

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

POSBIÓTICO DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA NA INIBIÇÃO DE *SALMONELLA*
HEIDELBERG

ANA CAROLINA IZIDORO DE MORAES

Botucatu - SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

POSBIÓTICO DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA NA INIBIÇÃO DE *SALMONELLA*
HEIDELBERG

ANA CAROLINA IZIDORO DE MORAES

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. ADRIANO SAKAI
OKAMOTO

BOTUCATU – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Moraes, Ana Carolina Izidoro de.

Posbiótico de bactéria ácido láctica na inibição de
Salmonella Heidelberg / Ana Carolina Izidoro de Moraes. -
Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Adriano Sakai Okamoto
Capes: 50503014

Palavras-chave: Microbiologia; Posbiótico; Probiótico;
Proteômica; Quorum sensing.

Nome da autora: Ana Carolina Izidoro de Moraes

Título: POSBIÓTICO DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA NA INIBIÇÃO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr Adriano Sakai Okamoto
Presidente e orientador
Departamento de Clínica veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Titular Raphael Lucio Andreatti Filho
Membro
Departamento de Clínica veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Alessandre Hataka
Membro
Departamento de Clínica veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profª.Drª. Elisane Milbradt
Membro
Faculdade de Pederneiras - FGP

Prof.Dr Guilherme Augusto Marietto Gonçalves
Membro
Doc.Bird - Consultoria em Medicina Aviária, Animais Exóticos e Silvestres

Data da defesa: 10 de janeiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Adriano Sakai Okamoto pela oportunidade de trabalhar junto.

Aos colegas de laboratório, companheiros de vida acadêmica e a todos que estiveram presente durante esses anos, me auxiliando na condução do projeto e no meu desenvolvimento profissional.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/UNESP pela oportunidade e suporte na realização do mestrado.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Código FAPESP 2021/10630-8

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Salmonela	10
2.2	<i>Salmonelose em aves</i>	11
2.3	<i>Avicultura e microbiota intestinal</i>	12
2.4	Probióticos	15
2.5	<i>Bacteriocinas – Proteínas – Peptídeos</i>	18
3.	OBJETIVOS	20
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Amostras	20
4.2	Experimento 1	20
4.2.1	Cultivo das amostras	20
4.2.2	Preparo do filtrado	21
4.2.3	Cultivo da amostra com probiótico	21
4.2.4	Teste de antagonismo <i>Spot on the Lawn</i>	21
4.3	Experimento 2	22
4.3.1	Análise proteômica	22
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
	CONCLUSÃO	32
	BIBLIOGRAFIA	33

MORAES, A. C. I. Posbiótico de bactéria ácido láctica na inibição de *Salmonella* Heidelberg. Botucatu, 2023. 42p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A carne de frango é uma das principais fonte de proteínas na alimentação humana, principalmente por ser um alimento de ótima qualidade. No Brasil predomina o sistema intensivo de produção, o que aumenta o risco de ocorrência de doenças pela densidade alta de animais dentro dos galpões. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade das bactérias ácido lácticas inibirem o crescimento da *Salmonella* Heidelberg (SH) pelo mecanismo de *quorum sensing in vitro* e análise da proteômica do posbiótico. Para os testes *in vitro* bactérias ácido lácticas foram submetidas ao teste *Spot on the Lawn* para avaliação da capacidade de inibição da SH. Em seguida, um posbiótico foi produzido pela homogeneização de SH com uma cepa de *Enterococcus* spp. O probiótico foi cultivado com o posbiótico e novamente ao teste *Spot on the Lawn*. As medidas dos halos de inibição da SH foram comparadas com àquela já obtida pelo mesmo teste, inicialmente para cada probiótico e posbiótico. Dessa maneira, foi possível verificar a ocorrência da comunicação bacteriana entre o probiótico e o posbiótico, após, foi verificado em análise proteômica que os posbióticos aumentaram a quantidade de proteínas e isso pode estar relacionado ao aumento da inibição contra a SH.

Palavras-chave: probiótico, posbiótico, proteômica, microbiologia, quorum sensing.

MORAES, A. C. I. Posbiotic of lactic acid bacteria in the inhibition of Salmonella Heidelberg. Botucatu, 2023. 42p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Chicken meat is one of the main sources of protein in human food, mainly because it is a high quality food. In Brazil, the intensive production system predominates, which increases the risk of diseases due to the high density of animals inside the sheds. The present work aimed to evaluate the ability of lactic acid bacteria to inhibit the growth of Salmonella Heidelberg (SH) by the in vitro quorum sensing mechanism and analysis of the proteomics of the postbiotic. For the in vitro tests, lactic acid bacteria were submitted to the Spot on the Lawn test to evaluate the SH inhibition capacity. Then, a postbiotic was produced by homogenizing SH with a strain of Enterococcus spp. The probiotic was cultured with the postbiotic and again to the Spot on the Lawn test. Measures of SH inhibition halos were compared with those already obtained by the same test, initially for each probiotic and postbiotic. In this way, it was possible to verify the occurrence of bacterial communication between the probiotic and the postbiotic, afterwards, it was verified in proteomic analysis that the postbiotics increased the amount of proteins and this may be related to the increase of inhibition against SH.

Keywords: probiotic, posbiotic, proteomics, microbiology, quorum sensing.

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola fornece uma fração significativa de componentes para a dieta humana, principalmente carnes de boa qualidade nutricional. A produção mundial de carne de aves aumentou constantemente nos últimos anos, espera-se que essa tendência continue, principalmente devido ao aumento da população humana e sua preferência por comer carnes magras (USDA, 2022).

A exploração intensiva de aves, em ambientes fechados, aumenta, consideravelmente, o risco de doenças devido à alta densidade de animais e agentes infecciosos, que podem atingir essas áreas (ESTEVEZ, 2007). Os patógenos, em determinadas ocasiões, não produzem doença no animal, que atuam como reservatórios, transmitindo ao homem por contato ou ingestão de aves e seus subprodutos. A salmonelose destaca-se entre as doenças microbianas intestinais mais frequentes que afetam as aves (OIE, 2021).

Alguns sorovares de *Salmonella* entérica estão especificamente ligados a determinados hospedeiros (JAJERE, 2019) aos quais estão totalmente adaptados e, em geral, não causam doenças em outras espécies animais. No entanto, alguns sorovares são frequentemente associados a doenças em uma ampla variedade de hospedeiros, como bovinos, suínos, ovinos, aves, equinos, roedores e até humanos (SOUZA *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, o controle de muitas doenças bacterianas e parasitárias na criação de animais, tem sido feito pela suplementação das rações com antibióticos promotores de crescimento. A crescente preocupação pública com os riscos associados a esta prática, conduziu às restrições na sua utilização sem fins terapêuticos. Isso tem impactado muito os setores da pecuária, principalmente o setor avícola (FANCHER *et al.*, 2020). E com isso o aumento de estudos de produtos alternativos ao uso de promotores de crescimento tem aumentado, entre eles o uso de probióticos e posbióticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Salmonela

A *Salmonella* spp. é um dos patógenos de origem alimentar mais importantes em todo o mundo, e os surtos de salmonelose ocorrem principalmente após o consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente produtos avícolas (WHO, 2015). No Brasil, esse patógeno foi identificado como o principal agente etiológico das doenças transmitidas por alimentos registradas, sendo responsável por 32% dos surtos (BRASIL, 2018).

É um patógeno intracelular facultativo causador de infecções localizadas ou sistêmicas, envolvendo importância econômica e de saúde pública. E continua sendo o principal patógeno de preocupação com a segurança alimentar em todo o mundo (PANDE *et al.*, 2016).

