



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS CASCAVEL*
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PCF

**AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *WICKERHAMOMYCES*
ANOMALUS EM *SALMONELLA MINNESOTA* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO**

GABRIEL ANTONIO MELIN

CASCAVEL – PR

2025

GABRIEL ANTONIO MELIN

**AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *WICKERHAMOMYCES*
ANOMALUS EM *SALMONELLA MINNESOTA* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para qualificação em nível de Mestrado em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

CASCADEL – PR

2025

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Melim, Gabriel Antonio
AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR
WICKERHAMOMYCES ANOMALUS EM SALMONELLA MINNESOTA ISOLADAS DE
CARNES DE FRANGO / Gabriel Antonio Melim; orientador Rinaldo
Ferreira Gandra. -- Cascavel, 2025.
35 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2025.

1. Salmonella minnesota. 2. Micocinas antimicrobianas. 3.
Resistência a antibióticos. 4. Wickerhamomyces anomalus. I.
Gandra, Rinaldo Ferreira, orient. II. Título.

BIOGRAFIA RESUMIDA

Gabriel Antonio Melin, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascido no dia 18 de julho de 2000, formou-se em Biomedicina pelo Centro universitário – UNIVEL, obtendo o título de bacharel em dezembro de 2022. No ano seguinte ingressou no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em nível de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas em saúde, orientada pelo professor Dr. Rinaldo Ferreira Gandra.

***Se a educação sozinha não
transforma a sociedade,
sem ela tampouco a
sociedade muda.***

Paulo Freire

Dedicatória

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me presentear com a oportunidade de cursar este mestrado tão almejado, e por todas as coisas boas concedidas até este momento.

Aos meus pais Eliane e Olmar por apoiarem, colaborarem e incentivarem o crescimento da minha história profissional.

Ao meu orientador Profº Dr. Rinaldo F. Gandra, por oportunizar meu ingresso nas pesquisas de micologia, por compartilhar sua experiência, seu conhecimento. Por ser uma pessoa ímpar.

Aos colegas do laboratório de micologia, Rafaela Marquezoni, Telma e as alunas de iniciação científica Julia e Luana pela ajuda e apoio. Aos colegas da turma de mestrado 2023/2025.

E, por fim, aos familiares e amigos que de alguma forma me auxiliaram e apoiaram nesta trajetória maravilhosa!

AÇÃO INIBITÓRIA DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* EM *SALMONELLA MINNESOTA* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO

RESUMO

A exportação e o consumo de carne de frango no Brasil vêm aumentando progressivamente, exigindo rigorosas análises microbiológicas para garantir a segurança alimentar. Dentre os patógenos de maior relevância destaca-se a *Salmonella minnesota*, sorovar associado à resistência antimicrobiana e frequentemente detectado em produtos cárneos. Este estudo teve como objetivo avaliar a produção de β -1,3-glucanases pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* e sua atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. minnesota* isoladas de carne de frango. Foram tipificados 73 isolados de *Salmonella* spp., dos quais 27 foram confirmados como *S. minnesota*. A ação das micocinas foram avaliadas por ensaios em meio sólido e microdiluição, observando-se inibição total das 27 cepas na concentração de 0,11 U/mg de β -glucanases presentes no sobrenadante da cepa *W. anomalus* WA40. Os resultados indicam que as micocinas possuem potencial como agentes de biocontrole e bioconservação na indústria avícola.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella minnesota*, Micocinas antimicrobianas, Resistência a antibióticos, *Wickerhamomyces anomalus*, carne de frango.

INHIBITORY ACTION OF MYCOCINS PRODUCED BY WICKERHAMOMYCES ANOMALUS ON SALMONELLA MINNESOTA ISOLATED FROM CHICKEN MEAT

ABSTRACT

The export and consumption of chicken meat in Brazil have been progressively increasing, demanding rigorous microbiological analyses to ensure food safety. Among the most relevant pathogens is *Salmonella minnesota*, a serovar associated with antimicrobial resistance and frequently detected in poultry products. This study aimed to evaluate the production of β -1,3-glucanases by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* and its antimicrobial activity against *S. minnesota* strains isolated from chicken meat. A total of 73 *Salmonella spp.* isolates were typified, of which 27 were confirmed as *S. minnesota*. The antimicrobial action of the mycocins was assessed through solid media and microdilution assays, with complete inhibition of all 27 strains observed at a concentration of 0.11 U/mg of β -glucanases present in the supernatant of the *W. anomalus* WA40 strain. The results indicate that the mycocins have potential as biocontrol and biopreservation agents in the poultry industry.

KEYWORDS: *Salmonella minnesota*; antimicrobial mycocins; antibiotic resistance; *Wickerhamomyces anomalus*; chicken meat.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 <i>Salmonella sp</i>	6
1.2 <i>Salmonella minnesota</i>	8
1.3 <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	9
2 OBJETIVO	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 METODOLOGIA	11
3.1 Cepas.....	11
3.2 Isolamento e identificação de <i>Salmonella sp</i>	12
3.3 Tipificação de <i>Salmonella sp</i>	12
3.4 Produção de micocinas.....	13
3.5 Dosagem de Atividade de Beta-glucanases	13
3.6 Teste de inibição em superfície sólida.....	14
3.7 Teste de microdiluição	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Tipificação de <i>salmonella sp</i>	16
4.2 Dosagem de B-glucanases	17
4.3 Teste microbiológico de inibição de superfície sólida.....	18
4.4 Teste de microdiluição	19
5 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipificação de 73 isolados de <i>Salmonella</i> spp de amostras de carne de frango.....	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teste de tipificação de *Salmonella minnesota* pelo método de aglutinação antígeno e anticorpo. Amostra A positivo para *Salmonella minnesota* e amostra B negativo para grupo pertencente.....16

