

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS EM  
DIFERENTES MATERIAIS PARA EQUIPAMENTOS DE  
ORDENHA EM FAZENDA LEITEIRA**

Laura Gonçalves da Silva Chagas

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS EM  
DIFERENTES MATERIAIS PARA EQUIPAMENTOS DE  
ORDENHA EM FAZENDA LEITEIRA**

Laura Gonçalves da Silva Chagas

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Monteiro Correia Lima  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Poliana de Castro Melo**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Área de Clínica Médica e Investigação Etiológica).

Junho - 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- C433f Chagas, Laura Gonçalves da Silva,  
2015 Formação de biofilmes microbianos em diferentes materiais para  
equipamentos de ordenha em fazenda leiteira / Laura Gonçalves da Silva  
Chagas. - 2015.  
62 f. : il.
- Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.  
Coorientadora: Poliana de Castro Melo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Bovino de leite - Ordenha - Teses. 3. Ordenha - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II. Melo, Poliana de Castro. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

LAURA GONÇALVES DA SILVA CHAGAS, nascida em 08 de julho de 1988, na cidade de Uberlândia-MG, é Médica Veterinária graduada, no ano de 2011, pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Realizou 3 iniciações científicas durante a graduação, entre 2008 e 2011, e todas foram publicadas em revistas. Os títulos foram: Origem e Distribuição do Nervo Retal caudal em Suínos (*Sus scrofa domesticus*, Linnaeus, 1758) da Linhagem Pen Ar Lan; Origem e Distribuição do Nervo Mediano em Suínos (*Sus scrofa domesticus* Linnaeus, 1758) da Linhagem Pen Ar Lan; e Avaliação da ocorrência de Mastite Subclínica Bovina e Perfil de Resistência de *Staphylococcus* sp *Streptococcus* sp e *Candida* sp em uma Propriedade Rural no Município de Indianópolis – MG. Iniciou o Mestrado em Ciências Veterinárias, na área de Clínica Médica e Investigação de Agentes Etiológicos na Faculdade de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia em 2013, e foi bolsista por um ano pela CAPES. Finalizou a especialização em Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais no Qualittas. Proprietária da Clínica Veterinária AMA – Assistência Médica Animal.

*“Mas os que esperam no SENHOR renovarão as forças,  
subirão com asas como águias; correrão, e não se  
cansarão; caminharão, e não se fatigarão.”*

Isaías 40:31

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico essa dissertação aos meus exemplos de vida e base forte da minha caminhada, meus pais, Rondino e Vânia, que sempre me estimularam a dar esse grande passo. E ao meu marido que esteve comigo durante toda a caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor e pela força nos momentos mais difíceis que passei, pois como está escrito em Romanos 5:3-5 "... mas também nos gloriamos nas próprias tribulações, sabendo que a tribulação produz perseverança; e a perseverança, experiência; e a experiência, a esperança.", foi uma das passagens da bíblia que me sustentou nesta fase da minha vida. A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor.

A minha família, por todo o amor, dedicação, educação, apoio e paciência que tem comigo, obrigada por sempre me incentivarem a realizar o mestrado e me ensinarem a nunca deixar de sonhar.

Ao meu marido, que várias vezes escutou minhas queixas e foi paciente comigo. Meu agradecimento pelas horas que ficou ao meu lado não deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo.

A minha orientadora Anna, por ter aceito meu convite de me orientar na elaboração deste trabalho, sempre com alto astral. Mesmo desempenhando muitas atividades, sempre me atendeu e ajudou. A minha co-orientadora Poliana, que contribuiu com meu crescimento; ainda que com sua ausência física, ela esteve presente, por outros meios, durante todo o trabalho. Elas foram exemplos de pessoas persistentes, que não têm obstáculo grande demais para não ser ultrapassado.

A equipe do Laboratório, que em todas as vezes que precisei de auxílio me ajudaram.

A UFU que me deu todo o apoio estrutural para a realização deste projeto. A FAPEMIG pelo auxílio financeiro e a CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta neste estudo. Obrigada.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .</b>	<b>12</b>
<b>SUMMARY .</b>	<b>14</b>
<b>CAPITULO I .</b>	<b>15</b>
1.1 Definição de biofilme .....	16
1.2 Adesão microbiana .....	17
1.3 <i>Quorum sensing</i> .....	18
1.4 Locais que ocorrem a formação de biofilme .....	18
1.5 Micro-organismos produtores de biofilmes na mastite bovina .....	19
1.6 Nanopartículas .....	20
REFERÊNCIAS .....	21
<b>CAPITULO II .</b>	<b>27</b>
Resumo .....	27
Abstract .....	28
Introdução .....	30
Material e Métodos .....	31
Resultados e Discussão .....	33
Conclusões .....	38
Agradecimentos .....	38
Referências Bibliográficas .....	39
<b>CAPITULO III .</b>	<b>42</b>
RESUMO .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	45
Seleção de Cepas .....	45
Preparação do Material .....	45
Avaliação da Formação de Biofilme nos Revestimentos .....	45

<i>Extração de Substâncias Extracelulares da Matriz e Quantificação de Proteínas Extracelulares e Polissacarídeos .....</i>	46
<i>Extração da Matriz por Sonicação .....</i>	47
<i>Quantificação das Proteínas da Matriz (Kit BCA) .....</i>	47
<i>Quantificação dos Polissacarídeos – Método do Ácido Fenol Sulfúrico .....</i>	47
<i>Microscopia Confocal a Laser (CLSM) .....</i>	48
<i>Análise Estatística .....</i>	48
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	48
<b>CONCLUSÃO .....</b>	53
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	53
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	53
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	62

## **Lista de tabelas**

### **CAPÍTULO II**

Tabela 1. Frequência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* em amostras de leite de vacas com mastite e de tanque de expansão, e de suabes de teteiras, em uma propriedade leiteira no município de Uberlândia, Minas Gerais..... 34

Tabela 2. Frequência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, e avaliação de formação de biofilme nas amostras de leite colhidas de vacas leiteiras com mastite e amostras das teteiras e do tanque de expansão, em uma propriedade leiteira no município de Uberlândia, Minas Gerais..... 35

### **CAPÍTULO III**

Tabela 1. Contagem das unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* nas diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , dos biofilmes aderidos nos revestimento compostos por polipropileno virgem, polipropileno e zeolita 3%, polipropileno e zeolita 6% e polipropileno, vidro e prata..... 59

Tabela 2. Contagem das unidades formadoras de colônias nas diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , dos biofilmes aderidos nos revestimento compostos por polipropileno virgem, polipropileno e zeolita 3%, polipropileno e zeolita 6% e polipropileno, vidro e prata ..... 59

## **Lista de Figuras**

### **CAPITULO I**

Figura 1. Composição bioquímica da matriz extracelular de oito amostras de *Staphylococcus aureus* (1 a 8), um *Staphylococcus epidermidis* (9), e 11 *Escherichia coli* (10 a 20), pelos métodos com kit BCA e do ácido fenol sulfúrico..... 37

### **CAPITULO II**

Figura 1. Esquema demonstrativo da avaliação da formação de biofilme em quatro revestimentos para aço inox..... 58

Figura 2. Extração de substâncias extracelulares da matriz e quantificação de proteínas extracelulares e polissacarídeos de 2 amostras (2 e 8) de *Staphylococcus aureus*, 2 amostras (4 e 7) de *Escherichia coli*, e 1 amostra (1) de *Staphylococcus epidermidis*, cultivadas por 24 horas no TSB com materiais de revestimento com polipropileno virgem (V), com polipropileno e zeolita 3% (Z3%), com polipropileno e zeolita 6% (Z6%) e com polipropileno, vidro e prata (Ag)..... 60

Figura 3. Microscopia confocal a laser (Zeiss 710) de *Staphylococcus epidermidis* (amostra 1) no material virgem (1), com zeolita 3% (2), com zeolita 6% (3) e com polipropileno, vidro e prata (4), imagens em stracks, todas as bactérias (A), bactérias vivas (B) e bactérias mortas (C) no aumento de 40x..... 60

## FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS EM DIFERENTES MATERIAIS PARA EQUIPAMENTOS DE ORDENHA EM FAZENDA LEITEIRA

**RESUMO** - A presença de biofilme microbiano aderido em equipamentos de ordenha, formado por limpezas inadequadas, constituem uma constante fonte de contaminação para os animais ordenhados e do leite que vai para a indústria, comprometendo tanto a saúde do animal quanto a qualidade do leite produzido. O objetivo deste estudo foi identificar cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Escherichia coli* produtoras de biofilme em amostras de leite de vacas com mastite, amostras de leite do tanque de expansão e suabes do conjunto de teteiras para ordenhadeira, e avaliar a formação de biofilme em quatro revestimentos para aço inox diferentes, composto por polipropileno, polipropileno com zeolita a 3%, polipropileno com zeolita a 6% e polipropileno com vidro e prata. Para caracterização fenotípica das cepas foram utilizados os testes com ágar vermelho congo (CRA), teste de microplacas com o corante cristal violeta, contagem de unidades formadoras de colônias das células em biofilme, extração da matriz por sonicação, quantificação de proteínas extracelulares e polissacarídeos, confirmados por análise de imagens geradas pela microscopia confocal a laser. Das 294 amostras analisadas foram identificadas oito cepas de *Staphylococcus aureus*, três *Staphylococcus epidermidis* e 22 *Escherichia coli*, dessas oito, uma e 11 foram produtoras de biofilme, respectivamente. A *Escherichia coli* foi a bactéria que mais formou biofilme em todos os materiais, e o revestimento para aço inox composto por polipropileno com zeolita a 6% teve uma maior adesão de biofilme microbiano quando comparado ao polipropileno com prata e vidro ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). O material composto por prata, vidro e polipropileno teve aderência de biofilmes microbianos, porém em menor concentração que os outros materiais testados, representando-se desta forma como alternativa para revestir superfícies de utensílios e equipamentos relacionados a ordenha.

**Palavras-chave:** Adesão microbiana, bovino leiteiro, nanopartículas

## BIOFILMS MICROBIAL FORMATION IN DIFFERENT MATERIALS FOR MILKING EQUIPMENT IN DAIRY FARM

**SUMMARY** - The presence of microbial biofilm attached milking equipment, formed by inadequate cleaning, are a constant source of contamination of the milking animals and which goes to the milk industry, compromising both the animal health and the quality of the milk produced. The objective of this study was to identify strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* producing biofilm in cows with mastitis milk samples, milk samples from the expansion tank and swabs of the set of liners for milking, and evaluate training biofilm coatings on four different stainless steel, comprising polypropylene, polypropylene with zeolite to 3% polypropylene with 6% zeolite and polypropylene with glass and silver. For phenotypic characterization of the strains were used for tests with congo red agar (CRA) microplate assay with crystal violet dye, counting colony forming units of biofilm cells, extracting the matrix by sonication, quantification of extracellular proteins and polysaccharides, confirmed by analysis of images generated by laser confocal microscopy. Of the 294 samples analyzed were identified eight strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and 22 three *Escherichia coli*, those eight, 1:11 were producing biofilm, respectively. *Escherichia coli* bacteria that has been formed over biofilm in all materials, and for coating stainless steel comprising polypropylene with 6% zeolite had a higher bond biofilm when compared to polypropylene and glass with silver ( $p < 0,05$ ). The material consists of silver, glass and polypropylene had microbial biofilms of grip, but at a lower concentration than the other materials tested, representing themselves in this way as an alternative to coat surfaces of utensils and equipment related to milking.

**Keywords:** Microbial adhesion, dairy cattle, nanoparticle

## CAPITULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

No ambiente, a bactéria é encontrada na forma planctônica (flutuante) para proliferação ou séssil (imóvel) para sua persistência. O biofilme é constituído por micro-organismos sésseis que produzem matriz com polímero orgânico e hidratado. Tem a finalidade de se defenderem das intempéries do ambiente externo (variação de pH, temperatura, nutrientes, ação de agentes químicos e físicos), de respostas inatas e adquiridas e da ação de antimicrobianos dentro do organismo (CLUTTERBUCK et al., 2007).

Toda a estrutura do biofilme é sustentada por pilares cilíndricos, com formato de cogumelo, que permitem o máximo de absorção de nutrientes do ambiente e o mínimo de desperdício. A formação do biofilme se inicia com poucas bactérias, para sua rápida proteção, com o objetivo de ser mais patogênica e ter maior *Quorum sensing*, pois quanto mais bactérias, maior a chance de eliminá-las e não formar o biofilme (CLUTTERBUCK et al., 2007).

