

DANIELLE CRISTINA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE *Salmonella* RESISTENTES A  
DESIDRATAÇÃO PARA O PREPARO DE MATERIAL DE  
REFERÊNCIA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

DANIELLE CRISTINA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE *Salmonella* RESISTENTES A  
DESIDRATAÇÃO PARA O PREPARO DE MATERIAL DE  
REFERÊNCIA**

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

APROVADA: 12 de março de 2010

---

Prof<sup>a</sup> Miriam Teresinha dos Santos  
(co-orientadora)

---

Dr<sup>a</sup> Virginia Maria Chaves Alves  
(co-orientadora)

---

Prof<sup>o</sup> Antônio Galvão do Nascimento

---

Dr<sup>a</sup> Cláudia Lúcia Oliveira Pinto

---

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

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo fôlego de vida, por ter me amado antes de tudo e nunca ter desistido de mim. Pela companhia, proteção e força para seguir adiante e nunca desistir. Tenho a certeza de que sem Ele, nada seria possível. A Ele seja dada toda a honra, toda glória e todo louvor.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade da realização do mestrado nessa instituição, pelo suporte teórico, pela infra-estrutura para realização dos experimentos e pela contribuição na minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

Aos funcionários, colegas e professores do Departamento de Microbiologia por toda ajuda e atenção que sempre me foi prestada.

Ao meu filho João Guilherme de Oliveira Nascimento, por ter sido meu anjo da guarda, minha inspiração, minha força nos momentos difíceis e acima de tudo por ser uma parte de mim.

Aos meus pais Maria Cristina de Oliveira e Daniel José do Nascimento (em memória) por terem me dado o dom da vida e por terem sido meu forte, meu auxílio e por terem me ensinado valores. Pelo amor, carinho e cuidado que sempre me dedicaram. Amo muito vocês.

À minha irmã Marília Gabrielle de Oliveira Nascimento, pelo amor, apoio, companheirismo e estímulo, mesmo que distante.

Aos membros de minha família: avós, tios, primos. Por estarem sempre comigo, fazendo parte do meu crescimento pessoal e profissional. A minhas tias Maria Auxiliadora Oliveira e Ana Lúcia de Oliveira pelo companheirismo, amor, consideração e amizade. Aos meus tios Raimundo Nonato e Antônio Carlos por serem exemplo profissional de amor e força. Aos meus primos Antônio Filho, Carlos César, Carlos Eduardo, Renato Rodrigo (em memória) e Laryssa Lorena, pelos momentos de alegria compartilhados e exemplos de pessoas que são.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pelo exemplo de pessoa e de profissional a ser seguido. Por toda a acolhida, confiança, companheirismo, críticas e carinho contribuindo em muito na pessoa e na profissional que sou hoje.

À professora Miriam Teresinha dos Santos pelo carinho e sugestões.

À doutora Virgínia Maria Chaves Alves pela ajuda técnica e opiniões.

Aos professores Denise Mara Soares Bazzolli, e Antônio Galvão pela paciência, conselhos, críticas e amizade durante o acompanhamento do estágio em ensino e pela amizade dedicada.

Aos amigos Margarete e José Maria, por terem sido sempre solícitos, pelo companheirismo, amizade e auxílio na realização dessa pesquisa.

Aos meus amados amigos Natan Pimentel e Laélia Soares, por estarem ao meu lado desde o início do curso, pelos momentos que tornaram meus dias mais felizes e pelo constante aprendizado, apoio e incentivo que me foram dedicados. Agradeço ao carinho e força dados por cada um de vocês nesses dois anos, pelos momentos de alegria e pelo consolo nos dias tristes. Jamais me esquecerei de vocês.

As minhas amadas amigas Maria Carolina, Mirella Moraes, Priscila Castanha, Gabriella Vilella, Alane Ramos e Cyntia Rodrigues por serem minhas amigas, pelo abraço, força, apoio, carinho, consolo, estímulo e consideração mesmo a distância. Por terem me recebido sempre com carinho e terem tornado minha vida mais feliz, por serem exemplos de pessoas e profissionais.

As minhas amigas de república Cláudia Braga, Cláudia Prudêncio, Bruna Magalhães, Marina Dal Monte e Alice Oliveira por terem sido minha

família em Viçosa, pelo carinho e atenção comigo e com o João sempre. Terei muitas saudades de vocês.

Aos funcionários, colegas e professores do Departamento de Microbiologia por toda ajuda e atenção que sempre me foi prestada.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meu MUITO OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

DANIELLE CRISTINA DE OLIVEIRA NASCIMENTO, filha de Daniel José do Nascimento e Maria Cristina de Oliveira, nasceu na cidade de Carpina - PE, em 10 de maio de 1986.

Em outubro de 2003 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural de Pernambuco, na cidade de Recife – PE, tornando-se bacharel em fevereiro de 2008.

Em março de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Material de Referência.....	3
2.2 Importância do gênero <i>Salmonella</i> em alimentos.....	5
2.3 Conservação de células bacterianas por liofilização.....	8
2.4 Agentes Osmoprotetores.....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Micro-organismo usado e preparo do inóculo.....	14
3.2 Determinação das condições de cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	15
3.3 Avaliação da influência de choque térmico sobre a sobrevivência de <i>Salmonella</i> . Enteritidis a liofilização.....	16
3.4 Determinação do substrato de suspensão de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis para o preparo de Material de Referência.....	17
3.5 Análise estatística.....	17

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
4.1 Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578.....	18
4.2 Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 à liofilização.....	20
4.3 Influência do choque térmico sobre a resistência de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 à liofilização.....	24
4.4 Substrato de desidratação para as células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578.....	25
4.5 Estabilidade do material liofilizado.....	28
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## RESUMO

NASCIMENTO, Danielle Cristina de Oliveira, MSc, Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Obtenção de células de *Salmonella* resistentes a desidratação para o preparo de Material de Referência.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadoras: Míriam Teresinha dos Santos e Virgínia Maria Chaves Alves.

Programas de controle e gestão da qualidade em laboratórios, a necessidade de padronização dos métodos de análise e repetibilidade dos dados experimentais têm impulsionado o aumento da utilização de Material de Referência (MR) nas análises microbiológicas. Considerando que as etapas de preparo e armazenamento do MR são processos estressantes que ocasionam injúrias ao micro-organismo teste faz-se necessário a preparação das células para tolerar a variação de temperatura e umidade a que são submetidas durante a liofilização e o armazenamento. Objetivou-se, neste trabalho, obter células de *Salmonella enterica* resistentes a liofilização para o preparo de MR e avaliar a estabilidade destas células ao longo da estocagem. O crescimento de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis PT4 578 foi acompanhado em caldo infusão cérebro coração (BHI) e meio mínimo de sais (MMS) acrescido dos solutos 0,5 M de cloreto de sódio (NaCl), 3 mM de trealose e, ou 0,05 mM de glicose. A

sobrevivência após a liofilização foi determinada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC.g<sup>-1</sup>). Avaliou-se o efeito do choque térmico nas células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 a 50 °C por 30 min no aumento da resistência à liofilização. Foi também avaliada a influência dos substratos de desidratação na resistência de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e a estabilidade do MR preparado durante 90 dias de estocagem a -20 °C e 4 °C. O meio de cultivo que garantiu a maior sobrevivência das células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 à liofilização foi o MMS, adicionado de NaCl, trealose e sacarose indicando que o estresse nutricional confere resistência cruzada à liofilização. O choque térmico diminui a viabilidade celular, após a liofilização. A adição de 100 mM de trealose e, ou sacarose ao leite desnatado reconstituído (LDR 10 %) como substrato de desidratação, aumentou a estabilidade das células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 no MR estocado a 4 °C e - 20 °C. A temperatura de estocagem de 4 °C resultou em perda da viabilidade celular em cerca de 2 ciclos logarítmicos após 90 dias de estocagem enquanto a -20 °C não houve perda na viabilidade celular significativa. Os resultados indicam que, para a obtenção de MR com maior estabilidade, há a necessidade do preparo da células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 para apresentar maior resistência a liofilização, submetendo estas células a condições de estresses nutricional e osmótico durante o cultivo e a inclusão de osmoprotetores (trealose ou sacarose) no substrato de desidratação.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Danielle Cristina de Oliveira, MSc, Universidade Federal de Viçosa, March of 2010. **Attainment of resistant cells of *Salmonella* the dehydration for the preparation of Material of Reference.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-Advisers: Míriam Teresinha dos Santos e Virgínia Maria Chaves Alves

Programs of control and management of the quality in laboratories, the necessity of standardization of the analysis methods and repeatability of the experimental data have stimulated the increase of the use of Reference Material (RM) in the microbiological analyses. Considering that the stages of preparation and storage of the MR are stress processes that causes to injuries to the microorganism test the preparation of the cells becomes necessary to tolerate the variation of temperature and humidity the one that is submitted during the freeze-drying and storage. It was objectified, in this work, to get resistant cells of *Salmonella enterica* the freeze-drying for the RM preparation and to evaluate the stability of these cells throughout the stockage. The growth of enteric *Salmonella* sorotipo Enteritidis PT4 578 was folloied in broth brain heart infusion (BHI) and mineral salts medium (MMS) increased of 0,5 M sodium chloride (NaCl), 3 mM of trehalose e, or 0,05 mM of glucose. The survival after the freeze-drying was determined by the counting of the number of form units of colonies (UF.g-1). The effect of the thermal shock in the cells of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 was evaluated the 50 °C in the increase of the resistance to the freeze-drying.

Also the influence of substrata of dehydration in the resistance of cells of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 and the stability of the MR was evaluated during 90 days of stockage in the 4 °C the - 20 °C. The way of culture that guaranteed the biggest survival of the cells of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 to the freeze-drying was the MMS, added of the evaluated solutos indicating it nutricional stress confers resistance crossed to the freeze-drying. The thermal shock diminishes the cellular viability, after the freeze-drying. The addition of 100 mM of trealose e, or sacarose to skimmed milk reconstituted (LDR) the 10%, increased the stability of the cells of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 in the stored MR the 4 °C and - 20 °C. The temperature of stockage of 4 °C resulted in loss of the cellular viability in about 2 logarithmic cycles after 90 days stockage while the -20 °C the loss in the cellular viability was ten times lesser. The results detach that, for the attainment of MR with bigger stability, it has the necessity of the preparation of the cells of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 to present greater resistance the freeze-drying, considering conditions of nutricional stress and osmotic during the culture and the inclusion of osmoprotectant in the dehydration substratum.

## 1. INTRODUÇÃO

Material de referência (MR) é definido pela norma ISO Guia 30: 1992 como “material ou substância homogênea que tem uma ou mais propriedades bem estabelecidas para ser usado na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais”. MRs químicos, biológicos, clínicos, industriais e ambientais são amplamente usados para calibração de instrumentos, validação de métodos e controle de qualidade e são ferramentas indispensáveis para o controle de qualidade nos procedimentos analíticos. Na preparação de um MR diversos aspectos devem ser levados em consideração como: seleção do material, preparação, embalagem, armazenamento, ensaios de homogeneidade e estabilidade, estudos de certificação, estimativa da incerteza de medição, documentação, gestão da qualidade, aprovação da certificação, distribuição e revalidação.

Vários fatores podem influenciar diretamente na estabilidade de um MR microbiológico como o tipo de micro-organismo teste, a composição e as condições de cultivo usado para multiplicação celular, a composição do substrato de suspensão para desidratação e as condições de estocagem. Os desafios para o desenvolvimento de MRs para análises microbiológicas não são apenas de natureza física ou química, mas também devem ser considerados os aspectos biológicos, como estabilização, sobrevivência e reativação de células viáveis.