Figura 2 - Distribuição Percentual das Amostras de *Salmonella spp.* Identificadas.....16

Figura 3 - Crescimento de *Salmonella minnesota* no controle positivo (A) e inibição da *Salmonella minnesota* com concentração de 0,11 U/ml de micocinas (B).....18

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Salmonella sp*

A *Salmonella sp* é um dos grandes causadores de infecções humanas podendo ser transmitidas por alimentos cárneos devido ao mau processo de cozimento, sendo encontrado principalmente em carnes de frango e derivados. O Brasil é um grande exportador deste alimento, porém a presença desta bactéria prejudica a exportação de carnes e derivados. O governo brasileiro tem adotado medidas de controle para evitar contaminações das espécies *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. Entretanto, nos últimos anos, a bactéria *S. minnesota* está sendo associada a infecções humanas além de apresentar um grande perfil de resistência a antibióticos e dificultar o tratamento dessa infecção (Foley *et al.*, 2013).

A Instrução Normativa SDA - 20, de 21 de outubro de 2016 regulamenta e obriga os estabelecimentos avícolas comerciais à realização de análises microbiológicas para o controle de *Salmonella spp* nos lotes de carne de frango e peru de corte. Além das análises nas amostras de carne, também são realizadas análises de superfície dos galpões. O Ministério da Agricultura também exige que os laboratórios sigam a metodologia oficial utilizada pela Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários, da Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - CGAL/SDA/MAPA, realizando a detecção de *Salmonella sp*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella monofásica* (1,4[5],12:-:i;-) e *Salmonella monofásica* (1,4[5],12:-:1,2) (Brasil, 2016).

Devido à grande contaminação de *Salmonella sp* em alimentos, os órgãos regulamentadores exigem que as indústrias possuam medidas rigorosas em pontos que são considerados críticos, para que sejam evitadas possíveis contaminações de microrganismo nos alimentos. Muitas vezes o animal é contaminado na fase do abate por ter contato com as fezes de aves contaminadas e vão para os frigoríficos, podendo assim disseminá-la para outros ambientes do frigorífico gerando contaminações cruzadas pelos seguintes meios: utilização de equipamentos automatizados, mãos de trabalhadores, água, outros lotes contaminados e utensílios utilizados (Hachiya *et al.*, 2020).

A *Salmonella sp* tem uma grande adaptabilidade crescendo entre 5°C a 45°C e uma ampla faixa de PH de 4,0 a 9,0, com transmissão fecal, oral e também por alimentos,

sendo que em ambientes favoráveis, a *Salmonella sp* pode sobreviver em águas e solos (Hachiya *et al.*, 2020).

A pesquisa realizada por Teixeira e Bittencourt (2021) analisa o impacto da resistência antimicrobiana em *Salmonella sp*, destacando essa questão como um desafio importante para a saúde pública. Os autores enfatizam que a resistência a antibióticos pode complicar surtos alimentares, tornando o tratamento de infecções mais difícil e caro. Além das repercussões diretas na saúde, a resistência antimicrobiana pode gerar consequências econômicas relevantes. Portanto, é crucial implementar políticas públicas que abordem essa resistência, incentivando o uso responsável de antimicrobianos na cadeia de produção de alimentos.

A *Salmonella spp.* constitui um dos principais desafios para a indústria avícola, devido à sua capacidade de causar prejuízos econômicos e impactos relevantes na saúde pública. Este patógeno, presente em diferentes etapas da cadeia produtiva, pode ser transmitido por via vertical ou horizontal, contaminando carne, ovos e derivados, e ocasionando infecções alimentares, especialmente em indivíduos vulneráveis. A ocorrência de cepas resistentes, favorecida pelo uso de antimicrobianos na produção animal, intensifica o risco à saúde humana. Por isso, o controle da *Salmonella spp.* requer a adoção de medidas preventivas em todas as fases da produção, incluindo biossegurança, vacinação e monitoramento oficial, assegurando a conformidade com padrões de segurança alimentar e a redução de sua disseminação (Mota *et al.*, 2025).

A ocorrência de *Salmonella spp.* na cadeia produtiva acarreta expressivos prejuízos econômicos, resultantes de perdas diretas na produção e de custos adicionais com ações de controle, prevenção e tratamento. Além disso, surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados podem levar à aplicação de medidas restritivas ao comércio, afetando a competitividade e a credibilidade dos produtos no mercado interno e externo. Esses impactos se estendem também ao aumento das despesas com saúde pública, devido ao tratamento de pessoas acometidas, reforçando a necessidade de estratégias eficazes de monitoramento e redução da contaminação ao longo de todo o processo produtivo (Ferreira *et al.*, 2020).

1.2 *Salmonella minnesota*

A *Salmonella minnesota* é um sorovar notável de *Salmonella spp* que foi identificado em carne de aves importadas, destacando preocupações significativas sobre segurança alimentar e saúde pública. Este sorovar, juntamente com outros, como *Salmonella heidelberg*, tem sido cada vez mais detectado nesse tipo de carne. A União Europeia possui regulamentações rigorosas em relação à *Salmonella* na carne de aves, concentrando-se principalmente nos sorovares mais comuns que causam infecções humanas, como *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. No entanto, a presença de *Salmonella minnesota* e os seus perfis de resistência a antibióticos associados, como a resistência a múltiplos medicamentos, representa um risco significativo. Apesar de ser relatado com menor frequência na Europa em comparação com o continente americano, a detecção deste sorovar em carnes importadas suscita preocupações devido ao seu potencial para transportar marcadores de resistência que podem ter impacto na saúde humana (Silveira *et al.*, 2021).