A formação de biofilme em diversos tipos de equipamentos médicos e alimentícios leva a população a uma crescente situação de perigo sanitário, um vez que pode provocar doenças crônicas, tornando os tratamentos com antimicrobianos usualmente utilizados ineficazes. Para as indústrias a formação de biofilme gera elevados gastos e prejuízos, pois sua presença determina o descarte do material contaminado. Sendo assim, é fundamental o estabelecimento de novas estratégias para eliminar os agentes formadores de biofilme.

Criar uma superfície antimicrobiana que iniba a adesão de biofilmes é um objetivo muito desejado (GIBELLI, 2012). A inserção de nanopartículas em um revestimento possuem características bactericidas, mas ainda são pouco conhecidas. Essas partículas atuam pela interrupção das transferências transmembrana, perturbação da membrana ou parede celular, presença de componente celular oxidante ou por produzir catabólitos tóxicos a espécies reativas ao oxigênio (ROS) (LI; TIAN, 2008).

Em uma revisão feita por Seil e Webster (2012), foram investigadas as propriedades antibacterianas das nanopartículas de metais, tais como o zinco, prata e cobre, óxido de zinco, óxido de alumínio, óxido de ferro, dióxido de silício e dióxido de titânio. A utilização dessas nanopartículas para revestimento de materiais susceptíveis a formação de biofilme foram muito eficazes, já que houve uma redução da aderência das bactérias no material. O diâmetro da partícula, carga da sua superfície e forma, foram parâmetros relevantes que determinaram a eficácia de cada nanopartícula.

Sendo assim, caracteriza-se a importância de estudos envolvendo materiais com nanopartículas de prata no sentido de melhorar a qualidade do leite que entra em contato com tais materiais e verificar se nestes materiais haverá ou não a formação de biofilmes.

### **1.1 Definição de biofilme**

É um conjunto de células sésseis, ligadas entre si, e aderidas a algum substrato ou superfície abiótica, que iniciam a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), com a função de proteger das adversidades do ambiente em que está. Assim, podem exibir um fenótipo diferente do expresso pelas células planctônicas, com relação a taxa de crescimento e transcrição de genes que derivam a resistência do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A capacidade de formar biofilme não é expressa por todas as bactérias, portanto, não é possível generalizar que todos os ambientes tenham adesão microbiana. Então, é importante conhecer sobre presença de micro-organismos formadores de biofilme em ambientes e animais doentes, pois a exibição desse fenótipo é uma forma de resistência e transmissão de doenças.

## 1.2 Adesão microbiana

A arquitetura inicial do biofilme se inicia com a formação de microcolônias, pela acumulação simultânea e crescimento das células planctônicas, associada à produção da EPS. A maturação para formar uma estrutura organizada pode ser plana ou em forma de cogumelo, dependendo da fonte de nutriente, e crescem da forma séssil com microcolônias heterogêneas, fechado e complexo. A dispersão é a última etapa do ciclo, em que a célula séssil pode retornar na forma planctônica, por influência externa como aumentos de cisalhamento de fluido, degradação enzimática endógena, liberação da EPS ou de proteína de ligação, falta de nutrientes, permitindo a formação de novos biofilmes (SREY; JAHID; HÁ, 2013).

Outro fator importante para a formação de biofilme além da EPS produzida pelas bactérias é a produção de substâncias contendo adesinas, que são proteínas que se ligam a fibronectina, colágeno e fibrinogênio, como ocorre com os estafilococos. Isso facilita a adesão em células e superfícies inertes. Também pode ser chamado de slime, um glicocálix que induz baixa resposta imune, é termolábil e protege contra danos mecânicos (AGUILAR; AMORENA; ITURRALDE, 2001; KRUKOWSKI; SZYMANKIEWICZ; LISOWSKI, 2008).

A produção de slime pelas bactérias facilita a aderência no epitélio das glândulas mamárias e protege estas células dos mecanismos de defesas do hospedeiro (MELCHIOR; FINK-GREMMELS; GAASTRA, 2006). Existem alguns mecanismos que selecionam os micro-organismos produtores de biofilme na glândula como, variações genéticas, taxas de mutação, seleção natural (TYERMAN et al., 2013), utilização de concentrações de antibióticos em dose sub-inibitória e utilização inadequada de desinfetantes (GILBERT; ALLISON; MACBAIN, 2002; GILBERT; MCBAIN; RICKARD, 2003), levando a persistência da mastite crônica nas vacas e presença de infecções recorrentes (MELCHIOR; FINK-GREMMELS; GAASTRA, 2006).

### 1.3 *Quorum sensing*

Dentro do biofilme existe uma comunicação entre as células, podendo ser competitiva ou cooperativa, chamada *Quorum sensing*, que determina a formação do biofilme em equilíbrio. Para sua formação, ocorre uma cooperação metabólica de nutrientes, manutenção da biodiversidade, homeostase dos micro-organismos e controle da virulência (LI; TIAN, 2012).

Miller e Bassler (2001) relataram que essa comunicação é realizada por moléculas difusíveis chamadas de autoindutores, que tem sinal de sensor ou ativador de transcrição para iniciar a expressão do gene que coordena as atividades, como controle de densidade populacional. As bactérias Gram-negativas usam o sistema *Quorum sensing* por moléculas de N-acil Homoserina Lactonas (AHLs), enquanto que as Gram-positivas utilizam moléculas com oligopeptídios (FUQUA; GREENBERG, 2002).

### 1.4 Locais que ocorrem a formação de biofilme

Cos et al. (2010) e Tran e Webster (2013) fizeram uma revisão dos principais locais que aparecem o biofilme e sua ocorrência em doenças. Esses filmes são muito comuns e aparecem na água de tratamento e distribuição de instalações, fábricas de papel, torres de resfriamento e tubulações industriais. Tal questão leva a perda de eficiência, danos ao equipamento, falha técnica e a contaminação do produto, tornando-se uma grande preocupação no processamento de alimentos e plantas farmacêuticas. As comunidades aderentes são capazes de colonizar dispositivos médicos implantados, tais como válvulas cardíacas artificiais, cateter venoso central e sondas urinárias, lentes de contato, tubo de ouvido, tubo endotraqueal, marca-passos, próteses ortopédicas, penianas, equipos e sistemas de diálise renal. Na medicina, os biofilmes estão relacionados a infecções bacterianas como fibrose cística, endocardite de válvula nativa, otite média crônica, prostatite, periodontite e infecções de feridas.

Em embarcações marítimas ocorrem a formação de incrustações por microflora,

macroflora mole e rígida, causada pelas forças de arrasto de fricção, sendo mais frequente em regiões tropicais e subtropicais (MARÉCHAL; HELLIO, 2009). São utilizados alguns compostos biocidas, como tributilteno e tributilestanho, para inibir sua formação. Segundo Turner, Singha e Richardsa (2009) observaram uma alta toxicidade para os organismos aquáticos, persistência no meio ambiente e resistência dos micro-organismos a esses compostos.

### **1.5 Micro-organismos produtores de biofilmes na mastite bovina**

Diversas espécies bacterianas são consideradas importantes causadoras da mastite subclínica e clínica. Dentre elas, incluem *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativa (ECN), *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* (LANGONI et al., 2011).

Tremblay et al. (2013) testaram a capacidade de formar biofilme, composição da matriz e os genes responsáveis pela resistência dessa matriz em 255 isolados de ECN. Entre os genes, foram notados o *icaA*, *bap*, *embP*, *atlE*, *fbe* e *aap* e suas combinações. Concluíram que o *Staphylococcus xylosus* e o *Staphylococcus haemolyticus* são os agentes com maior habilidade de formar biofilme.

Em um estudo realizado por Fernandes et al. (2011), em sete propriedades entre os municípios de Viçosa e Juiz de Fora, Minas Gerais, foram observados alguns fatores de resistência pelas *Escherichia coli* encontradas no leite de animais com mastite. Como a produção de verotoxinas, capacidade de produzir biofilme, resistência a antibióticos como sulfa com tripetropim, ampicilina e neomicina. Também foram identificados alguns antígenos somáticos e flagelares.

Szweda et al. (2012) analisaram 132 amostras de leite de vacas com mastite no Leste da Polônia. Fizeram uma classificação das amostras produtoras de biofilme conforme a absorbância do espectrofotômetro e testes genotípicos para identificar os genes *icaA*, *icaD*, *bap* e *spa*. Os testes fenotípicos revelaram que 76 (57,6%) das estirpes testadas foram produtoras de biofilme, e todas as amostras (132) abrigavam os

genes icaA e icaD.

## 1.6 Nanopartículas

A nanopartícula de prata possui efeito antimicrobiano, não-tóxico e seguro que pode ser utilizado como revestimento em equipamentos e utensílios (DOWLING et al., 2003). Ela tem o efeito de inibir o sistema enzimático da cadeia respiratória gerando oxigênio reativo e é capaz de alterar a síntese de DNA por reagir com enxofre e grupos de fósforo; por isso, sua grande utilização na cicatrização de feridas (McDONNELL; RUSSELL, 1999; BRETT, 2006). Em concentração de 10 ng/mL após cerca de 7 minutos, em média, são capazes de matar os isolados de *Staphylococcus aureus* de vacas com mastite subclínica (DEHKORDI; HOSSEINPOUR; KAHRIZANGI, 2011).

Casagrande et al. (2010) avaliaram se nanopartículas de prata, ouro, cobre e níquel em materiais odontológicos, impediam o crescimento do *Streptococcus mutans*, que é o principal agente etiológico causador da cárie dentária. Os autores observaram resistência ao cobre e ouro, enquanto a prata e, principalmente, o níquel houve sensibilidade *in vitro*.

Alt et al. (2004) adicionaram nanopartículas de prata de 5-50 nm, no cimento ósseo. Os autores verificaram sua eficácia quanto à inibição da formação de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, na concentração de 1,0%. Em relação a citotoxicidade, avaliadas pela liberação de lactato-desidrogenase, número de células vitais e teor de proteínas dos fibroblastos de ratos, não houve diferenças substanciais comparado ao grupo controle.

Alguns autores verificaram propriedades antimicrobianas (WANG; WEBSTER, 2013; TRAN; WEBSTER, 2013), anticancerígena (RAYMAN, 2005) e probiótica (YANG et al., 2009) das nanopartículas de selênio. Wang e Webster (2013) testaram nanopartículas de selênio em papel toalha, que reduziu em 88% a adesão de bactérias, para utilizar em indústrias de embalagens de alimentos, remédios e ambientes clínicos.

Um revestimento eficaz contra a formação de incrustação e biofilme deve ter as

seguintes propriedades: controle por cinco anos de incrustação, ser resistente, exigir baixa manutenção, ser liso, não-tóxico para as espécies alvo, de fácil manuseio e de baixo custo (RALSTON; SWAIN, 2009; MARÉCHAL; HELLIO, 2009). A utilização de uma superfície com microtextura formada de nanopartículas é o ideal para impedir a adesão dos menores aos maiores micro-organismos, mas, pelo custo alto e ser impraticável em grandes embarcações marítimas, fica inviável (CALLOW; CALLOW, 2009).

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 183-191, jan. 2001.
- ALT, V.; BECHERT, T.; STEINRUCKE, P.; WAGENER, M.; SEIDEL, P.; DINGELDEIN, E.; DOMANN, E.; SCHNETTLER, R. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 18, p. 4383–4391, aug. 2004.
- BRETT, D. W. A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. **Ostomy Wound Manage**, King of Prussia, v. 53, n. 1, p. 34-41, jan. 2006.
- CALLOW, J. A.; CALLOW, M. E. Advances nanostructured surfaces for the control of marine biofouling: the AMBIO project. In: HELLIO, C.; YEBRA, D. M. Y. **Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies**. Cambridge: Woodshead Publishing, 2009. pp. 647–663.
- CASAGRANDE, J. J. C. **Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata, cobre, ouro e níquel contra *Streptococcus mutans***. 2010. 11f. Monografia (Graduação em

Fármacia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, 2010. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/00004E/00004EFD.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2013.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 1-17, mar. 2007.

COS, P.; TOTÉ, K.; HOREMANS, T.; MAES, L. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 16, n. 20, p. 2279-2295, jul. 2010.

DEHKORDI, S. H.; HOSSEINPOUR, F.; KAHRIZANGI, A. E. An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, n. 52, p. 10795-10797, sept. 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, apr. 2002.

DOWLING, D. P.; BETTS, A. J.; Pope, C.; McCONNELL, M. L.; ELOY, R.; ARNAUD, M. N. Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum. **Surface and Coatings Technology**, Lausanne, v. 163-164, n. 30, p. 637-640, jan. 2003.

FERNANDES, J. B. C.; ZANARDO, L. G.; GALVÃO, N. N.; CARVALHO, I. A.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes

and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 23, n. 6, p. 1146–1152, nov. 2011.

FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 3, n. 9, p. 685–695, sept. 2002.

GIBELLI, I. C. **Ação antibacteriana de nanopartículas de prata em Poli (ácido lático) – PLA e estudo da biodegradação**. 2012. 62f. Dissertação de mestrado (Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 2012.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MACBAIN, A. J. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 98-110, may 2002.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 245-248, jun. 2003.

LANGONI, H.; PENACHIO, D.S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; MARTINS, P. Y. F.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, dez. 2011.

LI, Y. H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, Basel, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, feb. 2012.

KRUKOWSKI, H.; SZYMANKIEWICZ, M.; LISOWSKI, A. Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 57, n. 3, p. 253-255, jul.-sept. 2008.

MARÉCHAL, J. P.; HELLIO, C. Challenges for the Development of New Non-Toxic Antifouling Solutions. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 11, p. 4623-4637, nov. 2009.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, jan. 1999.

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Berlin, v. 53, n. 7, p. 326–332, sept. 2006.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 165–199, oct. 2001.

RALSTON, E.; SWAIN, G. Bioinspiration—the solution for biofouling control? **Bioinspiration & Biomimetics**, Brisol, v. 4, n. 1, p. 1-9, mar. 2009.

RAYMAN, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 64, n. 4, p. 527–542, nov. 2005.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HÁ, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2 , p. 572-585, jun. 2013.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILEWSKI, S.; FRANKOWSKA, A.; JAKUBCZAK, A. Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 61, n. 1, p. 65–69, jan.-mar. 2012.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, n. 1, p. 2767-2781, jun. 2012.

TYERMAN, J. G.; PONCIANO, J. M.; JOYCE, P.; FORNEY, L. J.; HARMON, L. J. The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 13, n. 22, p. 1-7, jan. 2013.

TRAN, P. A.; WEBSTER, T. J. Understanding the wetting properties of nanostructured selenium coatings: the role of nanostructured surface roughness and air-pocket formation. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, n. 1, p. 2001-2009, may 2013.

TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D.; CHEVER, P.; HAINE, D.; MESSIER, S.; JACQUES, M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 96, n. 1, p. 234-246, jan. 2013.

TURNER, A.; SINGHA, N.; RICHARDSA, P. Bioaccessibility of metals in soils and dusts contaminated by marine antifouling paint particles. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, n. 15, p. 1526–1532, may 2009.

WANG, Q.; WEBSTER, T. J. Short communication: inhibiting biofilm formation on paper towels through the use of selenium nanoparticles coatings. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, n. 1, p. 407-411, jan. 2013.

YANG, J.; HUANG, K.; QIN, S.; WU, X.; ZHAO, Z.; CHEN, F. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 54, n. 2, p. 246–254, feb. 2009.

## CAPITULO II

### Normas conforme a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

#### Avaliação da formação de biofilme por cepas bacterianas isoladas de amostras de leite de vacas com mastite e equipamentos de ordenha

[*Evaluation of biofilm formation by bacterial strains isolated from cows milk samples with mastitis and milking equipment*]

L.G.S. Chagas<sup>1</sup>, P.C. Melo<sup>2</sup>, G.B. Ramos<sup>1</sup>, S.C. Brasão<sup>1</sup>, A.M.C. Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia – UFU – Uberlândia – MG

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC - Ilhéus – Bahia

#### RESUMO

A presença de bactérias formadoras de biofilme microbiano na glândula mamária de vacas leiteiras e aderidas aos equipamentos e utensílios do ambiente de ordenha, constitui uma das causas de resistência ao tratamento de mastite em vacas leiteiras. O estudo teve como finalidade identificar cepas produtoras de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Escherichia coli*, em amostras de leite de animais com mastite, tanque de expansão e teteiras do conjunto de ordenha, além do que, visou-se quantificar as proteínas extracelulares e polissacarídeos das estirpes. Foram colhidas 294 amostras no total, em uma propriedade no município de Uberlândia, Minas Gerais. As estirpes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* isoladas foram analisadas por métodos fenotípicos a característica de formação de biofilme, pelo ágar Vermelho Congo (CRA) e teste de adesão em microplaca. A quantificação de proteínas foi realizada com o Kit BCA e de polissacarídeos pelo método do ácido fenol sulfúrico. Identificou-se oito cepas de *S. aureus*, uma de *S. epidermidis* e 11 cepas de *E. coli* produtoras de biofilme, todas compostas com maior concentração de polissacarídeo do que proteína na matriz. A *E. coli* foi considerada a bactéria mais prevalente das amostras e o *S. aureus* a maior produtora de biofilme. Os resultados do CRA e do teste de adesão em microplaca foram similares ao identificar as cepas produtoras de biofilme, conforme a expressão do fenótipo e quantificação da matriz. A classificação de estirpes de *S. aureus*, como

maiores produtores de biofilme, preocupa ainda mais os produtores, pois tais são considerados um dos principais agentes etiológicos contagiosos causadores da mastite bovina. E a capacidade de *E. coli* e *S. epidermidis* produzirem biofilme torna indispensável a reavaliação das medidas profiláticas com o intuito de evitar a adesão de bactérias produtoras de biofilme.

*Palavras-chave:* *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, bovino leiteiro.

## ABSTRACT

The presence of biofilm forming bacteria in the mammary glands of dairy cows and adhered to equipment and utensils milking environment is one of the causes of resistance to treatment of mastitis in dairy cows. The study was intended to identify strains producing biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* in samples of milk from animals with mastitis, expansion tank and liners of the whole milking, besides, it aimed to quantify proteins and extracellular polysaccharides strains. 294 samples were taken in total, in the city of Uberlândia, on Minas Gerais estate. The strains of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli* isolated were analyzed by the methods phenotypic characteristic of biofilm formation by Congo Red Agar (CRA) and adhesion test microplate. The quantification of proteins was performed using the BCA kit and polysaccharides by the phenol sulfuric acid method. It was identified eight strains of *S. aureus*, *S. epidermidis*, and a 11th *E. coli* strains producing biofilm, all composite with higher concentrations of polysaccharide to protein in the matrix. *E. coli* was considered the most prevalent bacteria samples and *S. aureus* the largest producer of biofilm. The results of the CRA and the adhesion test microplate were similar to identify the strains producing biofilm as the expression of the phenotype and quantification matrix. The classification of strains of *S. aureus*, as the largest producers of biofilm even more concerned producers as such are considered a major cause contagious pathogens of bovine mastitis. And *E. coli* and *S. epidermidis* capacity produce biofilm makes it essential to re-evaluation of preventive measures in order to prevent the adhesion of bacteria producing biofilm.

*Keywords:* *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, dairy cattle.

## INTRODUÇÃO

A mastite bovina ameaça a renda dos pecuaristas, bem como a imagem do setor leiteiro, em virtude dos problemas relacionados ao bem-estar animal, à qualidade do leite e à saúde pública, na hipótese de haver a presença de resíduos no leite de agentes antimicrobianos e o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos. Embora possa ser ocasionada por inúmeros patógenos, bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. são reconhecidas como os agentes etiológicos mais isolados dos casos de mastite (De Vliegher *et al.*, 2012).

Uma das causas na falta de sucesso no tratamento da mastite por antimicrobianos é a capacidade de microrganismos produtores de biofilme aderirem a superfície do tecido mamário. Assim, a substância polimérica extracelular (EPS), presente na matriz do biofilme, estabiliza as colônias de qualquer tipo de estresse (Donlan, 2002; Melchior *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2012). Além disso, a distribuição de um agente antimicrobiano no tecido da mama pode ser bloqueada por alterações fisiopatológicas da glândula mamária, tais como isquemia e necrose, tornando-o incapaz de chegar ao local de ação ou avançar em concentrações sub-inibitória (Bengtsson *et al.*, 2009).

Stepanovic *et al.* (2000) afirmaram que o teste de aderência em placas é um dos métodos utilizados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos pelos *Staphylococcus* sp.. Além disso, pode ser usado como um indicador de patogenicidade dos microrganismos. As cepas que produzem slime no teste de microplaca sugerem uma potencial capacidade para aderirem no tecido glandular mamário. Logo, a presença desse mucopolissacarídeo dificulta o tratamento da mastite por antibióticos e a resposta imune inata do hospedeiro (Marques *et al.*, 2013).

É importante utilizar-se de métodos rápidos e fáceis para investigar a presença de bactérias produtoras de biofilme, para que medidas de controle e profilaxia sejam mais eficazes (Agnol *et al.*, 2013; Darwish e Asfour, 2013). A cultura em ágar vermelho congo (CRA) e o teste de adesão em microplaca servem para detectar a produção de

biofilme pela bactéria, um verifica a expressão do fenótipo pela coloração das colônias, e o outro a quantidade de matriz do biofilme, respectivamente. Os métodos de quantificação de proteínas extracelulares e polissacarídeos caracterizam a composição da matriz do biofilme por concentrações variadas de proteína e polissacarídeo, sendo um dos fatores responsáveis para avaliação da virulência de cada cepa.

Para a realização do presente estudo foram selecionadas cepas de *Staphylococcus aureus*, por serem consideradas bactérias contagiosas e estarem presentes em vários casos de mastite bovina, como agente etiológico principal e cepas de *Escherichia coli*, presentes no ambiente, cuja presença atua como indicador de contaminação ambiental. Como os estafilococos coagulase negativos vêm aumentando gradativamente como causador de mastite selecionou-se também cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

O objetivo do referido estudo foi identificar as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Escherichia coli* nas amostras de leite de vacas com mastite, do tanque de expansão e suabes do conjunto de teteiras para ordenhadeiras e verificar a formação de biofilme pelas cepas encontradas, além de quantificar as proteínas extracelulares e polissacarídeos das cepas produtoras de biofilme.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas amostras de leite de 80 vacas da raça Girolando, em uma propriedade rural produtora de leite no município de Uberlândia, estado de Minas Gerais, nos meses de fevereiro, abril e maio 2014. As amostras de leite dos animais reagentes ao CMT e dos que apresentarem sinais evidentes da presença de mastite clínica, foram colhidas de acordo com as normas de assepsia propostas por Harmon et al. (1990), totalizando 261 amostras.

Após cada ordenha foi colhida uma amostra de leite do tanque de expansão de acordo com o preconizado por Brito et al. (1998), totalizando três amostras. Para coleta de amostras de teteiras, foram friccionados suabes estéreis em movimentos circulares na porção final de cada teteira, em todos os conjuntos de ordenhadeiras e depois colocados em meio Stuart conforme recomendação de McDonald et al. (1993), totalizando 30 amostras.

Todas as amostras foram preservadas em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e levados ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

Para o isolamento e identificação das espécies de *Staphylococcus* sp., primeiramente, foram semeados dez microlitros das amostras de leite sobre a superfície do meio seletivo ágar Baird Parker (Himedia) (Silva *et al.*, 1997) a 37°C entre 24 e 48 horas. As colônias positivas para o teste da catalase e Gram positivos em forma de cocos foram submetidas à prova de coagulase em tubo, para a diferenciação dos estafilococos coagulase positiva (ECP) e estafilococos coagulase negativa (ECN).

*Staphylococcus aureus* foram identificados por produção de acetoína e fermentação da maltose e trealose (Koneman, 2001). *Staphylococcus epidermidis* foram testados em um esquema simplificado, segundo Koneman (2001), quanto à utilização da sacarose e trealose, crescimento em meio anaeróbico tioglicolato e resistência à polimixina B.

Para isolamento e identificação de *Escherichia coli* foram semeados dez microlitros das amostras de leite sobre a superfície do meio seletivo ágar Eosin Methylene Blue (EMB - Merck) à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , entre 18 e 24 horas, em ambiente de microaerofilia, em jarra de anaerobiose. As colônias que cresceram no ágar apresentaram morfologia de grande dimensão, cor pretas-azuladas, com reflexo verde metalizado. Após, utilizou-se o método de coloração do Gram, para confirmar as *Escherichia coli* que multiplicaram no meio. As colônias identificadas foram semeadas por picada em profundidade em um tubo contendo o meio inclinado Rugai (Newprov), seguido de incubação a 35°C entre 18 a 24 horas (Araújo, 2008).

A produção de biofilme foi determinada pelo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA) [0,8 g de corante vermelho congo (Vetec) e 50 g de sacarose (Himedia) para 1 Lt de Ágar Brain Heart Infusion (Himedia)] (Freeman *et al.*, 1989). Para tanto, as placas de Ágar Vermelho Congo foram inoculadas e incubadas a 37°C por 24 horas, seguido por uma incubação a temperatura ambiente por 48 horas. A produção de colônias rugosas e negras foram utilizadas para diferenciar de estirpes não produtoras de biofilmes, as quais apresentaram colônias lisas e vermelhas.