Pertencente à família Enterobacteriaceae a *Salmonella* spp. é um bacilo gram negativo, anaeróbico facultativo e não formador de esporos (OIE, 2012). São identificadas em três espécies por diferenciação bioquímica (BACK, 2010). A *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies sendo *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *csu indica*. As *Salmonellas* spp. causam a doença denominada Salmonelose, estando associada a grandes prejuízos na produção animal (BACK, 2010).

A *Salmonella* spp. é frequentemente isolada de produtos oriundos da produção avícola, indicando falhas na produção. Essas falhas podem ocorrer em diferentes etapas de produção, além disso ela pode ter caráter assintomático nas aves predispondo a manutenção dela no aviário. Aves positivas que serão destinadas ao abate poderão contaminar o abatedouro pois, a *Salmonella* spp. está presente no seu trato gastrointestinal, mesmo que o abatedouro siga rigorosamente as boas práticas de fabricação (COLLA *et al.*, 2012).

Os sorovares que se destacam são os paratíficas pois não são espécies específicas de aves (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014), e seu isolamento em aves e seus subprodutos têm maior ocorrência quando comparado a produtos provenientes de outros animais (ANDREATTI FILHO, 2007). Além disso, a presença de animais portadores assintomáticos facilita a disseminação da bactéria aumentando a ocorrência da contaminação alimentar, tem mostrado a

importância deste agente na saúde pública mundial e por isso medidas de controle devem ser adotadas (SHINOHARA *et al.*, 2008).

A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Heidelberg pertence ao grupo de Salmonelas paratíficas e causa doença em humanos e em animais. Por elas terem alto grau de adaptabilidade acabam se disseminando e se mantendo nos ambientes (BERNDT *et al.*, 2007). Vale a pena salientar que dentre as salmonelas que causam infecção em humanos, a *Salmonella* Heidelberg parece ser a mais invasiva e causa doenças com maior gravidade que outros sorovares paratíficos (PUBLIC *et al.*, 2007).

Portanto, em frangos de corte, a redução de *Salmonella* spp. em granja é essencial para contribuir com a segurança alimentar. A indústria avícola tem buscado novas estratégias para controlar a presença de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva avícola. Entre elas estão a adição de probióticos, prebióticos e pós-bióticos, que promovem a eficiência alimentar, e com esse objetivo atuando como promotores de crescimento (KHAN; CHOUSALKAR, 2020).

Atualmente, as podem ser utilizadas como ferramentas complementares na avicultura para obtenção de informações que possam resultar na formulação de estratégias terapêuticas e na detecção de padrões de resistência a antibióticos, reduzindo a presença de *Salmonella* spp. e os custos de produção (VAID *et al.*, 2021).

2.2 Salmonelose em aves

A *Salmonella enterica* é um dos agentes mais comuns de doenças bacterianas transmitidas por alimentos (MALOWICZ *et al.*, 2014), sendo as aves um importante reservatório (SILVEIRA *et al.*, 2021).

Além disso, resistência a antibióticos tem sido encontrada em *Salmonella* spp. e a resistência parece ser maior entre cepas isoladas de amostras relacionadas a aves quando comparadas a *Salmonella* spp. isoladas de outros alimentos (MAYRHOFER, 2004). Apesar de várias medidas de controle e grandes investimentos terem sido feitos nos abatedouros brasileiros, a *Salmonella* spp. ainda causa transtornos na indústria (PANZENHAGEN *et al.*, 2016).

Desde 2003, a Instrução Normativa 70/2003/MAPA. Instituiu o Programa de Redução de Patógenos (PRP), que implementou análises laboratoriais contínuas e sistemáticas de carcaças frescas de frango e peru, testando-as para *Salmonella* spp. e envolve todos os frigoríficos cadastrados no Serviço de Inspeção Federal, para realização de amostragem microbiológica e monitoramento de bactéria em carcaças de frango e peru (BRASIL, 2003).

Estudos europeus avaliaram a ocorrência de *Salmonella* em carne de frango importada e descreveram a presença de *Salmonella* Heidelberg em carne de frango importada do Brasil (VAN BOECKEL *et al.*, 2019).

Segundo Kipper *et al.* (2021), *Salmonella* Heidelberg é a mais frequente em diversas granjas de frangos de corte, das principais regiões produtoras brasileiras. Portanto, alimentos de origem aviária (principalmente carcaças de frango) comercializados no país e exportados para outros continentes estão contaminados com esse patógeno, gerando diversos prejuízos econômicos nacionais e internacionais. Além disso, estas salmonelas são geralmente resistentes a antibióticos e podem causar infecção humana invasiva e septicêmica, representando um problema de saúde pública.

2.3 Avicultura e microbiota intestinal

A demanda por produtos avícolas cresceu exponencialmente nas últimas décadas e estima-se que a carne de frango será a mais consumida, no mundo, até 2026 (FAO, 2017). A avicultura brasileira é um setor da economia que passou por significativas mudanças nos últimos 40 anos. O processo de industrialização colocou o setor como um dos líderes em tecnologia e produção, tanto no abastecimento do mercado interno quanto nas exportações. O início das atividades industriais ocorreu no Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), enquanto São Paulo continua sendo o único estado com produção expressiva no Sudeste (COSTA, 2010).

O Brasil produziu 14.329 milhões de toneladas em 2021, o estado líder foi o Paraná com 35,54%, segundo a ABPA. O Brasil possui aproximadamente 180.000 granjas dedicadas à cadeia produtiva de aves. BRF e JBS (CAMPOS, 2016).

No Brasil, o sistema de produção intensiva é predominante e os avanços tecnológicos, em diferentes áreas, têm trazido aumento de produtividade, se destacando em alguns processos como: identificação genética de linhagens adequadas para as etapas da indústria avícola, produção de vacinas, especificação da qualidade nutricional das aves, bem como melhorias ambientais e equipamentos de alta performance (SAKAMOTO *et al.*, 2020). O projeto de uma granja precisa contemplar a relação das aves com o ambiente, integrando o comportamento animal a fisiologia das aves, os conceitos ambientais e os sistemas de produção (ABREU; ABREU 2011). A necessidade de inovar no uso das tecnologias torna-se evidente, mediante às mudanças climáticas e ao contexto socioeconômico em evolução (FREITAS *et al.*, 2007).

No passado, o uso profilático de antibióticos aumentava o crescimento e a eficiência alimentar em frangos de corte, reduzindo infecções subclínicas e colonização de bactérias patogênicas oportunistas (HUME, 2011). As restrições aos antibióticos permitiram o ressurgimento de doenças como a salmonelose em frangos de corte (IMMERSEEL *et al.* 2009).

Atualmente, alguns pontos críticos na produção em frangos de corte estão relacionados ao bem-estar das aves, saúde do lote, segurança alimentar e eficiência produtiva (ABREU; ABREU, 2011). Segundo Dawkins e Layton (2012), a associação entre práticas de manejo e a genética proporcionam uma ferramenta importante, para melhorar o desenvolvimento dos animais de pecuária. A densidade de criação é um fator crítico na avicultura industrial, diretamente relacionado com o retorno econômico da produção (Allain *et al.*, 2009).

Os pontos críticos da linha de produção justificaram o uso de antibióticos, como aditivos na dieta dos animais. Atualmente a tendência mundial é de diminuir uso desses produtos, devido a possível contaminação das aves (com resíduos de antibióticos), além disso o aparecimento de bactérias resistentes também tem sido uma preocupação e com isso, países importadores, restringem o consumo de aves alimentadas com antibióticos. Mediante essas considerações, na busca de soluções, tem sido realizada análises com probióticos e prebióticos, estudados mundialmente, como uma possível alternativa para substituir o uso de antibióticos (PELICANO; SOUZA; SOUZA, 2002).

