplicação de métodos de rastreio para determinar a presença e até mesmo quantificar os patógenos em amostras de alimentos [1, 3].

O desenvolvimento de um método rápido, sensível e específico para a detecção de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos é de grande importância para garantir a segurança alimentar. A evolução e aplicação de bio e nanosensores para a detecção de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos vêm crescendo e, particularmente, as novas tendências nos últimos anos vêm incluindo novos elementos específicos de bio-reconhecimento como bacteriófagos e lecitina, a utilização de nanomateriais entre outras técnicas [4].

Os bacteriófagos têm um grande potencial para o uso como agentes de biocontrole em alimentos devido a uma série de propriedades, tais como especificidade para procaríotos alvo, incapacidade de infectar células eucariotas, capacidade de auto replicação e onipresença na natureza, o que os torna excelentes ferramentas para fins de segurança alimentar [5-7]. Além disso, os bacteriófagos podem ser utilizados como componentes biológicos de sensores, naturalmente imobilizados ou geneticamente modificados para emissão de sinal indicativo da molécula de interesse.

Os nanomateriais possuem dimensões inferiores a 100 nm. Reduções do tamanho possibilita uma área superficial maior e, conseqüentemente, aumenta-se a capacidade de construir dispositivos multifuncionais com uma pequena área da seção transversal. O aumento da área superficial também possibilita uma intensificação do sinal pretendido com a molécula de interesse utilizada [8].

Dentre os nanomateriais utilizados nas pesquisas estão os nanotubos de carbono (CNTs). Os CNTs têm diversas aplicações devido às suas propriedades únicas. Dentre essas aplicações podemos citar: adsorventes de metais pesados em efluentes; remoção de gases prejudiciais ao ambiente; e uso biotecnológico como, por exemplo, biossensores [9-12].

CNTs já são usados na interação superficial com biomoléculas (proteínas, peptídeos e nucleotídeos) [8]. Essa interação se estende aos bacteriófagos, que têm sido

utilizados em sensores e dispositivos fotovoltaicos à base de nanotubos de carbono e, mais recentemente bacteriófagos ligados aos CNTs, afim de melhorar o desempenho para a utilização como um potencial produto curativo [8, 13-15].

O bacteriófago UFV-AREG1 foi isolado a partir de águas residuais de estábulo, mostrando especificidade para *Escherichia coli* O157: H7 (CDC EDL-933), *E. coli* O111 (CDC O11ab) e *E. coli* (ATCC 23229). Bacteriófago UFV-AREG1 pode atingir concentrações acima de 10^{12} PFU/mL em condições de laboratório quando o hospedeiro é a *E. coli* O157: H7 [16].

Nosso trabalho, teve como objetivo imobilizar o bacteriófago UFV-AREG1 em nanotubos de carbono de paredes múltiplas para posterior construção de um nanobiosensor para detecção de *E. coli* O157:H7.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material e micro-organismos

O bacteriófago utilizado foi o UFV-AREG1, específico para *E. coli* O157:H7, foi obtido do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A bactéria *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 foi adquirida do banco de culturas da Fiocruz. O nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, chamado aqui apenas de CNT) foram obtidos do Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os meios microbiológicos utilizados no estudo foram o Brain Heart Infusion (BHI) caldo, Agar Bacteriológico e Agar Muller Hinton adquiridos da Himedia (Índia).

2.2. Potencial zeta

Para identificar qual o melhor procedimento de interação entre o fago e o CNT e definir os melhores parâmetros para o delineamento experimental foi realizada a medida do potencial Zeta da solução do fago e do CNT (Nano Zetasizer, Malvern Instruments, UK). O fago e o CNT encontravam-se em tampão SM ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl [pH 7,5], $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 % gelatina). O frasco contendo somente o CNT foi colocado em ultrassom por 5 min para melhor dispersão e suspensão das partículas de nanotubo no meio. As amostras (fago e CNT) a $25 \pm 0,1$ °C foram colocadas em um capilar descartável e o mesmo foi inserido no instrumento equipado com laser He/Ne 4mW. Utilizou-se, então, a técnica de microeletroforese por técnica de Doppler a

laser para a determinação do potencial Zeta. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

2.3. Interação fago-CNT

2.3.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental Box-Behnken foi utilizado para otimizar as melhores condições de interação fago-CNT, sendo escolhidos três fatores de interesse, combinados em níveis codificados pelos pontos da parte cúbica (± 1) com níveis do ponto central (0).

Foram estudadas as variáveis independentes: temperatura de secagem do fago com o nanotubo (28, 32,5 e 37 °C), tempo de agitação da solução fago/nanotubo (1, 2 e 3 min) e massa de nanotubo (0,01, 0,025 e 0,04 g), além de três pontos centrais, totalizando 15 ensaios (Tabela 1).

Após definição do potencial, foram adicionados em microtubos as massas nanotubo de carbono, adicionados 1,0 mL de solução de bacteriófago ($5,9 \times 10^{-9}$ PFU.mL⁻¹) e agitados em vortex por 2 min. Após agitação em vortex a dispersão foi centrifugada a 10.000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e a solução foi seca em estufa por 4 h. Após secagem os microtubos foram armazenados em geladeira a 4 °C para posterior análise antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 e teste de estabilidade.

Tabela 1 – Delineamento experimental Box-Behnken utilizado na avaliação da interação do bacteriófago UFV-AREG1 com o nanotubo em função dos fatores temperatura, tempo de agitação e massa de CNT.

Fatores			
Ensaios	Temperatura de secagem (°C)	Tempo de agitação (min)	Massa de CNT (g)
1	28	1	0,025
2	37	1	0,025
3	28	3	0,025
4	37	3	0,025
5	28	2	0,01
6	37	2	0,01
7	28	2	0,04
8	37	2	0,04
9	32,5	1	0,01
10	32,5	3	0,01
11	32,5	1	0,04
12	32,5	3	0,04
13	32,5	2	0,025
14	32,5	2	0,025
15	32,5	2	0,025

2.3.2. Avaliação da viabilidade dos fagos após interação com CNT

Para avaliar se houve a interação do fago com o CNT enumerou-se as placas de lise formadas após contato fago-CNT com a bactéria. Para isso, 200 µL de uma cultura pré-ativada de *E. coli* O157:H7 foi espalhada em ágar BHI, deixando-se secar. Foi adicionado ao microtubo fago-CNT (de cada tratamento) 1,0 mL de tampão SM e procedeu-se as diluições em série e adicionou-se 10 µL da alíquota da diluição na placa contendo a bactéria, pela técnica de microgotas. As análises foram realizadas em triplicata para determinar as unidades formadoras de placas por mL da amostra (PFU.mL⁻¹) e, assim, elucidar a taxa de adsorção do fago. As placas foram incubadas a 37 ° C por (18-24 h) e as placas de lise formadas foram contadas.

2.3.3. Análise estatística

O programa STATISTICA versão 10, copyright© StatSoft, Inc. (2011) foi utilizado para a análise estatística após a execução dos procedimentos e caracterização das amostras. Gráficos de superfície de resposta foram obtidos. Análises de variância (ANOVA) foram efetuadas para a variável resposta de cada superfície com os dados gerados de cada ensaio, em que p valores indicam os termos significativos em nível de significância de 10 %. Uma ferramenta de cálculo foi utilizada para identificar os níveis dos fatores estudados que minimizam e maximizam a resposta de interação do fago com o CNT. Para os testes de estabilidade e efeito antimicrobiano o teste de Tukey foi aplicado sobre as médias ao nível de significância de 5 %.

2.4. Análise da estabilidade

Os microtubos contendo soluções com fago-CNT foram armazenados a 4 °C durante 21 dias. Nos intervalos (1, 7, 14 e 21) dias, alíquotas da solução de fago-CNT foram analisadas para determinar a estabilidade do fago no nanotubo. Para isto, 200 µL de uma cultura pré-ativada de *E. coli* O157:H7 foi espalhada em ágar BHI, deixando-se secar. 10 µL da alíquota da diluição fago-CNT foram adicionados na placa contendo a bactéria, pela técnica de microgotas. As análises foram realizadas em triplicata. As placas foram incubadas a 37 ° C por (18-24 h) e as placas de lise formadas foram contadas.

2.5. Efeito antimicrobiano do fago-CNT

A capacidade antimicrobiana dos fagos-CNT foi verificada pelo método utilizado de análise em meio sólido sugerido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária [17] para teste rápido de sensibilidade *in vitro* de bactérias aeróbias e agentes antimicrobianos.

As análises foram feitas em três repetições e em duplicata. Placas contendo Ágar Mueller-Hinton (Himedia, Índia) foram previamente inoculadas com a cultura de *E. coli* por espalhamento. Círculos de 0,5 cm de diâmetro foram demarcados no meio e 0,01 g do fago-CNT, 0,01 g de CNT (sem o fago) e 10 µL da suspensão do fago ($2,6 \times 10^9$ PFU.mL⁻¹) foram depositados sobre estes círculos e as placas incubadas a 37 ± 2 °C por 24 h. O halo de inibição foi medido através da área de inibição formada medida pelo programa ImageJ.

2.6. Caracterização do fago-CNT por Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de fago-CNT foram colocadas em uma base de aço coberta com fita de carbono e as imagens obtidas foram registradas em arquivo digital. As análises foram feitas no centro de pesquisa da empresa VSB - Vallourec & Sumitomo Tubos do Brasil, Jeceaba/MG. Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV para caracterização da amostra fago-CNT. O modelo de MEV utilizado foi o INSPECT S50 da marca FEI, condição de medição: Campo horizontal máximo: 6.5 mm a distância de trabalho (WD) de 10 mm; e 11.3 mm a WD 25 mm; Tensão de aceleração 200 V – 30 kV; Corrente: até 2 µA, ajustável continuamente; Magnitude: 13 para 1.000.000.

2.7. Montagem do nanosenor

Segundo a Lei de Ohm [18], a corrente elétrica em um circuito é diretamente proporcional à tensão nele aplicada e inversamente proporcional à sua resistência, conforme mostrado na Equação 1.

$$I = \frac{V}{R} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde,

I = Corrente elétrica (A);

V = Tensão elétrica (V); e,

R = Resistência elétrica (Ω).

Já a resistência elétrica é em função da resistividade do meio e do seu volume, conforme mostrado na Equação 2.

$$R = \rho \frac{L}{A} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde,

L = Comprimento (m);

A = Área (m²); e,

ρ = Resistividade do meio ($\Omega \text{ m}$).

Assim, quando utilizamos uma fonte de alimentação para fazer circular uma corrente constante por um meio cujo volume não se altera, as variações de tensão sobre ele representarão mudanças diretamente proporcionais às alterações no valor da sua resistividade.

Esse conceito físico é a base para o sistema de medição do valor da resistividade da solução analisada pelo sensor.

O fago na concentração de 10^9 PFU.mL⁻¹ presente no nanotubo (fago-CNT) e a concentração de *E. coli* O157:H7 de 10^8 UFC.mL⁻¹, foram adicionados, em intervalos de tempo diferentes, em 10 mL de solução tampão SM (50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl [pH 7,5], 0,1 mol.L⁻¹ NaCl, 8 mmol.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0,01 % (m/v) gelatina) que estava colocado em uma placa de Petri. Antes de ser adicionado na placa, o microtubo contendo fago-CNT foi adicionado de 1,0 mL do mesmo tampão e logo após, adicionado na placa. Em seguida, 100 μL da bactéria pré-ativada foi adicionada ao tampão contendo o fago-CNT.

Procedeu-se, então, a leitura da amostra, em função da atuação do fago-CNT, mostrado na forma de diagrama de blocos na Figura 1. Já que a corrente na solução é constante, as variações de tensão sobre ela representam, em última instância, mudanças na sua resistividade oriundas da interação entre as bactérias e o fago-CNT.

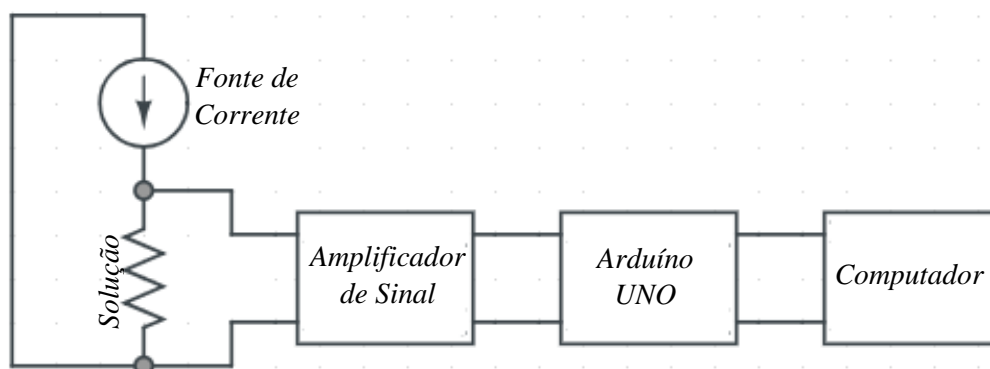


Figura 1 – Diagrama em blocos do sistema de medição da resistência elétrica da solução

O circuito completo do sensor de medição está na Figura 2, sendo que os valores dos seus componentes estão na Tabela 2. Para minimizar os efeitos de carregamento desse sensor no meio, foi utilizado um amplificador operacional de alta impedância de entrada na configuração *buffer* (amplificador com ganho unitário). A tensão sobre a solução (tampão SM + fago-CNT + bactéria) foi da ordem de 2 V para uma corrente constante de 450 μA .