MRs microbiológicos são encontrados em várias formas, sendo a mais comum, a forma desidratada. O processo de liofilização usado na desidratação é letal para muitas células, pois afeta consideravelmente os componentes celulares. Portanto, torna-se necessário a preparação das células do micro-organismo teste para resistir à variação de temperatura e umidade a que são submetidas nas etapas de produção, transporte e estocagem. Estruturas celulares como membrana citoplasmática, ácidos nucléicos e certas enzimas são os alvos celulares dos danos causados pela desidratação e devem ser estabelecidas condições de produção das células que minimizem os estresses sobre essas estruturas.

A utilização de agentes osmoprotetores, como sacarose e trealose, no preparo das células para liofilização é uma alternativa a ser considerada. Trealose é capaz de manter a estrutura tridimensional de lipídeos e proteínas sob estresse, preservando suas funções biológicas. Células liofilizadas e estocadas na presença de trealose têm diminuição na fase de adaptação e recuperam o volume celular anterior quando reidratadas.

Além de contribuir para o preparo de MR microbiológicos, a obtenção de células desidratadas estáveis pode impulsionar a preparação de biosensores, melhorar a estocagem de clones em laboratório e de estirpes usadas na fabricação de alimentos. Considerando o potencial de aplicação de células resistentes aos processos de produção e armazenamento de MR e a necessidade de metodologias certificadas para a detecção de *Salmonella* o objetivo do presente trabalho foi o de obter células de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis resistentes a desidratação para o preparo de MR liofilizado.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Material de Referência**

Um laboratório, para produzir dados consistentemente confiáveis deve implementar um programa apropriado de procedimentos de garantia da qualidade. Os métodos analíticos devem ser validados como adequados ao uso antes de serem utilizados no laboratório. O Ensaio de Proficiência é ferramenta fundamental para a verificação e acompanhamento dos resultados analíticos laboratoriais. Isso se dá por meio da avaliação do desempenho do laboratório por monitoramento contínuo e da identificação de problemas relacionados com a sistemática de ensaios, possibilitando o emprego de ações corretivas e, ou preventivas e, conseqüentemente, levando à implementação dos seus procedimentos (INCQS, 2003). O uso de MR é de suma importância para os ensaios de proficiência, uma vez que sendo esse material estável o bastante, este pode ser empregado desde a calibração de equipamentos até a validação de metodologias analíticas.

O material de referência certificado (MRC) sempre é acompanhado de certificado de análise, mencionando os valores das grandezas de interesse com as respectivas incertezas e a sua certificação é realizada utilizando-se metodologias primárias ou comparações interlaboratoriais (ISO GUIA 30:1992). MRs e MRCs necessitam atender a vários requerimentos incluindo: (1) representativo a cujo uso é usado; (2) homogeneidade

específica com limites definidos e (3) estabilidade específica com limites sobre um período de tempo específico (VELD, 1998).

O MRC deve estar numa matriz o mais compatível possível em relação aquela que está sendo utilizada no procedimento de medição e as propriedades certificadas no MRC em uso num processo de medição devem ser estáveis no decorrer do experimento. O certificado do MRC deve estabelecer os parâmetros referentes à estabilidade e a incerteza do valor certificado deve ser compatível com a exatidão e a confiabilidade requeridas no processo de medição. (ISO GUIA 30:1992)

Estão disponíveis no mercado diferentes tipos de MRs usados para dar suporte a medições voltadas para a composição química, biológica, clínica, física, propriedades de engenharia e outras áreas como na avaliação sensorial de alimentos e bebidas. São requeridos ainda para estimativa da incerteza de medição, na calibração e na adequação de equipamentos, reagentes e padrões. Eles podem ser caracterizados para “identidade” de um material, como por exemplo, a estrutura química, tipo de fibra, espécies microbiológicas, ou para “valores de propriedades”, como por exemplo, a quantidade de substância química específica e a dureza (INMETRO, 2005).

MRs são ferramentas indispensáveis para o controle de qualidade de análises microbiológicas (PHILIPP *et al.*, 2007). Para que o material de referência seja certificado o número de micro-organismos presentes deve estar distribuído homogeneamente entre as amostras e deve permanecer estável por longo período de tempo (VELD, HAVELAAR e STRIJP-LOCKEFEEER, 1999). MRs para análise microbiológica de alimentos são, em sua maioria, cápsulas de gelatina contendo leite em pó contaminado artificialmente pelo microrganismo de interesse. Existem ainda materiais no formato de pastilhas, lentículas, discos de gelatina e discos liofilizados (STAMP, 1947; MOOIJMAN *et al.*, 1992; CODD, RICHARDSON e ANDREWS, 1998; LIGHTFOOT, RICHARDSON e HARFORD, 2001; VENELINOV e QUEVAUVILLER, 2003; PHILIPP *et al.*, 2007).

Atualmente não existem MR para todos os ensaios químicos, físicos e microbiológicos realizados pelos laboratórios de análise de alimentos. Somente estão disponíveis MRs para as técnicas analíticas mais

rotineiramente empregadas e para um número muito restrito de matrizes. Esses MRs são muito caros, já que as etapas de certificação são demoradas e dispendiosas. Além disso, não há MRCs para a análise microbiológica de alimentos produzidos no Brasil e a importação destes é difícil, o que desperta o interesse do país em se firmar no mercado nacional e internacional como produtor de MR (ÁVILA *et al.*, 2003).

Em se tratando de MR microbiológico, vários fatores podem influenciar diretamente na estabilidade do material como tipo de micro-organismo teste, as condições do meio de cultura usado para multiplicação celular, composição do substrato de suspensão para desidratação, umidade relativa do laboratório e da matriz do material e as condições de estocagem (JANNING *et al.*, 1995). Os desafios para o desenvolvimento de MRs para análises microbiológicas não são somente de natureza física ou química, mas também devem ser considerados os aspectos biológicos, como estabilização, sobrevivência e reativação de células viáveis (PHILIPP *et al.*, 2007).

Como os MRs são ferramentas indispensáveis para a certificação de métodos de análise e sendo a análise de *Salmonella* uma ferramenta muito importante e muito usada para determinar a qualidade e segurança de alimentos, faz-se necessário o desenvolvimento de MRs para a harmonização de metodologias de detecção desse patógeno.

## **2.2 Importância do gênero *Salmonella* em alimentos**

O gênero *Salmonella* é significativo não somente por ameaçar a saúde pública mundial, mas também por ser um sistema modelo para o estudo de mecanismos fundamentais de patogênese bacteriana (OHL e MILLER, 2001). As principais síndromes clínicas associadas com infecções por *Salmonella* são febre tifóide, paratifóide e gastroenterites agudas e severas (OHL e MILLER, 2001) A importância clínica desta bactéria foi reconhecida muito tempo antes dos modernos métodos de especificação baseados em homologia de DNA (SALYERS e WHITT, 1994). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* é a maior causa das infecções não tifóides

relacionadas a alimentos em humanos e animais de sangue quente (BRENNER *et al.*, 2000; BETANCOR *et al.*, 2009).

*Salmonella* é um bastonete gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* não formador de esporos, anaeróbico facultativo e oxidase negativo (TERRAGNO *et al.*, 2003; FORSYTHE, 2005; JAY, 2005; SILVA *et al.*, 2007). Normalmente os membros do gênero são móveis, reduzem nitrato a nitrito e geralmente produzem ácido (prova bioquímica de vermelho de metila positiva) e gás a partir da fermentação da glicose. A temperatura e o pH de crescimento varia entre 5 °C e 7 °C e 46 °C, com ótima entre 35 °C e 43 °C e o pH entre 3,8 e 9,5 com ótimo entre 7 e 7,5. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (ICMSF, 1996; YAN *et al.*, 2003; POPOFF e LE MINOR, 2005).

Alimentos de origem animal particularmente carne de aves e ovos de galinha são as principais fontes deste patógeno, mas outros alimentos como vegetais frescos também são importantes (HALD *at al.*, 2004). Ovos e alimentos que contem ovos são os mais frequentemente envolvidos em surtos por *Salmonella* (EFSA, 2009). Diferentes sorotipos de *Salmonella* podem ser isolados de ovos, mas os dominantes são Typhimurium e Enteritidis responsáveis pela maioria dos surtos entre 1988 e 2008 (ICMSF, 1996; EFSA, 2009; HIERRO *et al.*, 2009). A contaminação dos alimentos ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação ou por contaminação cruzada de alimentos crus com processados (D'AOUST, 1994; FORSYTHE, 2005).

O micro-organismo multiplica-se no alimento até atingir a dose infecciosa que varia de 20 até 10<sup>6</sup> células de acordo com a idade e a saúde da vítima, com o alimento e ainda com o sorotipo de *Salmonella* (FORSYTHE, 2005; SILVA *et al.*, 2007). Após colonizar o intestino delgado, o micro-organismo pode atravessar a camada de muco intestinal aderindo às células do epitélio intestinal. *Salmonella* expressa diversas fimbrias que contribuem para a sua capacidade de aderir às células epiteliais do intestino (BAUMLER, TSOLIS e HEFFROM, 1997; BAUMLER, HARGIS e TSOLIS, 2000). Após a adesão às células intestinais o patógeno induz endocitose por parte da célula hospedeira formando vesículas onde irá se multiplicar. A infecção desencadeia uma resposta inflamatória. O período de incubação

antes do aparecimento dos sintomas varia de 16 a 72 horas, sendo a enfermidade normalmente, autolimitante e persiste durante 2 a 7 dias. Os sintomas da doença incluem geralmente diarreia, dor abdominal, febre branda e calafrios, náusea e algumas vezes vômito, dor de cabeça e fraqueza (SALYERS e WHITT, 1994; FORSYTHE, 2005; ANDREWS e BAUMLER, 2005).

O gênero *Salmonella* consiste de somente duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (POPOFF e LE MINOR, 2005; SILVA *et al.*, 2007). Esta nomenclatura está de acordo com o sistema atual adotado pelo CDC que tem como base as propriedades de hibridização do DNA. Sabe-se ainda que as subespécies são diferenciadas quanto às características antigênicas em cerca de 2.500 sorotipos, como por exemplo *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium ou ainda os sorotipos Typhi e Enteritidis (BRENNER *et al.*, 2000).

A técnica convencional de detecção de *Salmonella* em alimentos é um método cultural clássico de presença ou ausência, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis. Esse é o caso de alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella* e, ou alimentos em que as células de *Salmonella* se encontram em número muito reduzido, ou ainda naqueles em que as células de *Salmonella* se encontram injuriadas pelo processo de preservação como calor, congelamento ou desidratação (SILVA *et al.*, 2007). Segundo a Instrução Normativa n° 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, os métodos para isolamento e identificação de *Salmonella* em alimentos, usualmente, são divididos em cinco etapas sucessivas: pré-enriquecimento ou enriquecimento não-seletivo; enriquecimento seletivo; isolamento e seleção em meios sólidos seletivos e diferenciais; identificação bioquímica das colônias suspeitas; análise antigênica com anti-soro polivalente O (BRASIL, 2003).

Diante da problemática de surtos com *Salmonella*, a necessidade de garantir alimentos seguros e de qualidade à população nacional e internacional faz se necessário o uso de metodologias certificadas para a detecção desse patógeno. O MR é uma ferramenta importante para se alcançar esse objetivo. Além disso, como a forma mais comum de produção de MRs é a desidratação, é necessário que se estabeleçam condições que aumentem a tolerância das células de *Salmonella* a estresses como congelamento, liofilização e choque osmótico.

### **2.3 Conservação de células bacterianas por liofilização**

A liofilização é um dos métodos mais comumente utilizados para a preservação de coleções microbianas e oferece a conveniência da estocagem, do transporte e também por manter os micro-organismos viáveis por longos períodos de tempo (MIYAMOTO-SHINOHARA, 2006). Este método não é recomendado para micro-organismos anaeróbios ou microaerófilos, como os do gênero *Clostridium*, *Helicobacter*, e *Microcycilus* por estes serem sensíveis aos radicais do oxigênio (RUDGE, 1991; MALIK e LANG, 1996).