O microbioma cecal é único e dinâmico, constituído principalmente de bactérias (aproximadamente 98%) (GLENDINNING *et al.* 2020).

Uma linhagem, no mesmo lote, com aves igualmente alimentadas, apresenta grandes diferenças na microbiota (STANLEY *et al.*, 2013). O fato da microbiota cecal dos frangos de corte variar tanto pode ser, em parte, devido à alta higiene nos incubatórios, resultando na falta de colonização por microrganismos de origem materna (STANLEY *et al.*, 2013). Além disso, a condição de alojamento, tem impacto sobre como a microbiota de frangos de corte pode responder a uma intervenção dietética.

Em relação as propriedades do trato gastrintestinal das aves, relacionados a exclusão da *Salmonella*, a permeabilidade da absorção de nutrientes e o transporte de substâncias extracelulares indesejadas, como bactérias, além das substâncias não digeridas. Portanto, a saúde intestinal desempenha um papel essencial na patogênese de vários distúrbios intestinais. A permeabilidade do intestino é controlada pela microbiota intestinal, secreções digestivas, barreiras físicas (mucina, células epiteliais intestinais que revestem e junções estreitas) e substâncias químicas como citocinas (BISCHOFF *et al.*, 2014).

Em condições normais, a relação simbiótica entre a microbiota intestinal e o hospedeiro determina crucialmente a saúde intestinal. Distúrbio na microbiota intestinal pode levar ao desequilíbrio da microbiota intestinal (ZOETENDAL; RAJILIC-STOJANOVIC; DE VOS, 2008). Vários fatores, como fatores antinutricionais na ração, metais pesados, substâncias tóxicas, toxinas bacterianas, herbicidas e antibióticos podem prejudicar a microbiota intestinal. Esses impactos podem levar a inflamação localizada, infecção extensa ou até intoxicação (ACKERMANN, 2015). Além disso, o epitélio intestinal funciona como uma barreira de bactérias patogênicas. A função prejudicada da barreira intestinal, pode ocasionar à infiltração de conteúdos luminiais, como bactérias e seus componentes associados, incluindo toxinas, para passar entre as células epiteliais (ABUJAMIEH *et al.*, 2016).

A evolução permitiu o desenvolvimento da capacidade de hospedar consórcios complexos e dinâmicos de microrganismos (WREN, 2000).

Compreender como o intestino das galinhas amadurece e se desenvolve, e como os suplementos alimentares beneficiam o desempenho intestinal,

auxiliará no aumento da eficiência alimentar, do crescimento e da saúde geral do animal (POURABEDIN; ZHAO, 2015).

2.4 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro de forma segura e eficaz. A maioria das cepas probióticas pertence aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, embora outros gêneros bacterianos como *Enterococcus*, *Bacillus* e certas espécies de leveduras também tenham sido propostas como probióticos (HILL *et al.*, 2014).

Quando utilizados como aditivo alimentar, esses microrganismos estão associados à manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, aumentando a resistência contra bactérias patogênicas e melhorando a imunidade do hospedeiro (CHOCT, 2009). Tais benefícios podem ser devido à sua capacidade de produzir ácidos graxos e ácidos orgânicos, bem como a síntese de compostos como vitaminas e biomoléculas antimicrobianas como as bacteriocinas, que atuam especificamente contra certos patógenos, ou na atividade de certas enzimas (HILL, 2014).

As cepas probióticas não devem competir com os microrganismos da microbiota normal, mas sim interagir em simbiose. Além disso, devem ser resistentes à bile e aos ácidos do trato gastrointestinal e ter a capacidade de aderir às células da mucosa intestinal, multiplicando-se rapidamente para estarem sempre presentes no lúmen intestinal e não serem totalmente eliminados durante o peristaltismo intestinal (MUSA, 2009).

Os probióticos tem mais de uma forma de ação, pode ser por competição de sítio de ligação evitando a adesão do patógeno, vetando a colonização, melhorando a função da barreira, melhorando a composição da microbiota intestinal, além disso eles podem produzir e ou aumentar a quantidade de substâncias que tenham ação antimicrobianas (PLAZA-DIAS *et al.*, 2019).

Microrganismos probióticos são frequentemente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica, veterinária e pertencem ao grupo das BAL, pois são historicamente utilizadas na fabricação de alimentos lácteos e como culturas iniciadoras, recebendo o selo de segurança da Food and Drug Administration

dos EUA (WESSELS *et al.*, 2004). As bactérias ácido lácticas pertencem a um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, classificadas conforme as características de fermentação da glicose, morfologia celular, capacidade de utilizar açúcares e faixa de temperatura de crescimento ideal (MOKOENA, 2017).

Ressalta-se que durante o manejo animal, diversas situações estressantes podem afetar seu crescimento e saúde (MOBERG, 2000). Embora os criadores forneçam dietas balanceadas, podem ocorrer algum estresse que possibilita a diminuição da imunidade das aves, podendo afetar significativamente os custos de produção (FRYE; WILLIAMS; GRAHAM, 1991).

A produção de substâncias antimicrobianas por cepas probióticas torna o uso desses microrganismos vantajoso. Embora vários microrganismos possam produzir substâncias antimicrobianas, as produzidas pelas BAL são diferenciadas, devido ao seu potencial uso como bioconservantes de alimentos (CINTAS *et al.*, 2001). Essas substâncias antimicrobianas são peptídeos ou proteínas sintetizadas e liberadas para o meio extracelular que possuem atividade contra outras espécies bacterianas (COTTER; ROSS; HILL, 2013). A inibição de bactérias patogênicas por BAL é mediada principalmente pela produção dessas biomoléculas, que estimulam a produtividade animal, proporcionando ganho de peso, fortalecendo o sistema imunológico e reduzindo a taxa de mortalidade por meio do controle de patógenos que comumente acometem suínos, bovinos e aves (BARROW, 1992).

Na produção avícola, um dos principais objetivos do uso da BAL é para a redução dos patógenos de origem alimentar *Salmonella* spp. e *Campylobacter* ssp, por meio da introdução de bactérias probióticas na dieta das aves (SVETICH; STERN, 2010). Esses patógenos são os principais causadores de doenças transmitidas por alimentos em humanos e as aves podem ser um importante reservatório (FENG *et al.*, 2016).

Ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas, liberam peptídeos antimicrobianos extracelularmente, em várias etapas do crescimento (GRAHAM *et al.*, 2017).

Bactérias ácido lácticas são encontrados nas membranas mucosas das vias respiratórias, intestinais entre outros locais (LIU *et al.*, 2014). São seguros para consumo e não alteram a qualidade e segurança dos alimentos (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018).

Na produção animal se destaca o uso de BAL que tem a capacidade de produzir bacteriocinas, pois têm relatos de aumento na taxa de crescimento das aves. Elas estão entre os grupos mais importantes de bactérias que fornecem benefícios para a saúde de humanos e animais (VIECO-SAIZ *et al.*, 2019).

Várias estratégias dietéticas estão disponíveis para modular a composição ou metabólico/atividade imunológica da microbiota intestinal. Entre as estratégias as mais estabelecidas são os probióticos e prebióticos (HILL, 2014).

Algumas espécies de BAL apresentam antagonismo com a *Salmonella* Heidelberg. O consumo prolongado de espécies de BAL pode induzir modificações qualitativas e quantitativas no ecossistema microbiano do trato gastrointestinal de animais e humanos (APAJALAHTI; VIENOLA, 2016). Estas bactérias são geralmente reconhecidas como seguras, com base nas definições de especialistas, que avaliam a segurança de substâncias alimentares (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015).