A capacidade de produção de biofilmes *in vitro* foi determinada de acordo com o método citado por Cucarella *et al.* (2001), com pequenas modificações descritas abaixo. As bactérias foram cultivadas individualmente, por uma noite, no Tryptic Soy Both (TSB) (Kasvi) a 37°C. Posteriormente, as células em suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo plano, diluídas em 1:200 em TSB, contendo 0,25% de glicose (Synth) e incubados por 24 horas a 37°C com agitação, com renovação do meio após 12 horas.

Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Solução Salina (NaCl à 0,85%) (Dinâmica) estéril e, logo após, incubadas em estufa com temperatura de 60°C e deixados até a secagem da placa, em torno de 30 minutos. Adicionou-se, então, 200µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e, após estarem secas, adicionou-se 200µL de ácido acético (Isofar) a 33%, para que fosse procedida a leitura a 570 nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go). Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Considerou-se bactérias produtoras de biofilmes as estirpes com absorbância maior que 0,1. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em triplicata, duas vezes (Mack *et al.*, 2001). A intensidade da produção de slime foi escalonada da seguinte maneira: forte ( $> 0,3$ ), moderada ( $> 0,2$  e  $< 0,3$ ) e fraca ( $> 0,1$  e  $< 0,2$ ) (Demo, 1996).

Para quantificação de proteínas extracelulares do biofilme, adicionou-se 25µL da amostra raspada em uma microplaca de 96 poços, acrescentou-se 200µL dos reagentes misturados do kit BCA (Sigma), homogeneizou-se por 30 segundos e incubou-se por 30 minutos, em temperatura ambiente. Foi utilizada a leitura de 562nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) e um tampão fosfato como branco (Azeredo *et al.*, 1999).

A determinação do conteúdo em polissacarídeos foi realizada segundo o método de Dubois *et al.* (1956). Adicionou-se 0,5 mL da amostra raspada em um tubo; 0,5 mL de fenol (50g/L - Dinâmica) e logo em seguida 2,5 mL de ácido sulfúrico (95-97% - Isofar). Homogeneizou-se a solução no vórtex e a colocou para reagir por 15 minutos em temperatura ambiente. Realizou-se a leitura na leitura de 490nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) e utilizou-se um tampão fosfato com branco.

Este projeto foi aceito pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com protocolo 076/14.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo Programa *Action*, o Teste binomial para duas proporções, com o nível de significância de 5% (Triola, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 294 amostras analisadas, foram identificadas 85 amostras (28,91%) de *Staphylococcus* sp., sendo 11 (12,94%) coagulase positivo e 74 (87,06%) coagulase negativo. Das amostras de estafilococos coagulase positiva, oito (72,72%) foram *Staphylococcus aureus* e três (27,27%) *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*. Já dos estafilococos coagulase negativo, três (4,05%) foram *Staphylococcus epidermidis*, 17 (22,97%) *Staphylococcus simulans* e 54 (72,98%) outras espécies de ECN. Não foram identificadas nenhuma amostra de *Staphylococcus* sp. do tanque de expansão e suabes de teteiras.

Marques *et al.* (2013) avaliaram 272 amostras de leite de vacas provenientes de oito propriedades situadas no Rio de Janeiro. Das amostras isoladas, 250 (91,91%) foram positivas do teste CMT, sendo que 145 amostras (58,00%) foram classificadas como estafilococos coagulase negativo, enquanto que dentre as 105 amostras (42,00%) de estafilococos coagulase positivo, 38 amostras (36,20%) foram de *S. aureus*, esses resultados foram semelhantes aos encontrados na presente pesquisa.

Nesse estudo, foram isoladas 22 amostras de *Escherichia coli*, sendo 17 amostras provenientes de leite de vacas com mastite e cinco amostras de suabes de teteiras. Cinco amostras de leite e sete amostras de suabes de teteiras foram produtoras de biofilme. Não houve o isolamento de nenhuma amostra de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* nas teteiras e leite do tanque de expansão, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* em amostras de leite de vacas com mastite e de tanque de expansão, e de suabes de teteiras, em uma propriedade leiteira no município de Uberlândia, Minas Gerais.

Amostras	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Leite de vacas com mastite	8	100,00	3	100,00	17	77,27	28	84,84
Leite do tanque de expansão	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Suabe de teteiras	0	0,00	0	0,00	5	22,73	5	15,16
Total	8	100,00	3	100,00	22	100,00	33	100,00

Martins *et al.* (2010) examinaram 432 amostras de leite, sendo que 304 delas foram positivas ao teste CMT. Pela análise microbiológica, verificou-se que 80 (26,31%) eram de *Corynebacterium* spp., 71 (23,35%) de *Staphylococcus aureus*, 18 (5,90%) de *Staphylococcus intermedium*, 2 (0,65%) de ECN e 1 (0,32%) de *Escherichia coli*. Esses dados diferem do presente estudo, uma vez que observou-se a elevada prevalência de *Escherichia coli* (*p*-valor<0,05).

Latorre *et al.* (2010) isolaram biofilme de *Listeria monocytogenes* do piso ao redor do poço, da sala de armazenamento, da borracha do conjunto de ordenha e dos filtros da linha do leite. Enquanto que no presente estudo foram investigados no tanque de expansão e em teteiras, e de todas as bactérias pesquisadas, isolaram-se cinco amostras de *E. coli* das teteiras (Tabela 1). Sabe-se que poucos estudos sobre a presença de biofilme no ambiente de ordenha foram realizados, por isso o isolamento de cepas produtoras de biofilme nos equipamentos e ambiente de ordenha confirma a possibilidade de contaminação do leite cru, trazendo riscos a saúde humana e do animal.

A presença de *E. coli* produtora de biofilme na propriedade representa indício de falta de higiene com os animais e equipamentos, o que facilita a infecção por essas cepas. Contudo, ressalta-se que, nessa fazenda, é o primeiro relato da presença de bactérias produtoras de biofilme, servindo para que os produtores e veterinários fiquem atentos quanto à presença dessa forma de resistência da bactéria e aos métodos de limpeza e desinfecção das superfícies, como medidas profiláticas, sendo que, uma vez formado o biofilme em superfícies, dificilmente a bactéria é destruída.

Foram identificadas 20 estirpes produtoras de biofilme sendo, oito (40,00%) *Staphylococcus aureus*, um (5,00%) *Staphylococcus epidermidis* e 11 (55,00%) *Escherichia coli*, uma vez que foram positivas nos testes do ágar vermelho congo e no teste de aderência. Todas as estirpes foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, já que tiveram a intensidade da produção do slime maior que 0,3 de absorbância (Tabela 2). *Staphylococcus aureus* foi a bactéria com maior produção de biofilme dentre todas as identificadas ( $p$ -valor<0,05).

Tabela 2. Frequência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, e avaliação de formação de biofilme nas amostras de leite colhidas de vacas leiteiras com mastite e amostras das teteiras e do tanque de expansão, em uma propriedade leiteira no município de Uberlândia, Minas Gerais, nos meses de fevereiro, abril e maio de 2014.

Microrganismo	N	%	Teste para biofilme		Presença de biofilme		Sim	Não		
			Vermelho Congo		Teste de microplaca com corante cristal violeta					
			N	%	N	%				
<i>S. aureus</i>	8	24,24	8	40,00	8	40,00	8	0		
<i>S. epidermidis</i>	3	9,10	1	5,00	1	5,00	1	2		
<i>E. coli</i>	22	66,66	11	55,00	11	55,00	11	11		
Total de amostras	33	100,00	20	100,00	20	100,00	20	13		

A presença de *S. aureus* formadora de biofilme pode ser considerada como uma das causas da dificuldade em tratar vacas com mastite. Sabe-se que a presença de biofilme na glândula dificulta o acesso do antibiótico em atingir os microrganismos e consequentemente destruí-los. A liberação de células planctônicas dos biofilmes aderidos na glândula mamária de uma vaca com mastite permite a contaminação de outras glândulas mamárias sadias pelas teteiras contaminadas, iniciando novamente o processo de formação de biofilme. Assim, torna-se imprescindível atenção aos procedimentos de limpeza e desinfecção dos utensílios que entram com os animais, como é caso de teteiras do conjunto de ordenhadeira.

Fabres-Klein *et al.* (2015) avaliaram que de 54 espécies de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite subclínica em fazendas no estado de Minas Gerais, dessas 47

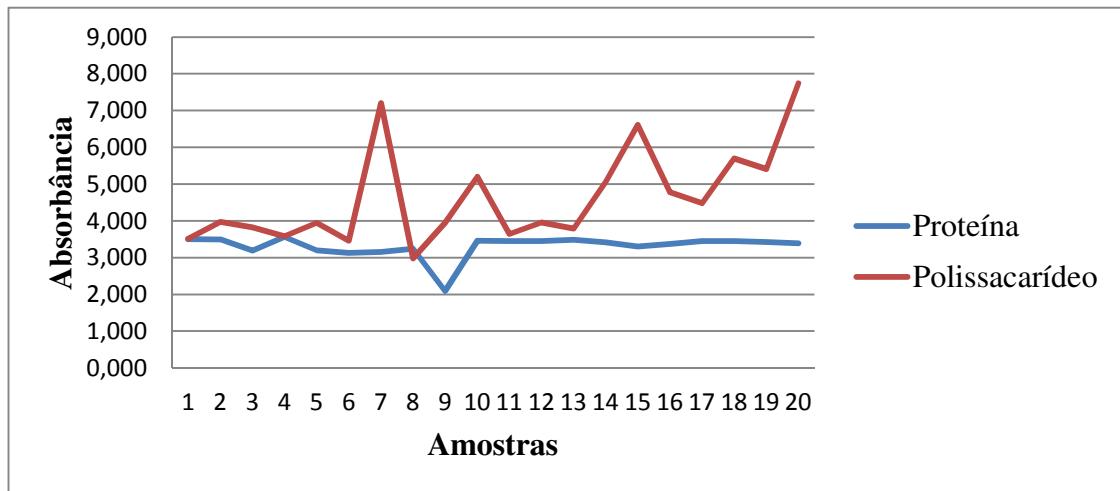
(87,03%) foram produtoras de biofilme no teste de aderência, mas somente 19 (35,18%) foram classificadas como produtoras de slime de acordo com o fenótipo das colônias no CRA. Melo *et al.* (2012) descreveram que de 94 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite oriundos de casos de mastite subclínica bovina de duas propriedades no estado de São Paulo, 93 (98,90%) estirpes se aderiram fortemente a microplaca de poliestireno. Esses resultados foram diferentes aos obtidos no presente estudo, em que todas as estirpes de *S. aureus* identificadas expressaram o fenótipo no teste CRA e produziram matriz no teste de microplacas com cristal violeta.

De 14 estripes de *Escherichia coli* isoladas pelo Departamento de Microbiologia de Gujarat, Índia, por Dadawala *et al.* (2010), 12 produziram colônias pretas no ágar vermelho congo. Porém, no teste de adesão somente 10 produziram slime com absorbância maior que 0,1. No entanto, nesse estudo dos 22 isolados de *E. coli*, 11 (50,00%) foram positivos no CRA e no teste de microplaca com corante cristal violeta.

Darwish e Asfour (2013) avaliaram 108 amostras de *Staphylococcus* sp., e isolaram 40 cepas de *S. aureus*, sendo que 27 (67,50%) produtoras de biofilme, dessas 21 (52,50%) foram classificadas como fortes, 11 (27,50%) moderadas e oito (20,00%) fracas produtoras de biofilme. Também detectaram 68 cepas de estafilococos coagulase negativa, sendo 49 (72,10%) produtoras de biofilme, desses isolados 30 (40,00%), 21 (30,90%) e 13 (19,20%) foram fortes, moderados e fracos respectivamente. Esses resultados diferiram do presente estudo, uma vez que todas as estirpes avaliadas foram classificadas como forte produtora de biofilme, apresentando elevada capacidade de aderência e com grande possibilidade de revestir aos danos externos.

A Figura 1 apresenta o resultado da análise quantitativa de proteína e polissacarídeo, e a biomassa pelo teste de aderência, em todas as amostras produtoras de biofilme do presente estudo. Observou-se que a EPS foi composta, principalmente, de polissacarídeos, porquanto a maioria das estirpes demonstraram absorbância maior que de proteínas. Tal quantificação é uma forma indireta de estimar a biomassa de depósito (Figura 1).

Figura 1. Composição bioquímica da matriz extracelular de oito amostras de *Staphylococcus aureus* (1 a 8), uma amostra de *Staphylococcus epidermidis* (9), e 11 de *Escherichia coli* (10 a 20), pelos métodos com kit BCA e do ácido fenol sulfúrico.