A resistência antimicrobiana em *Salmonella minnesota*, particularmente a sua resistência a antibióticos críticos como fluoroquinolonas e cefalosporinas, destaca a necessidade urgente de melhores medidas de vigilância e controle. Esta resistência resulta frequentemente do uso indevido de antibióticos na produção avícola, o que pode levar à propagação de cepas resistentes. Os estudos sobre estes casos isolados sublinham a importância de aderir aos atuais regulamentos de segurança alimentar, além de melhorar as práticas de monitorização para evitar a propagação de *Salmonella minnesota* (Silveira *et al.*, 2021)

A análise de 183 amostras de *Salmonella minnesota* provenientes de fezes de frango no Brasil revelou preocupações sérias em relação à resistência antimicrobiana. O estudo indicou que essa cepa apresenta alta resistência a diversos antimicrobianos comuns, sugerindo uma tendência alarmante com possíveis consequências para a saúde pública. A investigação dos genomas mostrou que a *Salmonella minnesota* possui resistência significativa a antibióticos como beta-lactâmicos, sulfametoxazol e oxitetraciclina, associada a genes de resistência como *sul2*, *tetA* e *blaCMY-2*, frequentemente localizados em plasmídeos *IncC* e *Inc11*, que favorecem a transferência horizontal de resistência. A predominância de *Salmonella minnesota* e *Salmonella heidelberg* na avicultura brasileira pode estar relacionada ao uso de vacinas contra

Salmonella enteritidis, que provocou uma substituição de sorovares, impulsionando a disseminação de cepas resistentes. Por isso, é fundamental implementar estratégias de controle mais eficazes e um monitoramento contínuo para enfrentar a propagação e o impacto dessas cepas na saúde pública e na avicultura (Alikhan *et al.*, 2022).

A análise de cepas de *Salmonella minnesota* e *Salmonella heidelberg* revelou uma significativa resistência a cefotaxime e ciprofloxacina, dois antibióticos críticos para o tratamento de infecções invasivas em humanos. Essa resistência é associada à presença do gene blaCMY-2, um tipo de β -lactamase AmpC, encontrado em plasmídeos IncA/C e IncI1, que facilitam a transferência horizontal de resistência.

Em particular, *S. Minnesota* foi identificada como portadora do gene blaCMY-2, refletindo uma tendência preocupante na indústria avícola brasileira, em que a disseminação de cepas resistentes está associada a um aumento de espécies menos comuns. Essa resistência, observada em amostras exportadas para a Europa, destaca a necessidade de revisar as regulamentações de segurança alimentar e fortalecer o monitoramento da resistência antimicrobiana para proteger a saúde pública (Campos *et al.*, 2018).

1.3 *Wickerhamomyces anomalus*

Bevan e Makower (1963) estudaram leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* extraídas de resíduos de cervejaria e descobriram que algumas delas produziam uma glicoproteína de baixo peso molecular, denominada toxina *killer* ou micocinas, capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos, enquanto permaneciam imunes a esse efeito. Essa descoberta estimulou a pesquisa sobre micocinas em várias leveduras, incluindo os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* (agora classificado como *Wickerhamomyces*), *Ustilago* e *Zygosaccharomyces* (Schmitt; Breinig, 2002).

Essas micocinas, geralmente glicoproteínas com propriedades antibióticas, atuam preferencialmente na membrana celular de determinados microrganismos, mesmo sem necessidade de contato direto. A produção de micocinas é afetada por fatores como pH e temperatura, sendo mais eficaz em ambientes ácidos e inativadas em temperaturas

elevadas (Magliani *et al.*, 1997; Marquina; Santos; Peinado, 2002; Lima, Bruno; Silva, 2007).

Polonelli *et al.* (1986) foram os primeiros a demonstrar que a cepa de *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*) ATCC 96603 possui atividade letal contra diversos microrganismos patogênicos, tanto procarióticos quanto eucarióticos.

Além das propriedades antibacterianas, *Wickerhamomyces anomalus* também apresenta atividade antifúngica. Um estudo conduzido por Masih, Alie e Paul (2000) demonstrou que essa levedura pode proteger videiras contra o fungo *Botrytis cinerea*. Além disso, a micocina de *Wickerhamomyces anomalus* DBVPG 3003 foi capaz de inibir cepas de *Brettanomyces*, que causam deterioração do vinho (Masih; Alie; Paul, 2000; Comitini *et al.*, 2004).

Na medicina, as micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* demonstraram a habilidade de sensibilizar cepas de *Malassezia furfur* e *Malassezia pachydermatis*, além de inibir *Candida tropicalis* e *Candida albicans* (Polonelli *et al.*, 1986; Guo *et al.*, 2013; Tay; Lim; Tan, 2014).

Diversos mecanismos de ação foram propostos para as micocinas, incluindo a formação de canais transmembrana nas células-alvo, vazamento de íons, inibição da divisão celular, danos ao material genético e a produção de compostos voláteis como acetato de etila, acetato de isoamila e propionato de etila. As micocinas, em particular as β -glucanases, são notáveis por sua alta atividade e amplo espectro de ação (Wang *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012).

Pesquisas indicam que algumas cepas de *Wickerhamomyces anomalus* produzem quantidades significativas de micocinas, que são consideradas o principal mecanismo de ação antimicrobiana, em conjunto com enzimas hidrolíticas e substâncias voláteis, podendo atuar de forma sinérgica (Cray *et al.*, 2013). As micocinas possuem baixa citotoxicidade, não causando hemólise nas células sanguíneas em comparação com antifúngicos, como a anfotericina B, e outras substâncias antimicrobianas de origem bacteriana, como as produzidas por *Pseudomonas syringae* (Paris *et al.*, 2016).