Para ser um probiótico de escolha a BAL deve ser resistente ao pH gástrico, portanto, elas têm que ser capaz de sobreviver e transitar pelo estômago apesar do seu baixo pH (CHARTERIS *et al.*, 1998). Nos últimos anos, vários estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as BAL exibem um efeito protetor no trato gastrointestinal excluindo patógenos ou promovendo a colonização intestinal (KOMMINENI *et al.*, 2015), entre eles podemos citar as bactérias do genero *Enterococcus* spp. O *Enterococcus faecium* foi o primeiro a ser usado como aditivo alimentar probiótico e permitido pela União Europeia (FRANZ *et al.*, 2011). *Enterococcus faecium* PNC01 demonstrou melhorar a imunidade intestinal e a secreção de muco jejunal em frangos de corte (WU *et al.*, 2019). *Enterococcus faecium* melhorou a resistência a bactérias patogênicas em animais. O intestino de aves é rico em bactérias lácticas, que tem sido utilizada como um importante recurso biológico para o isolamento de probióticos (XIE *et al.*, 2019).

Um grande número de BAL foi isolado do conteúdo intestinal de animais e usado como probiótico (ADHIKARI; KWON, 2017). Como a adesão de probióticos ao epitélio intestinal é um pré-requisito para sua função e a colonização por adesão tem especificidade do hospedeiro.

2.5 Bacteriocinas – Proteínas – Peptídeos

Atualmente, os consumidores buscam produtos alimentícios seguros, saudáveis, saborosos, de longa vida útil e minimamente processados. As BAL são consideradas microrganismos de qualidade alimentar por atenderem a estas exigências, e têm sido aplicadas em alimentos fermentados (COTTER; ROSS; HILL; 2013).

Recentemente alguns autores têm indicado que os microrganismos benéficos produzem micro e macromoléculas bioativas, denominada de posbióticos, eles conferem vários benefícios a saúde do hospedeiro, podemos dizer que é uma alternativa promissora para alguns tratamentos, logo essas biomoléculas poderão ser utilizadas para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos microrganismos benéficos, auxiliando na preservação e na comunicação bacteriana (ABBASI *et al.*, 2022).

Recursos naturais extraídos de plantas, animais e microrganismos, combinados com ferramentas químicas e biotecnológicas, fornecem diferentes compostos que podem ser promissores, como agentes antimicrobianos (MBAVENG *et al.*, 2015). Os peptídeos ou proteínas sintetizadas por ribossomos, inibem o crescimento e a reprodução de uma variedade de bactérias (CHEN *et al.*, 2021).

Os peptídeos das bacteriocinas são liberados em ambiente polimicrobiano competitivo, e são usados para eliminar outras espécies bacterianas, particularmente aquelas que estão intimamente relacionadas (PEREZ; *et al.*, 2014).

Compostos microbianos são comuns entre as espécies de bactérias, e alguns estudos sugerem que praticamente todas as bactérias são capazes de produzir substâncias. Devido a essa alta diversidade de bactérias produtoras, uma grande variedade de peptídeos pode ser identificada, e algumas bactérias podem produzir vários tipos (CINTAS *et al.*, 2001). Esta ampla gama de moléculas antimicrobianas permite variadas aplicações biotecnológicas, industriais e farmacêuticas (YANG *et al.*, 2014).

Caracterizados por sua natureza probiótica, algumas BAL e seus produtos metabólicos são considerados como seguros para a indústria de alimentos. Bactérias ácido lácticas são usados em vários processos (por

exemplo, fermentação, preservação de alimentos) devido à sua capacidade bioconservante de inibir microbiota (CINTAS *et al.*, 2001).

Algumas substâncias podem apresentar grande potencial para substituir outros compostos antimicrobianos ou para serem combinadas com antibióticos, e estudos *in vivo* têm mostrado seu potencial como agente terapêutico em caso de infecções recorrentes auxiliando nas funções fisiológicas (HASSAN *et al.*, 2012).

A maior parte das funções fisiológicas das células são exercidas pelas proteínas. A identificação quantitativa, qualitativa e estrutural é essencial para entender o funcionamento dos sistemas biológicos. Logo o estudo do proteoma permite a identificação das proteínas que estão sendo expressas em um determinado momento e quantifica elas assim fornecendo informações de proteínas ali expressas. O estudo passa por etapas incluindo extração e tratamento da amostra, separação das proteínas ou peptídeos, espectrometria de massa e análise dos resultados em ferramentas de bioinformática (EMIDIO *et al* 2015).

3. OBJETIVOS

Verificar a presença de proteínas produzidas por *Enterococcus* spp. que atuam na comunicação bacteriana contra *Salmonella* Heidelberg.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em duas análises.

Análise 1: Foram realizados dois experimentos, sendo um com a aplicação do posbiótico produzido pelo *Enterococcus* spp., sem o contato prévio com a *Salmonella* Heidelberg (SH) e outro com contato antes da extração.

Análise 2: Foram realizado análise proteômica dos posbióticos.

4.1 Amostras

Para os seguintes experimentos laboratoriais, foram utilizadas duas cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) e uma cepa de bactéria SH. O *Enterococcus* sp. foi utilizado como BAL produtora do posbiótico, o *Pediococcus* sp. como BAL probiótica, isolados de aves adultas saudáveis de granjas comerciais, e a cepa de *Salmonella* Heidelberg como bactéria indicadora a ser inibida no teste de inibição em placa, *Spot on the Lawn*. Todas as bactérias citadas anteriormente foram provenientes do Laboratório de Ornitopatologia da UNESP, campus de Botucatu.

4.2 Experimento 1

4.2.1 Cultivo das amostras

As BALs foram cultivadas em meio de cultura específico, DeMan, Rogosa e Sharpe (MRS), sob 37°C por 24 horas.

A SH foi cultivada em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI), também sob 37°C por 24 horas.

4.2.2 Preparo do filtrado

Para o preparo do posbiótico utilizado no experimento 1 (EXP 1), 100 µL de um cultivo prévio de *Enterococcus* spp foi inoculado em 10 mL de caldo MRS durante 24 horas a 37°C, e em seguida foi realizada a esterilização por filtração em membrana de nitrocelulose (0.22 µm), assim gerando o posbiótico do EXP 1.

Para o preparo do posbiótico utilizado no experimento 2 (EXP 2), 100 µL de um cultivo prévio de *Enterococcus* sp e 100 µL de um cultivo prévio de SH foram ambos inoculados em 10 mL de meio de cultura ½ MRS ½ BHI e incubados à 37°C por 24 horas. Após transcorrido o tempo de cultivo, 100 µL deste cultivo foram inoculados em 10 mL de caldo MRS e cultivados sob 37°C por 24 horas, com o intuito de se eliminar possíveis partículas de SH e/ou metabólitos produzidos por ela. Finalmente, após a incubação, o cultivo foi submetido ao processo de esterilização por filtração em membrana de nitrocelulose, assim gerando o posbiótico do EXP 2.

4.2.3 Cultivo da amostra com posbiótico

Com o intuito de possibilitar contato e sensibilização da BAL probiótica pelo posbiótico, o *Pediococcus* spp. foi incubado separadamente com cada posbiótico.

Em dois micros tubos graduados em 2 mL e contendo 200 µL de caldo MRS, foram inoculados 120 µL de *Pediococcus* sp. previamente cultivado, além de 200 µL de posbiótico, sendo um micro tubo para cada posbiótico (EXP 1 e EXP 2) No experimento 1 e 2 os micros tubos foram então submetidos à incubação sob 37°C por 24 horas.