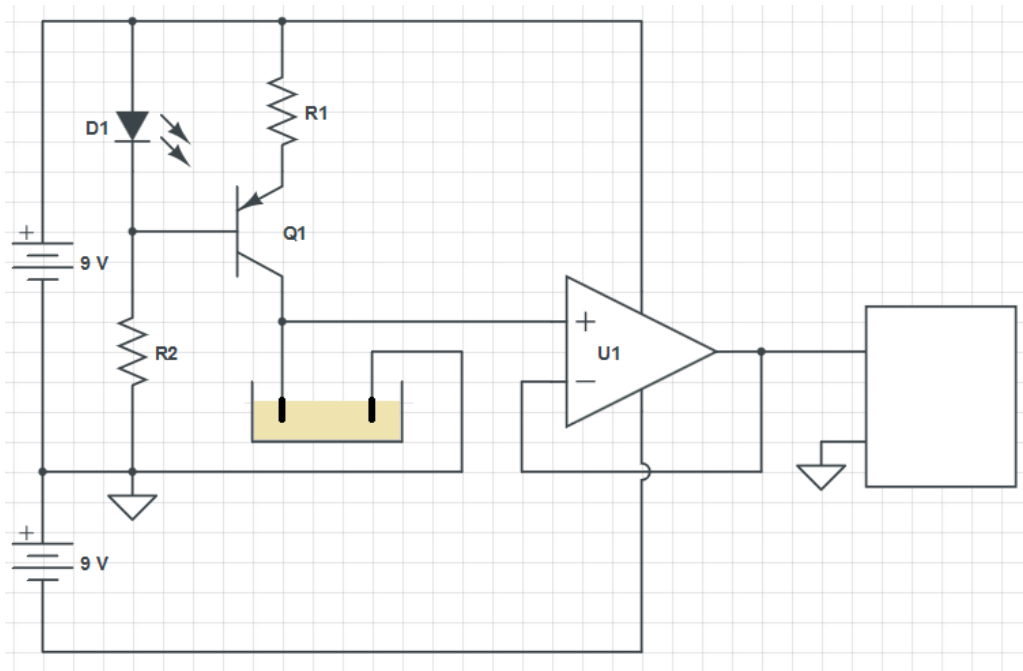


Figura 2 - Circuito eletrônico do sensor

Tabela 2 – Componentes do sensor

Código	Descrição
R1	Resistor 3,9 k Ω – ¼ W
R2	Resistor 680 Ω – ¼ W
Q1	Transistor PNP 2N2907
D1	LED
U1	CI TL071

Para facilitar o processo de mensuração periódica da tensão aplicada sobre a solução (tampão SM + fago-CNT + bactéria), foi utilizada uma plataforma de desenvolvimento de baixo custo em placa única baseada num microcontrolador *Atmel AVR*, com *hardware* e *software* abertos [19]. O modelo empregado foi o MEGA da família Arduíno, mostrado na Figura 3.



Figura 3 – Arduíno MEGA

O *firmware* (código-fonte) do microcontrolador dessa plataforma foi escrito para fazer as leituras da tensão com intervalos de 20 segundos, enviando-as então para um computador, onde elas foram salvas em um arquivo para posterior análise.

3. Resultados e discussão

3.1. Potencial Zeta

O valor do potencial Zeta medido para a dispersão do fago UFV-AREG1 e CNT em tampão SM foi de -5,28 mV e -3,00 mV, respectivamente. Esses valores próximos de zero demonstram que tanto o fago quanto o CNT apresentam uma baixa carga superficial negativa, sugerindo que a interação entre fago-CNT possa ocorrer por interações hidrofóbicas e/ou forças de dispersão. Não houve nenhuma adição de qualquer outro componente no meio ou a funcionalização na superfície do CNT para ocorrer a interação.

3.2. Delineamento experimental

Após a análise do potencial Zeta, a interação fago-CNT foi avaliada em relação à viabilidade dos vírus pós adsorção, quantificando o mesmo pela concentração de placas de lise formadas após contato com a bactéria, para definir as melhores condições de adsorção e comprovar a interação do fago com o CNT. Na Tabela 3 são mostrados os valores de quantificação dos fagos adsorvidos no nanotubo (PFU.mL⁻¹) nos ensaios de 1 a 15 utilizando a metodologia de planejamento do tipo Box-Behnken.

Tabela 3: Quantificação dos fagos armazenados em CNT nos diferentes ensaios (log de PFU.mL⁻¹).

Ensaio	Temperatura de secagem (°C)	Tempo de agitação (min)	Massa de CNT (g)	Log de PFU.mL ⁻¹
1	28,0	1	0,025	6,00
2	37,0	1	0,025	6,00
3	28,0	3	0,025	6,30
4	37,0	3	0,025	6,70
5	28,0	2	0,01	6,60
6	37,0	2	0,01	7,00
7	28,0	2	0,04	2,00
8	37,0	2	0,04	5,50
9	32,5	1	0,01	8,00
10	32,5	3	0,01	9,40
11	32,5	1	0,04	8,00
12	32,5	3	0,04	9,30
13	32,5	2	0,025	8,20
14	32,5	2	0,025	9,00
15	32,5	2	0,025	9,00

A significância estatística foi avaliada ao nível de 90 % de confiança ($p < 0,1$). A Tabela 4 apresenta os resultados da ANOVA obtidos do delineamento Box-Behnken.

Tabela 4 – ANOVA gerada pelo software STATISTICA.

Fatores	SS	df	MS	F	P
(1) Temperatura (L)	2,31125	1	2,31125	1,99586	0,195431
Temperatura (Q)	31,95103	1	31,95103	27,59106	0,000771
(2) Tempo (L)	1,71125	1	1,71125	1,47774	0,258781
Tempo (Q)	0,77564	1	0,77564	0,66980	0,436819
(3) Massa (L)	4,80500	1	4,80500	4,14932	0,076028
Massa (Q)	0,98564	1	0,98564	0,85114	0,383210
Erro	9,26417	8	1,15802		
Total	52,21333	14			

O $F_{\text{calculado}}$ (27,82) para a regressão foi maior do que o F_{tabelado} (6,93), portanto, a regressão é estatisticamente significativa. Além disso, verifica-se que os termos de segunda ordem de temperatura e de primeira ordem da massa apresentaram um valor p menor que o α determinado para 0,1, e, assim, são os termos significativos na interação fago-CNT. Também foi avaliado o valor de R^2 (0,82257) que se mostrou um valor adequado. Portanto, podemos concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

A Figura 4 representa os diagramas de superfície de resposta dos resultados obtidos. Ao analisar essas curvas, observa-se que a região que melhor atinge a interação fago-CNT é a região de vermelho escuro.

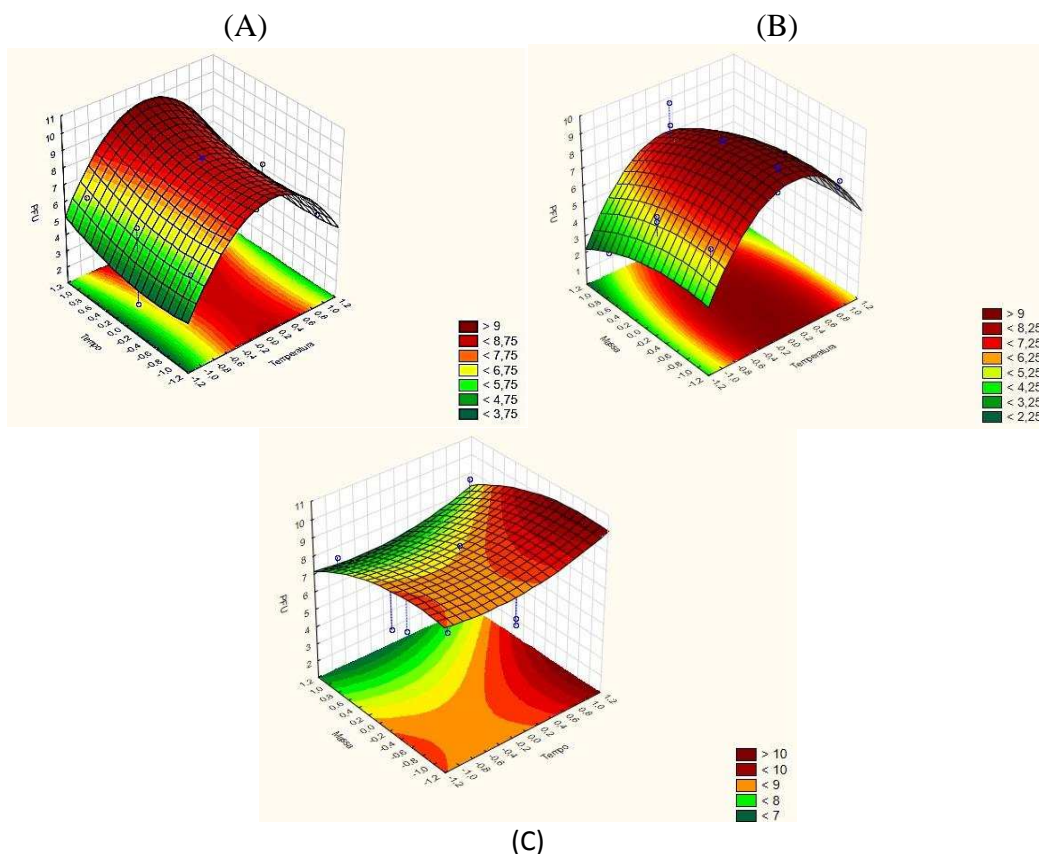


Figura 4 - Superfície de resposta 3D: (A) a influência da temperatura e do tempo de agitação quando a massa de CNT é fixada igual a 0,025 g, (B) a influência da temperatura e da massa de CNT quando o tempo de agitação é fixado igual a 2 min, (C) a influência da massa de CNT e do tempo de agitação quando a temperatura é fixada igual a 32,5 °C.

É possível verificar via superfície (Figura 4), diagrama de Pareto, curvas de contorno e da análise da confiabilidade estatística (Figuras S1 e S2 e Tabela 1S, respectivamente – Material Suplementar) que para uma melhor adsorção do fago no nantubo a temperatura ótima de secagem foi de 32,5 °C, a massa de CNT de 0,01 g e tempo de agitação de 2 min.

3.3. Teste de estabilidade dos bacteriófagos em CNT

Os microtubos de fago-CNT foram testados para verificar a estabilidade do fago adsorvido. Em intervalos de 7 dias, a partir do dia 1 a estabilidade foi avaliada pela contagem das placas de lise formadas (PFU) após diluição seriada dos microtubos contendo fago-CNT armazenados a 4 °C em contato com a bactéria. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 em log de PFU. Não houve diferença significativa (5 %)

na estabilidade dos fagos no nanotubo ao longo do tempo de análise de 21 dias e estocagem a 4 °C.

Tabela 5 - Teste de estabilidade do fago no nanotubo de carbono analisado por 21 dias.

Tempo (dias)	Viabilidade dos fagos (log de PFU)
1	9,95 ^a
7	10,24 ^a
14	10,29 ^a
21	10,48 ^a

^a Valores acompanhados da mesma letra significa que não houve diferença significativa a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os fagos se mantiveram protegidos durante o tempo de estudo avaliado de 21 dias, sendo capazes de provocar lise em células de *E. Coli* O157:H7.

Em um estudo realizado por Cooper e colaboradores [8] na conjugação magnética do bacteriófago 13 (fago de *Pseudomonas aeruginosa*) com CNT testando o efeito do armazenamento do mesmo a 20 °C e no escuro, o fago conjugado se manteve estável no CNT por seis semanas. Após este período, houve uma queda na contagem de fagos, porém mesmo em uma taxa reduzida o fago demonstrou seu potencial infeccioso para lisar células bacterianas. Fagos protegidos por matrizes poliméricas não perdem sua capacidade de lise e ainda podem ser liberados de forma controlada no meio [20-22]. A proteção do fago por uma matriz ou sua conjugação com outros materiais de interesse pode proporcionar um maior controle na liberação, uma maior eficiência do fago no controle de bactérias, bem como um indicativo de sinal quando se utiliza fago como um sensor, por exemplo.