A *Artemia salina* é comumente utilizada como parâmetro para avaliar a toxicidade de extratos de plantas. Essa técnica foi adaptada para testar a toxicidade das micocinas, com ensaios realizados no sobrenadante das micocinas produzidas por leveduras, os quais mostraram baixa toxicidade em organismos testados (Junges *et al.*, 2020).

A produção de micocinas pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* tem um potencial considerável para aplicações contra microrganismos patogênicos, apresentando pouca ou nenhuma toxicidade para humanos. Pesquisas adicionais, como as de Prat *et al.* (2019) e Teixeira *et al.* (2021) sublinham a viabilidade dessas micocinas no desenvolvimento de conservantes naturais para a indústria alimentícia, reforçando a necessidade de investigações contínuas sobre suas propriedades antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo verificar a produção de β -1,3 glucanases pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* e sua ação frente a *Salmonella minnesota* isoladas de frangos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar *Salmonella sp* de amostras de carne de frango.
- Realizar tipificação dos isolados de *Salmonella minnesota*.
- Produzir de micocinas pela cepa de *Wickerhamomyces anomalus* WA40.
- Avaliar a ação das micocinas da levedura *Wickerhamomyces anomalus* em cepas de *Salmonella minnesota*.
- Testar as micocinas como possível antimicrobiano para controlar a contaminação da *S. minnesota* em meio sólido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas

Foi empregado um protocolo já criado para a produção das micocinas utilizando a levedura *Wickerhamomyces anomalus*. Atualmente, faz parte da micoteca do laboratório de micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE), vinculado ao Hospital Universitário do Oeste do Paraná seu sequenciamento

encontram-se no GenBank para WA40 KT580792 e está disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

A coleta de *Salmonella spp* foi realizada em um laboratório de microbiologia de alimentos em Cascavel, PR, a partir de amostras de frangos. O objetivo dessas análises microbiológicas foi detectar a presença de patógenos que podem afetar a segurança alimentar.

Cabe destacar que o laboratório utiliza de métodos padrão para isolamento e identificação, assegurando a confiabilidade dos resultados e contribuindo para o monitoramento da qualidade dos produtos alimentares. Essa metodologia é essencial para avaliar a prevalência de *Salmonella spp* na cadeia de produção.

3.2 Isolamento e identificação de *Salmonella sp*

Para a realizar a detecção de *Salmonella spp* foi pesado 25g de carne de frango e homogeneizado com o caldo Água peptona tamponada (APT) e incubada a 36° por 24 horas, em seguida alíquotas de 1 ml foram inoculadas em caldo seletivo MKTTN (Caldo Mueller-Kauffmann Tetrationato), que favorecem apenas o crescimento de *Salmonella sp*. Este passo geralmente envolve a incubação a 36°C por 24 horas.

Após o enriquecimento, foram realizadas repiques em meio solido diferencial, como o meio Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e ágar Hektoen entérico (HE). Esses meios permitem a diferenciação de *Salmonella sp* com base em características morfológicas e de coloração, colônias que apresentam características típicas de *Salmonella sp* (como colônias negras) são selecionadas para análise adicional.

A identificação de *Salmonella* é confirmada por meio de testes bioquímicos, como a fermentação de glicose, a produção de gás, produção de H₂S, fermentação de ureia e a utilização de lisina. Para o isolamento de *Salmonella sp* realizado no laboratório foram seguidas as normas internacionais, envolvendo uma série de etapas padronizadas para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados. O procedimento comumente adotado é baseado nas diretrizes fornecidas por organizações como a Organização Internacional de Normalização – ISO (2002).

3.3 Tipificação de *Salmonella sp*

Para realizar a tipificação de *Salmonella minnesota* foi utilizado soro somático O:21 da marca SSI Diagnostica e dois soros flagelares fase um H:b e fase dois H:e, n, x da mesma marca SSI Diagnostica. As amostras de *Salmonella spp* isoladas foram semeadas em ágar MH (Mueller Hinton) e incubadas a 36°C por 24 horas, para a tipificação foi colocado 30µL de soro somático ou flagelar em uma lâmina e homogeneizado uma pequena quantidade de massa bacteriana com o auxílio de uma alça 10µL afim de visualizar a aglutinação ou não com o intuito de confirmar o grupo e o gênero da *Salmonella minnesota* (Grimont; Weill, 2007; Filho *et al.*, 2011).

3.4 Produção de micocinas

Para a produção das micocinas da levedura *Wickerhamomyces anomalus* foi utilizado o procedimento pressuposto por Paris *et al.* (2016), em que a cepa foi reativada por estria simples em meio de recuperação de cepas (0,1% cloranfenicol; 1,2% ágar-ágar; 1% peptona; 1% glicose; 1% caldo BHI).

Após a reativação, ela foi incubada em frascos de roux contendo 200 ml de caldo (1% de peptona, 1% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico) pH 4,7 e em seguida foram incubados a 25°C por 10 dias. Após este período, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 min, obtendo o sobrenadante que foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4°C.

3.5 Dosagem de Atividade de Beta-glucanases

Para a determinação de β -glucanases foi utilizado o método de Miller (1959) com algumas modificações. A atividade foi determinada ao incubar 25 µL do extrato bruto com 25 µL de Laminarina 1% em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, a 37 °C, por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido 3,5'-dinitrosalicílico (DNS). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm utilizando de glicose como padrão. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

Para realizar a atividade específica das micocinas é utilizado o método para quantificação de proteínas na amostra de micocinas utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 proposto por Bradford, a reação é realizada com 1 ml do reagente e 100µL do

extrato enzimático, após aguardar por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida realizar a leitura em espectrofotômetro a 595 nm e descontado o valor com a determinação da atividade enzimática (Bradford, 1976). A atividade específica de β -glucanases foi calculada dividindo a concentração de atividade enzimática pela concentração de proteína (Lehninger *et al.*, 1976).