4.2.4 Teste de antagonismo *Spot on the Lawn*

Ambos os inóculos descritos anteriormente em “4.4 Cultivo da amostra com posbiótico” foram submetidos ao teste de antagonismo em placa *Spot on the Lawn*, com o intuito de se verificar possível aumento do antagonismo, proporcionado pelo posbiótico “EXP 1”

Cerca de 10 µL de cada cultivo contendo *Pediococcus* spp. e seu respectivo posbiótico, foram semeados em forma de pontos e em triplicata, em

placas de Petri contendo ágar MRS, seguinte de incubação à 37°C por 24 horas. Concomitantemente, foi preparado o inóculo de SH, sendo inoculados 100 µL de um cultivo prévio, em 10 mL de caldo BHI, e incubado à 37°C por 24 horas.

Transcorrido o adequado período de incubação, foram preparados tubos estéreis contendo 10 mL de caldo BHI à 0,65% de ágar-ágar e colocados em banho-maria à 45°C. Em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e após resfriamento em cerca de 35°C, cada unidade foi inoculada com 100 µL do cultivo de SH anteriormente produzido. Em seguida, cada tubo foi homogeneizado e cuidadosamente vertido em cada placa de Petri incubada no dia anterior. Após agarificação do meio recém vertido, o conjunto foi então novamente submetido à incubação sob 37°C por 24 horas. Transcorrido o período de 24 horas citado anteriormente, os halos de inibição formados foram mensurados.

Salienta-se que previamente aos inóculos de BALs e SH em todas as etapas, a concentração destas bactérias foi prevista com auxílio da escala nefelométrica de McFarland objetivando-se a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.3 Experimento 2

A análise proteômica foi realizado no IBTEC – UNESP Campus de Botucatu, no Laboratório de Proteômica, pela equipe da Professora Lucilene Delazari dos Santos.

4.3.1 Análise proteômica

4.3.1.1 Preparo das amostras

Dois mililitros (2 mL) de cada amostra foram dialisadas contra 2 litros do tampão Acetato de Amônio 50 mM, pH 6.8 em membranas de celulase, a fim de remover sais e compostos de baixa massa molecular. A diálise ocorreu com a troca do tampão a cada uma hora por meio de 4 trocas. Após a diálise, as amostras foram removidas da membrana e condicionadas com microtubos plásticos.

4.3.1.2 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas totais foi realizada usando o método Pierce 660 (Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent, Thermo Fisher Scientific), utilizando a proteína padrão albumina bovina.

4.3.1.3 Eletroforese do tipo SDS-PAGE

O controle de qualidade das amostras foi realizado, utilizando a estratégia de eletroforese unidimensional, sob condições desnaturantes em sistema vertical (Mini VE, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). O gel de separação à 12% (m/v) e de empilhando à 5% (m/v) de poliacrilamida foram utilizados para o fracionamento proteico. Foram utilizados de 20 a 500 µg de proteínas totais em cada amostra por poço, utilizando-se o tampão de amostra TRIS-HCl 60 mM, pH 6.8, 50% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS, 23 mM 2-mercapetanol e 0,1% (m/v) azul de bromofenol. As amostras foram homogeneizadas e submetidas a desnaturação em banho à 70° C por 5 minutos. Foi utilizado o marcador de massa molecular Low Molecular Weight (97–14.4 kDa, Cytiva) como calibrante interno para os perfis proteicos amostrais. A separação proteica foi efetuada sob amperagem constante (400 mA) e voltagem de 150 V. Os géis foram corados com Coomassie Coloidal G-250 e posteriormente, armazenados em ácido acético 10% (v/v). Os géis foram escaneados utilizando o equipamento ImageQuant LAS500 e os dados de densidade proteica foram obtidos por meio do software Image J.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no teste *Spot on the Lawn* foram mensurados em halos de inibição, medidos em milímetros. Demonstrando que houve aumento do halo de inibição do probiótico após o contato com o posbiótico, podemos observar os resultados na tabela 1.

Tabela 1. Mensuração dos halos de inibição de bactérias ácido láticas com ou sem adição do indutor, sensibilizado ou não, sob o teste de antagonismo em placa *Spot on the Lawn*. Medida em milímetros

Inóculo	Mediana (Q1 -Q3) mm
<i>Pediococcus</i> 54 + posb 84 n sensi.	3 (1 - 4) a
<i>Pediococcus</i> 54 + posb 84	3 (1 - 5) a
<i>Pediococcus</i> 54	1 (1 - 2) b

Letras diferentes na mesma coluna e bloco indicam diferença estatística ($p < 0.05$) sob o teste de Mann-Whitney

Os probióticos testados apresentaram aumento do tamanho do halo após o contato com o posbiótico, assim demonstrando que o *Enterococcus* spp. produziu e liberou alguma substância (posbiótico), que estimulou a inibição da SH pelo probiótico, assim aumentando a inibição da SH. Observado pelo teste *Spot on the Lawn* assim concordando com os autores Waters, Bassler (2005) e Reading, Sperandio (2006) que descrevem que as bactérias se comunicam por meio de substâncias sinalizadoras, gerando modificação no comportamento coletivo. Esse mecanismo denominado *quorum sensing* envolve a produção, liberação e reconhecimento destas substâncias. Não houve diferenças estatísticas entre os posbióticos testados.

Os posbióticos foram testados sozinhos sem a presença de BAL, mas eles não tiveram a capacidade de inibir o crescimento da SH, isso vai de encontro com o trabalho de Griffiths (2005), que os posbióticos gera uma ação coletiva no comportamento bacteriano.

As bactérias com o mecanismo de *quorum sensing* fazem um mapeamento do habitat, por reconhecimento de algumas alterações como quantidade de nutrientes, densidade populacional (FUQUA *et al*,1994) reconhecendo e/ou liberando substâncias sinalizadoras, que levam a ações como mudança de

ambiente, estabilização na multiplicação ou combate a patógenos (KHMEI; METLITKSKAYA, 2006).

Avançando na pesquisa as amostras de posbiótico que apresentaram aumento no halo de inibição foram enviadas para análise proteômica.

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o pelo método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) em triplicata, tendo como equação da reta $y = 0,0001x + 0,0671$ e $R^2 = 0,9959$. A Figura 1 evidencia a linearidade das 8 diluições da proteína padrão albumina bovina.

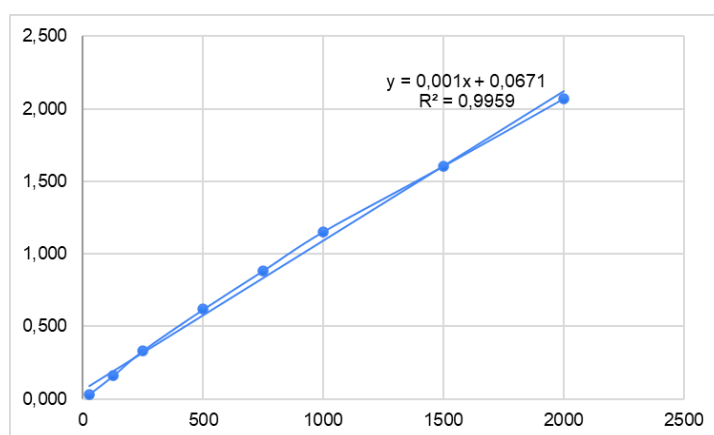


Figura 1: Elaboração da curva de calibração mediante oito diluições da proteína padrão albumina bovina.

Tendo em vista o ótimo valor do coeficiente de determinação (R^2) de 0.99, utilizou-se da equação da reta para determinar as concentrações proteicas em cada amostra. Para o cálculo, foram consideradas a média das absorbâncias das triplicatas amostrais (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de proteínas presentes nas amostras obtidos pelo método de BCA.