Melo *et al.* (2012) avaliaram que, pelo teste de aderência em microplaca, o cristal violeta cora a matriz de exopolissacarídeo produzida pela bactéria, sendo possível determinar se as estírpes são formadoras de biofilme. A presença da proteína na matriz extracelular é fundamental para a estrutura do biofilme. Por conseguinte, qualquer mutação ocorrida com o gene responsável pela produção da EPS prejudica a célula bacteriana, fazendo-a se comportar como produtora de biofilme (Branda *et al.*, 2006). Nesse estudo, observou-se que todas as bactérias possuem uma alta concentração de proteína e polissacarídeos.

Souza *et al.* (2009) utilizaram quatro cepas de *S. epidermidis* para determinar a extração e quantificação de proteína e polissacarídeo. Observaram que, conforme a quantidade detectada de biomassa no teste de microplaca, a quantidade de proteína e polissacarídeos foi proporcional, funcionando como um método indireto para determinação de biomassa. Do mesmo modo, verificaram que a quantidade de polissacarídeos foi maior que a de proteína em três cepas; entretanto, em uma cepa a diferença entre os compostos retomencionados não foi significativa. Isso confirma que a proteína também pode constituir uma importante parte da matriz do biofilme, como aconteceu em algumas cepas de *S. aureus* e *E. coli* deste estudo (Figura 1).

O método para extração da EPS pode influenciar no rendimento e composição química dos polímeros extracelulares e levar a diferentes graus de lise celular e, consequentemente, contaminação de exopolímeros com componentes intracelulares (Bura *et al.*, 1998). Igualmente, a quantidade de polímeros pode variar significativamente segundo a estirpe (Chaignon *et al.*, 2007). A matriz do biofilme atua como uma barreira de penetração de antibióticos e sanitizantes, sendo que a presença de altas concentrações das proteínas e polissacarídeos atuam como defesa aos agentes externos (Souza *et al.*, 2009).

Nesse estudo foram utilizadas técnicas rápidas e que causassem o mínimo de lise possível na célula bacteriana. Verificou-se que o *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* tiveram uma concentração de polissacarídeos variável conforme a bactéria, enquanto que a proteína se manteve-se praticamente constante entre as cepas. Assim, constatou-se que a composição da matriz do biofilme varia segundo a estirpe. Cada um desses compostos atua de maneira diferente na formação e patogenicidade do biofilme de cada cepa.

Desse modo, há necessidade de definir estratégias de caráter profilático, como implementação de um plano de limpeza eficaz e a utilização de um processo de desinfecção frequente, para prevenir a formação de biofilmes, com a finalidade de se obter um produto com qualidade e segurança.

## CONCLUSÕES

Nesse estudo, observou-se que houve a presença de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* produtoras de biofilme em amostras de leite de vacas com mastite e suabes de teteiras, mas nenhuma foi identificada no tanque de expansão. Também, os métodos de CRA e o teste de microplaca com corante cristal violeta foram testes de diagnóstico eficazes e rápidos, que podem ser inseridos na rotina laboratorial e solicitação pelos veterinários. Os resultados apresentados sugerem que a produção de polímeros extracelulares desempenha um papel no biofilme da biomassa total.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiar este projeto, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal

de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, a equipe do laboratório pelo auxílio na execuçāodo experimento e a fazenda pelas coletas das amostras.

## REFERÊNCIAS

- AGNOL, A.M.D.; CAVALCANTE, M.B.; FRANÇA, C.A. et al. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC. *Semin., Ciênc. Agrár.*, v.34, p.311-322, 2013.
- ARAÚJO, V.J.A. *Qualidade do leite de cabra in natura processado em mini-usinas do médio sertão e cariri paraibano – Estudo comparativo.* 2008. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campo Grande, Patos.
- AZEREDO, J.A.; LAZAROVA, V.; OLIVEIRA, R. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Water Sci Technol.*, v.39, p.243-250, 1999.
- BENGSSON, B.; UNNERSTAD, H.E.; EKMAN, T. et al. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol.*, v.136, p.142-149, 2009.
- BRANDA, S.S.; CHU, F.; KEARNS, D.B. et al. A major rotein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol.*, v.59, p.1229–1238, 2006.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.*, v.18, p.38-44, 1998.
- BURA, R.; CHEUNG, M.; LIAO, B. et al. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Sci Technol.*, v.37, p.325–333, 1998.
- CHAIGNON, P.; SADOVSKAYA, I.; RAGUNAH, C.H. et al. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v.75, p.125–132, 2007.
- CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; UBEDA, C. et al. Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.*, v.72, p.2177-2185, 2004.

- DADAWALA, A.I.; CHAUHAN, H.C.; CHANDEL, B.S. et al. Assessment of *Escherichia coli* isolates for in vitro biofilm production. *Veterinary World*, v.3, p.364-366, 2010.
- DARWISH, S.F.; ASFOUR, H.A.E. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *ScientificWorldJournal*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>>. Acessado em: 04 jun. 2015.
- DEMO, M. *Caracterizacion y estudios de patogenicidad de cepas de la genero Staphylococcus asiladas de leches mastiticas*, 1996. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Argentina.
- DE VLIEGHER, S.; FOX, L.K.; PIEPERS, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.*, v.95, p.1025-1040, 2012.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.*, v.8, p.881-890, 2002.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.*, v.28, p.350-356, 1956.
- FABRES-KLEIN, M.H.; SANTOS, M.J.C.; KLEIN, R.C. et al. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*, v.11, p.1-8, 2015.
- FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.*, v.42, p.872-874, 1989.
- HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER, D.E. et al. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington: National Mastitis Council. 1990. 34p.
- LATORRE, A.A.; VAN KESSEL, J.S.; KARNS, J.S. et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci.*, v.93, p.2792-2802, 2010.

- KONEMAN, E.W. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 2001. p.562, 614-623, 1066, 1311-1312, 1334-1335.
- MCDONALD, J.S; KINSEL, M.L.; ADAMS, D.S. et al. Studying the effects of backflushing milking units. *Vet. Med*, v.88, p.382-386, 1993.
- MACK, D.; SABOTTKE, A.; DOBINSKY, S. et al. Effects of the interactions between glutaraldehyde and the polymeric matrix on the efficacy of the biocide against *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, v.17, p.93-101, 2001.
- MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E.C.L. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.*, v.33, p.161-170, 2013.
- MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.11, p.181-187, 2010.
- MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastites infections? *Vet J.*, v.171, p.398-407, 2006.
- MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A. et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite subclínica bovina. *Biosci. J.*, v. 28, p.94-99, 2012.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.
- SOUZA, C.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. The role of extracellular polymers on *Staphylococcus epidermidis* biofilm biomass and metabolic activity. *J Basic Microbiol.*, v.49, p.363–370, 2009.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.*, v.40, p.175-179, 2000.
- TRIOLA, M.F. Introdução à Estatística. 7. ed. LTC: Rio de Janeiro, 1999. 410 p.

## CAPÍTULO III

### Normas de acordo com a revista *Journal of Dairy Science*

#### **Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* em revestimentos para aço inox compostos por polipropileno com zeolita e polipropileno com vidro e prata**

### RESUMO

A presença de biofilme microbiano aderido em equipamentos de ordenha, formado por limpezas inadequadas, constituem uma constante fonte de contaminação para os animais ordenhados e para o leite que vai para a indústria, comprometendo tanto a saúde do animal quanto a qualidade do leite produzido. O objetivo desse estudo foi avaliar a formação de biofilme em quatro revestimentos para aço inox diferentes, compostos por polipropileno virgem, polipropileno com zeolita a 3%, polipropileno com zeolita a 6% e polipropileno com vidro e prata. Para a determinação da formação de biofilme nos quatro revestimentos testados, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias das células em biofilme, extração da matriz por sonicação, quantificação de proteínas extracelulares e polissacarídeos, confirmados por análise de imagens geradas pela microscopia confocal a laser. Foram selecionadas cinco amostras de *Staphylococcus aureus*, uma de *Staphylococcus epidermidis* e cinco de *Escherichia coli* produtoras de biofilme para avaliar a adesão nos diferentes revestimentos. A *Escherichia coli* foi a bactéria com maior produção de biofilme em todos os revestimentos testados, o polipropileno com zeolita a 6% apresentou uma maior adesão de biofilme microbiano quando comparado ao polipropileno com prata e vidro. Esperava-se que o material composto por prata, vidro e polipropileno tivesse menor aderência de biofilmes microbianos, mas nesse estudo observou-se que não houve diferença entre os revestimentos de polipropileno virgem, com zeolita a 3% e com vidro e prata.

**Palavras-chave:** Rebanho leiteiro, mastite bovina, inox.

## INTRODUÇÃO

O biofilme é composto por uma matriz de exopolissacarídeo (EPS) (Bose e Ghosh, 2011), composta por polissacarídeos e proteínas essenciais para sua formação (Campoccia et al., 2011). Ele é capaz de proteger os micro-organismos das atividades externas como a ação de antibióticos e atividades internas como controle do metabolismo (Campoccia et al., 2011).

Estas estruturas naturalmente ocorrem em variados tipos de ambientes, sejam eles bióticos ou abióticos. Entretanto, a presença do biofilme em ambientes que tem contato com alimentos, como é o caso do aço inoxidável 304 funcionam como ponto de contaminação, causando uma liberação constante de micro-organismos patogênicos e deterioradores como *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (Fuster-Valls et al., 2008; Boari et al., 2009, Ciccio et al., 2015). Dessa forma, é de fundamental definir estratégias que impeçam a adesão de biofilmes, para reduzir os riscos de contaminação dos produtos.

Existem alguns estudos sobre a ação de metais que inibem a formação de biofilme microbiano, principalmente na área de odontologia, em doenças periodontais e próteses (Tamanai-Shacoori et al., 2014) e em forma de aditivos em produtos de consumo, incluindo meias, camisas, filtros de água, antitranspirantes, pentes e tintas (Nagy et al., 2011).

Latorre et al. (2010) fizeram uma pesquisa para isolar biofilme de *Listeria monocytogenes*, e observou-se a presença do biofilme em equipamentos e ambiente de ordenha. Isso confirma que a pesquisa de um revestimento que iniba a formação de biofilme para adicionar nos utensílios e no equipamento de ordenha é uma forma de reduzir os riscos a saúde humana e do animal.

Khamene et al. (2014) avaliaram a atividade de nanopartículas de prata quanto ao seu efeito antimicrobiano, a dosagem ideal para uma ação mais eficaz e o tempo de ação para destruição completa do biofilme. Observaram que uma dosagem alta da

nanopartícula e um período de incubação prolongado influência de forma negativa na ação anti-biofilme.

Outro tipo de produto utilizado para inibir a formação de biofilme é o zeolita, um mineral presente em rocha sedimentar vulcogênica, cristalino, poroso, hidratado, alumino-silicato com propriedades físico-químicas, tais como troca iônica, peneiramento molecular, catálise e adsorção, e uma forte afinidade para os metais pesados iônicos (Eriksson, 2007; Wang e Peng, 2010). O zeolita bruto é considerado como um material de custo acessível, também com atividade bactericida (Ebrahimi et al., 2014).

A criação de um material que evite a adesão do biofilme é uma opção interessante para os produtores rurais e empresários no setor de equipamentos de ordenha, porque, se esse material revestir o equipamento de inox utilizados na rotina diária, trará inúmeros benefícios, como evitar a propagação de doenças, reduzir a corrosão do equipamento e danos qualitativos à matéria-prima. Consequentemente, eliminará o contato da glândula mamária das vacas com as bactérias produtoras de biofilme, pois são causas responsáveis pela dificuldade e resistência ao tratamento da mastite bovina.

Ainda são poucos os relatos de adesão de biofilme em equipamentos utilizados na produção rural, embora haja vários relatos na área médica e odontológica (Cos et al., 2010; Tran e Webster, 2013).