A liofilização pode ser definida como um processo de estabilização, no qual um material é previamente congelado e então a quantidade de solvente é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção para valores tais que impeçam a atividade biológica e reações químicas (AYROSA, FAINTUCH e PITOMBO, 2001). A finalidade do congelamento dentro do processo de liofilização consiste na imobilização do produto a ser liofilizado, interrompendo o metabolismo celular. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação seguida pela dessorção, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A estrutura e forma do produto, assim como a taxa de sublimação, são determinadas pelo processo de congelamento. A estrutura não deve ser alterada durante o processo de liofilização para se evitar a ocorrência de danos irreversíveis ou perda do produto. O congelamento é uma das etapas mais críticas do processo de liofilização (MURGATROYD *et. al.*, 1997).

O liofilizador consta basicamente de quatro partes: câmara de secagem, condensador, bomba de vácuo e compressor. A câmara de secagem se destina a receber o material a secar, é construída de forma a suportar as pressões negativas de operação e possui porta que fecha hermeticamente, através da qual se faz a carga e descarga do equipamento. A câmara de secagem está diretamente conectada ao condensador e este, por sua vez á bomba de vácuo. O condensador opera em temperaturas abaixo de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dependendo dos obstáculos que o vapor encontra para atingir o condensador. A temperatura da superfície do condensador deve ser mantida em valores tais que a pressão de vapor do gelo esteja bem abaixo da pressão total da câmara. Quanto maior for o gradiente de temperatura entre o produto e o condensador, maior será a velocidade de secagem. O calor deve ser fornecido ao material através do aquecimento das placas por um fluido circulante ou por resistência elétrica. A razão de remoção da umidade depende da taxa de fornecimento de calor ao produto. Portanto depende da condutividade térmica do material e da sua espessura (JENNINGS, 1988).

Para um material ser congelado, de forma que a liofilização possa ocorrer, deve haver mudança de fase envolvendo o solvente. Se o solvente é água, então devem ser formados cristais de gelo o que resulta na separação do soluto do solvente. Os solutos são então, confinados a uma localização conhecida como a região intersticial da matriz. Quando a temperatura e pressão requeridas são atingidas no condensador e câmara respectivamente, inicia-se a secagem primária. A temperatura é então aumentada de tal forma que a sublimação do gelo possa ocorrer na matriz do produto. Após a secagem primária, prossegue-se com a evaporação da água remanescente por um período em geral de 30 % a 50 % do tempo gasto na primeira fase. O processo de secagem secundária serve para diminuir o conteúdo de umidade residual no produto, de tal forma que já não haverá crescimento microbiano ou reações químicas (JENNINGS, 1999; AYROSA, FAINTUCH e PITOMBO, 2001; REY, 2002).

O processo de liofilização pode causar diversas mudanças estruturais no espectro das proteínas. Roy e Gupta (2004), por meio de análises por espectroscopia com infravermelho, estudaram as alterações

estruturais nas proteínas após a liofilização. Geralmente, a secagem de uma proteína induz à diminuição e desordem das estruturas de  $\alpha$ -hélice e o aumento nas estruturas folhas- $\beta$ .

Além das mudanças em proteínas sensíveis a liofilização altera também o estado físico dos lipídeos das membranas celulares. Ao remover as ligações de hidrogênio da água com as regiões polares dos fosfolipídios acontece aumento no empacotamento destes, e forças na cadeia acil aumentam a probabilidade de interações de Van der Waals. O resultado dessa mudança de conformação dos fosfolipídios leva à mudança de fase da membrana, da fase líquido cristal para a fase gel (CROWE *et al.*, 1988).

Uma vez que o processo de liofilização pode ser letal para algumas células ocasionado a perda de aproximadamente um ciclo logarítmico, já que este procedimento afeta severamente os componentes celulares (LIEVENSE *et al.*, 1994), torna-se necessário a preparação das células do micro-organismo teste para tolerar a variação de temperatura e umidade a que são submetidas nas etapas de produção, transporte e estocagem de MR (SILVA, 2008). Estruturas celulares como membrana citoplasmática, ácidos nucleicos e certas enzimas são os alvos celulares dos danos causados pela desidratação (TYMCZYSZYN *et al.*, 2007) e devem ser consideradas condições de produção das células que minimizem os estresses sobre essas estruturas.

## **2.4 Agentes osmoprotetores**

A estocagem durante longos períodos de tempo de células vivas é uma etapa crítica para diversas técnicas emergentes como a engenharia de células e tecidos, transplante de células e o uso de células vivas como biosensores para a detecção de xenobióticos e patógenos no ambiente (ACKER, 2002).

Diversos tipos de substâncias, como açúcares e outros carboidratos têm sido usados para diminuir os danos às células causados pela liofilização (SIMIONE e BROWN, 1991). Esforços vêm sendo feitos na intenção de entender a função dos açúcares intracelulares na proteção das células dos danos da desidratação (CROWE e CROWE, 2000; ACKER,

2002). Carboidratos de baixo peso molecular como a trealose, sacarose e maltose, apresentam capacidade de estabilizar material biológico durante a secagem (GUO *et al.*, 2000; CROWE *et al.*, 2001). O mais comum e mais efetivo desses açúcares é a trealose, que corresponde a 20% do peso da matéria seca de muitos organismos que sobrevivem naturalmente à desidratação, um fenômeno conhecido como anidrobiose (CROWE, HOEKSTRA e CROWE, 1992; CROWE *et al.*, 1997; GUO *et al.*, 2000)

A utilização de agentes osmoprotetores, como a trealose, no preparo das células para liofilização é uma alternativa a ser considerada (SILVA *et al.*, 2008). Trealose é amplamente distribuída nas células vivas, sendo em geral associada com a proteção a estresses (ARGUELLES, 2000; ELBEIN *et al.*, 2003), é um dissacarídeo não-redutor e carboidrato de reserva e pode ser acumulado como soluto compatível em resposta a várias condições estressantes, como desidratação, congelamento e estresse osmótico, aumentando a viabilidade das células a temperaturas baixas (KANDROR, DELEON e GOLDBERG, 2002; KWON *et al.*, 2003; OREN, 2003). Esse dissacarídeo é frequentemente encontrado em leveduras, fungos filamentosos, plantas, muitas bactérias e em archaeas termofílicas e halofílicas (SANTOS e DA COSTA, 2001; ELBEIN *et al.*, 2003). Tem demonstrado também diminuir os danos oxidativos causados por radicais oxigênio (BENAROUDJ *et al.*, 2001). A trealose acrescentada ao meio de desidratação ou acumulada como soluto compatível em resposta ao estresse osmótico, ocasionou aumento considerável na tolerância de *Escherichia coli* a processos de secagem (WELSH e HEBERT, 1999).

O mecanismo de proteção pela trealose ainda não é bem conhecido. Uma hipótese é de que a trealose possa substituir as moléculas de água após a desidratação, pela formação de ligações de hidrogênio ao redor de grupos polares e carregados presentes na membrana fosfolipídica e em proteínas (CROWE, CROWE e CHAPMAN, 1984; CROWE, 2002). A exclusão total ou parcial das moléculas de água e a ausência de formação de uma fase gel nas células desidratadas previne a ruptura de organelas celulares e reações de oxidação, o que mantém a integridade da estrutura e assim a viabilidade celular (POTTS, 1994; CROWE, 2002). Quando reidratadas as células retomam sua atividade normal sem danos letais

causados pelo ciclo desidratação/reidratação (CROWE, 2002). A trealose é capaz de manter a estrutura tridimensional de lipídeos e proteínas sob estresse e preservar suas funções biológicas. Em trabalhos anteriores foi demonstrado essa capacidade da trealose de preservar moléculas biológicas em situações de dessecação, exposição à luz e ao ar e estresse térmico (LESLIE *et al.*, 1995; PENNA e MEYER-FERNANDES, 1998). Células de diversos grupos biológicos como leveduras e vegetais, quando liofilizadas e estocadas na presença de trealose têm uma diminuição na fase de adaptação (lag) e recuperam o volume celular anterior quando reidratadas (ISRAELI *et al.*, 1993; TYMCZYSZYN *et al.*, 2007).

*Salmonella* Typhimurium é também capaz de acumular trealose em resposta ao estresse osmótico (CANOVAS *et al.*, 2001) e é um importante elemento da resposta a escassez de nutrientes (SPECTOR, 1998) sendo parcialmente controlada por RpoS (HENGGE-ARONIS *et al.*, 1991). Quando a osmolaridade externa aumenta, as células tendem a transportar solutos compatíveis como prolina, glicina-betaina, glutamato ou trealose, por transportadores de membrana do tipo ABC osmosensíveis para contrabalancear o aumento na pressão externa, glicina-betaina e prolina servem como osmoprotetores quando adicionados extracelularmente, mas glutamato e trealose podem ser sintetizados pela célula (FOSTER e SPECTOR, 1995). Quando a osmolaridade externa diminui a célula libera os solutos acumulados para o meio externo por meio de canais mecanosensíveis (ROMANTSOV, GUAN e WOOD, 2009).

As enzimas trealose-6-fosfato fosfatase (OtsB) e trealose-6-fosfato sintase (OtsA) são responsáveis pela conversão de UDP glicose e glicose-6-fosfato em trealose, sendo localizados em um único operon, o *otsBA*, (GIAEVER *et al.*, 1988). *Salmonella* Typhimurium mutantes nesse operon, crescem muito lentamente em meios de cultura contendo concentrações de 0,5 M de NaCl e diminuem a viabilidade para 0,6 % da densidade inicial de células (HOWELLS *et al.*, 2002).

Em estudo que *E. coli* foi geneticamente engenheirada para sintetizar sacarose pela adição do gene que codifica a sintase de sacarose (*spsA*) e testada para a sobrevivência após a desidratação. A estirpe recombinante exibiu uma sobrevivência dez vezes maior que a estirpe selvagem (BILLI *et*

*al.*, 2000). Estirpes de *E. coli*, destinadas a produção de etanol, sobreviveram mais a desidratação quando o açúcar disponível para a fermentação foi a sacarose, sendo a sobrevivência ótima entre 50 e 70 gramas de sacarose por litro (MILLER e INGRAM, 2008).

A obtenção de células desidratadas estáveis poderá dar maior impulso na preparação de biosensores, estocagem de clones em laboratório, linhagens usadas na manufatura de alimentos (BILLI e POTTS, 2002) e na produção de materiais de referência microbiológico.

Sendo *Salmonella* um patógeno importante para a saúde pública e o material de referência necessário para laboratórios de análise de alimentos na certificação de suas metodologias e nos ensaios de proficiência, a obtenção de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 estáveis poderá encurtar as etapas de desenvolvimento de MR e ainda garantir maior repetibilidade nas análises e conseqüentemente menor número de resultados falso negativo. Em estudo que *E. coli* foi geneticamente engenheirada para sintetizar sacarose pela adição do gene que codifica a sintase de sacarose (*spsA*) e testada para a sobrevivência após a desidratação. A estirpe recombinante exibiu uma sobrevivência dez vezes maior que a estirpe selvagem (BILLI *et al.*, 2000). Estirpes de *E. coli*, destinadas a produção de etanol, sobreviveram mais a desidratação quando o açúcar disponível para a fermentação foi a sacarose, sendo a sobrevivência ótima entre 50 e 70 gramas de sacarose por litro (MILLER e INGRAM, 2008).

A obtenção de células desidratadas estáveis poderá dar maior impulso na preparação de biosensores, estocagem de clones em laboratório, linhagens usadas na manufatura de alimentos (BILLI e POTTS, 2002) e na produção de materiais de referência microbiológico.

Sendo *Salmonella* um patógeno importante para a saúde pública e o material de referência necessário para laboratórios de análise de alimentos na certificação de suas metodologias e nos ensaios de proficiência, a obtenção de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 estáveis poderá encurtar as etapas de desenvolvimento de MR e ainda garantir maior repetibilidade nas análises e conseqüentemente menor número de resultados falso negativo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia Agrícola (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV)- MG.