Amostra	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	1,025
2	0,876
3	0,856
4	1,333
5	1,438
6	1,290
7	1,459
8	1,092

Em seguida, géis de eletroforese foram confeccionados como controle de qualidade para avaliar a qualidade e variabilidade proteica nas amostras. Vinte e setenta microgramas (20 μg e 70 μg) de proteínas totais de cada amostra foram separadas e preparadas (desnaturação à 70°C por 5 minutos) para a elaboração de uma eletroforese unidimensional em géis de poliacrilamida 12% (m/v). A Figura 2 evidencia as imagens dos géis corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

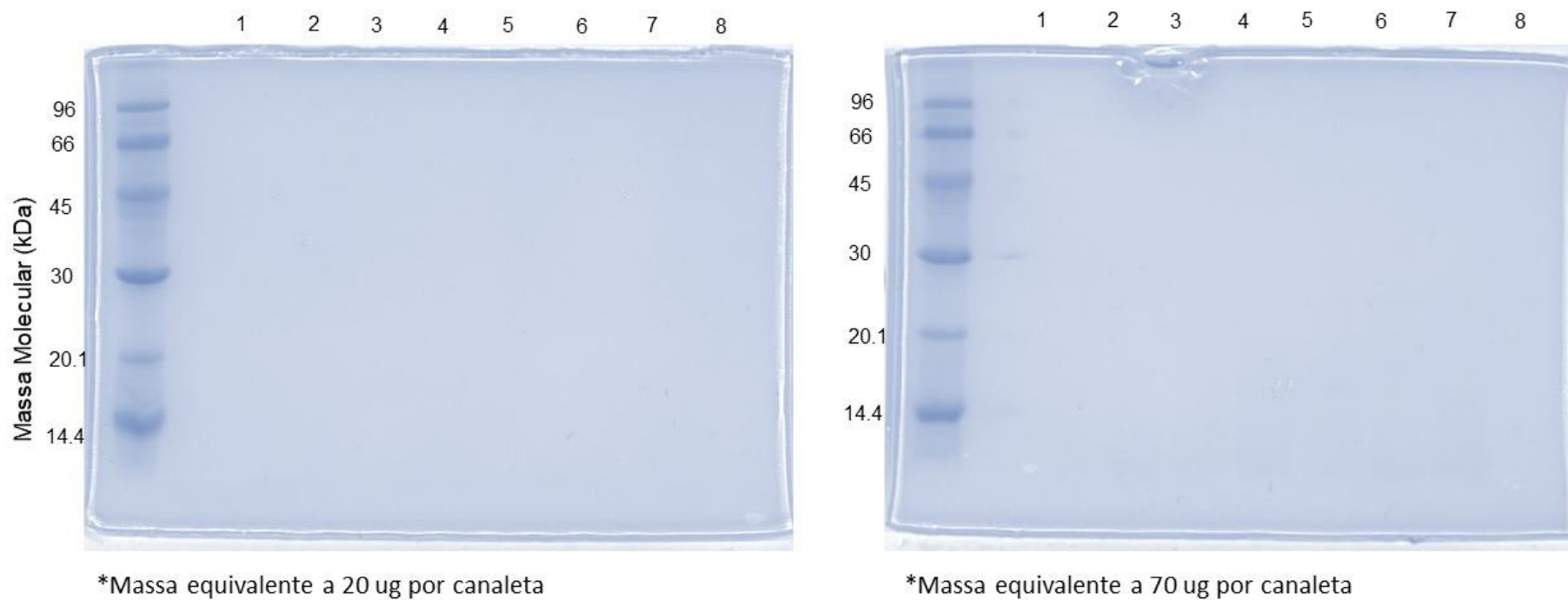


Figura 2: Perfil protéico das amostras 1 a 8 em gel de eletroforese de poliacrilamida de 12% (m/v) sob condições redutoras e desnaturantes.

Uma vez não detectadas bandas proteicas, entendeu-se que a quantificação proteica realizada superestimou a quantidade de proteínas nas amostras, ou seja, outras moléculas presentes nas amostras foram quantificadas juntamente com as proteínas. Desta forma, submeteu-se a um novo gel de eletroforese o equivalente a 500 μg de proteínas totais por amostra, a fim de revelar a presença de potenciais proteínas nas amostras (Figura 3).

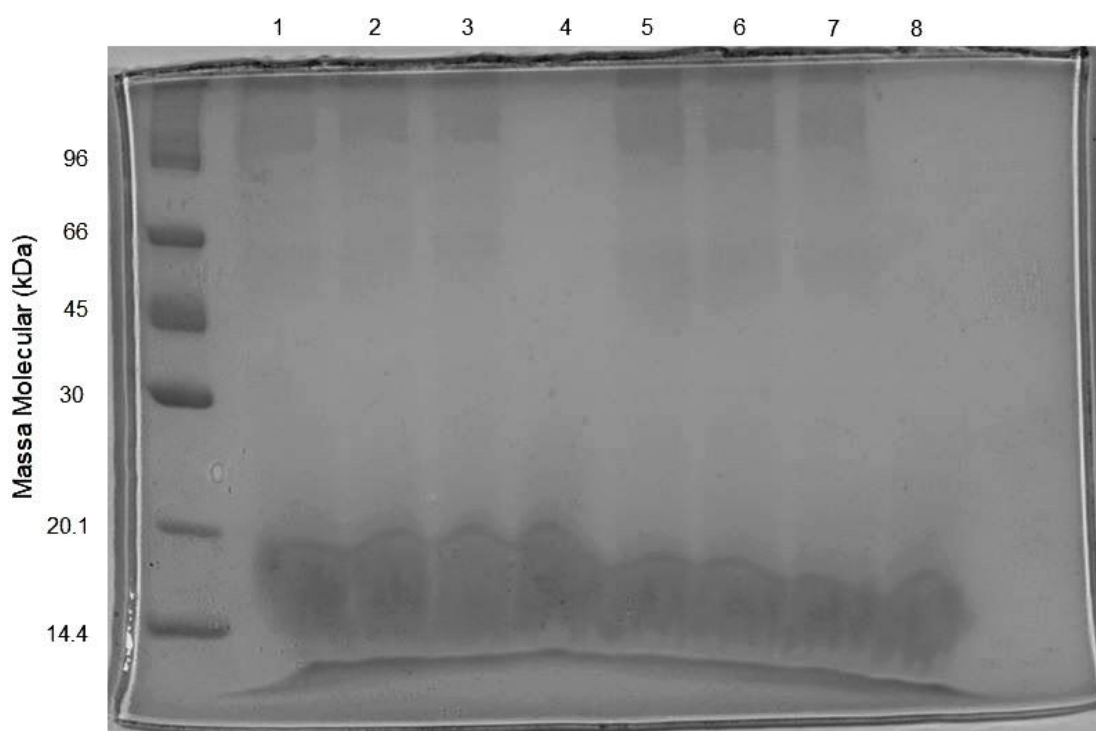


Figura 3: Perfil protéico das amostras 1 a 8 em gel de eletroforese de poliacrilamida de 12% (m/v) sob condições redutoras e desnaturantes.