Nesse estudo objetivou-se avaliar a formação de biofilmes microbianos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, em quatro tipos de materiais de revestimento de aço inox, compostos por polipropileno virgem, polipropileno com zeolita a 3%, polipropileno com zeolita a 6% e polipropileno com vidro e prata.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Seleção de Cepas*

Foram identificadas cinco cepas de *Staphylococcus aureus*, uma cepa de *Staphylococcus epidermidis* e cinco cepas de *Escherichia coli* isoladas do leite de casos de mastite bovina, de uma fazenda no município de Uberlândia, Minas Gerais, segundo metodologia descrita por Koneman (2001). Essas cepas identificadas como produtoras de biofilme pelo ágar vermelho congo (Freeman et al., 1989) e teste de microplaca com corante cristal violeta (Cucarella et al., 2004). Os testes foram realizados nos Laboratórios de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

### *Preparação do Material*

Para testar os seguintes revestimentos do aço inox 304: polipropileno virgem, polipropileno com zeolita a 3%, polipropileno com zeolita a 6% e polipropileno com vidro e prata, foram cortados fragmentos de cada material <sup>1,2</sup> em forma de quadrado de 1cm x 1cm, e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

### *Avaliação da Formação de Biofilme nos Revestimentos*

As bactérias selecionadas foram cultivadas individualmente, por uma noite, no Tryptic Soy Both (TSB) (Kasvi) a 37°C com agitação. A seguir, as células em suspensão foram inoculadas em placas de poliestireno estéreis com 6 poços em fundo plano junto com o material testado, diluídas em 1:200 em TSB com 0,25% de glicose (Synth) e incubados por 24 horas à 37°C com agitação, e renovação do meio após 12 horas (Gomes, 2010).

---

<sup>1.</sup> Material fabricado pela empresa Nanox (São Carlos, SP).

<sup>2.</sup> Material fornecido pela empresa Jacto (Pompéia, SP).

O biofilme microbiano formado nos materiais foram lavados com 200 $\mu$ L de solução salina (NaCl a 0,85%) três vezes. Em seguida, foi adicionado 200 $\mu$ L de solução salina com o material em uma placa de petri estéril para o procedimento de raspagem do biofilme com ponteiras de 200 $\mu$ L em média 40 vezes em cada lado do revestimento. A solução raspada, em triplicata de cada estirpe, foi colocada em um microtubo tipo *eppendorf* para realizar a sonicação (Ultrasonic Processor) durante 20 segundos numa amplitude de 22%. Após a sonicação as estirpes foram submetidas a um vórtex para homogenização (Gomes, 2010).

Então, realizou-se várias diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) para a contagem de colônias em placas de petri contendo meio Triptycase Soy Agar (TSA) (Kasvi), pelo método de gotejamento da amostra raspada (adicionou-se três gotas separadas de 10 $\mu$ L no TSA e inclinou-se a placa para que as gotas escorressem pelo meio). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Logo após foram realizadas as contagens das colônias existentes em cada placa e realizado o cálculo para as diluições expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (Gomes, 2010).

Manipulou-se cinco *S. aureus*, um *S. epidermidis* e cinco *E. coli*, para testar cada material. O teste foi realizado em triplicata, três vezes com cada bactéria, totalizando 15 repetições para cada tratamento e cada diluição  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  para o *S. aureus* e *E. coli*, e 3 repetições para o *S. epidermidis* (Gomes, 2010). Para a avaliação de cada revestimento com o resultado de todas as bactérias, foram totalizadas 33 repetições para cada tratamento e cada diluição  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ . Esta técnica está descrita em forma de esquema simplificado na Figura 1.

### ***Extração de Substâncias Extracelulares da Matriz e Quantificação de Proteínas Extracelulares e Polissacarídeos***

Foram selecionadas cepas produtoras de biofilme que aderiram fortemente nos materiais testados, sendo duas de *Staphylococcus aureus*, uma de *Staphylococcus epidermidis* e duas de *Escherichia coli*. Todas as estirpes foram incubadas com os materiais testados, na diluição de 1:200 com TSB e 0,25% de glicose em placas de poliestireno estéreis com 6 poços em fundo plano, a 37°C durante 24 horas em agitação, e renovação do meio após 12 horas. Depois foi realizada a raspagem do material com

tampão fosfato salina (PBS) para a realização dos testes descritos abaixo (Gomes, 2010).

### ***Extração da Matriz por Sonicação***

A extração da matriz do biofilme foi realizada com a raspagem do material no PBS. Após a ressuspensão do biofilme, a suspensão foi a suspensão por 30s a 30W/Hz no gelo, homogeneizada no vórtex por 2 minutos, centrifugada a 3000 g por 10 minutos a 4°C. Filtrou-se o sobrenadante em uma membrana de 0.2µm, e colocou-se a membrana para secar a 60°C em torno de 20 minutos. Determinou-se o peso seco pela diferença de pesos (subtraindo peso do filtro) (Azeredo et al., 1999).

### ***Quantificação das Proteínas da Matriz (Kit BCA)***

Adicionou-se 25µL da amostra raspada em uma microplaca de 96 poços. Logo após acrescentou-se 200µL dos reagentes misturados do kit BCA (Sigma), homogeneizou-se por 30 segundos e incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi utilizada a leitura de 562nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) e um tampão fosfato como branco (Azeredo et al., 1999).

### ***Quantificação dos Polissacarídeos – Método do Ácido Fenol Sulfúrico***

A determinação do conteúdo em polissacarídeos foi realizada segundo o método de Dubois et al. (1956). Adicionou-se 0,5 mL da amostra raspada em um tubo; 0,5 mL de fenol (50g/L - Dinâmica) e logo em seguida 2,5 mL de ácido sulfúrico (95-97% - Isofar). Homogeneizou-se a solução no vórtex e a colocou para reagir por 15 minutos a temperatura ambiente. Realizou-se a leitura de 490nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) e utilizou-se um tampão fosfato como branco.

### ***Microscopia Confocal a Laser (CLSM)***

A microscopia foi realizada em uma cepa de *Staphylococcus epidermidis*, incubada com os quatro materiais testados em placa de poliestireno estéril com 24 poços em fundo plano em 1:200 no TSB com 0,25% de glicose, a 37°C durante 24 horas em agitação, com renovação do meio após 12 horas (Gomes, 2010).

No Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Uberaba de Minas Gerais (UFTM) os materiais foram lavados com solução salina estéril e corados com Kit VIVO/MORTO (Live/Dead – BacLight – L7012) utilizando Microscópio Confocal a Laser (Zeiss 710), com uma excitação a laser a 488 nm (Ar laser) e 561 nm (He laser) para Syto 9 (sinais verdes) e filtros de emissão a 500 - 545 nm e 580 - 680 nm para iodeto de propídio (sinais vermelhos). A coloração foi de verde para os micro-organismos vivos e vermelho para os mortos (inviáveis). Os dados da imagem foram processados em um software específico, Fuji (Kunze et al., 2010).

### ***Análise Estatística***

Foi realizado o teste de qui-quadrado para verificar a relação entre os fatores tratamento (revestimentos) e diluição ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ) com nota (número de colônias no TSA). Realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis comparando tratamento, diluição, diluição dentro do tratamento e tratamento dentro da diluição, com o nível de significância de 5%.

Os procedimentos para as análises estatísticas são descritos em Triola (1999) e Ayres et al. (2007), sendo utilizada a ferramenta Action (2015) ([www.portalaction.com.br](http://www.portalaction.com.br)) que se baseia no programa R (R Development Core Team, 2015).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A capacidade de adesão do *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* nos materiais testados, foi avaliada pelo teste de contagem de Unidades Formadoras de Colônias por ml. Constatou-se que nas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , todas as amostras tiveram mais de 10

UFC, enquanto que nas diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  variou conforme o material e a bactéria, como demonstra a Tabela 1. Salienta-se que a presença da bactéria na diluição  $10^{-5}$  denota que o material inibiu precariamente a formação de biofilme, como foi o caso de uma cepa de *Staphylococcus aureus*.

Pelo teste qui-quadrado, houve diferença estatística significativa ( $p$ -valor < 0,05) ao comparar os revestimentos e as diluições com o número de colônias de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. No teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, verificou-se diferença estatística significativa entre todas as diluições por bactéria. No entanto, na hipótese de se testar por revestimento, a comparação entre a diluição  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  para o *S. aureus* e *S. epidermidis* não teve diferença significativa. Além disso, entre a diluição  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  para *E. coli* também não obteve diferença estatística significativa. Já o restante das comparações entre as diluições apresentou diferença significativa ( $p$ -valor < 0,05) (Tabela 1). De tal modo, é possível inferir que todos os materiais tiveram formação de biofilme microbiano, notando-se que, por bactéria, não há como selecionar o melhor material, mas a *E. coli* apresentou maior adesão em todos os revestimentos testados (Tabela 1).

Na Tabela 2 observa-se o resultado geral por revestimento testado, onde se incorporou todos os resultados das bactérias no teste de Contagem das Unidades Formadoras de Colônias das células em biofilme. Pelo teste qui-quadrado e o de Kruskal-Wallis, percebeu-se que na diluição  $10^{-4}$ , o polipropileno com zeolita a 6% teve maior adesão de biofilme microbiano, quando comparado ao polipropileno com prata e vidro ( $p$ -valor < 0,05). Todavia, não houve diferença estatística significativa entre o polipropileno com vidro e prata, polipropileno com zeolita 3% e o polipropileno virgem nessa diluição, sendo ambos os materiais capazes de terem adesão por biofilme.

Cowan et al. (2003) testaram a aderência de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 em um material para revestimento de aço inoxidável, composto por zeolita e prata a 2,5% e zinco a 14%. Foi observado que a concentração de zeolita de 1,5 ou 3,1 mg/mL, foi a ideal para atividade bactericida, e a de prata de 39 ou 78  $\mu$ g/mL. Fez-se uso do zinco por ser capaz de ajudar a reduzir a absorção do alimento, em contato com a superfície do material. A mistura dessas partículas fez

diminuir em 99% da adesão dos biofilmes no revestimento, sendo que a partir de 6 horas de incubação do TSB e após 24 horas não observou-se nenhuma adesão.

Entretanto, nesse estudo observou-se que as partículas de prata e de zeolita, a 3%, não foram capazes de inibir a adesão de células bacterianas. O efeito bactericida das duas partículas em associação é muito mais elevado (COWAN et al., 2003); porém, para reduzir os custos da produção do material, realizou-se a tentativa de utilizar a zeolita e a prata separadamente para inibir a formação de biofilme em polipropileno.

Neves et al. (2014) testaram a eficácia de nanopartículas de prata na dosagem de 0,3% e 0,6% em resinas para evitar a adesão de biofilme de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* após a restauração dentária, e observaram um ótimo efeito bactericida das duas dosagens. No teste de quantificação de UFC, os autores avaliaram até a diluição  $10^{-6}$ . Constataram um número de colônias menor que o controle nos dois materiais nos dias um, quatro e sete de incubação. Nesse estudo, verificou-se que o *S. aureus*, *S. epidermidis* e a *E. coli*, tiveram uma adesão menor à superfície houve formação de biofilme no máximo até a diluição  $10^{-5}$ . Entretanto, não houve diferença estatística entre os revestimentos com partículas e o controle, polipropileno virgem.

Em virtude do grande impacto ambiental causado pela toxicidade de metais e pelas implicações graves no tratamento de água residual causado pelas bactérias nitrificantes, Nagy et al. (2011) criaram uma membrana composta por zeolita para estabilizar as partículas de prata inseridas. Fizeram uso da bactéria *E. coli* para verificar se haveria adesão de biofilme. Para a destruição das células bacterianas, foi avaliada a liberação da prata progressivamente, sendo que, com 30 minutos, teve uma eliminação menor quando comparada aos 180 minutos de exposição, quando erradicou quase totalmente as cepas. No presente estudo avaliou a exposição das bactérias ao revestimento com 24 horas. Contudo, após esse período tais bactérias estavam viáveis. Sendo assim a zeolita e a prata não foram eficiente na inibição da formação de biofilme.

Quando os micro-organismos são cultivados com a prata, a partícula consegue aderir ao exopolissacarídeo, prejudicando o *quorum sensing*, e inativam algumas funções fisiológicas como a síntese da parede celular, transporte de membrana, ácidos nucleicos (RNA e DNA) síntese e tradução, dobragem e função das proteínas, e de transporte de elétrons, prejudicando a sobrevivência das células e formação de biofilmes

pelo efeito bactericida (Morones et al., 2005; Giulio et al., 2013; Gurunathan et al., 2014).

Ao analisar os relatos de autores anteriores e os resultados brutos dessa pesquisa, era de se esperar que o revestimento com a prata tivesse uma menor adesão de biofilmes. No entanto, quando avaliados estatisticamente, não houve diferença entre os revestimentos de polipropileno virgem, polipropileno com zeolita 3% e polipropileno com vidro e prata.

A maior eficiência dos materiais na destruição de bactérias Gram negativas quando comparado a bactérias Gram positivas, é decorrente da reduzida quantidade de peptidoglicanos carregados negativamente nas paredes celulares das espécies Gram negativas, o que influencia na entrada do composto para agir como bactericida (Nagy et al., 2011; Saengmee-Anupharb et al., 2013).

