

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

OTÁVIO CINTRA LEMOS OLIVIERI

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓXIDO DE ZINCO DOPADO COM PRATA
NO CONTROLE DE BIOFILMES DE *Salmonella* Heidelberg FORMADOS EM OVOS

Uberlândia

2017

OTÁVIO CINTRA LEMOS OLIVIERI

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓXIDO DE ZINCO DOPADO COM PRATA NO
CONTROLE DE BIOFILMES DE *Salmonella* Heidelberg FORMADOS EM OVOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial à obtenção do grau de Médico
Veterinário.

Orientador: Belchiolina Beatriz Fonseca

Co-orientador: Paula Luiza Alves Pereira
Andrada Silva

Uberlândia

2017

OTÁVIO CINTRA LEMOS OLIVIERI

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓXIDO DE ZINCO DOPADO COM PRATA NO
CONTROLE DE BIOFILMES DE *Salmonella* Heidelberg FORMADOS EM OVOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial à obtenção do grau de Médico
Veterinário.

Uberlândia, 02 de dezembro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Belchiolina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia

Thomas Abdo Costa Calil
Lohmann Tierzucht

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Universidade Federal de Uberlândia

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, que nunca mediram esforços para me estimular no que eu julgava pertinente à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter iluminado o caminho percorrido até aqui, por ter me livrado de todos os males por ter atendido às minhas preces.

Sou imensamente grato à minha família. Agradeço minha mãe, Márcia, pela criação, pelo carinho ofertado a vida toda, pelo porto seguro que sempre me ofereceu. Meu pai, Orlando, agradeço a proteção que me transmite, obrigado pelos conselhos sempre pertinentes, obrigado por ser exemplo de ser humano, como diz a moda: *“Todas minhas faculdades, não me ensinaram metade do que meu pai me ensinou”*. Ao meu irmão Pedro, companheiro e amigo. Obrigado por ser essa pessoa inspiradora, obrigado pelo apoio e pelas dicas ao longo do caminho. As minhas irmãs Mariana e Sofia, exemplos de pureza, honestidade e carinho. Obrigado pelos agradabilíssimos momentos que nos proporcionam, pelas risadas, pela transmissão de paz e calma à família. Família, foi com vocês e por vocês que estou aqui hoje.

Aos meus avós, Vovô Pedro, Vovô Lando, Vovó Zira, Vovó Gão. Meu carinho e respeito por vocês sempre foi enorme, são pessoas que merecem admiração de todos. Obrigado pelas histórias, pelos ensinamentos, pelo carinho que sempre me ofereceram. Vô Lando, onde estiver espero que esteja orgulhoso de ver cada neto seu atingindo seus objetivos.

A minha namorada Isabella, obrigado por partilhar seu amor comigo, obrigado pela companhia e estímulos durante minha graduação. Obrigado pela compreensão nos momentos difíceis e pela comemoração nos bons momentos. Serei grato por toda nossa vida.

Aos amigos de curso, obrigado pelos bons momentos de diversão, pelo compartilhamento das mesmas angústias, pela parceria nesses anos todos, pelos estudos compartilhados. Espero que nossas amizades perdurem por longos anos.

Agradeço a nossa equipe de pesquisa, em especial a Paula, Thais, Banner, Marcelo, Roberta, Silvia, Francesca, Priscilla, Pedro e Wesley. Obrigado pela ajuda, pela paciência nos ensinamentos e por serem sempre solícitos. Tenham a certeza que sem vocês esse trabalho não aconteceria.

Aos membros da banca meu eterno agradecimento. Bia, obrigado pela orientação, pelas oportunidades e pelos ensinamentos. Evandro, grande professor, sempre paciente e didático, obrigado pelas lições. Thomas, obrigado pelos ensinamentos, pelos conselhos e pela amizade, sempre foi uma inspiração.

Se plantar a semente com esforço e honestidade, dos frutos colhidos nenhum será perdido.

RESUMO

Salmonella spp. é comumente associada à alimentos de origem avícola levando a surtos de infecção em humanos. O controle da *Salmonella*, e outros micro-organismos, é um desafio na cadeia de produção, principalmente devido à capacidade de formação de biofilmes. Em busca de novas estratégias a nanotecnologia fornece matérias promissoras para controle e prevenção de contaminações. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da nanopartícula de óxido de zinco dopada com prata (ZnO-Ag) sobre o controle de biofilme de *S. Heidelberg* em ovos embrionados oriundos de reprodutoras de perus industriais. Para isso, ovos de perus foram colocados em meio contendo *S. Heidelberg* o que permitiu adesão de biofilme na casca. Alguns grupos tiveram desinfecção pré e pós contato com a bactéria, outros tiveram desinfecção apenas pós contato. Foi avaliada a eficiência que a nanopartícula em comparação ao ácido peracético em alta dosagem tiveram na prevenção e controle de *S. Heidelberg*, bem como a capacidade da bactéria em atingir albúmen e gema. Ainda foi realizada microscopia eletrônica para a visualização dos biofilmes em amostras de cascas dos ovos expostos à *Salmonella Heidelberg*. Os resultados mostraram que a nanopartícula de óxido de zinco dopada com prata é uma alternativa promissora para a avicultura com potencial de reduzir a carga microbiana em ovos. Contudo, ainda são necessários estudos para garantir a segurança de sua utilização bem como padronizar doses e metodologias de aplicação.