Mesmo que o método de quantificação tenha superestimado a quantidade de proteínas, a nova análise de eletroforese com uma elevada quantidade de amostra bruta evidenciou a presença de proteínas em todas as amostras ensaiadas. A Figura 3 evidencia os perfis proteicos das amostras, das quais as amostras 1 a 3 e 5 a 7 apresentaram expressão de proteínas de forma diferencial frente aos respectivos controles (amostras 4 e 8) com bandas proteicas de massas moleculares entre 50 a 96 kDa, além da forte evidência de bandas protéicas de massas moleculares entre as massas 14.4 e 20 kDa. Nos perfis protéicos das amostras 5 a 7, as bandas protéicas da região de massas

moleculares entre 50 a 96 kDa, denotam expressão diferencial perante a mesma região dos perfis proteicos das amostras 1 a 3.

Apesar da avaliação visual de uma imagem de um gel de eletroforese ser uma validação qualitativa, há fortes indícios de que os tratamentos empregados nas amostras 1 a 3 e 5 a 7, exercem influência biológica na linhagem celular exposta, haja vista que, ao compararmos estas amostras com seus respectivos controles, bandas proteicas apresentam expressões diferenciais. E desta mesma forma, indica-se que o tratamento realizado nas amostras 5 a 7 tem influência positiva no que se refere à expressão das proteínas (*up regulation*) em comparação com o tratamento realizado nas amostras 1 a 3.

De forma a ratificar a análise qualitativa visual mencionada, utilizou-se da análise quantitativa, utilizando dados de densidade das bandas contidas no conjunto de proteínas presentes nas colunas verticais do gel de eletroforese onde cada amostra foi inserida na malha de poliacrilamida. Com auxílio do software Image J foi possível obter os dados de densitometria. A Tabela 3 representa a média e o desvio padrão de densidade proteica das amostras 1, 2 e 3 (réplicas biológicas) do Experimento 1 (Exp 1), das amostras 5, 6 e 7 (réplicas biológicas) do Experimento 2 (Exp 2) e das amostras 4 e 8 (réplicas individuais dos controles) denominados Branco 1 e Branco 2 (BR1 e BR2). A Figura 4 representa graficamente os dados quantitativos da densidade determinada para cada grupo experimental deste estudo.

Tabela 3: Dados de densidade proteica das proteínas contidas nos poços do gel de eletroforese de cada grupo experimental.

	Exp 1	BR1	Exp 2	BR2
Media	1.24E+06	1.13E+06	1.30E+06	1.12E+06
DP	4.51E+04	-	2.78E+03	-

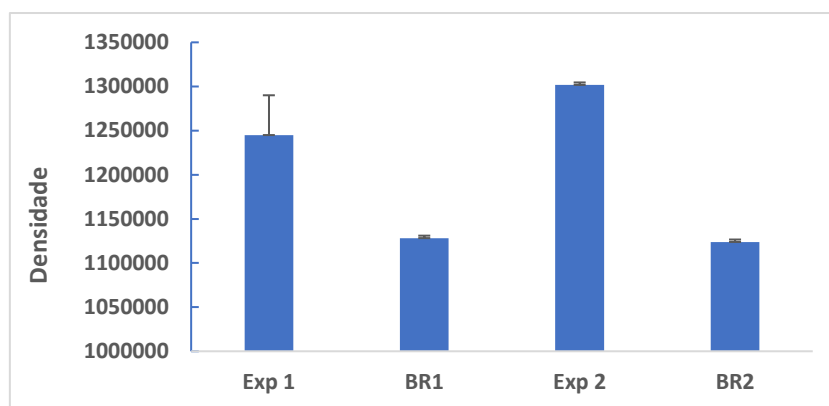


Figura 4: Média e desvio padrão da densidade proteica no gel de poliacrilamida de cada grupo experimental analisadas pelo software Image J.

Já a Figura 5 indica o valor de *Fold Change* (FC), o qual é calculado a partir da divisão entre os dados de densidade proteica do Experimento 1 em relação aos dados do Branco 1 e dos dados do Experimento 2 em relação aos dados do Branco 2. Assim, temos FC de Exp1/BR1 de 1.10 e Exp2/BR2 de 1.15.

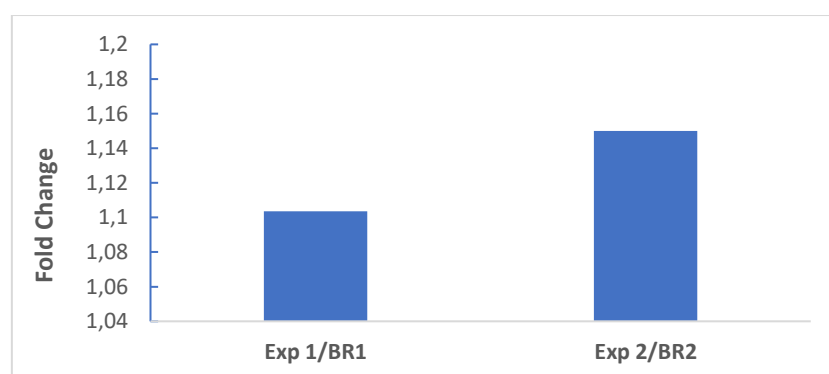


Figura 5: Relação de proporcionalidade (= Fold change) entre a densidade proteica contida nas amostras experimentais em relação aos seus respectivos controles.

Diante dos dados quantitativos das análises de densidade proteica totais em cada amostra analisada, ratifica-se as evidências qualitativas relatadas anteriormente em que os perfis das amostras 1 a 3 (Exp1) e 5 a 7 (Exp2) apresentam expressão de proteínas de forma diferencial positivamente (*up regulation*) quando comparados com seus respectivos controles (amostras 4 e 8 = BR1 e BR2). Além disso, a razão de FC entre EXP2/BR2 indica uma tendência de que o tratamento realizado nas amostras 5 a 7 (EXP2), influencia

positivamente (*up regulation*), porém, levemente moderada, a expressão das proteínas em comparação com o tratamento realizado nas amostras 1 a 3 (Exp1).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos observar aumento do halo de inibição da SH e a presença de proteínas no posbiótico produzidas pelo *Enterococcus* spp., responsável por uma possível ação de *quorum sensing*, entre as bactérias ácido lácticas utilizadas nesse estudo.

Logo se faz necessário a identificação destas proteínas para elucidar como elas atuam.

BIBLIOGRAFIA

ABBASI, A. *et al.* Potential *in vivo* delivery routes of postbiotics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 62, n. 12, p. 3345-3369, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2020.1865260>. Acesso em: 1 jun. 2022.

ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 1-14, 2011. Suplemento especial.

ABUJAMIEH, M. *et al.* Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. **Research in Veterinary Science**, London, v. 109, p. 81-85, 2016.

ACKERMANN, W. *et al.* The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. **Current Microbiology**, New York, v. 70, n. 3, p. 374-382, 2015.

ADHIKARI, B.; KWON, Y. M. Characterization of the culturable subpopulations of *Lactobacillus* in the chicken intestinal tract as a resource for probiotic development. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1389, 2017.

ALLAIN, V. *et al.* Skin lesions in broiler chickens measured at the slaughterhouse: relationships between lesions and between their prevalence and rearing factors. **British Poultry Science**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 407-417, 2009.

ANDREATTI FILHO, R. L. Paratifo aviário. *In*: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. p. 96-111

APAJALAHTI, J.; VIENOLA, K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 221, pt. B, p. 323-330, 2016.

BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2010. 311 p.

BARROW, P. A. Probiotics for chickens. *In*: FULLER, R. (ed.). **Probiotics: the scientific basis**. Edinburgh: Springer Science+Business Media Dordrecht, 1992. p. 225-257.

BERNDT, A. *et al.* Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BISCHOFF, S. C. *et al.* Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, London, v. 14, p. 189, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 70 / SDA / MAPA**. Brasília: MAPA, 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3136>. Acesso em: 20 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2022.