As amostras utilizadas nesse estudo foram colhidas do leite de vacas com mastite e de equipamentos de ordenha. O contato dessa matéria-prima com o aço inoxidável faz aumentar as propriedades de hidrofobicidade e receptor de elétrons, por causa da quantidade de gordura no produto (Hamadi et al., 2014). Sabe-se que este componente é um fator importante na adesão de biofilmes microbianos. Dessa forma, os procedimentos de limpeza e desinfecção dos equipamentos utilizados durante a ordenha e dos tetos das vacas, devem ser realizados corretamente em todas as ordenhas.

Existem vários parâmetros físico-químicos da superfície que podem influenciar na formação de biofilmes microbianos, como, tensão de superfície, hidrofobicidade, interação eletrostática, rugosidade da superfície, citotoxicidade e dosagens diferentes das nanopartículas nos materiais (Sousa; Teixeira; Oliveira, 2009; Laverty; Gorman; Gilmore, 2013; Neves et al., 2014). Estes fatores também contribuem para determinação da eficácia de um material que iniba a adesão de biofilmes.

A Figura 2 resume os resultados da extração de substâncias da matriz e análise quantitativa de proteína e polissacarídeo em diferentes materiais testados. O aumento da proteína e polissacarídeos nas amostras quando expostas a prata e a zeolita deve-se a provável lise das células bacterianas, e liberação do conteúdo intracelular, e a grande

interação das partículas com a matriz da bactéria (Monteiro et al., 2013). A ação das partículas na matriz torna a extração dela mais eficaz.

Estimar a quantidade de proteína e polissacarídeo é uma maneira indireta de estimar a biomassa de depósito, uma vez que esses parâmetros são os principais componentes do biofilme (Lazarova e Manem, 1995). Pela Figura 2 observou-se que a quantidade da matriz reduz quando o biofilme é reduzido pela presença de zeolita e prata, comparado ao controle (polissacarídeo virgem).

Oliveira (2013) também encontrou uma maior quantidade de polissacarídeo comparado a proteína em bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos, aderidos em cupons de aço carbono em contato com água doce, avaliados em 30, 60 e 90 dias de incubação. A liberação de polissacarídeos contribui para deterioração do aço carbono.

Leite (2013) também avaliou a quantidade de proteína e polissacarídeo em duas cepas de *S. epidermidis*, após um tratamento com N-acetilcisteína (NAC) e outro com NAC e rifampicina. A proteína e o polissacarídeo tiveram um aumento significativo após a exposição dos agentes, principalmente os polissacarídeos. Contudo, quando as bactérias tiveram contato com os agentes combinados a proteína aumentou mais ainda. Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, em que as bactérias quando expostas a zeolita ou prata, aumentou a quantidade de proteínas e principalmente de polissacarídeos do *S. epidermidis* quando comparado ao polipropileno virgem.

Pelas imagens registradas no microscópio confocal a laser, os resultados dos testes anteriores confirmam a eficácia do material de polipropileno com prata e vidro (Figura 3). Esses resultados, foram semelhantes aos obtidos por Morita et al. (2014) que observaram a atividade bactericida e antibacteriana da prata em fios ortodônticos com biofilmes de *Streptococcus sobrinus*. Essa atividade acontece provavelmente pelos seguintes mecanismos: inibição da replicação do DNA e a mitose, efeitos da permeabilidade da membrana celular, e controle da oxidação de glicose conforme relatado por outros pesquisadores (Slawson et al., 1990).

No kit de viabilidade de células microbianas observou-se que os três materiais (polipropileno com zeolita 3%, polipropileno com zeolita 6% e polipropileno com prata e vidro), tiveram a presença de células mortas, pelo efeito bactericida da zeolita e da prata. Em adição, algumas bactérias que vão morrendo, podem lançar toxinas que vão matando as outras.

Nas fotos com a presença de bactérias vivas e mortas, verde e vermelho respectivamente (A), aparecem células amarelas por causa da sobreposição dos dois tipos de células, e como o aumento de 40x impossibilita a visualização delas separadamente, por ser composto por várias camadas de bactérias. A microscopia confocal a laser é uma boa técnica para visualização do biofilme e eficácia dos materiais, porém para quantificação não é eficaz.

A presença de bactérias produtoras de biofilme Gram negativas, como a *Escherichia coli*, é preocupante para os produtores rurais, pois, como foi visto nesse estudo, tal bactéria tem elevada capacidade de se aderir em superfícies, tornando-se uma fonte de contaminação contínua aos animais. A utilização de partículas como a prata e a zeolita com polipropileno, como revestimento do inox, não tiveram um resultado tão eficaz, pois não houve diferença estatística que comprovasse boa capacidade. Isso ocorreu devido à adesão, principalmente na diluição  $10^{-4}$ .

## CONCLUSÕES

A *Escherichia coli* foi a bactéria que mais formou biofilme em todos os revestimentos testados, o polipropileno com zeolita a 6% teve uma maior adesão de biofilme microbiano quando comparado ao polipropileno com prata e vidro. Esperava-se que o material composto por prata, vidro e polipropileno tivesse menor aderência de biofilmes microbianos, mas nesse estudo observou-se que não houve diferença entre os revestimentos de polipropileno virgem, com zeolita a 3% e com vidro e prata.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiar este projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

Action. Disponível em: <[www.portalaction.com.br](http://www.portalaction.com.br)>. Acesso em: 01 ago. 2015.

Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. S. dos. 2007. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 364 p.

Azeredo, J. A., Lazarova, V., and Oliveira, R. 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Water Sci Technol.* 39:243-250.

Boari, C. A., Alves, M. P., Tebaldi, V. M. R., Savian, T. V., and Piccoli, R. H. 2009. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 29:886-895.

Bose, S., and Ghosh, A. K. Biofilms A challenge to medical science. 2011. *J Clin Diagn Res.* 5:127-130.

Campoccia, D., Montanaro, L., Ravaioli, S., Pirini, V., Cangini, I., and Arciola, C. R. 2011. Exopolysaccharide production by *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with biofilm extracellular DNA. *Int J Artif Organs.* 34:832-839.

Ciccio, P. D., Vergara, A., Festino, A. R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., and Ianieri, A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control.* 50:930-936.

Cos, P., Toté, K., Horemans, T., and Maes, L. 2010. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Curr Pharm Des.* 16:2279-2295.

Cowan, M. M., Abshire, K. Z., Houk, S. L., and Evans, S. M. 2003. Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30:102-106.

Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., and Penadés, J. R. 2004. Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72:2177-2185.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28:350-356.

- Ebrahimi, R., Zandi, S., and Gharibi, F. 2014. Removal of nickel and total chromium using *Escherichia coli* biofilm supported on clinoptilolite. *J Environ Manage.* 2:126-133.
- Eriksson, H. 2008. Controlled release of preservatives using dealuminated zeolite Y. *J Biochem Biophys Methods.* 70:1139–1144.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42:872-874.
- Fuster-Valls, N., Hernández-Herrero, M., Marín-de-Mateo, M., Rodríguez-Jerez and J. J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control.* 19:308-314.
- Giulio, M. D., Bartolomeo, S. D., Campli, E. D., Sancilio, S., Marsich, E., Travani, A., Cataldi, A., and Cellini, L. 2013. The effect of a silver nanoparticle polysaccharide system on Streptococcal and saliva-derived biofilms. *Int J Mol Sci.* 14:13615–13625.
- Gomes, F. 2010. Novas estratégias terapêuticas contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*. MS Thesis. Minho Univ., Braga.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., and Kim, J. H. 2014. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bactéria. *Nanoscale Res Lett.* 9:1-17.
- Hamadi, F., Aserne, F., Elabed, S., Bensouda, S., Mabrouki, M., and Latrache, H. 2014. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control.* 38:104-108.
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S. Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., Jayarao, B. M., Houser, B. A., Daugherty, C. S., and Schukken, Y. H. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 93:2792–2802.
- Laverty, G., Gorman, S. P., and Gilmore, B. F. 2013. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiol.* 8:509-524.
- Lazarova, V., and Manem, J. 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.* 29:2227–2245.

- Leite, B. A. 2013. Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos. MS Dissertation. Federal São Carlos Univ., São Carlos.
- Khameneh, B., Zarei, H., and Bazzaz, B. S. F. 2014. The effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus epidermidis* biofilm biomass and cell viability. *Nanomed J.* 1: 302-307.
- Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5th ed. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, Brasil.
- Kunze, B., Reck, M., Dotsch, A.; Lemme, A., Schummer, D.; Irschik, H., Steinmetz, H., and Wagner-Dobler, I. 2010. Damage of *Streptococcus mutans* biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *BMC Microbiol.* 10:2-13.
- Monteiro, D. R., Silva, S., Negri, M., Gorup, L. F., Camargo, E. R., Oliveira, R., Barbosa, D. B., and Henriques, M. 2013. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol.* 114:1175–1183.
- Morita, Y., Imai, S., Hanyuda, A., Martin, K., Hanada, N., and Nakamura, Y. 2014. Effect of silver ion coating of fixed orthodontic retainers on the growth of oral pathogenic bactéria. *Dent Mater J.* 33:268–274.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., and Kouri, J. B.; Ramirez, J. T. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 16:2346–2353.
- Nagy, A., Harrison, A., Sabbani, S., Munson Jr, R. S., Dutta, P. K., and Waldman, W. J. 2011. Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *Int J Nanomedicine.* 6:1833–1852.
- Neves, P. B. A., Agnelli, J. A. M., Kurachi, C., and Souza, C. W. O. 2014. Addition of silver nanoparticles to composite resin: effect on physical and bactericidal properties *in vitro*. *Braz Dent J.* 25:141-145.
- Oliveira, E. S. D. 2013. Biocorrosão em cupons de aço carbono expostos à agua doce. 2013. MS Dissertation. Federal Pernambuco Univ., Recife.
- R Development Core Team. R. 2015. A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2015. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em mai. 2015.

- Saengmee-Anupharb, S., Srihirin, T., Thaweboon, B., Thaweboon, S., Amornsakchai, T., Dechkunakorn, S., and Suddhasthira, T. 2013. Antimicrobial effects of silver zeolite, silver zirconium phosphate silicate and silver zirconium phosphate against oral microorganisms. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3:47-52.
- Slawson RM, Lee H, Trevors JT. 1990. Bacterial interactions with silver. *Biol Met.* 3:151-154.
- Sousa, C., Teixeira, P., and Oliveira, R. 2009. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. *Int J Biomater.* 9:1-9.
- Tran, P. A., and Webster, T. J. 2013. Understanding the wetting properties of nanostructured selenium coatings: the role of nanostructured surface roughness and air-pocket formation. *Int J Nanomedicine.* 8:2001-2009.
- Triola, M. F. 1999. *Introdução à Estatística.* 7. th. LTC: Rio de Janeiro, 410 p..
- Tamanai-Shacoori, Z., Chandad, F., Rébillard, A., Cillard, J., and Bonnaure-Mallet, M. 2014. Silver-zeolite combined to polyphenol-rich extracts of *Ascophyllum nodosum*: potential active role in prevention of periodontal diseases. *Plos One.* 9:1-8.
- Wang, S., and Peng, Y. 2010. Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chem Eng J.* 156:11–24.

Figura 1. Esquema demonstrativo da avaliação da formação de biofilme em quatro revestimentos para aço inox.