3.4. Efeito antimicrobiano do fago-CNT sobre *E. Coli* O157:H7

A área de inibição média formada pelo fago-CNT foi de 2.955 ± 294 cm² calculada pelo ImageJ e constatou-se que não houve crescimento de bactérias em volta do círculo indicando uma atividade antimicrobiana ao longo da superfície onde o fago-CNT foi depositado como mostrado na Figura 5. Não houve inibição do crescimento da bactéria quando no meio foi depositado apenas o CNT e a média da área de inibição formada pela microgota contendo o fago livre foi de 2.628 ± 341 cm². Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a área de inibição formada pelo fago-CNT e o fago livre.



Figura 5 – halo de inibição formado pelo fago-CNT em meio contendo *E. coli* O157:H7, onde F.CNT – halo formado pelo fago-CNT; F – halo formado pela microgota do fago livre; e CNT – halo contendo apenas nanotubo de carbono.

A formação de um halo de inibição está diretamente relacionada à difusão do fator antimicrobiano no meio sólido da amostra testada após 24 h de avaliação [23]. Dessa forma, uma área em que não há crescimento do micro-organismos se forma. Diversos fatores influenciam na difusão do fator antimicrobiano para o meio. Esses fatores estão relacionados a especificidade de cada componente utilizado como a velocidade de crescimento do micro-organismo, composição do ágar e interações entre o antimicrobiano e o material do qual ele se encontra imobilizado [24]. Devido a tal especificidade, a comparação entre resultados obtidos deve ser feita desde que submetidos às mesmas condições de estudo. Contudo, o estudo da interação entre bacteriófago e CNT são recentes e, portanto, inovadores, não sendo encontrado ainda na literatura para comparação.

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura do nanotubo de carbono contendo o fago adsorvido podem ser observadas na Figura 6 (A-E).

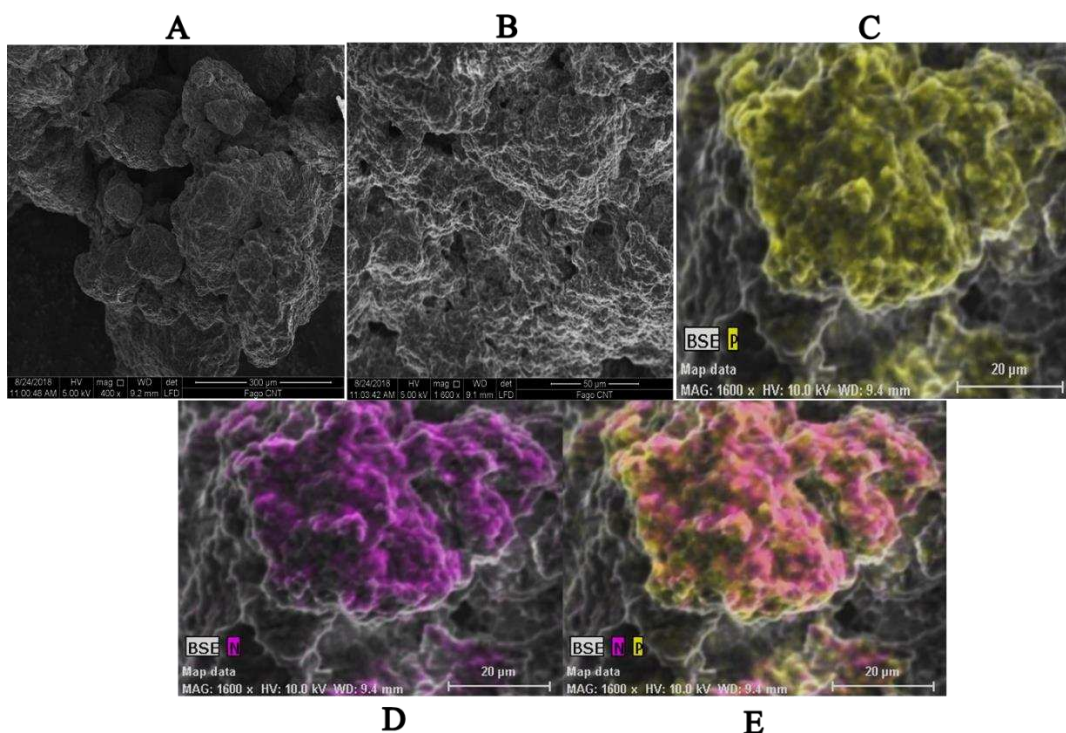


Figura 6 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do fago-CNT. A – Aumento de 400X; B – Aumento de 1600X; C – Aumento de 1600X com elemento P destacado em amarelo; D – Aumento de 1600X com elemento N destacado em rosa; e E – Aumento de 1600X destacando os dois elementos N e P juntos.

Um nanotubo de carbono é uma molécula cilíndrica e oca feita de uma camada singular de carbonos ligados entre si, sendo o seu diâmetro da ordem de poucos nanômetros e o seu comprimento pode chegar a vários micrômetros [9, 25]. Os nanotubos de carbono contêm, em sua estrutura basicamente carbono e hidrogênio. Portanto, ao identificarmos via microanálise de energia dispersiva no MEV alguns elementos químicos em nossa amostra de fago-CNT como o fósforo (P) e o Nitrogênio (N), podemos sugerir que os mesmos se relacionam ao fago, uma vez que o capsídeo viral é composto basicamente de proteínas [26, 27].

A solução de fago adicionada ao nanotubo é composta de um tampão que contém Tris-HCl, NaCl, $Mg(SO_4)_2$ e gelatina bacteriológica. Ao adicionar essa solução ao nanotubo a mesma é agitada e depois centrifugada e o sobrenadante descartado. Alguns elementos como Cl, Na e O também foram identificados pela microscopia (Figura S3 – Material Suplementar).

Esses resultados nos possibilitam inferir que a encapsulação pode evitar perdas durante o manuseio e perdas pelas condições ambientes, permitindo uma liberação controlada dos vírus para o ambiente. Tais benefícios permitem não só a utilização desse material em nanosensores como também otimiza sua resposta.

3.6. Aplicação dos fagos do sensor para detecção de *E. coli* O157:H7

Realizou-se vários testes de leitura da tensão na solução contendo o fago-CNT mais a bactéria para determinação do circuito a ser montado e logo após o projeto do protótipo final (Figuras S4 e S5 – Material Suplementar). Após montagem do protótipo do nanosensor para fazer a leitura da solução (tampão SM + fago-CNT + bactéria), e estabilização da leitura do meio, o fago-CNT foi adicionado (4 min). Logo após a bactéria pré-ativada (10^8 UFC.mL⁻¹) foi adicionada (7 min) e procedeu-se a leitura por 1h 30 min. O mesmo tempo foi estabelecido para o controle negativo (contendo a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* + fago-CNT) e para o outro controle contendo apenas o fago-CNT, no qual a bactéria não foi adicionada. A Figura 7 apresenta os resultados obtidos do sensor.

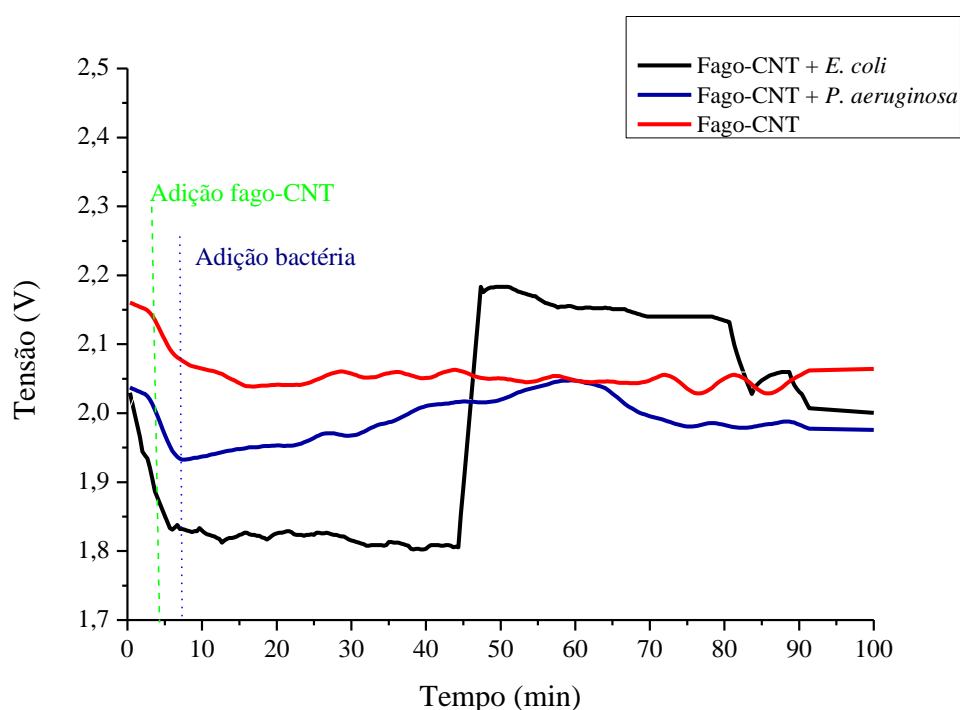


Figura 7 – gráfico da tensão versus tempo da amostra contendo fago-CNT mais a bactéria *E. coli* O157:H7; fago-CNT mais a bactéria *P. aeruginosa* e fago-CNT sem a presença da bactéria.

Após 45 min, aproximadamente, do contato do fago com a bactéria houve um pico na tensão proveniente do rompimento das células bacterianas causada pela lise celular e consequente liberação de íons do interior da célula para o meio, alterando assim a resistividade do meio. O estudo da cinética do fago UFV-AREG1 realizado por Lopez (2018) demonstrou que o tempo que este fago leva para infectar a célula e causar a morte celular demora cerca de 40 - 50 min após o qual ocorre o *burst-size* (explosão celular) com liberação de cerca de 18 partículas virais por cada célula infectada [28]. Estes

resultados nos possibilitam também avaliar e certificar os tempos de *burst-size* de outros fagos. O controle negativo contendo a bactéria *P. aeruginosa* mais o fago-CNT e o controle contendo apenas fago-CNT, também não sofreram nenhuma alteração brusca da tensão, comprovando a eficiência do sensor contra a *E. coli* O157:H7.

Para que o fago reconheça o hospedeiro e injete seu material genético são necessários receptores específicos na parede celular da bactéria que são fundamentais. Por isso, o sistema desenvolvido abre caminho para possibilidades de desenvolvimento de uma diversidade de biossensores. O desenvolvimento de alguns sensores requer modificações genéticas no capsídeo viral, que muitas vezes são realizados para que o fago possa ser imobilizado em uma superfície sensora para detecção do patógeno. Gervais e colaboradores [29] desenvolveram um biossensor com fagos biotinilados adicionados em superfície de ouro para detecção da bactéria. Outros trabalhos fazem a imobilização de fagos ou de suas proteínas do capsídeo em superfícies sensoras já desenvolvidas no mercado utilizando assim, o fago como um elemento-chave nessas superfícies para detecção do hospedeiro de interesse seja por ampliação de sinal, impedância, colorimetria, amperimetria, entre outros [30-33]. Em nosso trabalho podemos não foi necessária nenhuma mudança genética do fago, nem alguma alteração na estrutura do nanotubo de carbono para imobilização do vírus, o que o torna um sensor simples e de baixo custo. Podemos concluir que nosso sensor é um sensor de resistividade que mede a resistência elétrica, quando aplicada uma corrente constante, causada pela quantidade de íons liberados no meio após o rompimento da parede celular da bactéria.

Portanto, foi possível desenvolver um nanobiossensor medindo a tensão de forma simples e de baixo custo baseado na cinética do fago, ou seja, no tempo em que o fago gasta para infectar e lisar a célula. Quanto menor esse tempo, mais rápido é a detecção da bactéria pelo sensor. O nanobiossensor nos possibilita também determinar o *burst-size* do fago utilizado, contribuindo assim com o estudo da cinética já realizado. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram escolhidos para amplificação do sinal e imobilização do fago, pois o uso de nanomateriais possibilita uma área superficial maior e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de construir dispositivos multifuncionais com uma pequena área da seção transversal. O aumento da área superficial também possibilita uma intensificação do sinal pretendido com a molécula de interesse utilizada [8]. A técnica aqui desenvolvida pode ser aplicada com diferentes fagos para a montagem de nanobiossensores de acordo com o hospedeiro de interesse a ser identificado.