3.6 Teste de inibição em superfície sólida

Para investigar a atividade antimicrobiana das micocinas extraídas das cepas de *Wickerhamomyces anomalus* WA40 contra cepas de *Salmonella minnesota* foram conduzidos testes microbiológicos de inibição em superfície em meio sólido. Essa metodologia é eficaz para avaliar a atividade antimicrobiana das micocinas, uma vez que possibilita a comparação do crescimento das colônias de *Salmonella minnesota* nas condições com e sem a presença das micocinas.

A técnica foi realizada conforme descrito por Junges *et al.* (2020), com adaptações específicas para o microrganismo em estudo e para as condições do presente trabalho. Essa abordagem permitiu uma análise mais precisa da atividade antimicrobiana das micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*, considerando as características particulares de *Salmonella minnesota*. As modificações foram essenciais para otimizar o desempenho experimental e garantir a relevância dos resultados obtidos.

Para a realização do teste, utiliza-se uma biplaca estéril, que contém duas partes distintas: uma delas é preenchida com Ágar SS (*Salmonella* e *Shigella*), enquanto na outra parte são adicionados 6 mL de Ágar SS, previamente incorporado com as micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* com atividade de 0,11 U/mg de β -glucanases. Após essa preparação, as amostras de *Salmonella minnesota* são estriadas em ambas as partes da biplaca utilizando uma técnica de estria simples, garantindo que a distribuição das amostras seja uniforme.

As placas são então incubadas a 37°C por 24 horas, permitindo o crescimento das colônias. Os testes são realizados em duplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados e aumentar a confiabilidade das observações.

A técnica empregada se baseia na capacidade das micocinas de inibir o crescimento de patógenos, e o uso do Ágar SS é fundamental, pois é um meio seletivo que favorece o crescimento de *Salmonella spp.* O monitoramento do crescimento

bacteriano nas diferentes condições permite avaliar a eficácia das micocinas e sua potencial aplicação na conservação de alimentos.

3.7 Teste de microdiluição

Para os testes de microdiluição foi utilizado o método alinhado à norma ISO 20776-1 indicado pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), com algumas adaptações. Utilizaram-se microplacas contendo 96 poços de fundo chato, dispostas em colunas (enumeradas de 1 a 12) e linhas (com letras de A a H). Foram testadas 27 cepas de *S. minnesota*, as quais foram previamente ajustadas à concentração em espectrofotometria, usando a absorbância a 600 nm (aproximadamente 5×10^5 UFC/mL).

Em seguida, foi homogeneizada em 5 mL de Caldo Mueller-Hinton, de onde foram retirados 100 µL e distribuídos nos poços das colunas, em que cada coluna corresponde a uma cepa teste de *S. minnesota*. Os sobrenadantes contendo as micocinas foram diluídos em caldo Mueller Hinton e 100 µL foram adicionados aos poços da linha B a F, resultando nas seguintes diluições (0,001; 0,003; 0,006; 0,013; 0,027; 0,055; 0,11 uL/mg). Na linha A foram realizados os controles de esterilidade (contendo somente caldo estéril) e a linha G foi realizado o controle de crescimento (contendo caldo MH e *S. minnesota*).

As placas foram seladas, homogeneizadas e incubadas a 37 °C. Após 24 horas, foi comprovada a presença ou ausência de crescimento bacteriano, tomando o controle de crescimento como referência. A partir do poço correspondente à maior diluição sem crescimento bacteriano visível, retirou-se uma alíquota de 10 µL, utilizando alça bacteriológica calibrada, que foi inoculada na superfície de Ágar SS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, sendo então realizada a leitura para confirmar a ausência de crescimento e determinar a menor concentração de micocina capaz de inibir o crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram contínuos em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tipificação de *salmonella* sp

Nesse estudo, o isolamento de *Salmonella* sp foi realizada em um laboratório de microbiologia de alimentos em Cascavel, Paraná e submetida a um processo de sorotipificação para confirmação como *Salmonella minnesota*, conforme demonstrado na Figura 1.

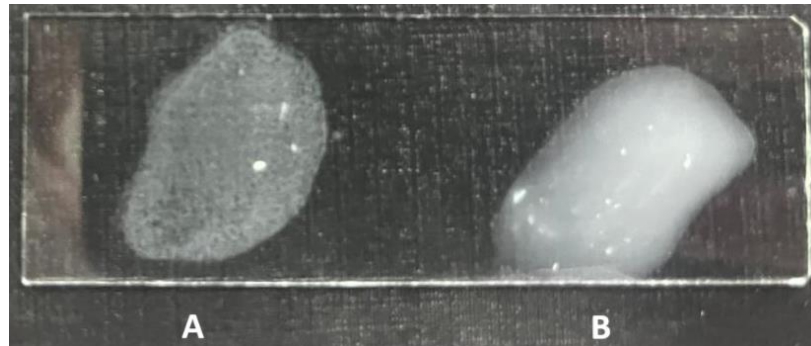


Figura 1. Teste de tipificação de *Salmonella minnesota* pelo método de aglutinação antígeno e anticorpo. Amostra A positivo para *Salmonella minnesota* e amostra B negativo para grupo pertencente.