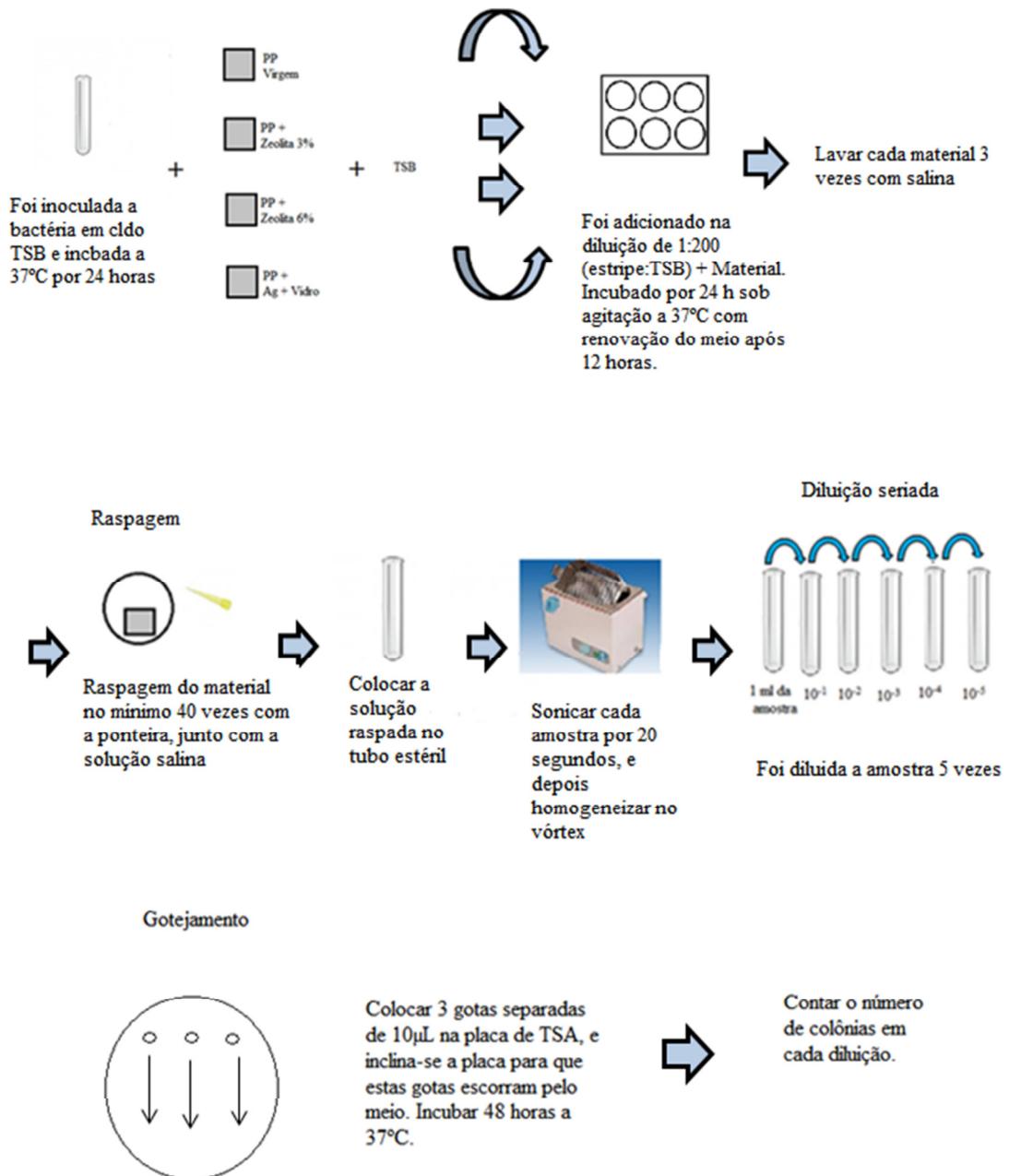


Tabela 1. Contagem das unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* nas diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , dos biofilmes aderidos nos revestimento compostos por polipropileno virgem, polipropileno e zeolita 3%, polipropileno e zeolita 6% e polipropileno, vidro e prata.

<b>Material para revestimento</b>	<b>Microrganismo</b>										
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>			<i>Escherichia coli</i>				
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$		$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$		$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Polipropileno virgem	5	2	1	1	0	0	5	5	0	0	
Polipropileno com zeolita a 3%	5	2	0	1	0	0	5	5	0	0	
Polipropileno com zeolita a 6%	5	3	0	1	1	0	5	5	0	0	
Polipropileno com vidro e prata	5	2	1	1	0	0	5	5	0	0	

Tabela 2. Contagem das unidades formadoras de colônias nas diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , dos biofilmes aderidos nos revestimento compostos por polipropileno virgem, polipropileno e zeolita 3%, polipropileno e zeolita 6% e polipropileno, vidro e prata.

<b>Material para revestimento</b>	<b>Micro-organismos testados</b>		
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Polipropileno virgem	11	7	1
Polipropileno com zeolita a 3%	11	7	0
Polipropileno com zeolita a 6%	11	9	0
Polipropileno com vidro e prata	11	7	1
Total de amostras testadas	44	30	2

Figura 2. Extração de substâncias extracelulares da matriz e quantificação de proteínas extracelulares e polissacarídeos de 2 amostras (2 e 8) de *Staphylococcus aureus*, 2 amostras (4 e 7) de *Escherichia coli*, e 1 amostra (1) de *Staphylococcus epidermidis*, cultivadas por 24 horas no TSB com materiais de revestimento com polipropileno virgem (V), com polipropileno e zeolita 3% (Z3%), com polipropileno e zeolita 6% (Z6%) e com polipropileno, vidro e prata (Ag).

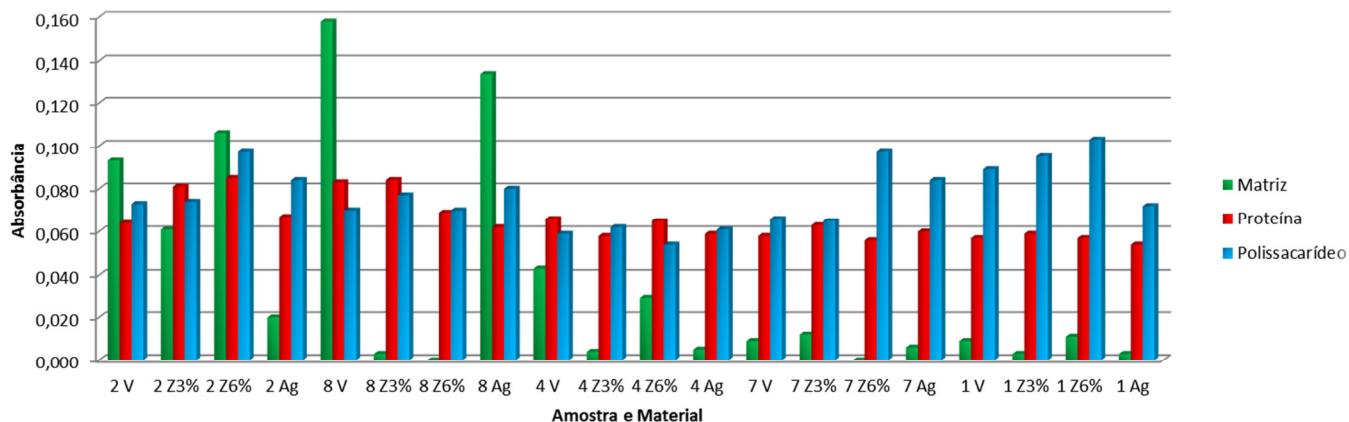
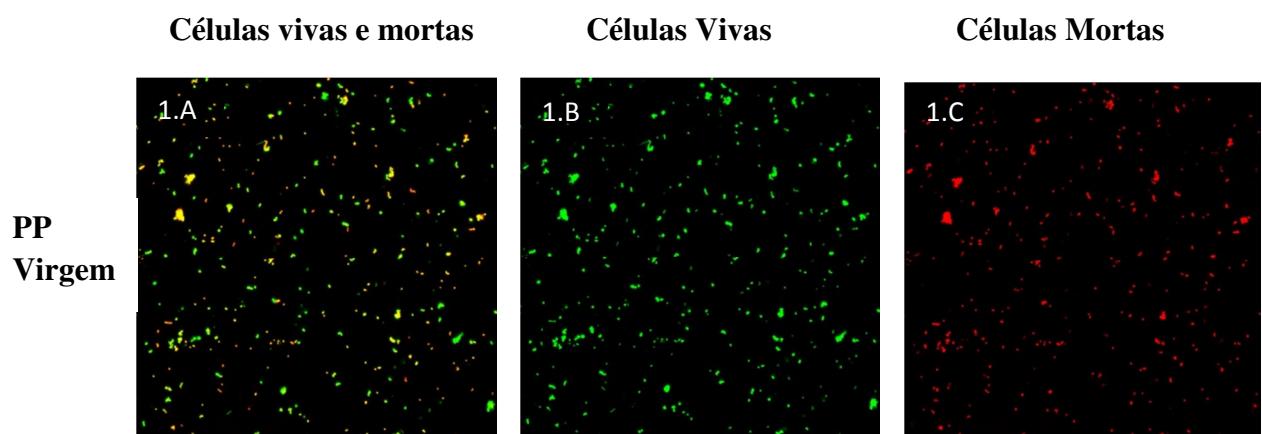
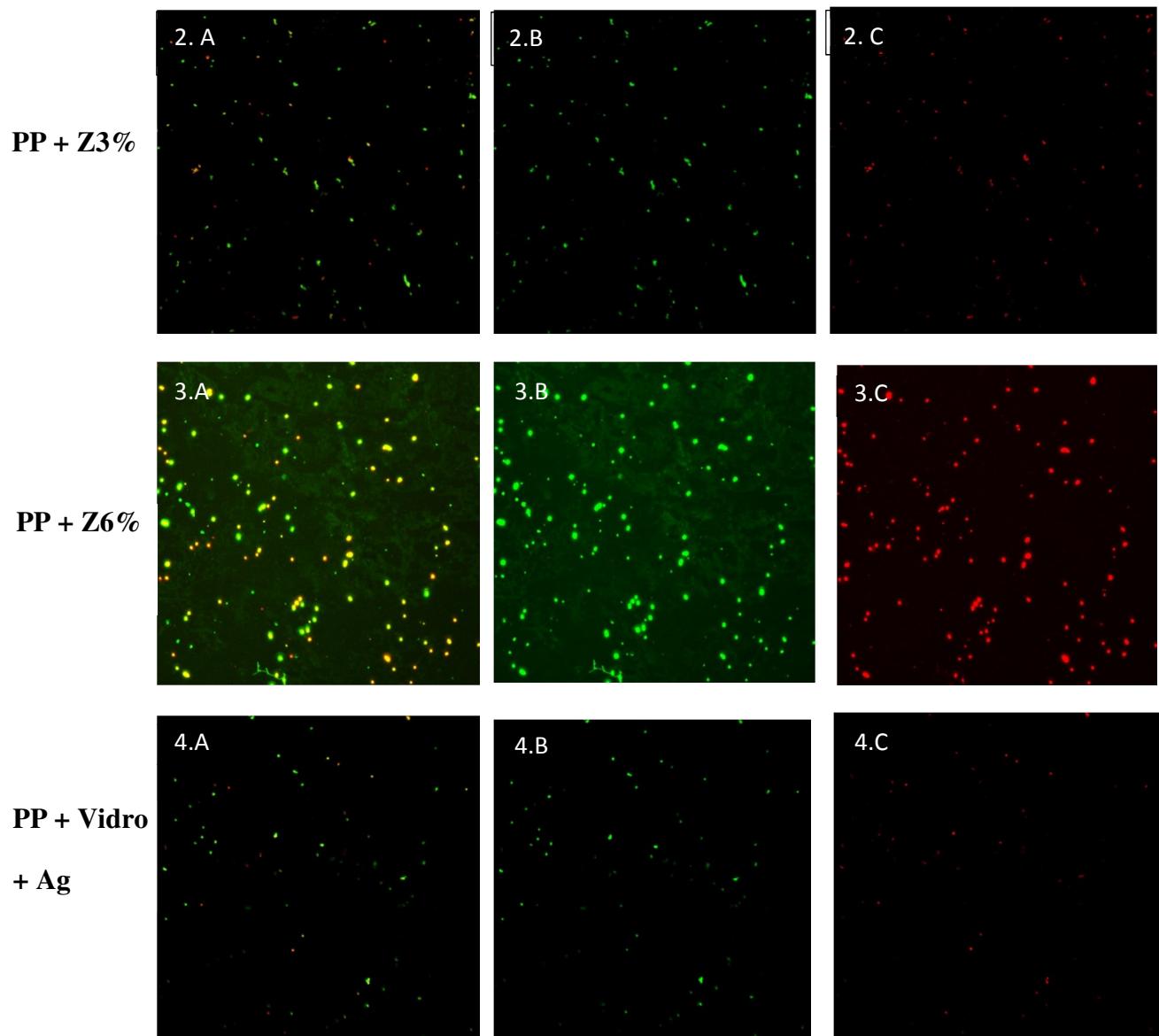


Figura 3. Microscopia confocal a laser (Zeiss 710) de *Staphylococcus epidermidis* (amostra 1) no material virgem (1), com zeolita 3% (2), com zeolita 6% (3) e com polipropileno, vidro e prata (4), imagens em stracks, todas as bactérias (A), bactérias vivas (B) e bactérias mortas (C) no aumento de 40x.





## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A presença de bactérias formadoras de biofilme em ambiente de ordenha causa preocupação aos produtores rurais e empresários de equipamentos para ordenha. Pois quando essas bactérias se aderem em superfícies dos utensílios e equipamento de ordenha, constituem uma forma de propagação de doenças aos animais, as pessoas, além de deterioração do leite cru e prejuízos a indústria. Por isso, a pesquisa de um revestimento que evite essa adesão, como medida de controle e prevenção da adesão de biofilme, torna a cada dia mais importante.