4. Conclusão

A imobilização do bacteriófago UFV-AREG1 em CNT se mostrou eficaz em acordo com os resultados obtidos da estabilidade e viabilidade do vírus no nanotubo. Os experimentos foram realizados via um delineamento experimental e uma posterior análise estatística não apontou perdas significativas na carga viral adsorvida no nanotubo. O teste disco-difusão confirmou a atividade antimicrobiana no material preparado. Foi possível a detecção de *E. coli* O157:H7 e o tempo de *burst-size* do vírus utilizando o CNT com o fago imobilizado ligado ao circuito eletrônico do nanobiosensor. O mecanismo desenvolvido também pode ser utilizado com outros fagos imobilizados no CNT para detecção do hospedeiro de interesse ou para determinação do *burst-size* viral. Testes futuros serão realizados para melhoria do nanobiosensor de tal forma a torná-lo comercial para a indústria e laboratórios de análises de alimentos.

Agradecimentos

O grupo de pesquisa agradece à Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro na pesquisa. À Empresa VSB - Vallourec & Sumitomo Tubos do Brasil, Jeceaba/MG pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. À Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Alto Paraopeba por ceder o espaço para a realização da pesquisa.

Referências bibliográficas

1. Lopez-Velasco, G., et al. (2015). Factors affecting cell population density during enrichment and subsequent molecular detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce contaminated during field production. **Food Control**, 54: p. 165-175.
2. Scallan, E., et al. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. **Emerg Infect Dis**, 17(1): p. 16-22.
3. Hoorfar, J. (2011). Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. **Apmis**, 119: p. 1-24.
4. Wang, Y., Z. Ye, and Y. Ying (2012). New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. **Sensors**, 12(3): p. 3449-3471.
5. Hungaro, H. M., et al. (2013). Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. **Food Research International**, 52(1): p. 75-81.

6. Mahony, J., et al. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, 22(2): p. 157-163.
7. Horgan, M., et al. (2010). Genome analysis of the *Clostridium difficile* phage Φ CD6356, a temperate phage of the Siphoviridae family. **Gene**, 462(1–2): p. 34-43.
8. Cooper, I. R., et al. (2015). Bacteriophage-nanocomposites: An easy and reproducible method for the construction, handling, storage and transport of conjugates for deployment of bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, 111(0): p. 111-118.
9. Iijima, S., Ajayan, P. and Ichihashi, T. (1992). Growth model for carbon nanotubes. **Physical Review Letters**, 69(21): p. 3100.
10. Thostenson, E. T., Ren, Z. and Chou, T.-W. (2001). Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, 61(13): p. 1899-1912.
11. Herbst, M. H., Macêdo, M. I. F. and Rocco, A. M. (2004). Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, 27(6): p. 986-992.
12. Davis, J. J., et al. (1998). The immobilisation of proteins in carbon nanotubes. **Inorganica Chimica Acta**, 272(1-2): p. 261-266.
13. Katz, E. and Willner, I. (2004). Biomolecule- functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. **Chem. Phys. Chem.**, 5(8): p. 1084-1104.
14. Mandal, H. S., et al., (2012). Carbon nanotube thin film biosensors for sensitive and reproducible whole virus detection. **Theranostics**, 2(3): p. 251.
15. Dang, X., et al. (2011). Virus-templated self-assembled single-walled carbon nanotubes for highly efficient electron collection in photovoltaic devices. **Nature Nanotechnology**, 6(6): p. 377.
16. Lopez, M. E. S., et al. (2016). ***Escherichia* phage UFV-AREG1, complete genome**. GenBank.
17. ANVISA. (2009). Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. **In: 15 ° Suplemento Informativo**. Brasil.
18. Gussow, M. (2009). **Eletricidade básica**. Tradução: José Lucimar do Nascimento. Porto Alegre. – Bookman.
19. Penido, É. d. C. C. (2017). **Projetos de Automação com o Arduíno**. Viçosa.

20. Balcão, V. M. et al. (2013). Structural and functional stabilization of phage particles in carbohydrate matrices for bacterial biosensing. **Enzyme and Microbial Technology**, 53(1): p. 55-69.
21. Tang, Z., et al. (2015). Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. **LWT - Food Science and Technology**, 60(1): p. 263-270.
22. Boggione, D. M. G., et al. (2017). Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 158: p. 182-189.
23. Sejas, L. M., et al. (2003). Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39(1): p. 27-35.
24. Bauer, A., et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45(4_ts): p. 493-496.
25. Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, 354(6348): p. 56.
26. Carter, J., Saunders, V. and Saunders, V. A. (2007). **Virology: principles and applications**. John Wiley & Sons.
27. Knipe, D. M. and Howley, P. (2013). **Fields Virology**. Wolters Kluwer Health.
28. Lopez, M. E. S. (2018). **Caracterização do bacteriófago UFV-AREG1 : potencial para o biocontrole de *Escherichia coli* O157:H7**. In Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa. p. 75.
29. Gervais, L., et al. (2007). Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 125(2): p. 615-621.
30. Balasubramanian, S., et al. (2007). Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus* — a surface plasmon resonance spectroscopic study. **Biosensors and Bioelectronics**, 22(6): p. 948-955.
31. Dutt, S., et al. (2013). Immobilization of P22 bacteriophage Tailspike protein on Si surface for optimized *Salmonella* capture. **J. Anal. Bioanal. Tech. S**, 7: p. 7.
32. Nanduri, V., et al. (2007). Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. **Biosensors and Bioelectronics**, 22(6): p. 986-992.
33. Tolba, M., et al. (2010). Oriented Immobilization of Bacteriophages for Biosensor Applications. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(2): p. 528-535.

Material Suplementar

As Figuras S1 e S2 mostram as curvas de contorno e o diagrama de Pareto, respectivamente e a Tabela 1S a análise de confiabilidade estatística do teste F. Estes são resultados complementares à superfície de resposta obtidos pela análise dos dados referentes ao delineamento experimental Box-Behnken e que comprovam qual o melhor delineamento para a adsorção do fago ao nanotubo.

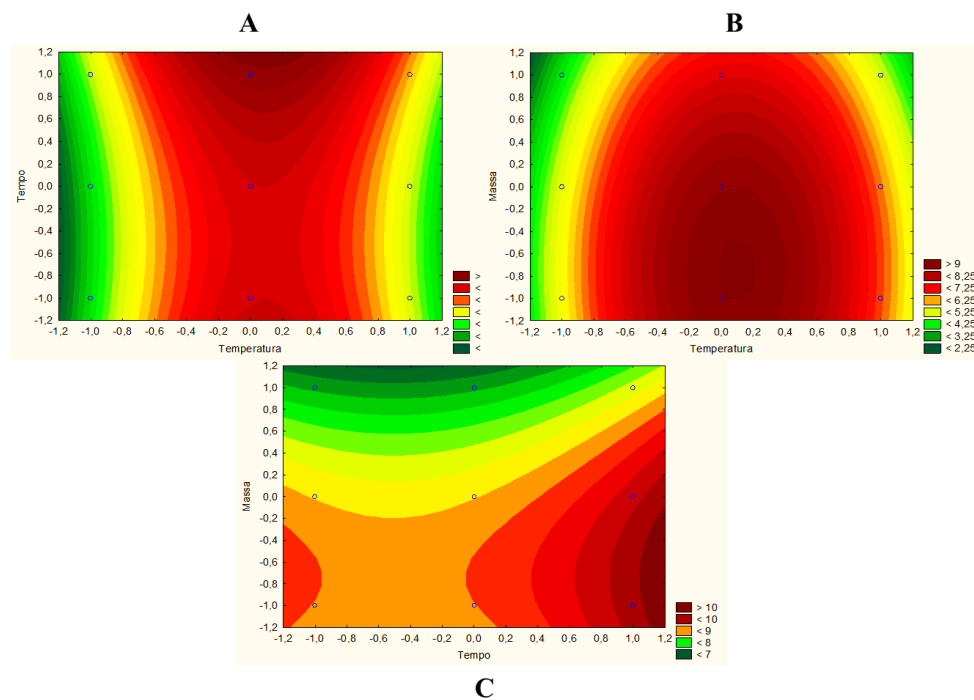


Figura S1 – curvas de contorno: (A) a influência da temperatura e do tempo de agitação quando a massa de CNT é fixada igual a 0,025 g, (B) a influência da temperatura e da massa de CNT quando o tempo de agitação é fixado igual a 2 min, (C) a influência da massa de CNT e do tempo de agitação quando a temperatura é fixada igual a 32,5 °C.

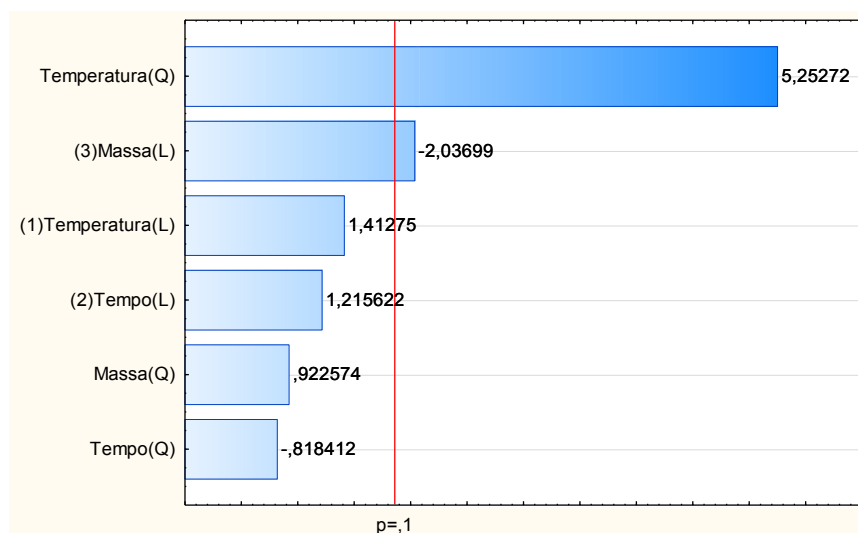


Figura S2 – Diagrama de Pareto

Tabela S1 – Análise da confiabilidade estatística através do cálculo de F.

	Soma dos Quadrados d medias	Graus de Liberdade	Q médio	F calculado	F tabelado
Regressão	42,94916	3	14,3164		
Resíduo	9,26417	11	0,8422	17,00	2,66
Total	52,21333	14	3,7295		

A Figura S3 representa a microscopia eletrônica de varredura do fago-CNT com os elementos Cl, Na e O destacados.

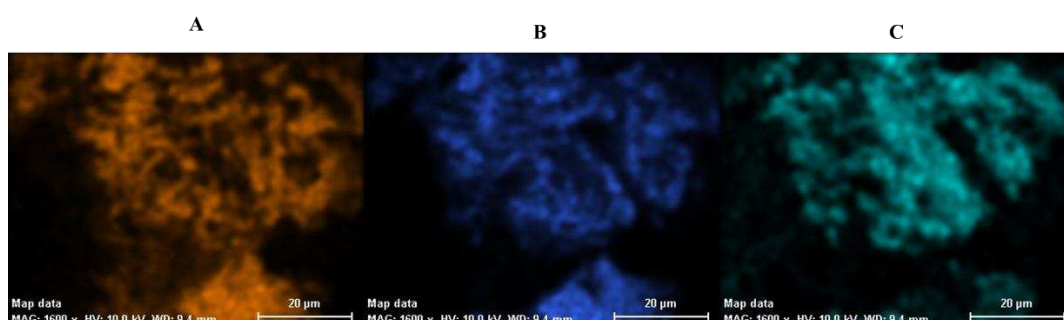


Figura S3 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do fago-CNT. A – Aumento de 1600X com o elemento Cl destacado em laranja; B – Aumento de 1600X com o elemento Na destacado em azul; C – Aumento de 1600X com elemento O destacado em verde.

A Figura 4S representa a tabela com os valores de tensão dos testes realizados com o fago UFV-AREG1 mais a bactéria *E. coli* O157:H7. Ambos (fago-CNT e bactéria) foram colocados ao tampão SM no início das medidas (tempo zero). Os testes foram inicialmente realizados apenas em meio contendo a bactéria e o fago usando o osciloscópio e multímetro para medição da resistividade do meio. Logo após o fago foi imobilizado ao nanotubo e realizou-se os testes com o fago-CNT mais a bactéria utilizando os mesmos equipamentos citados anteriormente. Em decorrência do baixo sinal emitido, houve a proposta da montagem de um circuito eletrônico completo afim de ampliar o sinal emitido pela resistividade do meio.