CAMPOS, A. **Brazil's poultry industry**. São Paulo: Repórter Brasil, 2016. Disponível em: https://reporterbrasil.org.br/wp-content/uploads/2016/07/Monitor2_ENG.pdf. Acesso em: 30 out. 2022.

CHARTERIS, W. P. *et al.* Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHEN, H. *et al.* Recent developments in antifungal lactic acid bacteria: application, screening methods, separation, purification of antifungal compounds and antifungal mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, p. 1-15, 2021.

CHOCT, M. Managing gut health through nutrition. **British Poultry Science**, Edinburgh, v. 50, n. 1, p. 9-15, 2009.

CINTAS, L. M. *et al.* Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, Thousand Oaks, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.

COLLA, F. L. *et al.* Isolamento de Salmonella Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 603-606, 2012.

COSTA, A. D. **Avicultura brasileira**. Porto Alegre: Agronet, 2010. Disponível em: <http://www.agronet.com.br/avicultura1.htm>. Acesso em: 20 out. 2022.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.

DAWKINS, M. S.; LAYTON, R. Breeding for better welfare: genetic goals for broiler chickens and their parents. **Animal Welfare**, London, v. 21, n. 2, p. 147-155, 2012.

EMIDIO, N. B. *et al.* Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 41, n. 3/4, p. 101-111, 2015.

ESTEVEZ, I. Density allowances for broilers: where to set the limits? **Poultry Science**, Cambridge, v. 86, n. 6, p. 1265-1272, 2007.

FANCHER, C. A. *et al.* Avian pathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*: challenges in no antibiotics ever broiler production and potential solutions. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 10, p. 1533, 2020.

FENG, J. *et al.* Using in vitro immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against Salmonella infection in broiler chicks. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2016.

FRANZ, C. M. A. P. *et al.* Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 125-140, 2011.

FREITAS, C. A.; BACHA, C. J. C.; FOSSATTI, D. M. The evaluation of agricultural sector growth in Brazil: time period 1970 to 2000. **Economia e Sociedade**, Campinas, v. 16, n. 1 (29), p. 111-124, 2007.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density LuxI family of cell density-responsive transcripti responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 2, p. 269-275, 1994.

GLENDINNING, L. *et al.* Assembly of hundreds of novel bacterial genomes from the chicken caecum. **Genome Biology**, London, v. 21, n. 1, p. 34, 2020.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 60, p. S98-S107, 2015. Supl. 2.

GRAHAM, C. E. *et al.* *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV Inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n. 17, p. 4507-4512, 2017.

GRIFFITHS, M. Quorum sensing. *In*: GRIFFITHS, M. (ed.). **Understanding pathogen behaviour**: virulence, stress response and resistance. Cambridge: Woodhead Publishing, 2005. Cap. 22, p. 580-640.

HASSAN, M. *et al.* Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 4, p. 723-736, 2012.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HUME, M. E. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. **Poultry Science**, Cambridge, v. 90, n. 11, p. 2663-2669, 2011.

IMMERSEEL, F. V. *et al.* Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 32-36, 2009.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.

JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, Gujarat, v. 12, n. 4, p. 504-521, 2019.

KHAN, S.; CHOUSALKAR, K. K. Transcriptome profiling analysis of caeca in chicks challenged with *Salmonella Typhimurium* reveals differential expression of genes involved in host mucosal immune response. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 104, n. 21, p. 9327-9342, 2020.

KHMEL, I. A.; METLITSKAYA, A. Z. Quorum sensing regulation of gene expression: a promising target for drugs against bacterial pathogenicity. **Molecular Biology**, Moscow, v. 40, n. 2, p. 169-182, 2006.

KIPPER, D. *et al.* Recent evolution and genomic profile of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from poultry flocks in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 87, n. 21, p. e0103621, 2021.

KOMMINENI, S. *et al.* Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. **Nature**, Basingstoke, v. 526, n. 7575, p. 719-722, 2015.

LIU, W. *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria. *In*: ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic acid bacteria: fundamentals and practice**. Berlin, Heidelberg: J. B. Metzler, Ed. Springer, 2014. p. 103-203.

LÓPEZ-GARCÍA, P.; EME, L.; MOREIRA, D. Symbiosis in eukaryotic evolution. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 434, p. 20-33, 2017.

MARLOW, V. L. *et al.* Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 196, n. 1, p. 16-27, 2013.

MBAVENG, A. T. *et al.* Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. **SpringerPlus**, Switzerland, v. 4, p. 823, 2015.

MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. *In*: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (ed.). **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Wallingford: Cabi, 2000. p. 1-21.

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.

MUSA, H. H. *et al.* The potential benefits of probiotics in animal production and health. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, n. 2, p. 313-321, 2009.

OCDE/FAO. **OCDE-FAO Agricultural Outlook 2017-2026**. Paris: OECD Publishing, 2017. 152 p.

OIE. **Manual of standard diagnostic tests and vaccines**: part 2, Section 2.9 chapter 2.9.9. Paris: World Organisation for Animal Health, 2021. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.09.%20Salmonellosis.pdf. Acesso em: 26 nov. 2022.

PANDE, V. V. *et al.* Study of Salmonella Typhimurium infection in Laying Hens. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 203, 2016.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2002.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, London, v. 13, p. S3, 2014. Supl. 1.

PLAZA-DIAZ, J. *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, Bethesda, v. 10, p. S49-S66, 2019. Supl. 1.

POURABEDIN, M.; ZHAO, X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 362, n. 15, p. 1-8, 2015.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. **Salmonella Heidelberg**: ceftiofur related resistance in human and retail chicken isolates. Ottawa: PHAC, 2007. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/heidelbergeng.php>. Acesso em: 10 fev. 2022.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 254, n. 1, p. 1-11, 2006.

SAKAMOTO, K. S. *et al.* The challenges of animal welfare in modern Brazilian poultry farming. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, Mossoró, v. 8, n. 2, p. 131-135, 2020.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, C. C. G.; SILVA, S. P. M.; RIBEIRO, S. C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 594, 2018.

SILVEIRA, L. *et al.* Characterization of multidrug-resistant isolates of *Salmonella enterica* serovars Heidelberg and Minnesota from fresh poultry meat imported to Portugal. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 27, n. 1, p. 87-98, 2021.

SOUZA, M. N. *et al.* Molecular detection of *Salmonella* serovars Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium directly from pre-enriched poultry samples. **British Poultry Science**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 388-394, 2019.

STANLEY, D. *et al.* Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e84290, 2013.

SVETECH, E. A.; STERN, N. J. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry - a review. **Poultry Science**, Cambridge, v. 89, n. 8, p. 1763-1768, 2010.

VAID, R. K. *et al.* Comparative genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum decodes strain specific genes. **PLoS One**, San Francisco, v. 16, n. 8, p. e0255612, 2021.

VIECO-SAIZ, N. *et al.* Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-17, 2019.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 21, p. 319-346, 2005.

WESSELS, S. *et al.* The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, p. 498-505, 2004.

World Health Organization. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases**: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: WHO, 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 20 out. 2022.

WREN, B. W. Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 1, n. 1, p. 30-39, 2000.

WU, Y. *et al.* Effects of dietary *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 supplementation on growth performance and cellular and humoral immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, Cambridge, v. 98, n. 1, p. 150-163, 2019.

XIE, S. *et al.* *Lactobacillus reuteri* stimulates intestinal epithelial proliferation and induces differentiation into goblet cells in young chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 49, p. 13758-13766, 2019.

YANG, S.-C. *et al.* Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 241, 2014.

ZOETENDAL, E. G.; RAJILIC-STOJANOVIC, M.; DE VOS, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, London, v. 57, n. 11, p. 1605-1615, 2008.