A sorotipificação dos 73 isolados de *Salmonella* sp provenientes de carnes de frango mostrou que 36,9 % (27/73) foram correspondentes a *S. minnesota*; 8,2% (6/73) foram correspondentes a *S. typhimurium*; 6,8% (5/73) foram correspondentes a *S. heidelberg*; 48,1% (35/73) não foram identificadas como mostra a Figura 2, anexo 1 sorotipificação de 73 isolados de *Salmonella* sp de amostra de carne de frango.

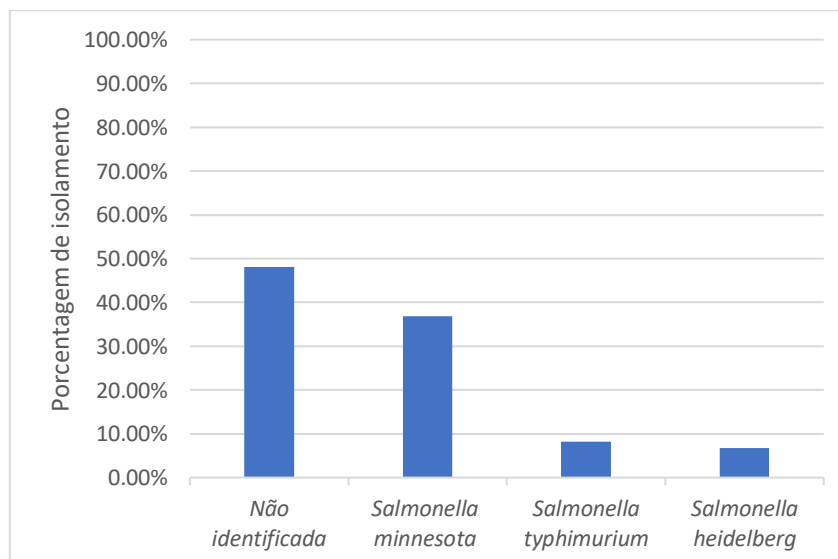


Figura 2. Distribuição Percentual das Amostras de *Salmonella* spp. Identificadas

Em comparação, o estudo de Alikhan *et al.* (2022) identificou 26 amostras de *Salmonella minnesota* entre 318 coletadas, que foram exportadas do Brasil para o Reino Unido, evidenciando uma prevalência semelhante e a importância dessa cepa no comércio internacional. Além disso, a pesquisa de Silveira *et al.* (2021) sobre carne de frango exportada para Portugal identificou 37 isolados de *Salmonella enterica Heidelberg* e 19 isolados de *Salmonella enterica* serovar *Minnesota*. Esses achados sublinham a necessidade de monitoramento constante das cepas de *Salmonella* em produtos alimentares, especialmente em um contexto de globalização das cadeias de suprimento.

Cabe destacar que esse tipo de análise é fundamental para a vigilância epidemiológica, o controle de surtos e o acompanhamento da resistência a antibióticos. De acordo com a norma internacional ISO 6579:2002, a tipificação sorológica deve ser aplicada para assegurar a precisão na identificação de *Salmonella spp.* e suas respectivas cepas (International Organization for Standardization, 2002). Esse método utiliza anticorpos específicos que reconhecem estruturas antigênicas na superfície das bactérias, como antígenos capsulares, somáticos e flagelares (Filho *et al.*, 2011). A implementação dessas técnicas além de aumentar a precisão na identificação, também desempenha um papel crucial na segurança alimentar e na saúde pública. A precisão na tipificação de *Salmonella* é crucial para identificar a origem de surtos alimentares e implementar medidas preventivas eficazes (Rabsch *et al.*, 2009).

Adicionalmente, estudos indicam que a sorotipificação, conforme as diretrizes de normas internacionais como a ISO 6579:2002, pode aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos, contribuindo para investigações epidemiológicas mais completas (International Organization for Standardization, 2002).

4.2 Dosagem de B-glucanases

A dosagem realizada de β -glucanases presente no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* WA40 foi possível determinar uma concentração de 0,11 U/mg. Em comparação, Calazans *et al.* (2020) obtiveram uma atividade da enzima as β -glucanases presentes no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus*.

WA45 foi de 0,4 U/mg, Martelli *et al.*, (2022) obtiveram uma concentração de 3,80 U/mg utilizando o sobrenadante da cultura da cepa *Wickerhamomyces anomalus* WA92.

A diferença na produção de micocinas pode ser em relação as diferentes marcas de meios como a peptona e o uso do inóculo na produção pode interferir na quantidade de B-glucanases.

4.3 Teste microbiológico de inibição de superfície sólida

As 27 amostras de *Salmonella minnesota* semeadas em Ágar SS acrescidos de micocinas contendo 0,11 U/mg de β -glucanases presente no sobrenadante com micocinas obtiveram inibição total das amostras de *Salmonella minnesota* em 48 horas de incubação como mostra a **Figura 3**.

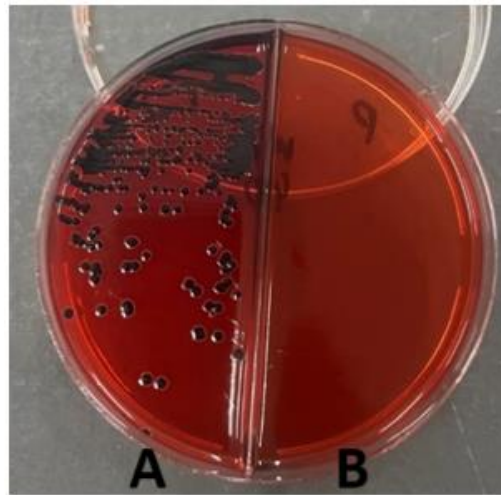


Figura 3. Crescimento de *Salmonella minnesota* no controle positivo (A) e inibição da *Salmonella minnesota* com concentração de 0,11 U/ml de micocinas (B).