	Primeiro Teste	Segundo Teste	Terceiro Teste	Quarto Teste	Quinto Teste
TEMPO (MIN)	fago+ bactéria	fago-CNT + bactéria	fago-CNT + bactéria	fago-CNT + bactéria	Circuito Completo + fago-CNT + bactéria
	multímetro e osciloscópio	multímetro e osciloscópio	phmetro	multímetro	multímetro
	tensão (mV)	tensão (mV)	ph	tensão (mV)	tensão (Volts)
0	157	197	7,84	155	0,886
1	67	180	7,86	59	0,312
5	69	47	8,42	63	0,44
10	69	45	8,38	66	0,44
15	69	36	8,33	73	0,513
20	69	37	8,27	82	0,534
25	76	32	8,23	81	0,605
30	78	48	8,21	83	0,803
35	83	43	8,23	102	0,925
37	99	35	8,22	117	0,925
38	202	33	8,22	178	0,944
39	287	32	8,2	236	1,015
40	315	32	8,14	248	1,402
41	454	31	8,12	341	1,887
42	460	30	8,14	379,4	2,13
43		29	8,1	431,2	2,53
44		28	8,08	483	2,97
45		27	8,06	534,8	3,02
50		26	8,04	312	3,39
55		24	8,02	363,8	3,58
60		23	8	333,22	3,5
65		22	7,98	412	3,51
70		21	7,96	417	3,51
75		20	7,94	417	3,78
80		19	7,92	415	3,82
85		17	7,9	410	3,88

Figura S4 - Resultados dos testes preliminares para montagem do circuito do nanobiosensor.

A Figura S5 representa o gráfico com os resultados do circuito completo antes da montagem do protótipo final. Neste teste a diferença de tensão se dá em torno de 40 min conforme demonstrado também pelo sensor final.

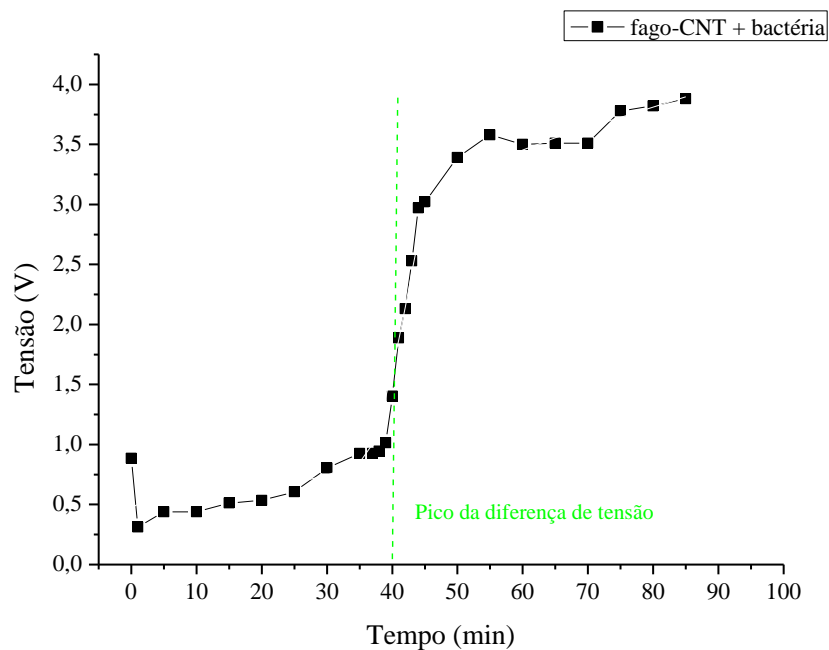


Figura S5 – Gráfico representativo do teste realizado com o circuito completo antes do protótipo final.

6. Capítulo III

Hidrogéis de Polivinil-Álcool (PVA) contendo o bacteriófago UFVAREG1 para aplicação como curativo adesivo para a indústria de alimentos

Resumo

Infecções cutâneas ocasionadas por cortes nas mãos de manipuladores de alimentos podem ocasionar contaminação nos alimentos, por isso o cuidado que se deve ter com a saúde do manipulador, bem como seu treinamento adequado, é de suma importância para a segurança alimentar. O objetivo deste trabalho foi incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 em hidrogel de álcool poli(vinílico) (PVA) para posterior aplicação como curativo adesivo. O PVA foi reticulado com glutaraldeído e adicionado de 1,0 mL de solução de fago a $2,8 \times 10^8$ PFU.mL⁻¹ e seco em estufa por 48 h. Após secagem, os hidrogéis (PVA-controle e PVA-fago) foram submetidos a testes de Intumescimento, Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análises Térmicas de DSC e TGA e efeito antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7. O intumescimento do filme de PVA-fago (38 %) foi maior que o PVA-controle (15 %) o que indica no PVA-fago ($p < 0,05$) uma maior difusão das moléculas de água para o interior da rede polimérica o que facilita a liberação do fago para o meio aquoso. O halo de inibição médio do hidrogel de fago foi analisado pelo programa ImageJ nos dando uma área de inibição de 3,715 cm² contra 2,916 cm² do controle com desvio padrão de 128,7 cm². O halo de inibição do PVA-fago foi mais significativo que o PVA-controle ($p < 0,05$). Esses resultados corroboram com análise antimicrobiana em meio líquido representado pela curva de crescimento microbiano obtido pelo leitor de microplacas. As análises do FTIR mostraram uma um pico para o PVA-fago entre as bandas 2860 e 2930 cm⁻¹ não encontrado no PVA-controle podendo estar relacionado ao fago adicionado. As análises térmicas (DSC e TGA) não apresentaram diferenças entre os hidrogéis de PVA-controle e PVA-fago. Portanto, foi possível incorporar o bacteriófago em hidrogel de PVA e avaliar sua liberação em fluido corporal simulado para posterior aplicação como curativo adesivo.

Palavras-chave: Polivinil-álcool (PVA), Hidrogel, Bacteriófago, Curativos adesivos

1. Introdução

Infecções cutâneas ocasionadas por cortes nas mãos de manipuladores podem ocasionar contaminação nos alimentos, por isso o cuidado que se deve ter com a saúde do manipulador, bem como seu treinamento adequado é de suma importância para a

segurança alimentar [1]. Para inibir o desenvolvimento de micro-organismos carreados por manipuladores, superfícies e equipamentos contaminados aos alimentos, diversos métodos são aplicados para prolongar a vida útil do produto e garantir seu consumo com segurança.

As alterações microbianas nos alimentos dependem da qualidade inicial da mesma e das condições de armazenamento. Contudo, a microbiota inicial depende de todo um conjunto de fatores, inclusive durante o processo de abate e ordenha dos animais, que podem levar à contaminação da matéria prima, bem como nas distintas etapas da produção dos produtos como a ação incorreta de manipuladores, equipamentos e utensílios não higienizados, uso indiscriminado de determinados aditivos e antimicrobianos e ingredientes em geral [2-4]. Cerca de 52 % dos surtos relatados estão relacionados a manipulação inadequada dos alimentos. Atualmente o CDC (2017) divulgou que 1 em cada 6 americanos adoecem por ingestão de alimentos contaminados [1].

Escherichia coli O157:H7 tem sido associada a surtos alimentares envolvendo derivados da carne de porco e vegetais folhosos como alface, espinafre, ervas culinárias, entre outros produtos processados e frescos [5-7].

Novos aspectos da aplicação de bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas estão em desenvolvimento, dentre eles o uso de fagos como adjuvantes na terapia antibiótica. A vantagem de uma terapia combinada é a menor probabilidade de desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes [8-10]. Por isso o uso de bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas vem se tornando uma terapia em potencial, visto que bactérias tem se tornado cada vez mais resistentes à antibióticos.

Biomateriais tem sido usado para liberação controlada de fármacos e estudos dos mesmos tem se intensificado nos últimos anos na área de saúde. Esses materiais são atóxicos, biocompatíveis e proporcionam uma melhora na qualidade de vida do paciente. Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros totalmente ou parcialmente hidrofílicos que intumescem em contato com a água o que facilita a liberação do fármaco e muito utilizados em aplicações biomédicas [11-13].

Atualmente, os hidrogéis são indicados como componentes de curativos para tratar feridas superficiais e profundas [14]. Dentre os vários polímeros utilizados como matérias-primas para hidrogéis, está o álcool poli(vinílico) chamado de PVA. O PVA é um polímero semicristalino, hidrofílico, constituído pela repetição dos isômeros (CH₂CHOH) contendo muitas hidroxilas, o que favorece a absorção de água e expansão

da rede polimérica facilitando a liberação do fármaco [13]. Vem sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica para liberação controlada de fármacos por sua biocompatibilidade, não-toxicidade, estabilidade com produtos químicos, baixo custo e com excelente resistência mecânica [15].

O bacteriófago UFV-AREG1 foi isolado a partir de águas residuais de estábulo, mostrando especificidade para *Escherichia coli* O157: H7 (CDC EDL-933), *E. coli* 0111 (CDC O11ab) e *E. coli* (ATCC 23229). Bacteriófago UFV-AREG1 pode atingir concentrações acima de 10^{12} PFU/mL em condições de laboratório quando o hospedeiro é a *E. coli* O157: H7 [16].

A proposta deste trabalho foi imobilizar o bacteriófago UFV-AREG1 em hidrogel de PVA, estudando a liberação controlada, para futura aplicação como curativo adesivo para tratamento de feridas cutâneas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Micro-organismos e materiais utilizados

O bacteriófago UFV-AREG1, específico para *Escherichia coli* O157:H7, foi obtido do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O hospedeiro foi a *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), adquirida do banco de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Utilizou-se álcool poli(vinílico) (PVA) (86,5 - 89,5 %) e massa molar ente (40 - 48) (Êxodo Científica, Brasil). Os meios microbiológicos utilizados no estudo foram o Brain Heart Infusion (BHI) caldo, Agar Bacteriológico e Agar Muller-Hinton adquiridos da Himedia (Índia).

2.2. Preparo do hidrogel de PVA e incorporação do bacteriófago

A dispersão aquosa de PVA 10 % (m/v) foi preparada em um béquer de 100 mL, onde 4 g do PVA foram adicionados de 40 mL de água purificada lentamente a 25 °C. Em seguida a dispersão foi agitada sob aquecimento de 80 ± 5 °C até completa dissolução. Após homogeneização, o aquecimento foi desligado e o volume de água completado (40 mL), deixando a dispersão sob agitação até atingir temperatura ambiente (± 25 °C). A seguir foi realizada a reticulação do PVA com glutaraldeído (GA – Dinâmica, Brasil). Ajustou-se o pH (3,8) da dispersão com HCl 1,0 M e foi adicionado 5 % (v/v) da solução de glutaraldeído a 25 % (v/v). Após homogeneização dividiu-se a dispersão em duas porções de 20 mL. Uma porção de 20 mL da dispersão foi vertida em placa de petri

(controle) e a outra porção de 20 mL foi adicionada de 1,0 mL de solução de bacteriófago ($2,8 \times 10^8$ PFU.mL⁻¹) sob agitação para homogeneização do fago na dispersão. A seguir os 21 mL foram adicionados em placa de petri (PVA/fago). As placas foram colocadas em estufa a 37 ± 2 °C por 48 h.

2.3. Avaliação do perfil de intumescimento do hidrogel em solução de fluido corporal simulado

Foi feito o ensaio de intumescimento utilizando solução de fluido corporal simulado (SBF) preparada conforme Kokubo [17], conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes usados na preparação de 1,0 L de solução de fluido corporal simulado (SBF).

Reagente	SBF 1,0 L
Água	750 mL
NaCl	7,996 g
NaHCO ₃	0,350 g
KCl	0,224 g
K ₂ HPO ₄	0,174 g
MgCl ₂	0,305 g
CaCl ₂	0,368 g
Na ₂ SO ₄	0,071 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057 g
HCl 1M	Necessária para ajuste do pH=7,25

Os hidrogéis de PVA-fago e PVA-controle tiveram a massa aferida em balança analítica, anotando-se a massa inicial, e então foram adicionados em microtubos contendo 1,0 mL da solução de SBF e retirados em intervalos de tempo determinados (15, 30, 60, 120 e 1440 min) para aferição da massa em balança analítica. O fluido acumulado na superfície foi retirado com auxílio de papel de filtro antes da pesagem. A partir dos resultados obtidos, o percentual de intumescimento foi calculado segundo a equação 1 [18]:

$$\% \text{ Intumescimento} = [(M_t - M_0) \div M_0] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, M_t representa a massa da amostra intumescida no tempo t e M_0 é a massa inicial da amostra.

Para avaliação da presença do fago no hidrogel e a constatação da sua liberação no meio foi feita a análise da titulação dos mesmos. O hidrogel PVA-fago (1,0 g) foi

adicionado em um tubo contendo 5,0 mL do fluido corporal simulado (SBF), adicionado de 100 μL da bactéria pré-ativada na concentração de 10^4 UFC.mL⁻¹ e incubado a 37 °C. Após intervalos de (0, 40, 120, 240 e 1440 min) o tubo foi retirado da estufa e uma alíquota de 100 μL foi retirada procedendo as diluições seriadas. Cada alíquota da diluição (100 μL) foi plaqueada em meio de cultura (BHI agar – Himedia, Índia) contendo a bactéria pré-ativada em sobrecamada (100 μL) e incubado a 37 °C/18-24 h. Após incubação as placas de lise foram contadas para determinar a quantidade de fago liberado do PVA no meio (SBF).