#### 3.1 Micro-organismo usado e preparo do inóculo

Foi utilizada a estirpe *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo PT4 578, cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). A confirmação da pureza da cultura foi feita inoculando-se *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em caldo infusão de cérebro e coração - BHI (Difco, Sparks, USA) e, após incubação por 18 h a  $37 \pm 1$  °C, a cultura ativada foi estriada em ágar padrão de contagem- PCA (Difco, Sparks, USA) e incubada nas mesmas condições. Uma colônia isolada foi estriada em ágar xilose lisina desoxicolato- XLD (Acumedia, Lansing, Michigan) e incubada por mais 18 a 24 h a  $37 \pm 1$  °C. A cultura estoque para o experimento foi feita a partir de células sobreviventes a estresse nutricional por 3 h em solução salina tamponada a  $37 \pm 1$  °C, seguido de liofilização e estocagem a - 20 °C por 16 meses. O estoque desta cultura foi feito em caldo infusão de cérebro

e coração (BHI) contendo 20 % de glicerol e mantido a -20 °C até o momento do uso.

O crescimento de *Salmonella* Enteritidis foi acompanhado em caldo BHI acrescido de 0,5 M de cloreto de sódio (NaCl), 3 mM de trealose e, ou 0,05 M de glicose e meio mínimo de sais - MMS e glicerol ( $K_2HPO_4$  7 g L<sup>-1</sup>;  $KH_2PO_4$  2 g L<sup>-1</sup>;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g L<sup>-1</sup>;  $(NH_4)_2SO_4$  1 g L<sup>-1</sup>; glicerol 4 g L<sup>-1</sup> e  $CaCl_2$  1 mmol L<sup>-1</sup>) acrescido de 0,5 M de NaCl, 3 mM de trealose e, ou 0,05 M de glicose, em microplacas de Elisa. A leitura de absorvância a 630 nm foi realizada em intervalos de uma hora até que o micro-organismo atingisse a fase estacionária. O experimento foi feito com três réplicas em duas repetições.

### **3.2 Determinação das condições de cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578**

*Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi ativada em caldo BHI por duas vezes consecutivas por 18 a 24 horas a  $36 \pm 1$  °C. Alíquotas de 300 µL da cultura ativada foram adicionadas em 30 mL dos meios de cultura contendo caldo BHI acrescido de 0,5 M de NaCl, 3 mM de trealose e, ou 3 mM de sacarose e meio mínimo de sais – MMS e glicerol acrescido de 0,5 M de NaCl, 3 mM de trealose e, ou 3 mM de sacarose. A incubação feita foi a  $36 \pm 1$  °C e, após 6 e 12 h de crescimento foram retiradas alíquotas de 1mL das culturas em caldo BHI para plaqueamento pela técnica de microgotas (MORTON, 2001). As amostragens feitas quando o cultivo foi em MMS e ocorreram após 20 e 26 h de crescimento.

As células foram coletadas nos mesmos tempos por centrifugação a 2513 g por 15 min a uma temperatura de 18 °C. O centrifugado foi lavado por duas vezes em solução salina peptonada 0,1 % esterilizada e então ressuspendido em leite desnatado reconstituído (LPD) a 10 % (p/v). O leite em pó desnatado foi obtido no comercio local e esterilizado por irradiação gama com a dose de 10 kGy no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN, Minas Gerais, Brasil. A suspensão foi agitada por alguns minutos em agitador de tubos e o número de células viáveis foi determinado

pela técnica de plaqueamento em microgotas (MORTON, 2001) em PCA. As placas foram incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 18 h. Volumes de 500 µL das suspensões de células cultivadas nos diferentes meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro e congelados a - 80 °C para serem liofilizados (Heto Lab. Equipment, Heto-Holten A/S, Denmark) por  $18 \pm 2$  h. Após liofilização o conteúdo dos frascos foi ressuspenso com o volume de 500 µL de salina peptonada 0,1 % esterilizada, o número de células viáveis foi determinado pela formação de colônias em ágar PCA pela técnica de microgotas (Morton, 2001), e expressa em unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>).

A condição de cultivo que resultou em maior sobrevivência de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi escolhida para a continuidade dos experimentos.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados num fatorial dois por cinco por dois.

### **3.3 Avaliação da influência de choque térmico sobre a sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 à liofilização**

As células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foram cultivadas na condição que garantiu maior sobrevivência à liofilização. Após o tempo de crescimento foi determinado o número de UFC.mL<sup>-1</sup> pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em ágar PCA. As células então foram submetidas a choque térmico a 50 °C por 30 min em banho-maria com circulação de água. Em seguida, foi novamente determinado o número de UFC.mL<sup>-1</sup>. As células foram então preparadas para a liofilização como descrito anteriormente e liofilizadas sendo o número de células viáveis determinado após a processo de liofilização.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados num fatorial cinco por dois.

### **3.4 Determinação do substrato de suspensão de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 para o preparo de Material de Referência.**

Células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivadas na condição que resultou em maior sobrevivência foram preparadas para liofilização conforme descrito anteriormente e ressuspendidas em substrato de suspensão, contendo leite desnatado reconstituído a 10 % (p/v) adicionado ou não de 100 mM de trealose e, ou 100 mM sacarose. Após a liofilização o número de células viáveis foi determinado em PCA pela técnica de microgotas (MORTON, 2001).

O substrato de suspensão que resultou em maior sobrevivência de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi escolhido para a continuidade da pesquisa. O material foi liofilizado em frascos de vidro e em seguida fechado com lacres de alumínio e estocados a temperatura de refrigeração e congelamento. O número de sobreviventes foi analisado nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem à temperatura de refrigeração ( $4 \pm 2$  °C) e de congelamento ( $- 20 \pm 2$  °C) pela técnica de microgotas (MORTON, 2001). Para a determinação de sobreviventes, três amostras do material liofilizado, de duas repetições, foram analisadas.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados num fatorial cinco por quatro.

### **3.5 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa SAEG, versão 9.1 (FUNARBE, 2007).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

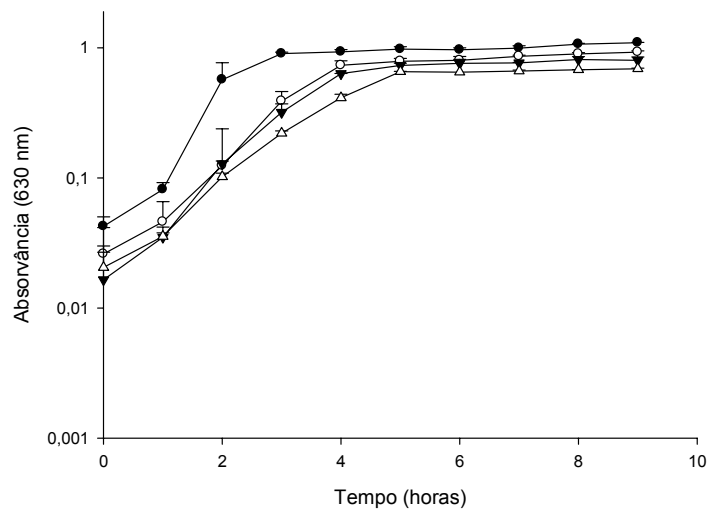
### 4.1 Crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578

Por meio da curva de crescimento determinou-se o tempo para *Salmonella* Enteritidis PT4 578 atingir a fase estacionária em caldo BHI adicionado de 0,5 M de NaCl, 3 mM de trealose e, ou 0,05 M de glicose (Figura 1) e em meio MMS e glicerol também adicionado dos mesmos solutos (Figura 2).

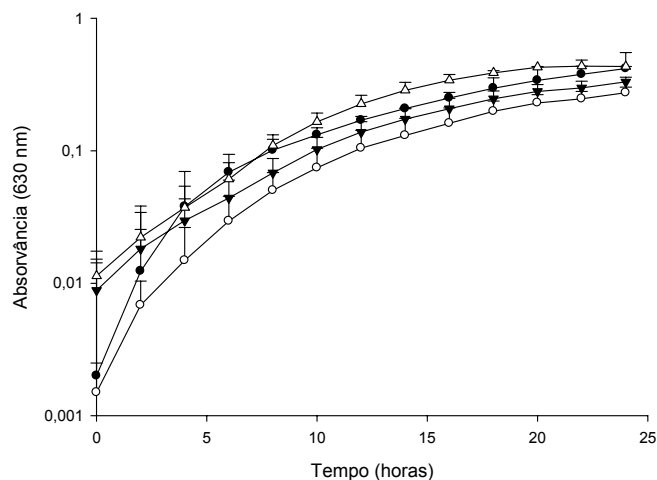
A adição de solutos aos meios de cultivo provocou um estresse osmótico indicado pelo retardamento do tempo de crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Quando culturas de *S. Typhimurium* são expostas a uma alta osmolaridade, estas diminuem instantaneamente sua densidade óptica o que é causado pela diminuição do volume citoplasmático, a densidade óptica é lentamente restabelecida quando ocorre a adaptação da cultura a nova condição ambiental (JOVANOVIČ *et al.*, 1988). O crescimento de *S. Typhimurium* em meio mínimo com 0,3 M de NaCl leva a um aumento de quatro a seis vezes no transporte de prolina para o interior celular (DUNLAP e CSONKA, 1985). Além disso a

hiperosmolaridade prolonga o tempo de adaptação celular, retardando a entrada na fase logarítmica de crescimento (MILLER e INGRAM, 2007).

Para a obtenção de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em fase estacionária estabeleceu-se os tempos de cultivo de 6 e 12 h em caldo BHI e 20 e 26 h em MMS, ambos adicionados dos solutos acima citados.



**Figura 1-** Crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em caldo BHI (—●—); BHI adicionado de 0,5 M de NaCl (—○—); BHI adicionado de 0,5 M de NaCl e 3 mM de trealose (—▼—) e BHI adicionado de 0,5 M de NaCl, 3 mM de trealose e 0,05 M de glicose (—△—).



**Figura 2-** Crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em meio MMS (—●—); MMS adicionado de 0,5 M de NaCl (—○—); MMS adicionado de 0,5 M de NaCl e 3 mM de trealose (—▼—) e MMS adicionado de 0,5 M de NaCl, 3 mM de trealose e 0,05 M de glicose (—△—).

## 4.2 Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis à liofilização

Células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em fase estacionária cultivadas em caldo BHI acrescido de NaCl, trealose e sacarose foram mais sensíveis ao processo de liofilização, indicado pelo maior número de reduções no número de ciclos log de células viáveis ( $P > 0,05$ ) comparado aos valores observados quando as células foram cultivadas apenas em caldo BHI (Tabela 1).

**Tabela 1-** Média de redução de ciclos logarítmicos de células após liofilização, de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivada em diversos meios de cultura.