Palavras chaves: Nanotecnologia, desinfecção de ovos, peruas, nanocristais, ácido peracético

ABSTRACT

Salmonella spp. is commonly associated with food from poultry origin, and these are important sources of infection outbreaks in humans. The control of this, and other microorganisms, is a challenge in the production chain, mainly due to the capacity of biofilm formation. In search of new strategies, nanotechnology provides promising materials for the control and prevention of contamination. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the silver-doped zinc oxide nanoparticle (ZnO-Ag) on *S. heidelberg* biofilm control in embryonated eggs from industrial turkey breeders. For this, turkey eggs were placed in medium containing *S. Heidelberg* which allowed biofilm adhesion in the shell. Some groups had disinfection before and after contact with the bacteria, others had disinfection only after contact. The efficiency of the nanoparticle and peracetic acid in high dosage was evaluated in the prevention and control of *S. Heidelberg*, as well as the ability of the bacteria to reach albumen and yolk. Electron microscopy was also performed to visualize the biofilms in samples of eggshells exposed to *Salmonella Heidelberg*. The results showed that silver-doped zinc oxide nanoparticle is a promising alternative for poultry with the potential to reduce microbial load on eggs. However, studies are still needed to ensure the safety of its use as well as to standardize doses and application methodologies.

Key words: Nanotechnology, disinfection of eggs, turkeys, nanocrystals, peracetic acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Características e ocorrência de Salmonella spp.	11
2.2 Biofilme	13
2.2.1 Aspectos gerais	13
2.2.2 Biofilme de Salmonella e fatores de virulência	14
2.3 Controle de micro-organismos e biofilmes	16
2.4 Nanopartículas	18
2.4.1 Prata e nanocristais de oxido de prata.....	19
2.4.2 Óxido de zinco.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Formação dos nanocristais e cepa avaliada.....	21
3.2 Avaliação da inibição de diferentes dosagens da dopagem de prata sobre Salmonella spp em placa	21
3.3 Biofilme em ovo.....	22
3.3.1 Avaliação da eficiência do Óxido de zinco dopado com prata no controle de biofilmes de Salmonella Heidelberg formados em ovos	22
3.4 Confirmação das espécies por PCR	23
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	24
3.6 Análise estatística.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Análise da inibição das nanopartículas de ZnO-Ag pelo método de difusão em disco	26
4.2 Nanopartículas (ZnO-Ag) no controle e prevenção de biofilmes de Salmonella Heidelberg formados em cascas de ovos e sua passagem para albúmen e vitelo	26
4.3 Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura	29
4 CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O controle de micro-organismos é um ponto crucial para a avicultura. A *Salmonella* spp. é um dos agentes mais comuns do mundo dentre aqueles causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO), inclusive no Brasil (BRASIL, 2015; WHO, 2016). Os produtos de origem avícola, são as principais fontes de surtos de salmoneloses, sendo associados a cerca de 47% das infecções em humanos (CDC, 2016). A posição do Brasil como segundo maior produtor, primeiro exportador de carne de frangos e terceiro maior exportador de perus do mundo (ABPA, 2014; ABPA, 2017), faz com que o país tenha como obrigação a capacidade de cumprir as normas estabelecidas pelo MAPA (Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento) e atender exigências de países importadores de modo que consiga um controle da *Salmonella* e de outros micro-organismos.

Existem vários métodos para o controle e prevenção de *Salmonella* e outros micro-organismos encontrados na cadeia de produção. Busca-se um controle efetivo dos ovos embrionados para evitar a transferência de bactérias presentes em granjas de reprodução para a progênie, evitando assim perdas no incubatório, infecção dos lotes no campo e contaminação do produto final de modo que garanta maior segurança para saúde dos consumidores e menor prejuízo financeiro.

A desinfecção de ovos após a postura conta com diferentes tipos de desinfetantes disponíveis no mercado, dentre eles o formol, cujo uso atualmente é restrito, e o ácido peracético que tem sido o usual. Contudo, novos produtos que garantam controle mais efetivo de micro-organismos, que tenham risco reduzido às pessoas, animais e meio ambiente, e que apresentem um custo viável surgem como novas estratégias de aplicação na avicultura. Nesse contexto pode-se citar as nanopartículas. Sabe-se que, por possuírem tamanho pequeno e elevada relação entre superfície e volume, as nanopartículas são potenciais agentes antimicrobianos, capazes interagir intimamente com as membranas dos micro-organismos (ALLAKER, 2010). Por serem estáveis mesmo em temperatura e pressão elevadas, por conseguirem atravessar a matriz dos biofilmes, por possuírem potencial inativador e praticamente não apresentarem efeitos sobre células humanas, são vistas como promissoras (COSTA et al., 2011; LU et al., 2012).