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana do fago pelo método de disco-difusão e em meio líquido

A atividade antimicrobiana do hidrogel de PVA contendo os fagos foi determinada pela técnica de disco-difusão, conforme descrito por Bauer [19], bem como segundo o padrão do Comitê Nacional de Padrões Clínicos Laboratoriais [20]. A cepa utilizada foi a *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895). As placas contendo Ágar Mueller-Hinton (Himedia, Índia) foram previamente inoculadas com a cultura de *E. coli* por espalhamento. Discos de 1,0 cm de diâmetro contendo PVA-fago e PVA-controle foram dispostos nas placas e incubados a 37 °C \pm 2 °C por 24 h. O halo foi medido através da obtenção da área de inibição analisada pelo programa ImageJ.

O crescimento microbiano em meio líquido foi avaliado por 24 h em leitor de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, USA) para determinação do efeito antimicrobiano do PVA-fago e PVA-controle em fluido corporal simulado (SBF) sobre a *E. coli*. A análise foi feita em triplicata e os dados coletados em um computador e a curva de crescimento determinada. Foram adicionados nos poços da microplaca: a) tratamento 1 - 500 μL de solução SBF mais 10 μL da bactéria na concentração de 10^5 UFC.mL⁻¹; b) tratamento 2 - 500 μL de solução SBF mais 10 μL da bactéria (10^5 UFC.mL⁻¹) mais 0,1 g do PVA-controle; c) tratamento 3 - 500 μL de solução SBF mais 10 μL da bactéria (10^5 UFC.mL⁻¹) mais 0,1 g PVA-fago). A microplaca foi colocada no leitor a 37 °C/24 h. A leitura foi realizada a cada 40 min iniciando no tempo 0.

2.5. Análise por Espectroscopia de Infravermelho

Ensaio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) também foi realizado para caracterização do polímero e identificação de grupos específicos do material e possíveis interações entre eles. A faixa de comprimento de onda

médio foi de (4000 a 400) cm^{-1} . O equipamento utilizado para os hidrogéis de PVA foi o Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, EUA).

2.6. Análises térmicas (DCS e TGA)

Para a caracterização térmica do hidrogel foi feita pela análise termogravimétrica (TGA) e análise termogravimétrica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), utilizadas para avaliar o comportamento de degradação do polímero. O aparelho empregado para análise de TGA foi o modelo DTG60H da Shimadzu. Para a DSC foi empregado o equipamento modelo DSC60 da Shimadzu, por meio de um ciclo de aquecimento com a temperatura variando de 0 até 250 °C para a análise do DSC e de 20 a 600 °C para análise do TGA, na razão de aquecimento de 10 °C. min^{-1} .

2.7. Análise estatística

Para a atividade *in vitro* dos hidrogéis de PVA-fago e PVA-controle, utilizou-se o DIC (delineamento inteiramente casualizado). Os dados foram analisados a 5 % de probabilidade por análise de variância (ANOVA). As diferenças entre médias foram analisadas pelo teste de Tukey usando o “MINITAB” 16 (Minitab Inc., EUA) como recurso estatístico.

3. Resultados e discussão

3.1. Aspectos visuais dos hidrogéis de PVA

O hidrogel de PVA reticulado com glutaraldeído, após secagem em estufa, apresentou transparência, flexibilidade, ausência de bolhas de ar, ausência de rachaduras e coloração uniforme conforme ilustra o aspecto macroscópico da Figura 1. O PVA foi o polímero escolhido por ter propriedades de biocompatibilidade, atoxicidade, hidrofiliabilidade, habilidade de formar filmes e fibras, além disso, apresenta características de boa e rápida dispersão em água, mucoadesividade, intumescimento, viscosidade aumentada em solução, fácil moldagem e transparência [21].



Figura 1 – Hidrogel de PVA. (A) PVA controle e (B) PVA-fago

O glutaraldeído foi usado como agente reticulante por proporcionar ligações covalentes cruzadas muito estáveis e irreversíveis, mesmo que ocorra uma grande variação de temperatura ou pH durante o processo de reticulação [22]. A olho nu não houve diferenças estruturais nos PVA-controle e PVA-fago produzidos, evidenciando assim, uma boa reticulação do hidrogel.

3.2. Perfil de Intumescimento

Os parâmetros de avaliação da porcentagem de intumescimento do PVA-controle e PVA-fago são mostrados na Tabela 2. Os valores da massa intumescida (M_t) no tempo t estão expressos em porcentagem.

Tabela 2 – Avaliação do intumescimento das amostras de PVA-controle e PVA-fago.

Tempo t (min)	PVA-controle M_t (%)	PVA-fago M_t (%)
15	0,6 ^a	12,5 ^b
30	7,3 ^a	21,7 ^b
60	7,3 ^a	28,5 ^b
120	7,2 ^a	37,7 ^b
1440	17,7 ^a	38,9 ^b

^{a,b} Valores acompanhados de letras diferentes significam que houve diferença significativa a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Houve aumento gradativo da massa do hidrogel em 24 horas de incubação, tanto para o gel controle quanto para o gel adicionado de fago. O aumento da massa no PVA-fago foi mais significativo que no PVA-controle ($p < 0,05$). Quanto maior a absorção de água pelo hidrogel, maior a expansão da rede polimérica e relaxamento da cadeia o que facilita a liberação do fago para o meio. O intumescimento indica também que houve uma polimerização e reticulação eficaz do hidrogel, que são importantes para a incorporação do princípio ativo e sua liberação controlada [23]. As taxas de intumescimento só não são maiores pois a reticulação reduz significativamente a afinidade dos polímeros pela água. Coelho (2012) sintetizou um hidrogel de PVA com pH 6,0 e obteve taxas de intumescimento de 350 % e Sadahira (2007) que submeteu seus hidrogéis em diferentes soluções de pHs e com diferentes métodos físico-químicos de reticulação obteve diferentes taxas de intumescimento [22, 24]. Trabalhos recentes usando PVA para composição de hidrogéis também demonstraram essas diferenças (pouco ou muito aumento) no intumescimento quando em diferentes soluções de pHs [25-28].

A média do número de fagos nos intervalos de tempo avaliados se manteve constante e foi de 10^7 PFU.mL⁻¹, sendo que foi adicionado inicialmente uma concentração

de fago de $2,3 \times 10^8$ PFU.mL⁻¹. Portanto, praticamente todo fago (93 %) adicionado na solução ficou retido no hidrogel de PVA e liberado de forma imediata, e não gradativa, logo após os primeiros tempos de contato do hidrogel com a solução SBF. Portanto o fago se adapta muito bem quando adicionado em polímeros capazes de retê-lo e mantê-lo viável para ser liberado para o meio quando este polímero entra em contato com o fluido de interesse.

3.3. Infravermelho

O FTIR é uma técnica utilizada na caracterização de polímeros, identificando grupos específicos do material e possíveis interações entre eles [29]. O PVA-controle, PVA-fago foram analisados separadamente e os seus espectros do infravermelho estão apresentados na Figuras 2 e 3, respectivamente. O infravermelho da solução de fago foi feito em um equipamento diferente dos outros (Figura S1 do Material Suplementar), uma vez que precisava-se aumentar a faixa do número de onda e a utilização de pastilhas de KBr para maiores detalhes. A Figura 4 representa a estrutura química do PVA reticulado com glutaraldeído [30].

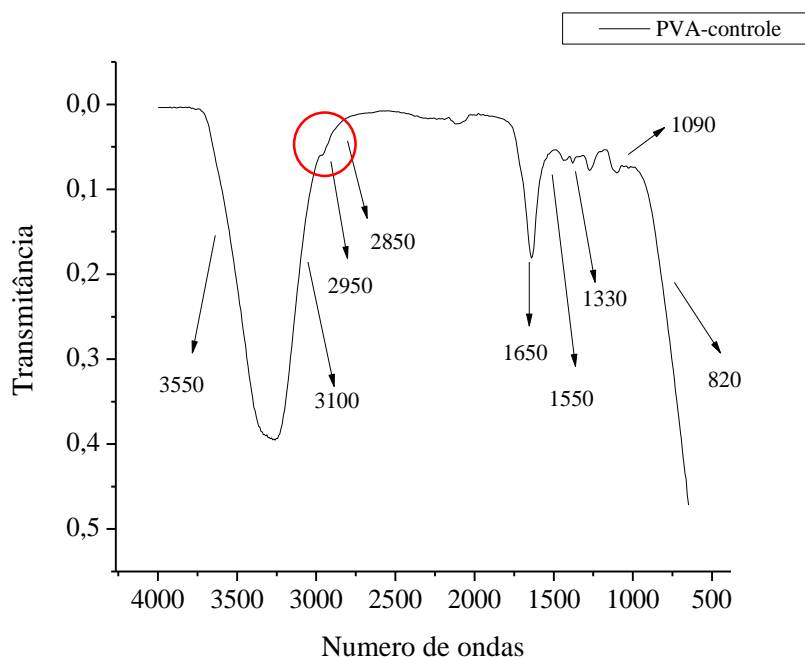


Figura 2 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o PVA-controle

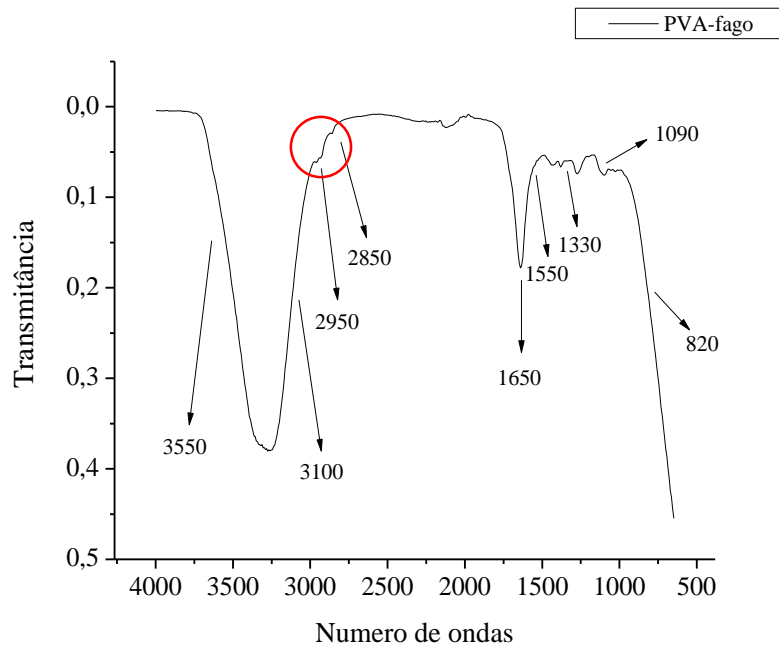


Figura 3 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o PVA-fago

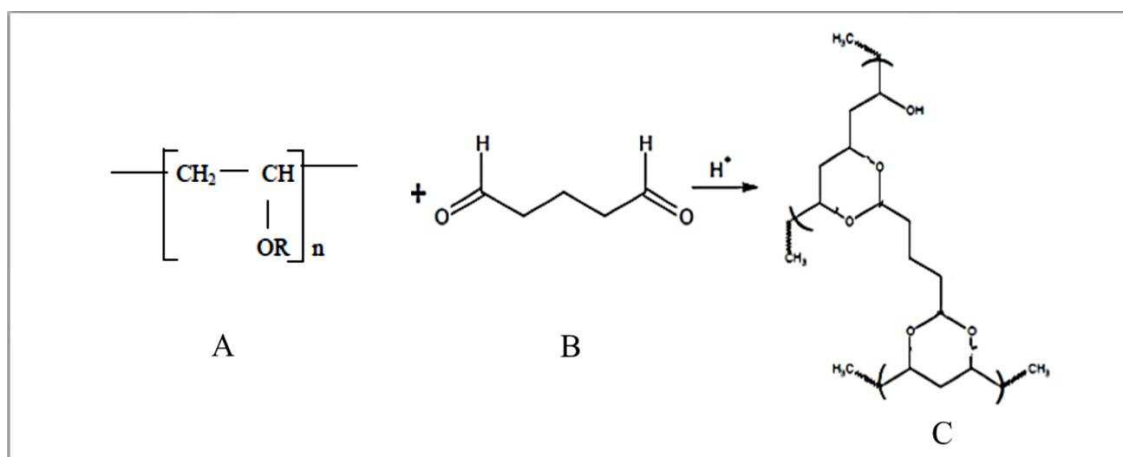


Figura 4 – Modelo de reticulação química com glutaraldeído. A – PVA (onde R = H ou COCH₃); B – Glutaraldeído; e C – Hidrogel de PVA reticulado.