Meios de cultura	N° de ciclos log reduzidos		
	Tempo de cultivo		
	6 h	12 h	
BHI <sup>1</sup>	1,72 A	1,85 A	
BHI+ 0,5 M NaCl	2,31 B	2,59 B	
BHI+ 0,5 M NaCl + 3 Mm trealose	2,17 B	2,42 B	
BHI+ 0,5 M NaCl + 3 Mm sacarose	2,22 B	2,70 B	
BHI+ 0,5 M NaCl + 3 Mm trealose + 3 Mm de sacarose	2,41 B	2,54 B	
Meios de cultura	Tempo de cultivo		
	20 h	26 h	
	MMS <sup>2</sup>	1, 21 C	1, 05 C
	MMS+ 0,5M NaCl	1, 44 C	0,85 D
	MMS+ 0,5M NaCl + 3 mM trealose	1, 51 C	0,88 D
	MMS+ 0,5M NaCl + 3 mM sacarose	1, 52 C	1,04 D
	MMS+ 0,5M NaCl + 3 mM trealose + 3 mM de sacarose	1, 27 C	1,16 C

<sup>1</sup>BHI - Caldo cérebro coração; <sup>2</sup>MMS - Meio mínimo de sais. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P = 0,05$ )

A restrição nutricional provocada pelo cultivo em MMS e glicerol aumentou a resistência de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 à liofilização constatada pelo menor redução de ciclos log (Tabela 1). Os solutos NaCl, trealose ou sacarose adicionados separadamente ao MMS e glicerol, ocasionou aumento significativo do número de sobreviventes após liofilização apenas após 26 h de cultivo. Esta informação pode ser constatada pela observação do número menor de ciclos log reduzidos (Tabela 1). Neste período de incubação as culturas encontravam-se há

mais de 6 h em fase estacionária o que poderia conferir maior oportunidade de resposta ao estresse. Segundo Legg (1998), a resistência de *Pseudomonas fluorescens* à desidratação aumentou significativamente em células com maior tempo na fase estacionária, aproximadamente 6 h, comparada com as células que estavam do início da mesma fase. Em *Salmonella*, a escassez de nutrientes pode levar à diminuição da culturabilidade e das atividades metabólicas, diminuição da capacidade de aderência e formação de biofilmes e ainda indução do acúmulo de trealose (SPECTOR, 1998; CARO, GOT e BALEUX, 1999; SUTHERLAND, 2001; GIAOURIS e NYCHAS, 2006).

A capacidade de acumular trealose ou outro carboidrato está associada ao aumento da tolerância a processos de desidratação e estresse osmótico. Esse acúmulo só é possível se o micro-organismo não puder utilizar esse carboidrato como fonte de carbono (STREETER, 2003) ou for capaz de concentrar as enzimas de utilização desse carboidrato dentro de vacúolos, como no caso de leveduras (JULES *et al.*, 2004; SAMPEDRO e URIBE, 2004).

A manutenção de células por mais tempo em fase estacionária resultou em maior resistência à liofilização quando *Salmonella* foi cultivada em MMS com adição de cada um dos solutos analisados (Tabela 1). De fato, a resistência a diversos tipos de estresses é desenvolvida durante a transição entre a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento (ROPERS *et al.*, 2006). Uma complexa rede genética regulatória integrada com vários sensores de fatores ambientais controla as mudanças morfológicas e fisiológicas durante a transição na fase de crescimento. Segundo Gottesman (1984), essa rede é composta por numerosos genes, proteínas e metabólitos, e os reguladores globais têm função chave nessa rede. Resultados similares ao encontrado em *Salmonella* Enteritidis PT4 neste trabalho foram observados em outras bactérias. Células de *Enterobacter sakazakii* em fase estacionária exibiram maior tolerância ao estresse osmótico e à desidratação, possivelmente pelo acúmulo de trealose, identificada por HPLC (BREEUWER *et al.*, 2003). Maior recuperação de células viáveis de *Lactobacillus rhamnosus* foi verificada após a desidratação de células em fase estacionária de 31 a 50 % quando

comparada com células em fase logarítmica (14 %) e na fase de adaptação (lag) (2 %) (CORCORAN *et al.*, 2004).

Outras bactérias também apresentam aumento de resistência à liofilização quando submetidas a estresse nutricional, como por exemplo, *Pseudomonas putida* cultivada sob estresse nutricional causado pela escassez de fontes de carbono apresentou resposta protetora contra a liofilização (PALMFELDT, RADSTROM e HAHN-HAGERDAL, 2003).

A etapa de congelamento faz parte do processo de liofilização e Palmfeldt, Radstrom e Hahn-Hagerdal (2003) observaram que células de *P. putida* em condições limitantes de carbono tiveram taxas de sobrevivência de 77 a 100 %, enquanto as células congeladas em fase exponencial de crescimento apresentaram taxas de 55 a 80 % de sobrevivência. A maior sobrevivência à liofilização pode ser atribuída à proteção cruzada conferida por proteínas expressas durante o estresse nutricional (DICKSON e FRANK, 1993). Em *E. coli*, dois grupos de genes codificam proteínas em resposta ao estresse nutricional: os genes *cst*, expressos em condições limitantes de carbono; e os genes *pex*, expressos em limitação de carbono, nitrogênio ou fósforo (CHUNG, BANG e DRAKE, 2006). A expressão de proteínas codificadas por esses genes pode induzir a proteção cruzada ao frio (SCHULTZ e MATIN, 1988); ao calor (ROWE e KIRK, 2000); a agentes químicos (JENKINS *et al.*, 1988; MATIN *et al.*, 1989; HENGGE-ARONIS, 1993); ao estresse osmótico (JENKINS *et al.*, 1990) e ao estresse ácido (JACKSON *et al.*, 1996; ELHANAFI *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2004).

O estresse osmótico causado pela adição dos solutos NaCl, trealose e sacarose ao meio BHI não conferiu aumento de resistência de *Salmonella* após liofilização, independente do tempo de cultivo das células (Tabela 1). É provável que as condições nutritivas do meio BHI associadas às concentrações dos solutos adicionadas não tenham resultado em resposta ao estresse osmótico suficiente para aumentar a sobrevivência à liofilização. Por outro lado, quando cultivada por 26 h em MMS e glicerol na presença dos mesmos solutos foi possível obter menor redução no número de células viáveis de *Salmonella* após a liofilização (Tabela 1). O cultivo das células em meio com alta osmolaridade permite o ajuste na distribuição de osmorreguladores na membrana citoplasmática (LANG, 2007; MUNNS e

TESTER, 2008) e resulta no acúmulo de solutos na tentativa de evitar a desidratação do citoplasma (ROMANTSOV, GUAN e WOOD, 2009). *Salmonella* Typhimurium em ambientes com alta osmolaridade importa rapidamente íons potássio, via sistemas de transporte que respondem à pressão de turgor, aumenta também a síntese de glutamato como forma de conter a pressão osmótica de forma rápida além de ativar outras respostas osmorregulatórias (ALTENDORF, 2009). Outros osmólitos orgânicos são então acumulados em menor velocidade pela importação e pela síntese, o que leva a redução da concentração de potássio e de glutamato. Quando os osmólitos exógenos são escassos, essa bactéria sintetiza e acumula trealose. Entretanto, betaína e prolina, se presentes no meio, são preferencialmente acumuladas por importação, e a síntese de osmoprotetores produzidos endogenamente é reduzida (BURG e FERRARIS, 2008). Pode-se sugerir então que houve acúmulo de osmólitos nas células de *Salmonella* disponíveis no meio de crescimento em resposta ao estresse osmótico, como o potássio, induzido pela adição de NaCl, trealose e sacarose e, dessa forma, houve aumento da capacidade de sobreviver ao processo de liofilização.

Os resultados obtidos reforçaram a informação de que a resistência de células à liofilização deve ser induzida desde o meio de cultivo e não somente constar da adição de agentes protetores na matriz de desidratação. Isso foi demonstrado por Morgan *et al.* (2006), que relataram que células microbianas devem ser condicionadas para a tolerância à desidratação, sendo expostas previamente a diversos tipos de estresses, como fase estacionária e condições de crescimento acidificadas. Na preparação de MRs células estáveis são de fundamental importância uma vez que nesse material não deve haver variação do número de unidades formadoras de colônias entre as amostras do mesmo lote, não haver interferência da matriz na análise e garantir a identificação do micro-organismo teste em ensaios qualitativos (PHILIPP *et al.*, 2007).

### 4.3 Influência do choque térmico sobre a resistência de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 à liofilização

O choque térmico de 37 °C para 50 °C durante 30 min não aumentou a resistência à liofilização, pois culturas que receberam o choque térmico apresentaram média de redução de ciclos logarítmicos maior do que o grupo controle, que não recebeu o referido tratamento (Tabela 2).

**Tabela 2-** Média de redução de ciclos logarítmicos após liofilização, de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em fase estacionária após cultivo em diversos meios de cultura e expostas a choque térmico de 37 °C para 50 °C por 30 min.

Meios de cultura	N° ciclos log reduzidos	
	Controle	Choque térmico
MMS <sup>1</sup>	1,99 A	1,82 A
MMS+ 0,5 M NaCl	1,18 B	1,97 A
MMS+ 0,5 M NaCl + 3 Mm trealose	1,47 B	1,92 A
MMS+ 0,5 M NaCl + 3 Mm sacarose	1,58 B	1,94 A
MMS+ 0,5 M NaCl + 3 Mm trealose + 3 Mm de sacarose	1,70 A	1,92 A

<sup>1</sup>MMS - Meio mínimo de sais. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (P= 0,05)

Resultado similar foi encontrado por Carmo (2006) em que a viabilidade de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 expostas a choque térmico por 30 min a 50 °C foi reduzida após a liofilização. Os resultados apresentados neste trabalho contradizem informações encontradas na literatura a respeito de *Salmonella*. Howells *et al.* (2002) verificaram que a estirpe de *Salmonella* Typhimurium que continha o gene para a sintase de trealose (*otsA*) silenciado apresentou sobrevivência 10 vezes menor ao tratamento a 50 °C, do que a estirpe selvagem, o que levou a conclusão de que a trealose influenciou na sobrevivência à altas temperaturas. Como a trealose é importante na sobrevivência de *Salmonella* a altas temperaturas e desempenha função osmoprotetora, foi suposto que o choque térmico induziria uma resposta cruzada à liofilização.

Entretanto, nas condições usadas neste estudo, não foi detectado aumento de resistência à liofilização em células submetidas ao choque térmico.

O estresse térmico além do estresse ácido induz o mesmo regulador de resposta RpoH em *E. coli*, que confere resistência ao calor e ao pH baixo e, por isso, é constatada a resistência cruzada a esses fatores estressantes (JENKINS, AUGER E MATIN, 1991). McCormick *et al.* (2003) constataram que a exposição de *Salmonella* à temperaturas um pouco superiores à temperatura de crescimento ótimo resultaram na produção de proteínas do choque térmico (HSP) que aumentam a tolerância térmica. Humfrey *et al.* (2003) verificaram que a transferência de *Salmonella* Enteritidis PT4 de 20 °C para 45 °C proporcionou resposta cruzada ao ácido. Entretanto, o choque térmico não confere resistência cruzada ao choque osmótico uma vez que a resistência ao estresse por falta de nutrientes na fase estacionária e no choque osmótico é dada pelo regulador global codificado pelo gene *rpoS* (WILDE *et al.*, 2000).

Outra hipótese para a não observação de resposta cruzada do estresse térmico ao estresse osmótico estaria relacionada à fase de crescimento e ao tempo de choque térmico a que as células foram expostas. Em *P. fluorescens* na fase estacionária a exposição ao choque térmico de 20 para 37 °C por cerca de 10 min levou ao aumento de apenas três vezes mais a sobrevivência após desidratação, enquanto que células na fase logarítmica de crescimento expostas ao mesmo tratamento aumentaram em 95 vezes a sobrevivência (LEGG, 1998).

Além do tempo de crescimento e a duração do choque térmico neste trabalho terem sido diferentes, as HSPs sintetizadas em resposta ao choque térmico não foram capazes de evitar os danos causados pelo congelamento e desidratação em *Salmonella* Enteritidis PT4 578.

#### **4.4 Substrato de desidratação para as células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578.**

Considerando que o estresse nutricional pelo cultivo em MMS e o estresse osmótico pela presença de NaCl, trealose e sacarose em MMS

resultou em maior resistência de *Salmonella* Enteritidis PT4 ao processo de liofilização, estes meios foram selecionados para a continuidade do estudo de sobrevivência em diferentes substratos de liofilização. Os resultados de sobrevivência de *Salmonella* cultivada em MMS com ou sem adição de solutos e liofilizadas em quatro tipos de substratos de desidratação estão apresentados na tabela 3.