Junges *et al.* (2020) realizou testes de inibição de superfície com a bactéria gram negativa *Acinetobacter baumannii* em que verificaram também inibição total com concentração de 80% de sobrenadante de micocinas com ágar nutriente. Para reduzir a contaminação de carnes e inibir o crescimento de *Salmonella spp* e outros microorganismos patogênicos, é comum o uso de conservantes químicos, como o nitrito e o nitrato de sódio.

Contudo, é importante considerar os potenciais efeitos tóxicos desses compostos, além do aumento da resistência de patógenos aos antimicrobianos. Pesquisas têm

mostrado que o consumo elevado desses aditivos pode estar relacionado a questões de saúde, incluindo o aumento do risco de câncer, diante dessas preocupações, alternativas para a conservação de alimentos têm sido desenvolvidas, incluindo o uso de leveduras que produzem micocinas (Muccilli; Restuccia, 2015; Silva, 2021). Essa situação enfatiza a importância de buscar métodos de conservação mais seguros.

4.4 Teste de microdiluição

O ensaio de microdiluição foi utilizado para avaliar a eficácia antimicrobiana de micocinas produzidas pelas cepas WA40 contra cepas de *Salmonella minnesota* isoladas de produtos cárneos nas seguintes diluições de β -glucanases 0,001; 0,003; 0,006; 0,013; 0,027; 0,055; 0,11 U/mg. Os resultados demonstraram maior efeito antimicrobiano na concentração 0,11 U/mg. As micocinas produzidas pela cultura de *Wickerhamomyces anomalus* WA40 apresentaram maior eficácia antimicrobiana contra bactérias isoladas de produtos cárneos de frango.

O método de microdiluição tem sido amplamente utilizado para avaliar a eficácia de compostos antimicrobianos contra *Salmonella spp.*, sendo considerada uma técnica padrão para sua precisão e reprodutibilidade.

Persel *et al.* (2025) observaram inibição do crescimento de todas as cepas de *Escherichia coli* testadas, incluindo a cepa padrão ATCC 25922 e outras 45 cepas multirresistentes, quando utilizado sobrenadante com 0,8 U/mg de β -glucanases. Quando a concentração foi reduzida para 0,4 U/mg, o sobrenadante manteve atividade frente a 78,2% das cepas.

Calazans *et al.* (2021) mostra os resultados de micocinas extraídas das leveduras *Wickerhamomyces anomalus* mostraram potencial antimicrobiano contra várias cepas de *Staphylococcus aureus*.

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que as micocinas das culturas de *W. anomalus* WA40 e WA45 demonstraram atividade antimicrobiana contra a *Salmonella minnesota* isolada de produtos cárneos, o que possibilita o desenvolvimento de novas técnicas baseadas no uso dessas micocinas para prevenir contaminações nas áreas de produção.

REFERÊNCIAS

ALIKHAN, N. F. *et al.* Dynamics of *Salmonella enterica* and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. **PLoS Genetics**, v. 18, n. 6, 2 jun. 2022.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. *In*: **Proc Xlth Int Congr Genet**, The Netherlands: Pergamon Press, v. 1, p. 202-203, 1963.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **IN nº 20, de 21 de outubro de 2016**. Estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor, na forma desta Instrução Normativa e dos seus Anexos I a IV. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/salmonella>. Acesso em: 03 out. 2025.

CAMPOS, J. *et al.* Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014–2015. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 151–154, 1 jan. 2018.

COMITINI, F. *et al.* *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiol Lett**, v. 238, p. 235-240, 2004.

CRAY, J. A.; BELL, A. N.; BHAGANNA, P.; MSWAKA, A. Y.; TIMSON, D. J.; HALLSWORTH, J. E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? **Microb Biotechnol**, v. 6, n. 5, p. 453-92, Sep 2013.

FERREIRA, P. A. B. **Análise do risco sanitário na cadeia produtiva de aves: o caso da *Salmonella* spp. em carne de frango exportada para a União Europeia**. 2020. – Escola Nacional de Administração Pública, Brasília, 2020.

FOLEY, S. L. *et al.* *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 582–607, dez. 2013.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.-X. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9. ed. 2007.

GUO, F. J. *et al.* A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 737-746, 2013.

HACHIYA, J. O. *et al.* Contaminação por *Salmonella* spp. durante o processamento de aves em abatedouros frigoríficos. **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 4, p. 218, 23 dez. 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:2002** - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva: ISO, 2002.

JUNGES, D. S. B. *et al.* Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Ecology**, v. 80, n. 2, p. 278–285, 1 ago. 2020.

LIMA, J. R. D.; VIANA, F. M. P.; LIMA, F. A.; PIENIZ, V.; GONÇALVES, L. R. B. Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 203-211, 2014.

LIMA, M. A.; BRUNO, G.; SILVA, R. **Factors influencing the production of killer toxins in yeasts**. Food Microbiology, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Artmed, 2019.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **Int Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 65-71, Jun 2002.

MARTELLI, E. C. *et al.* Conservação de formulação tópica utilizando micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*. **Scientia Plena**, v. 1, n. 1, 2022.

MASIH, E. I.; ALIE, I.; PAUL, B. Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 2, p. 233–237, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOTA, G. F.; QUIRINO, É. F. S.; ANJOS, J. M.; SILVA, V. B. Salmoneloses na avicultura e seu impacto na saúde única. **Revista DELOS**, Curitiba, v. 18, n. 63, p. 1-15, 2025. DOI: 10.55905/rdelosv18.n63-148.

MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 588–611, 2015.

PARIS, A. P. *et al.* Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 878–884, 1 dez. 2016.

POLONELLI, L.; LORENZINI, R.; DE BERNARDIS, F.; MORACE, G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. **Mycopathologia**, v. 96, n. 2, p. 103-7, nov. 1986.

POLONELLI, L.; MAGLIANI, W.; CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; CONTI, S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 35-41, jan. 2011.

PRAT, D. *et al.* **Natural preservatives based on yeast micocinas for the food industry**. Food Science and Technology International, 2019.

RABSCH, W. *et al.* Epidemiology of *Salmonella* infections in Germany: a review of the data. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, n. 3, p. 257-76, Aug 2002.

SCHNEIDER, J. *et al.* Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalous* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 3, p. 382-6, 2012.

SILVA, R. R. da. Riscos toxicológicos associados ao consumo de embutidos com altos níveis de nitrato e nitrito. **Revista Eletrônica Estácio Redife**, [s. l.], 2021.

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**, v. 27, n. 1, p. 87–98, 1 jan. 2021.

SUN, H. Y. *et al.* Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalous* HN1-2 isolated from mangrove ecosystem. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 251-256, 2012.

TAY, S. T.; LIM, S. L.; TAN, H. W. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalous* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 439, 2014.

TEIXEIRA, L. M.; BITTENCOURT, P. F. Impacto da resistência antimicrobiana em *Salmonella*: um desafio para a saúde pública. **Jornal de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 37, n. 2, p. 215-226, 2021.

TEIXEIRA, M. S. *et al.* The potential of *Wickerhamomyces anomalous* in food preservation. **Journal of Food Protection**, v. 1, n. 1, 2021.

WANG, X. *et al.* Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. **Curr Microbiol**, v. 55, p. 396–401, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 - Tipificação de 73 isolados de *Salmonella spp* de amostras de carne de frango.

Resultado:	Sorologia:	Espécie:
Sal 1	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 2	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 3	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 4	O:04 + / i + / 1,2 +	<i>Salmonella typHimurium</i>
Sal 5	O:04 + / r + / 1,2 +	<i>Salmonella heidelberg</i>
Sal 6	O:04 +	Não identificada
Sal 7	O:04 +	Não identificada
Sal 8	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 9	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 10	O:04 +	Não identificada
Sal 11	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 12	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 13	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 14	O:04 + / r + / 1,2 +	<i>Salmonella heidelberg</i>
Sal 15	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 16	O:04 + / r + / 1,2 +	<i>Salmonella heidelberg</i>
Sal 17	O:04 +	Não identificada
Sal 18	O:04 + / i + / 1,2 +	<i>Salmonella typHimurium</i>
Sal 19	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 20	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 21	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 22	O:21 +	Não identificada
Sal 23	-----	Não identificada
Sal 24	-----	Não identificada
Sal 25	-----	Não identificada
Sal 26	O:21 +	Não identificada
Sal 27	O:21 +	Não identificada
Sal 28	O:04 +	Não identificada
Sal 29	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 30	O:4 +	Não identificada
Sal 31	O:04 + / i + / 1,2 +	<i>Salmonella typHimurium</i>
Sal 32	O:4 +	Não identificada
Sal 33	O:4 +	Não identificada
Sal 34	O:4 +	Não identificada
Sal 35	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 36	O:21 +	Não identificada
Sal 37	O:21 +	Não identificada
Sal 38	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>

Sal 39	O:21 +	<i>Não identificada</i>
Sal 40	O:21 + / b + / e,n,x -	<i>Não identificada</i>
Sal 41	O:21 +	<i>Não identificada</i>
Sal 42	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 43	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 44	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 45	O:04 +	<i>Não identificada</i>
Sal 46	O:04 +	<i>Não identificada</i>
Sal 47	O:04 + / i + / 1,2 +	<i>Salmonella typHimurium</i>
Sal 48	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 49	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 50	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 51	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 52	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 53	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 54	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 55	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 56	O:21 + / b + / e,n,x +	<i>Salmonella minnesota</i>
Sal 57	-----	<i>Não identificada</i>
Sal 58	-----	<i>Não identificada</i>
Sal 59	O:04 + / i + / 1,2 +	<i>Salmonella typHimurium</i>
Sal 60	O:04 + / r + / 1,2 +	<i>Salmonella heidelberg</i>
Sal 61	-----	<i>Não identificada</i>
Sal 62	O:04 +	<i>Não identificada</i>
Sal 63	O:21 + / b -	<i>Não identificada</i>
Sal 64	O:21 + / b + / e,n,x -	<i>Não identificada</i>
Sal 65	O:04 + / r + / 1,2 +	<i>Salmonella heidelberg</i>
Sal 66	-----	<i>Não identificada</i>
Sal 67	O:21 + / b - / e,n,x -	<i>Não identificada</i>
Sal 68	O:04 + / i + / 1,2 +	<i>Salmonella typHimurium</i>
Sal 69	O:09 +	<i>Não identificada</i>
Sal 70	O:04 +	<i>Não identificada</i>
Sal 71	O:04 +	<i>Não identificada</i>
Sal 72	-----	<i>Não identificada</i>
Sal 73	-----	<i>Não identificada</i>
O:21 - Antígeno somático para <i>Salmonella minnesota</i> O:04 - Antígeno somático para <i>Salmonella</i> sp do grupo B H:b - Antígeno flagelar para <i>Salmonella minnesota</i> H:i - Antígeno flagelar H:1,2 - Antígeno flagelar H:r - Antígeno flagelar H:e,n,x - Antígeno flagelar Aglutinação positiva (+) Sem aglutinação (-)		