Fonte: adaptado de Mansur, 2008

As bandas presentes no hidrogel de PVA, de acordo com a literatura, e que também foram encontradas em nosso trabalho, tanto no PVA-fago quanto no PVA-controle, são as seguintes: entre (3600-3100) cm^{-1} relaciona-se ao estiramento de O-H e das fortes ligações inter e intramoleculares que é acompanhada de outra absorção em 1640 cm^{-1} , devido à deformação angular de H-O-H; entre (2950-2850) cm^{-1} encontramos o estiramento C-H; (1650-1330) cm^{-1} os estiramentos C=O, C-O, O-H; 1554 cm^{-1} é referente à vibração do estiramento C=C; 1421 cm^{-1} é atribuído à vibração de flexão do OH; 1366 cm^{-1} CH- R- CH₂; 1329 cm^{-1} (OH)-C-OH; 1254 cm^{-1} CH (=CO-C); 1090 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O enquanto a banda de 820 cm^{-1} é atribuída à vibração do

estiramento C-C [30-32]. Entre a região das bandas (2950-2850) cm^{-1} no PVA-fago encontramos duas bandas de 2860 e 2930 cm^{-1} (região demarcada pelo círculo vermelho) diferentemente do PVA-controle, podendo indicar o estiramento de ligação C-H ligado no nitrogênio de uma amina primária alifática, sendo o nitrogênio presente na a composição proteica do fago.

Porém, essas bandas (2860 e 2930 cm^{-1}) não puderam ser visualizadas na espectroscopia da solução de fago, realizada no outro equipamento, devido a banda larga entre (3600-3100) cm^{-1} (Figura S1), que pode ter mascarado as bandas do estiramento de ligação C-H ligado ao nitrogênio. Portanto, para a solução de fago o espectro obtido não foi possível de identificar o fago na pastilha de KBr, pois as bandas do espectro referem-se à água presente na dispersão em quantidades muito superiores ao fago.

3.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do fago liberado foi avaliada pelo método disco-difusão, conforme preconizado pela ANVISA [33]. Os discos de hidrogéis de 1,0 cm^2 foram colocados sobre o meio de cultura em placa de Petri contendo a bactéria pré-ativada e as placas foram incubadas a 35 °C/24 h. A Figura 5 mostra as placas com o halo de inibição formado tanto para o PVA-controle quanto para o PVA-fago. Os valores das áreas dos halos de inibição foram analisados pelo programa ImageJ e as áreas médias foram de 2,916 cm^2 para o PVA-controle e 3,715 cm^2 para o PVA-fago com desvio padrão de 128,7 cm^2 .

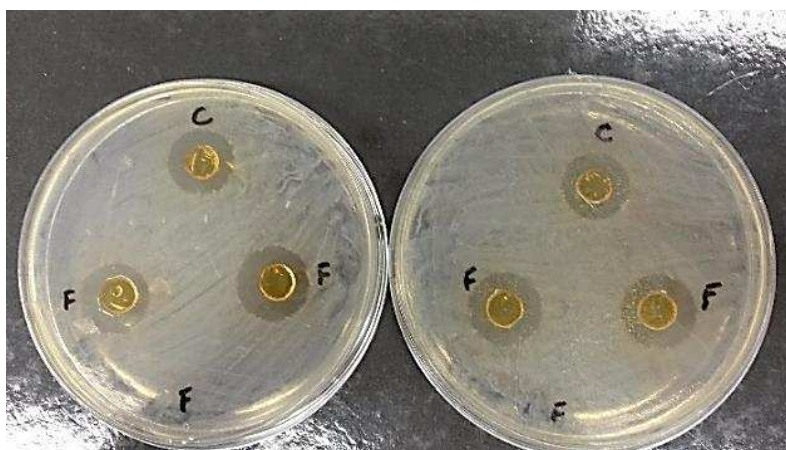


Figura 5 – Halo de inibição formado pelo hidrogel de PVA. C: PVA-controle e F: PVA-fago.

Não houve crescimento de bactérias em volta do disco indicando uma atividade antimicrobiana ao longo de uma superfície sólida onde o hidrogel de PVA foi depositado. O halo de inibição formado pelo PVA-fago foi mais significativo que o PVA-controle ($p < 0,05$). A formação de um halo de inibição está diretamente relacionada à difusão do

fator antimicrobiano no meio sólido da amostra testada após 24 h de avaliação [34]. Dessa forma, uma área em que não há crescimento do micro-organismos se forma. Diversos fatores influenciam na difusão do fator antimicrobiano para o meio. Esses fatores estão relacionados a especificidade de cada componente utilizado como a velocidade de crescimento do micro-organismo, composição do ágar e interações entre o antimicrobiano e o material do qual ele se encontra imobilizado [19]. Podemos observar também que o halo de inibição formado pelo PVA-fago foi maior que o do controle, o que pode ter sido proveniente do fago liberado do PVA para o meio. A formação do halo pelo PVA-controle pode ter sido ocasionado pela presença do glutaraldeído, usado como reticulante, e que é considerado um agente bactericida muito usado em estabelecimentos de assistência à saúde [35].

Esses resultados corroboram os resultados obtidos pela curva de crescimento em meio líquido (Figura 6).

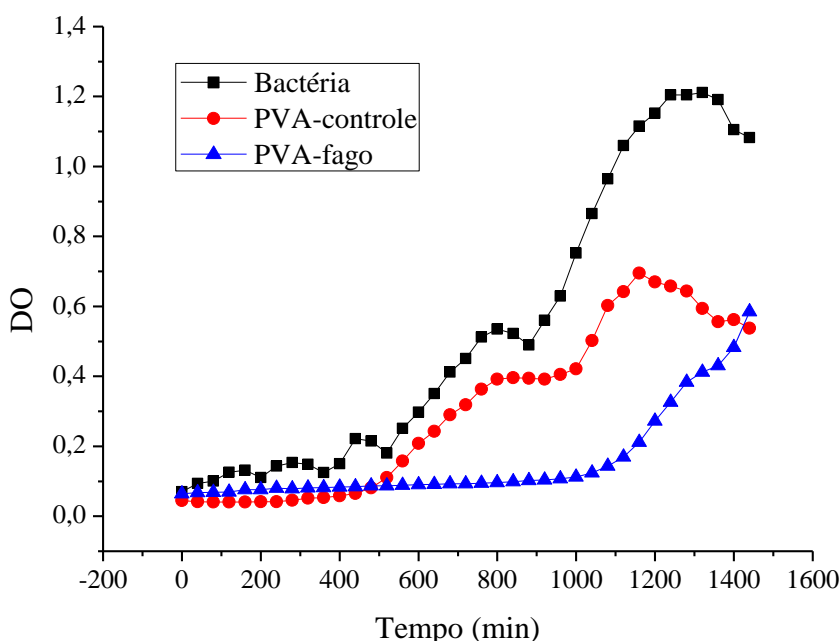


Figura 6 – Curva de crescimento de *E. coli* O157:H7 expressa em função da densidade ótica (DO) por tempo na temperatura de 37 °C, em fluido corporal simulado (SBF).

O aumento da fase de latência ou fase lag é um indicativo da inibição do crescimento. A fase lag da bactéria na presença do PVA-fago é superior à da bactéria sozinha e com PVA-controle. A fase latência pode ter uma maior duração quando, por exemplo, a bactéria é incubada em condições ambientais de estresse da qual não se encontra adaptada e que conduzem normalmente a fases de latência extensas [36].

Observe que os bacteriófagos têm um papel importante como reguladores do crescimento microbiano, desde que estejam presentes em ambientes de alta densidade [37] em condições favoráveis (umidade, atividade de água, nutrientes, etc), ele encontra as bactérias e as infecta, porque os bacteriófagos não são móveis. A eficiência dos bacteriófagos pode ser afetada pelo estado nutricional e fisiológico da bactéria hospedeira e esta infecção pode determinar os parâmetros e sua eficiência. Quando o PVA-fago é difundido no meio líquido favorece o crescimento de bactérias, afetando o período de latência e o tempo de lise celular, já que o meio é rico em nutrientes que podem afetar diretamente o receptor de fago, os níveis de ATP e AMP cíclico ou até mesmo a expressão de genes característicos da replicação lisogênica [37]. Esses detalhes poderiam explicar o comportamento limitado do bacteriófago na curva diante do crescimento da bactéria mostrado na figura após as 16 h da fase lag. Outro aspecto importante é que como os fagos são hospedeiros-específicos, dependem da bactéria para sua replicação e sobrevivência [38], portanto não é interessante para o fago eliminar toda a bactéria presente no meio, deixando-a replicar para que ele possa iniciar um novo ciclo de infecção e replicação viral.

3.5. DSC e TGA

As análises térmicas foram realizadas para avaliar o comportamento de degradação dos polímeros. A TGA permite avaliar essa degradação por meio da perda de massa em função da temperatura e a DSC mede a diferença de energia fornecida à substância também em função da temperatura controlada [22]. As curvas de DSC e TGA podem ser observadas nas Figuras 7 e 8.

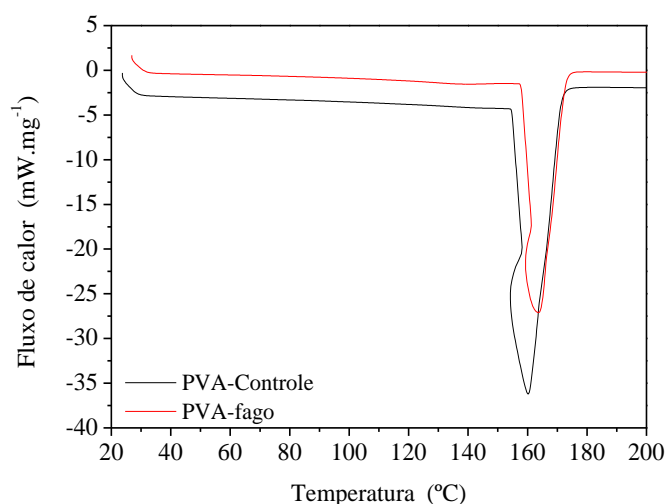


Figura 7 – Curvas de DSC dos hidrogéis de PVA-controle e PVA-fago.

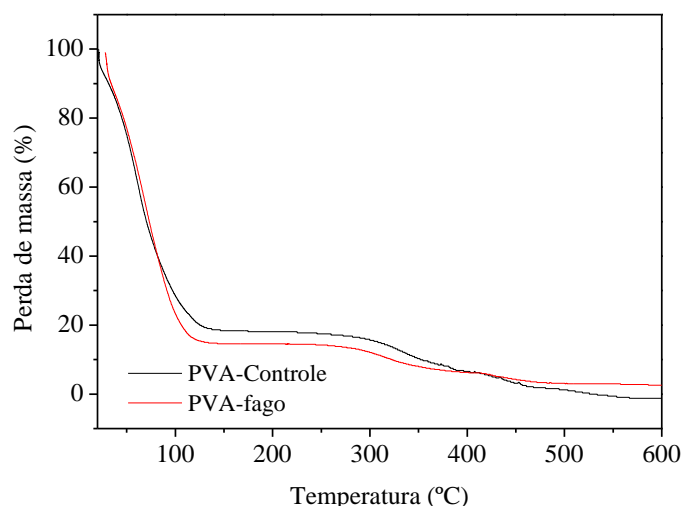


Figura 8 – Curvas de TGA para os hidrogéis de PVA-controle e PVA-fago.

As curvas calorimétricas do PVA-controle e do PVA-fago mostraram um evento exotérmico na temperatura de aproximadamente 160 °C, característico de uma temperatura de fusão do PVA. Além disso, os picos apresentaram-se acentuados e estreitos, o que pode estar relacionado com o grau de cristalinidade do polímero. Pode-se verificar em outros estudos uma diferença nessa temperatura de fusão, uma vez que o obtido por outros estudos foi de 212 °C. Porém, variações nessa temperatura estão relacionadas ao grau de hidrólise e a massa molar do polímero [22, 29, 31, 39].

Para a perda de massa (TGA) observamos duas regiões de perda para o PVA-controle e PVA-fago. A primeira perda é em torno de 100 °C, a segunda em torno de 350-400 °C. Resultados semelhantes são mostrados por outros estudos e, considera-se que o primeiro estágio está relacionado à perda de água [25, 26, 31, 32] e a segunda perda está relacionada à degradação térmica do material.