Como a análise estatística dos dados não demonstrou diferença significativa do número de sobreviventes em relação ao substrato de cultivo a ao meio de liofilização, foram realizados testes de média individualmente. O meio de cultivo que apresentou menores médias de redução de ciclos logarítmicos foi o MMS acrescido de 0,5 M NaCl, 3 mM trealose e 3 mM de sacarose (Tabela 3).

**Tabela 3-** Média de redução de ciclos logarítmicos de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivada em MMS acrescido de diversos solutos, liofilizadas em diferentes substratos de liofilização.

Meios de cultura	Substratos de desidratação			
	LDR <sup>2</sup> 10 %	LDR 10 % + 100 Mm trealose	LDR 10 % + 100 Mm sacarose	LDR 10 % + 100 Mm trealose + 100 Mm de sacarose
MMS <sup>1</sup>	2,00 A	1,53 B	1,24 C	1,09 C
MMS+ 0,5 M NaCl	1,84 A	0,64 C	0,85BC	1,01 BC
MMS+ 0,5 M NaCl + 3 Mm trealose	1,65 A	1,06 BC	0,93 C	1,24 BC
MMS+ 0,5 M NaCl + 3 Mm sacarose	1,82 A	1,35 B	1,17 B	1,12 B
MMS+ 0,5 M NaCl + 3 Mm trealose + 3 Mm de sacarose	1,47 A	0,75 B	0,65 B	0,70 B

<sup>1</sup>MMS - Meio mínimo de sais, <sup>2</sup>LDR – Leite desnatado reconstituído. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (P= 0,05)

A presença de 100 mM de trealose e, ou sacarose usados como agentes crio e osmoprotetores adicionados isolados ou combinados ao LDR 10 % para liofilização levou ao aumento da sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (Tabela 3). Estes substratos foram então utilizados para a continuidade da pesquisa.

O LDR é amplamente empregado como meio para desidratação de bactérias lácticas, por prevenir injúria celular, pois contribui para estabilização dos constituintes da membrana, formando uma estrutura

porosa no produto desidratado o que leva a formação de uma capa protetora para as células (ANANTA *et al.*, 2005; MIYAMOTO e SHINOHARA, 2006). Em razão dessas características, essa matriz de suspensão é preferencialmente usada para o preparo de MRs para análise microbiológica de alimentos (LIGHTFOOT, RICHARDSON e HARFORD, 2001).

O efeito protetor de células microbianas ao processo de desidratação exercido pelos carboidratos é registrado na literatura. A desidratação de bactérias ressuspendidas em soluções contendo os dissacarídeos trealose e sacarose levou ao aumento da sobrevivência após a desidratação (POTTS, 1994; LESLIE *et al.*, 1995). Trealose e sacarose são açúcares não redutores conhecidos por estabilizarem proteínas, membrana citoplasmática e macromoléculas, mantendo-as num ambiente químico inerte (SUSSICH *et al.*, 2001; SAMPEDRO e URIBE, 2004). Como o mecanismo de proteção pela trealose ainda não é bem conhecido, trabalhos vêm sendo desenvolvidos para elucidação desse fenômeno. Células de *E. coli* e de *Bacillus thuringiensis* se desidratadas na presença de trealose têm uma sobrevivência de 70 % e 57 %, respectivamente (LESLIE *et al.*, 1995). Quando esses mesmos micro-organismos são liofilizados na presença de sacarose a sobrevivência de *E. coli* é de 56 % e de *B. thuringiensis* de 44 %, entretanto a desidratação na ausência dos açúcares resultou numa sobrevivência de apenas 8 % e 14 %, respectivamente (LESLIE *et al.*, 1995). A trealose tem ainda a capacidade de aumentar a tolerância à luz e a secagem ao ar, capacidade não observada na sacarose (LESLIE *et al.*, 1995).

A indução da biossíntese de trealose por uma pré-exposição ao estresse osmótico com a adição de sais pode ser combinada com a desidratação em soluções contendo trealose adicional e aumentou a sobrevivência de *E. coli* em 80 % (GARCIA *et al.*, 2000). Estirpes de *E. coli* que receberam um cassete integrado no cromossoma (*tac-otsBA*) para aumentar a síntese de trealose intracelular, sobreviveram mais à desidratação quando cultivadas em sacarose do que em xilose (MILLER e INGRAM, 2008). O efeito benéfico de trealose e sacarose na tolerância à desidratação pode resultar da sua natureza não reativa (MILLER e

INGRAM, 2008) e da capacidade de diminuir a temperatura de transição ( $T_m$ ) da membrana seca pela troca da água entre os grupos apolares de lipídios, prevenindo a fase de transição e seu consequente rompimento durante a reidratação (LESLIE *et al.*, 1995).

#### 4.4 Estabilidade do material liofilizado

O número médio de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis PT4 após a liofilização em LDR 10 % contendo 100 mM de trealose ou 100 mM de sacarose ou da mistura dos dois açúcares foi de  $2,8 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

A perda de viabilidade de células liofilizadas e estocadas a 4 °C foi maior no substrato de desidratação LDR 10% acrescido de 100 Mm de sacarose (Tabela 4).

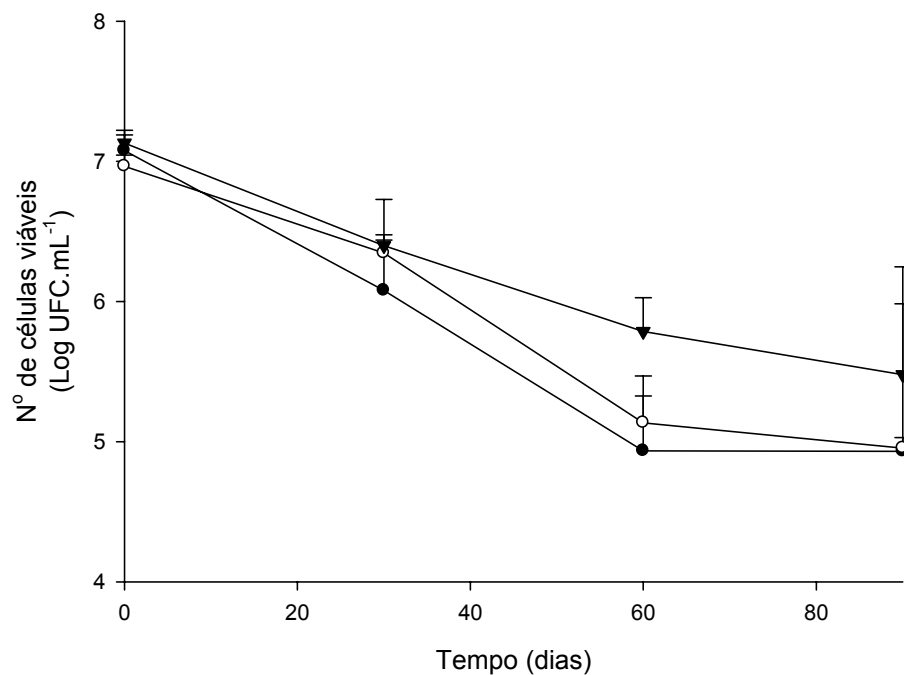
**Tabela 4-** Média de redução de ciclos logarítmicos de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 liofilizadas em LDR acrescido de diversos solutos, durante 90 dias de estocagem a 4 °C.

Meios de desidratação	Temperatura de Estocagem 4 °C
LDR <sup>1</sup> 10 % + 100 Mm Trealose	1,3788 A
LDR 10 % + 100 Mm Sacarose	1,8248 B
LDR 10 % + 100 Mm Trealose + 100 Mm de Sacarose	1,3438 A

<sup>1</sup> LDR – Leite desnatado reconstituído. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (P= 0,05)

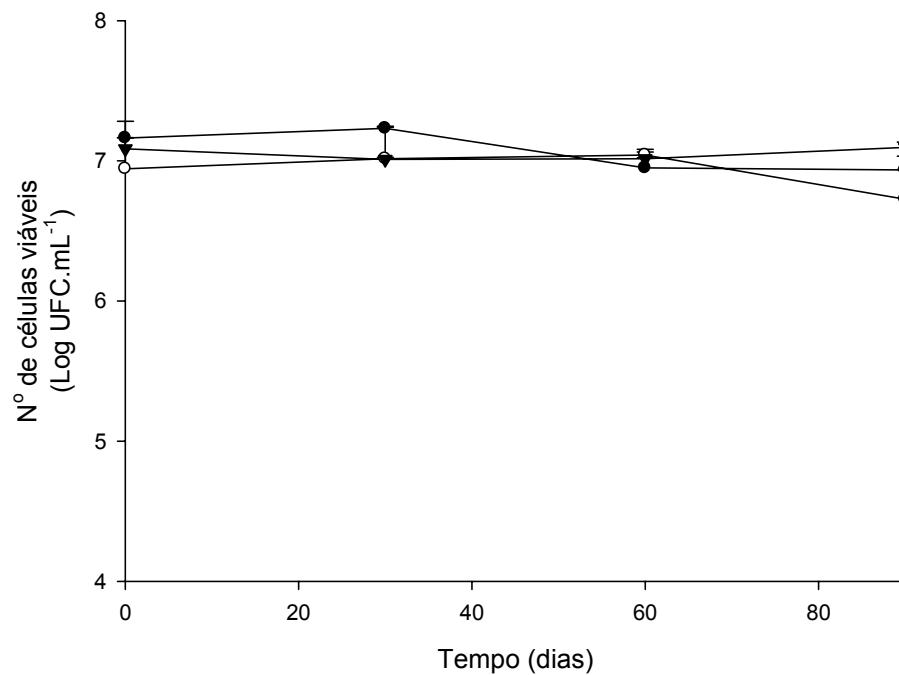
Durante 90 dias de estocagem, não houve diferença significativa entre os três substratos de desidratação, a presença de trealose no substrato garantiu um maior número de sobreviventes (Figura 3). A liofilização na presença de trealose também levou ao aumento da sobrevivência de células de *Campylobacter jejuni* em dois ciclos logarítmicos quando comparadas com a sobrevivência de células não tratadas, durante dois meses a 4 °C (PORTNER, LEUSCHNER e MURRAY, 2007). A temperatura de estocagem é fator importante na sobrevivência de células bacterianas liofilizadas. Beckers *et al.* (1985) avaliaram as temperaturas de 4 °C, 22 °C e 37 °C para estocagem de MR e verificaram

que 4 °C foi suficiente para manter a viabilidade de *Salmonella* por 120 dias. A variação nos resultados pode ser atribuída à natureza da embalagem do material e, no trabalho citado acima, os autores utilizaram o MR acondicionado em cápsulas e com sílica gel para diminuir a reidratação do material durante a estocagem. Costa *et al.* (2000) analisaram a vida útil de *Pantoea agglomerans* desidratada em diferentes temperaturas e concluíram que as células que ficaram armazenadas a 4 °C por 90 dias apresentaram redução de viabilidade em 0,5 ciclos logarítmicos, enquanto na população decélulas armazenadas a 25 °C por 28 dias houve redução da viabilidade em três ciclos logarítmicos. Portner, Leuschner e Murray (2007) verificaram que células de *C. jejuni* liofilizadas na presença de trealose tiveram viabilidade de dois ciclos logarítmicos maior do que as células não tratadas, durante dois meses a 4 °C.



**Figura 3-** Estabilidade do material com células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 liofilizado em LDR 10 % adicionado de 100 mM de trealose (—●—), LDR 10 % adicionado de 100 mM de sacarose (—○—) e em LDR 10 % adicionado de 100 mM de trealose e 100 mM de sacarose (—▼—), durante estocagem a 4 °C.

A redução do número de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis PT4 em cerca de 0,1 ciclo logarítmico constatado aos 30 dias de estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 4) foi 10 vezes menor do que no material estocado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  no mesmo período (Figura 3) e que se manteve praticamente sem alteração até 90 dias de estocagem. No substrato de desidratação LDR 10 % acrescido de 100 mM de trealose a redução do número de ciclos logarítmicos foi menor (Tabela 5).



**Figura 4-** Estabilidade do material com células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 liofilizado em LDR 10 % adicionado de 100 mM de trealose (—●—), LDR 10 % adicionado de 100 mM de sacarose (—○—) e em LDR 10 % adicionado de 100 mM de trealose e 100 mM de sacarose (—▼—), durante estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A presença dos açúcares no substrato de suspensão em conjunto com a temperatura de estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi determinante para a manutenção de maior viabilidade celular. Linsinger *et al.* (2001) verificaram que *Salmonella* Thyphimurium usada no preparo de MR em cápsula manteve viabilidade por 50 meses a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos que relatam o efeito de trealose e sacarose combinados na sobrevivência de bactérias à desidratação. Os resultados relativos ao uso separado de

osmoprotetores indicaram efeitos no aumento da resistência bacteriana à desidratação. A suplementação do meio de crescimento de bactérias do ácido lático com os açúcares que são adicionados ao substrato de desidratação levaram ao aumento da proteção à desidratação durante a estocagem (CARVALHO *et al.*, 2004). Em *Bradyrhizobium japonicum* Streeter (2003) demonstrou que a adição de trealose ao meio de crescimento foi mais efetiva na proteção contra a desidratação que apenas a adição de trealose ao substrato de desidratação.

**Tabela 5-** Média de redução de ciclos logarítmicos de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 liofilizadas em LDR acrescido de diversos solutos, durante 90 dias de estocagem a - 20 °C.

Meios de desidratação	Temperatura de Estocagem 20 °C
LDR <sup>1</sup> 10 % + 100 Mm Trealose	0,1114 A
LDR 10 % + 100 Mm Sacarose	0,6767 C
LDR 10 % + 100 Mm Trealose + 100 Mm de Sacarose	0,4137 B

<sup>1</sup> LDR – Leite desnatado reconstituído. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (P= 0,05)

A presença de trealose no substrato de desidratação além de manter as moléculas estáveis durante a desidratação, ajuda na manutenção da viabilidade celular durante o congelamento, pois moléculas de trealose se intercalam na membrana celular entre os grupos apolares dos fosfolípidios, tanto extra quanto intracelularmente, diminuindo a formação de cristais de gelo no interior da célula durante o congelamento mantendo a integridade da membrana e proteínas (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Entretanto, além da temperatura de estocagem, a atmosfera exerce influência sobre a sobrevivência de células bacterianas desidratadas. No presente estudo, células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foram liofilizadas em frascos de vidro e lacrados em atmosfera ambiente. Bozoglu *et al.* (1987) analisaram o efeito da estocagem ao ar, com nitrogênio e à vácuo, sobre a sobrevivência de células de *Lactobacillus bulgaris* e *Streptococcus thermophilus* desidratadas. A estocagem de células desidratadas em frascos de vidro à vácuo, ou em atmosfera de nitrogênio, resultou em maior sobrevivência do que as estocadas em ar atmosférico. Esses autores atribuíram esses resultados à difusão do oxigênio pela interface das células,

uma vez que estas permanecem permeáveis durante a estocagem, e que resulta em acúmulo de radicais livres do oxigênio. Como as células não podem metabolizá-los ou não conseguem transportá-los de forma ativa para o meio extracelular, esses radicais podem danificar de forma irreversível as estruturas celulares. Outro fator importante é a umidade do ambiente de estocagem, que pode afetar também a estabilidade do produto (MORGAN *et al.*, 2003). A adição de sílica gel em MR de *Salmonella* Typhimurium por Beckers *et al.* (1985) aumentou a estabilidade do mesmo na temperatura de 4 °C.

Os resultados reforçam a importância de que a escolha da temperatura adequada de estocagem influencia diretamente na recuperação das células. Resultados evidenciados por Janning *et al.* (1995) reforçaram que abusos de temperatura na estocagem e no transporte do material de referência podem afetar a sua utilização.

Os resultados do presente estudo reafirmam que devem ser utilizadas alternativas de preparo das células de *Salmonella* para tolerar a variação de temperatura a que são submetidas nas etapas de preparo, transporte e estocagem do MR. Essas alternativas devem ser adotadas desde o meio de cultivo das células até o substrato em que as células são liofilizadas e estocadas.

A obtenção e uso de células mais resistentes ao processo de liofilização e ao período de estocagem podem impulsionar o desenvolvimento de MRs com um maior prazo de validade, com um menor número de variações entre as unidades e mais homogêneo. Esses conduzem a melhorias significativas dos resultados analíticos, seja por meio da calibração dos instrumentos ou validações das metodologias empregadas (JENKS, 1995). Os materiais de referência são somente um dos itens necessários à confiabilidade metrológica das análises e por isso outros fatores também são importantes, como a aplicação de conceitos de boas práticas de laboratório e treinamentos dos analistas são também imprescindíveis (JENKS, 1995).

## 5. CONCLUSÕES

O estresse nutricional e osmótico induzido em *Salmonella* Enteritidis PT4 578 pelo cultivo em Meio mínimo de sais e glicerol acrescido de 0,5 M de NaCl, 3 mM trealose e 3 mM de sacarose conferiu maior resistência à liofilização. A exposição adicional de *Salmonella* ao choque térmico não aumentou a sobrevivência à liofilização.

O cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em condições de estresse nutricional e osmótico seguido da ressuspensão em Leite desnatado reconstituído (LDR 10 %) acrescido de 100 mM de trealose, de 100 mM de sacarose e 100 mM de trealose combinado com 100 mM de sacarose não resultou em diferença significativa na resistência de células de *Salmonella* logo após a liofilização.

O número de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 liofilizadas e estocadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi cerca de 10 vezes maior do que o material estocado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Durante a estocagem a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a redução na viabilidade celular foi de dois ciclos logarítmicos e na estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o substrato que continha os dois açúcares de forma combinada manteve maior viabilidade celular, com redução de apenas 0,1 ciclo logarítmico durante os 90 dias de estocagem.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, J. P.; FOWLER, A.; LAUMAN, B.; CHELEY, S.; TONER, M. Survival of desiccated mammalian cells: beneficial effects of isotonic media, **Cell Preservation Technology**. v. 1, p. 129– 140, 2002.

ALTENDORF, K.; BOOTH, J. R.; GRALLA, J. D.; GREIE, J. C.; ROSENTHAL, A. Z.; WOOD, J. M. Modulo 5.4.5. Osmotic stress. In BOCK, A.; CURTISS III, R.; KAPER, J. B.; KARP, P. D. NEIDHARDT, F.C.; NYSTROM, T.; SLAUCH, J.M. SQUIRES, C. L. (Eds). **American Society for Microbiology**, 2009.

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Internacional Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.

ANDREWS, H.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella* species. In: FRATAMICO, P.; BHUNIA, A. K.; SMITH, J. L. **Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology**. Caister Academic Press, p. 327- 339, 2005.

ARGUELLES, J.C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. **Archives of Microbiology**, v. 174, p. 217-224, errata 174, 456, 2000.

ÁVILA, A. K.; GEMAL, A. L.; GÓES, H. C. A.; OLIVERAS, L. Y.; BORGES, R. M. H.; FREITAS, S. C.; MARTINELLI, S.; CORRÊA, T. B. S.; SOUZA, V. I. Oficina sobre ensaios de proficiência e produção de materiais de referência no Brasil, em produtos relacionados às áreas de vigilância sanitária e ambiental, com ênfase em alimentos, **FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, Brasil, Dezembro/ 2003.

AYROSA, A.M.I.B.; FAINTUCH, B.L.; PITOMBO, R.N.M. Freeze-drying parameters and hygroscopic profile of radiopharmaceutical kits labeled with <sup>99m</sup>Tc. **The Journal of Nuclear Medicine**. v. 42, p. 264-270, 2001.

BAUMLER, A. J.; HEFFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for iroB. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1224- 1230, 1997.

BAUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50- 61, 2000.

BECKERS, H. J.; VAN LEUSDEN, F. M.; ROBERTS, D.; PIETZSCH, O.; PRICE, T. H.; VAN SCHOTHORST, M.; TIPS, P. D.; VASSILIADIS, P.; KAMPELMACHER, E. H. Collaborative study on the isolation of *Salmonella* from artificially contaminated milk powder. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 35- 40, 1985.

BENAROUDJ, N.; LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 24261–24267, 2001.

BETANCOR, L.; YIM, L.; FOOKES, M.; MARTINEZ, A.; THOMSOM, N.R.; IVENS, A.; PETERS, S.; BRYANT, C.; ALGORTA, G.; KARIUKI, S.; SCHELOTTO, F.; MASKELL, D.; DOUGAN, G.; CHABALGOITY, J.A.

Genomic and phenotypic variation in epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 237-242, 2009.

BILLI, D.; WRIGHT, D.J.; HELM, R.F.; PRICKETT, T.; POTTS, M.; CROWE, J.H. Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1680-1684, 2000.

BILLI, D.; POTTS, M. Life and death of dried prokaryotes. **Research in Microbiology**, v.153, p. 7-12, 2002.

BOZOGLU, T.F., OZILGEN, M., BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 9, p. 531–537, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 de 26 de agosto de 2003, Brasília/ DF. **Diário Oficial da União**, nº 181, seção 1, p. 14- 51, 2003.

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

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H.M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 967-973, 2003.

BURG, M.B.; FERRRARIS, J.D. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 7309-7313, 2008.

CAMPBELL, J.; BANG, W.; ISONHOOD, J.; GERARD, P. D.; DRAKE, M. A. Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 21, p. 727-735, 2004.

CANOVAS, D.; FLETCHER, S. A.; HAYASHI, M.; CSONKA, L. N. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3365–3371, 2001.

CARMO, A.P. Produção de cultura DVS (Direct Vat Set) para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo minas frescal. Viçosa: UFV 84p **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)**, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CARO, A.; GOT, P.; BALEUX, B. Physiological changes of *Salmonella typhimurium* cells under osmotic and starvation conditions by image analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 265–273, 1999.

CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X.; GIBBS, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 248–254, 2004.

CHANG, D.; SMALLEY, D.; CONWAY, T. Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. **Molecular Microbiology**, v. 45, n.2, p. 289–306, 2002.

CHUNG, H. J.; BANG, W.; DRAKE, M. A. Stress response of *Escherichia coli*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 52- 64, 2006.

CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p.1024–1039, 2004.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; VINAS, I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.873–878, 2002.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, p. 701–703, 1984.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F.; RUDOLPH, A. S.; AURELL WINSTROM, C.; SPARGO, B. J.; ANCHORDOGUY, T. J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 947, p.367–384, 1988.

CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M.. Anhydrobiosis, **Annual Review Physiology**, v. 54, p. 579–599, 1992.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; PRESTRELSKI, S.; HOEKSTRA, F.A.; ARAUJO, P.D.; PANEK, A.D. Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration, in: W.H. Dantzler (Ed.), **Handbook of physiology**, Oxford University Press, New York, NY, p. 1445–1477, 1997.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Preservation of mammalian cells—learning nature’s tricks, **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 145–146, 2000.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; OLIVER, A.E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W. TABLIN, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. **Cryobiology**, v. 43, p. 89–105, 2001.

CROWE, J.H.; Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosys. **Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology**, v. 131, p 505-13. 2002.

CODD, A.A.; RICHARDSON, I.R.; ANDREWS, N. Lenticules for the control of quantitative methods in food microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 913-917, 1998.

D'AOUST, J.-Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1-2, p.11- 31, 1994.

DICKSON, J. S.; FRANK, J. F. Bacterial starvation stress and contamination of beef. **Food Microbiology**, v. 10, p. 215- 222, 1993.

DUNLAP, V.J.; CSONKA, L.N. Osmotic regulation of L-proline transport in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.163, p.296-304, 1985.

EFSA. The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. **EFSA Journal**, v. 271, p. 1–102, 2009

ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I. e CARROLL, J. D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, p. 17R–27R.