4. Conclusão

O hidrogel de PVA reticulado com glutaraldeído e adicionado do bacteriófago UFV-AREG1 apresentou grau de intumescimento e maior efeito antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7 maior que o PVA-controle (sem adição do fago) o que pode favorecer a sua liberação para o meio. O fago estava presente no PVA numa média das unidades formadoras de placas de 10^7 PFU.mL⁻¹, constatando que 93 % do fago adicionado na solução ficou retido no hidrogel de PVA. Houve um surgimento de duas bandas em 2860 e 2930 cm⁻¹ do PVA-fago quando comparado ao PVA somente, indicativo da presença do fago no PVA. Além disso, não houve grande diferença nos eventos térmicos do PVA

e do PVA-fago, mostrando que o grau de cristalinidade não foi modificado. Com mais estudos e controle do processo, o hidrogel de PVA adicionado do bacteriófago UFV-AREG1 poderá ser utilizado como curativo adesivo pela indústria de alimentos no controle do patógeno *E. coli* O157:H7.

Agradecimentos

O grupo de pesquisa agradece à Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro na pesquisa. Ao Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa pelas imagens de DSC e TGA. À Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Alto Paraopeba por ceder o espaço para a realização da pesquisa.

Referências bibliográficas

1. (CDC), C.F.D.C.A.P. (2017). *Escherichia coli* 2017. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>> Acesso em: 26 de julho de 2018.
2. Voidarou, C., et al. (2007). Aerobic and Anaerobic Microbiology of the Immersion Chilling Procedure During Poultry Processing. **Poultry Science**, 86(6), p. 1218-1222.
3. Berry, E. D. and Wells, J. E. (2010). *Escherichia coli* O157: H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. **Advances in food and nutrition research**, Elsevier, p. 67-117.
4. Chekabab, S. M., et al. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157: H7. **FEMS Microbiology Letters**, 341(1), p. 1-12.
5. Lopez-Velasco, G., et al. (2015). Factors affecting cell population density during enrichment and subsequent molecular detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce contaminated during field production. **Food Control**, 54, p. 165-175.
6. Berry, E. D., et al. (2015). Effect of proximity to a cattle feedlot on *Escherichia coli* O157: H7 contamination of leafy greens and evaluation of the potential for airborne transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(3), p. 1101-1110.
7. Honish, L., et al. (2017). *Escherichia coli* O157: H7 Infections associated with contaminated pork products - Alberta, Canada, July–October 2014. **Canada communicable disease report - Relevé des maladies transmissibles au Canada**, 43(1), p. 21-24.

8. Paul, V. D., et al. (2011). Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection. **BMC Microbiology**, 11(1), p. 195.
9. Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. **Nat. Rev. Microbiol.**, 8(5), p. 317-27.
10. Lu, T. and Collins, J. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104, p. 11197 - 11202.
11. Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, p. 18-23.
12. Azevedo, M. D. (2002). Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. **In: Workshop do Curso: Tópicos Especiais em Química Inorgânica, IV introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico.**
13. Hong, H., et al. (2014). Facile method to prepare self-healable PVA hydrogels with high water stability. **Materials Letters**, 122, p. 227-229.
14. Jones, A. and Vaughan, D. (2005). Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. **Journal of Orthopaedic Nursing**, 9, p. S1-S11.
15. Gu, T., et al. (2014). A preliminary research on polyvinyl alcohol hydrogel: A slowly-released anti-corrosion and scale inhibitor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 122, p. 453-457.
16. Lopez, M. E. S., et al. (2016). Genome Sequence of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Bacteriophage UFV-AREG1. **Genome Announcements**, 4(5).
17. Pompeu, L., et al. (2013). Aluminatos de cálcio e seu potencial para aplicação em endodontia e ortopedia (Calcium aluminates potential for endodontics and orthopedic applications). **Cerâmica**, 59, p. 216-224.
18. Kokabi, M., Sirousazar, M. and Hassan, Z.M. (2007). PVA - clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. **European Polymer Journal**, 43(3), p. 773-781.
19. Bauer, A., et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45(4-ts), p. 493-496.
20. CLSI. (2011). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: TwentyFirst Informational Supplement.** Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA.
21. Hwang, M. R., et al. (2010). Gentamicin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol/dextran hydrogel: gel characterization and in vivo healing evaluation. **Aaps Pharmscitech**, 11(3), p. 1092-1103.

22. Coelho, S. L. (2012). **Desenvolvimento e Caracterização de Hidrogel para Liberação de Nitrofurazona**, in **Ciências Farmacêuticas**. Universidade de Sorocaba: Sorocaba. p. 84.
23. Amaral, R. H., et al. (2008). Caracterização físico-química e biocompatibilidade in vitro de membranas de hidrogel. *In Anais do Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*.
24. Sadahira, C. M. (2007). **Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação "in vitro" de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químico**. Universidade Federal de Minas Gerais. p. 89.
25. Hezaveh, H. and Muhamad, I. I. (2013). Controlled drug release via minimization of burst release in pH-response kappa-carrageenan/polyvinyl alcohol hydrogels. **Chemical Engineering Research and Design**, 91(3), p. 508-519.
26. Juby, K. A., et al. (2012). *Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study*. **Carbohydrate Polymers**, 89(3), p. 906-913.
27. Wang, F., Wen, Y. and Bai, T. (2016). The composite hydrogels of polyvinyl alcohol–gellan gum-Ca²⁺ with improved network structure and mechanical property. **Materials Science and Engineering: C**, 69, p. 268-275.
28. Mahdavinia, G. R. and Etemadi, H. (2014). In situ synthesis of magnetic CaraPVA IPN nanocomposite hydrogels and controlled drug release. **Materials Science and Engineering: C**, 45, p. 250-260.
29. Juvencio, L. R. F. (2017). **Preparação e caracterização de filme de PVA/Quitosana/Colágeno visando a aplicação como curativo cutâneo**.
30. Mansur, H. S., et al. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, 28(4), p. 539-548.
31. Zu, Y., et al. (2012). Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 50(1), p. 82-87.
32. Choo, K., et al. (2016). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. **Materials**, 9(8), p. 644.
33. ANVISA. (2009). **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana**.

34. Sejas, L. M., et al. (2003). Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39(1), p. 27-35.
35. Padoveze, M. C. and Castelo Branco Fortaleza, C. M. (2014). Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 48(6).
36. Madigan, M. T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1997). **Brock biology of microorganisms**. Vol. 11: Prentice hall Upper Saddle River, NJ.
37. Miller, R. V. and Day, M. J. (2008). Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. **Bacteriophage Ecology**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
38. Abedon, S. T. (2008). **Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses**. Vol. 15: Cambridge University Press.
39. Rasia, G. M. (2015). **Síntese e funcionalização de hidrogéis de poli (álcool vinílico)**.

Material suplementar

A Figura S1 representa o espectro de absorção no infravermelho da suspensão do fago UFV-AREG1 em tampão SM.

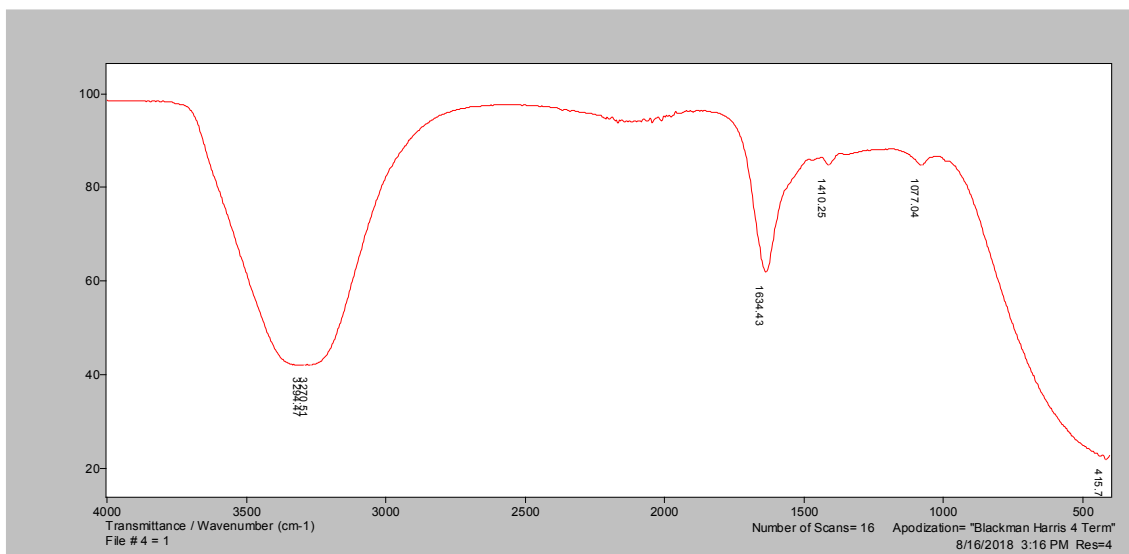


Figura S1 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para a suspensão do fago UFV-AREG1.

7. Conclusão geral

O objetivo do nosso trabalho foi incorporar o bacteriófago UFV-AREG1 em duas diferentes matrizes poliméricas e em um nanomaterial para posterior aplicação na indústria de alimentos. As matrizes poliméricas escolhidas foram o alginato-Na e o polivinil-álcool (PVA) e o nanomaterial foi o nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT).

O primeiro capítulo apresentou a incorporação de 90 % de fago em alginato via técnica de microfluídica, corroborado, também, com a microscopia confocal de varredura em que o fago corado microencapsulado pode emitir fluorescência no equipamento. As microcápsulas foram aplicadas em um gel de propilenoglicol e sua estabilidade no gel foi mantida durante os 21 dias de análise. O gel foi aplicado em uma superfície e mostrou-se eficiente na redução da bactéria *E. coli* O157:H7 comparado com o álcool 70 %. Assim, foi possível microencapsular os fagos em matriz de alginato-Ca e aplicar as microcápsulas no gel antimicrobiano para uso como sanitizantes na indústria alimentícia.

O segundo capítulo do nosso trabalho desenvolveu um nanobiosensor para detecção de *E. coli* O157:H7 com a adsorção do fago em nanotubos de carbono de paredes múltiplas e a medição de tensão. A melhor condição de adsorção do fago no nanotubo foi encontrada após um delineamento experimental Box- Behnken, sendo a melhor condição: massa de CNT (0,01 g), tempo de agitação (2 min) e temperatura de secagem (32,5 °C).

Além disso, o teste disco-difusão confirmou a atividade antimicrobiana no material preparado. Esses resultados, portanto, são um indicativo de que foi possível criar um envelope de forma a aumentar a durabilidade e a estabilidade do bacteriófago, além de preservar sua capacidade de combater a proliferação bacteriana. Após montagem do circuito eletrônico e, posteriormente, a montagem do nanobiosensor para detecção de *E. coli* O157:H7 utilizando o MWCNT com o fago imobilizado, os resultados foram satisfatórios na detecção da bactéria pelo sensor proposto demonstrando que a bactéria pode ser detectada na amostra após 40 min de análise e leitura do sistema. Isso nos possibilita também utilizar outros fagos imobilizados no nanotubo em acordo com hospedeiro de interesse. Testes futuros serão realizados para melhoria do nanobiosensor de tal forma a torná-lo comercial para a indústria e laboratórios de análises de alimentos.

O terceiro capítulo mostrou a incorporação de 93 % do fago em hidrogel de PVA, apresentando um maior efeito antimicrobiano do que o PVA livre de fago via teste de halo de inibição. O hidrogel de PVA reticulado com glutaraldeído e adicionado do

bacteriófago UFV-AREG1 apresentou grau de intumescimento maior que o PVA-controle (sem adição do fago) o que favorece a sua liberação controlada para o meio.

Houve um surgimento de duas bandas em 2860 e 2930 cm^{-1} do PVA-fago quando comparado ao PVA somente, indicativo da presença do fago no PVA. Além disso, não houve grande diferença nos eventos térmicos do PVA e do PVA-fago. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para que o hidrogel de PVA adicionado do bacteriófago UFV-AREG1 possa ser utilizado como curativo adesivo pela indústria de alimentos no controle do patógeno *E. coli* O157:H7.

Em geral a incorporação do fago UFV-AREG1 em matrizes poliméricas, como o alginato-Na e álcool poli(vinílico) para liberação no meio e aplicação como biocontrole e terapia e sua adição em MWCNT para uso como nanobiosensor se mostrou satisfatória em todos os estudos realizados neste trabalho, demonstrando que o fago tem potencial para ser utilizado para esses fins. Para aplicação na Indústria de Alimentos, trabalhos futuros do fago em PVA se fazem necessários em meio *in vivo* para a finalidade do curativo adesivo. Quanto ao nanobiosensor, se faz necessário mais testes específicos na bactéria de interesse para determinação do limite de detecção do sensor e, conseqüentemente, sua aplicação em alimentos, para se ter uma padronização da técnica de uso. E também determinar a montagem final do sensor, de tal forma que o mesmo se torne comercial para ser apresentado no mercado.