ELHANAFI, D.; LEENANON, B.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Impact of cold and cold-acid stress on post-stress tolerance and virulence factor expression of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 19- 26, 2004.

FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. How *Salmonella* survive against the odds. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 145–174, 1995.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; MELO, L.C.V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo state, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n4, p. 19-184, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução de Guimarães, M. C. M. e Leonhardt, C. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2005.

GARCIA, A.; BREDHOLT, H.; STROM, A.R.; TUNNACLIFFE, A. Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4142–4144, 2000.

GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. J. E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v. 23, p. 747-752, 2006.

GOTTESMAN, S. Bacterial regulation: global regulatory networks. **Annual Review of Genetics**, v. 18, n.18, p. 415–441, 1984.

GUO, N.; PUHLEV, I.; BROWN, D. R.; MANSBRIDGE, J.; LEVINE, F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 168–171, 2000.

HALD T.; VOSE D.; WEGENER H. C.; KOUPEEV T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. **Risk Analysis**, v. 24, n1, p. 255-269, 2004.

HAULY, M. C. O.; NOGUEIRA, R. B.; OLIVEIRA, A. S. Influence of NaCl and NaNO<sub>2</sub> on the lactic acid fermentation of *Lactobacillus curvatus* grown in MRS medium. **Seminário de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 22, p. 37-41, 2001

HENGGE-ARONIS, R.; KLEIN, W.; LANGE, R.; RIMMELE, M.; BOOS, W. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 7918–7924, 1991.

HENGGE-ARONIS, R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. **Cell**, v. 72, p. 165- 168, 1993.

HIERRO, E.; MANZANO, S.; ORDÓÑEZ, J. A.; HOZ, L.; FERNÁNDEZ, M. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 125-130, 2009.

HOWELLS, A. M., BULLIFENT, H. L., DHALIWAL, K., GRIFFIN, K., GARCIA, D. C., FRITH, G., TUNNAcliffe, A. e TITBALL, R. W. Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 281–287, 2002.

HUMPREY, T.J.; WILDE, S.J.; ROWBURY, R.J. Heat tolerance of *Salmonella typhimurium* DT104 isolates attached to muscle tissue. **Letters in Applied Microbiology**, v.5, p. 265-268, 2003.

ICMSF- International Commission on Microbiological Specification for foods. **Microrganisms in food 5- Microbiological specifications of food pathogens**. Blackie Academic and Professional, 1996.

INMETRO. **Orientações para a seleção e uso de materiais de referência, DOQ- CGCRE- 016**, 2005.

INCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. I Oficina sobre Programas de Ensaio de Proficiência e Produção de Materiais de Referência no Brasil, com Ênfase em Alimentos, **Qualidade em Foco**. Dezembro, 2003.

ISO Guia 30:1992 Terms and definitions used in connection with reference materials, **International Standards Organization (ISO)**, Geneva.

ISRAELI, E.; SHAFFER, B. T.; LIGHTHART, B. Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. **Cryobiology**, v. 30, p. 519-523, 1993.

JACKSON, T. C.; HARDIN, M. D.; ACUFF, G. R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage temperature and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 230- 2037, 1996.

JANNING, B.; IN'T VELD, P. H.; MOOIJMAN, K. A.; HAVELAAR, A. H. Development, production and certification of microbiological reference material. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240- 245, 1995.

JAY, J. M., **Microbiologia de alimentos**. 6<sup>a</sup> ed, São Paulo: Artmed, 2005.

JENKS, P.J., "Use, abuse, and availability of certified reference materials", **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.352, p. 3-4, 1995.

JENKINS, D. E.; SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3910- 3914, 1988.

JENKINS, D. E.; CHAISSON, S. A.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 2779- 2781, 1990.

JENKINS, D. E., AUGER, E. A.; MATIN, A. Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1992-1996, 1991.

JENNINGS, T.A. Discussion of primary drying during lyophilization. **Journal Parenteral Science and Technology**, v. 42, p. 118-121, 1988.

JOVANOVIĆ, S.B.; MARTINELL, M.; RECORD, M.T.; BURGESS, R.R. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p. 534- 539, 1988.

JULES, M.; GUILLOU, V.; FRANCOIS, J.; PARROU, J.-L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.5, p. 2771–2778, 2004.

KANDROR, O., DELEON, A., GOLDBERG, A. L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proceedings of the National Academy of Science, USA** .v. 99, p.9727–9732, 2002.

KWON, H. B.; YEO, E. T.; HAHN, S. E.; BAE, S. C.; KIM, D. Y. AND BYUN, M. O.; Cloning and characterization of genes encoding trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) and trehalose-6-phosphate phosphatase (TPS2) from *Zygosaccharomyces rouxii*. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 433–440, 2003.

LANG, F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. **Journal of the American College of Nutrition**, v.26, p. 613S-623S, 2007.

LEGG, M. J. (Reading, England). Zeneca Limited (London, England). Viability of bacterial dried cells. **US patent 5728574A**, 17 mar. 1998.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L.M.; Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3592–3597, 1995.

LIEVENSE, L. C.; VERBEEK, M. A. M.; NOOMEN, A. AND VAN'T RIET, K.; Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 90–94. 1994.

LIGHTFOOT, N. F.; RICHARDSON, I. R.; HARFORD, J. P. The use of lenticules™ for the process control of enumeration techniques in food and

enviromental microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 660-667, 2001.

LINSINGER, T. P. J.; PUWELS, J.; VAN DER VEEN, A. M. H.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p.20- 25, 2001.

MALIK, K.A.; LANG, E. Successful preservation of *Campylobacteraceae* and related bacteria by liquid-drying under anaerobic conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, p. 37–42, 1996.

MATIN, A.; AUGER, E. A.; BLUM, P. H.; SCHULTZ, J. E. Genetic basis starvation survival in non-differentiating bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 43, p. 293- 316, 1989.

MCCORMICK, K.; HAN, I. Y.; ACTON, J. C.; SHELDON, B. W.; DAWSON, P.L.D- and z-values for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in packaged low-fat ready-to-eat turkey bologna subjected to a surface pasteurization treatment. **Poultry Science**, v. 82, p. 1337–1342, 2003.

MILLER, E. N.; INGRAM, L. O. Sucrose and overexpression of trehalose biosynthetic genes (*otsBA*) increase desiccation tolerance of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 503-508, 2008.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; SUKENOBE, J.; IMAIZUMI T.; NAKAHARA, T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, v. 52, p. 27-32, 2006.

MOOIJMAN, K. A.; IN'T VELD, P. H.; HOEKSTRA, J. A.; HEISTERKAMP, S. H.; HAVELAAR, A. H.; NOTERMANS, S. H. W.; ROBERTS, D.; GRIEPINK, B.; MAIER, E. A. Development of microbiological reference materials. **Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Report EUR, 14375 EN, 1992.**

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p.183-193, 2006.

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. .59, p. 651-681, 2008.

MURGATROYD, K.; BUTLER, L. D.; KINNARNEY, K.; MONGER, P. **Good pharmaceutical freeze-drying practice**, Peter Cameron (ed.), 1997.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. **Annual Reviews of Medicine**, v. 52, p. 259-274, 2001.

OREN, A.; Organic compatible solutes. Springer (ed) **Halophilic microorganisms and their environments**, v. 5.Netherlands, p. 279–305, 2003.

PALMFELDT, J.; RADSTROM, P.; HAHN-HAGERDAL, B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. **Cryobiology**, v. 47, p. 21- 29, 2003.

PENNA, M. S.; MEYER-FERNANDES, J. R.; Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 60, p. 10–14, 1998.

PHILIPP, W. J.; VAN IWAARDEN, P.; SCHIMMEL, H.; MEEUS, N.; KOLLMORGEN, N. Development of reference materials for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 12, p. 134-138, 2007.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E.; Genus XXXIII *Salmonella*. In Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. (Eds). **Bergey's manual of sistematic bacteriology**, New York: Springer Science e Business media Inc, 2<sup>a</sup> Ed., v. 2, p. 764- 799, 2005.

PORTNER, D. C.; LEUSCHNER, R. G. K.; MURRAY, B. S. Optimizing the viability during storage of freeze-dried cell preparation of *Campylobacter jejuni*. **Cryobiology**, v. 54, p. 265-270, 2007.

POTTS, M.; Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological Reviews**, v. 58, p. 755–805, 1994.

REY, L. Some leading prospects in freeze-drying. **Lyophilization Conference 2002** (Notes). Amsterdam, 2002.

RODRIGUES, J. P.; PARAGUASSÚ-BRAGA, F. H.; CARVALHO, L.; ABDELHAY, E.; BOUZAS, L. F.; PORTO, L. C. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. **Cryobiology**, v. 56, p. 144-151, 2008.

RODRIGUES, A. M.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 57-62, 2001.

ROMANTSOV, T.; GUAN, Z.; WOOD, J. M. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 2092-2100, 2009.

ROPER, D.; JONG, H.; PAGE, M.; SCHNEIDER, D.; GEISELMANN, J. Qualitative simulation of the carbon starvation response in *Escherichia coli*. **BioSystems**, v. 84, p. 124-152, 2006.

ROWE, M. T.; KIRK, R. B. Effect of nutrient starvation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to subsequent heat stress. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1745- 1748, 2000.

ROY, I.; GUPTA, M.N. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, p.165-177, 2004.

RUDGE, R. H. Maintenance of bacteria by freeze-drying. *In*: B.E. Kirsop, A Doyle (Eds.), **Maintenance of microorganisms**, 2<sup>a</sup> ed, Academic Press, London, pp. 31–43, 1991.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Illinois: ASM Press, p. 229- 243,1994.

SAMPEDRO, J. G.; URIBE, S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256/257, p. 319-327, 2004.

SANTOS, H.; DA COSTA, M. S. Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. **Methods Enzymology**, v. 334, p. 302–315, 2001.

SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. Regulation of carbon starvation genes in *Escherichia coli*. **FEMS Symposium**, v. 44, p. 50- 60, 1988.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 3<sup>a</sup> Ed., p. 253-285, 2007.

SILVA, C. S. F. Preparo de Material de Referência Microbiológico para análise de *Salmonella*. Viçosa: UFV 102p **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)**, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

SIMIONE, F. P.; BROWN, E. M. **ATCC preservation methods**: freezing and freeze-drying. 2. Ed. Rockville: American Type Culture Collection, 1v 1991.

SPECTOR, M. P. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. **Advances in Microbial Physiology**, v. 40, p. 233–279, 1998.

STAMP, L. The preservation of bacteria by drying. **Journal of General Microbiology**, v.1, p.251- 265, 1947.

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 484–491, 2003.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

TERRAGNO, R.; CAFFER, M. I.; BRUNO, S.; BINSZTEIN, N. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS *Salmonella*: Parte 1- Aislamiento, identificación y serotipificación. **Global Salm-Surv, Ministerio da Salud, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas**, Departamento de Bacteriología, Buenos Aires, Argentina, 2003.

TYMCZYSZYN, E. E.; GO' MEZ-ZAVAGLIA, A.; DISALVO, E. A. Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 845–851, 2007.

VAN DER VEEN, A. M. H.; Measurement uncertainty and the use of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 8, p. 555–558, 2003.

VELD, P. H. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 35-41, 1998.

VELD, P. H.; HAVELAAR, A. H.; STRIJP-LOCKEFEEER, N. G. W. M. The certification of a reference material for the evaluation of methods for enumeration of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 266-274, 1999.

VENELINOV, T.; QUEVAUVILLER, P. Are certified reference materials really expensive? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p.15- 18, 2003.

WELSH, D. T.; HERBERT, R. A.; Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 174, p. 57–63, 1999.

WILDE, S.; JORGENSEN, F.; CAMPBELL, A.; ROWBURY, R.; HUMPHREY, T. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhanced RPoS- independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air-drying on surfaces. **Food Microbiology**, v. 17, p. 679-686, 2000.

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