No intuito de sobreviver e de se manter em ambientes adversos, *Salmonella* spp., e também outros micro-organismos, desenvolveram mecanismos diversos, dentre eles a capacidade de aderir em superfícies e produzir biofilmes (STEENACKERS et al., 2012). Isso gera uma grande preocupação, uma vez que a capacidade de permanecer em ambientes, resistindo a sanitizantes e antimicrobianos proporciona uma constante fonte de micro-organismos, o que contribui com a veiculação de patógenos nas cadeias produtivas e, conseqüentemente, nos alimentos (SCHLISSELBERG; YARON, 2013).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da nanopartícula de óxido de zinco dopada com prata (ZnO-Ag) sobre o controle de biofilme de *S. Heidelberg* tendo como modelo experimental ovos embrionados oriundos de reprodutoras de perus industriais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características e ocorrência de *Salmonella spp.*

Salmonella é um gênero de bactérias que tem como características serem gram-negativas, possuírem formato de bastonete, são anaeróbias facultativas e não são formadoras de esporos. A temperatura ideal para crescimento é de 37°C e o pH ótimo encontra-se no intervalo do 6,5 e 7,5, contudo, podem se desenvolver com 45°C e pH de 4 a 9. Além disso são catalase positiva e oxidase negativa, fazem fermentação de glicose e geram ácidos, promove redução de nitrato em nitrito, e gera produção de citocromo oxidase (D'AOUST, MAURER, 2007; GAST, 2008; LOUREIRO et al., 2010). Excetuando-se os sorotipos Pullorum e Gallinarum, são bactérias móveis (GERMANO; GERMANO, 2008) dotam de fimbrias, flagelos e proteínas da membrana externa que participam da adesão e invasão em células dentre outros mecanismos de sobrevivência (BERNDT et al., 2007)

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. bongori*, a qual possui 23 sorovares e *S. entérica*, que por sua vez detém de mais de 2500 sorovares, os quais estão dispostos em seis subespécies: *I- S. entérica*, *II- S. salamae*, *IIIa- S. arizonae*, *IIIb- S. diarizonae*, *IV- S. houtenae* e *VI- S. indica*. Cada subespécie possui bioquímica, estrutura e genoma diferentes entre si, e para a identificação usa-se número romanos para o sorovar, a identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares ligados à virulência (Vi) (BRENNER et al., 2000; TINDALL et al., 2005; GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010)

Dentre os sorovares de todas subespécies, um total de aproximadamente 2579, 59% estão no grupo *Salmonella entérica* subespécie *entérica*, e essas cepas são as causas de 99% da infecções por *Salmonella* em humanos e animais homeotérmicos (BRENNER et al., 2000; GRIMONT; WEILL, 2007).

Existe um outro padrão de classificação relacionado à especificidade de um hospedeiro e no padrão de ocorrência do quadro clínico da doença. Há três tipos: (1) *Salmonella* muito adaptada aos animais, como exemplo destacam-se: *S. Pullorum* e *Gallinarum* (aves), responsáveis por causar pulrose e tifo aviário, respectivamente; *S. Cholerasuis* e *S. Thyphisuis* (suínos) e *S. Dublin* (bovino); (2) *Salmonellas* muito adaptadas aos seres humanos, exemplo, *S.*

Thyphi e *S. Paratyphi* causadoras da febre entérica e (3) *Salmonellas* zoonóticas, que são as que contém os sorovares que afetam homem e animal (RODRIGUES, 2011).

As *Salmonellas* podem se multiplicar de várias maneiras, seja por divisão celular simples, ou por transferência vertical do material genético, em que o micro-organismo transfere seu material genético à sua progênie, bem como a transferência horizontal, que consiste em um micro-organismo adquirir material genético de outro, sem haver a necessidade de serem do mesmo gênero, espécie e geração (BAUMAN et al., 2012). Estudos sugerem que a aquisição por transferência horizontal é responsável por cerca de 25% do genoma das *Salmonellas* patogênicas (PORWOLLIK; McCLELLAND, 2003). Além disso, a aquisição de material genético por essas bactérias pode ser via transferência de plasmídeos, transpósons e bacteriófagos (NORDMANN; POIREL, 2005)

Existem genes relacionados à sobrevivência, que determinam a aquisição de nutrientes e respiração das bactérias, e aqueles genes relacionados à virulência, que propiciam às bactérias condições de competição, caracterizando como vantagens evolutivas, como por exemplo, resistência a antimicrobianos e enterotoxinas (LANGRIDGE et al., 2009).

A *Salmonella* possui genes de virulência oriundos de transferência vertical localizados em ilhas de patogenicidade, que garantem genes relacionados a adesão das bactérias no hospedeiro, invasão e sobrevivência no meio intracelular bem como estratégias evasivas ao sistema imunológico (FORTES et al., 2012). Apesar do genoma da *Salmonella* ter sido inteiro sequenciado, alguns genes ainda possuem função desconhecida.

Normalmente *Salmonellas* são encontradas no trato gastrointestinal dos animais, o que torna a transmissão oro-fecal a mais importante. A bactéria pode estar presente no ambiente, na água e em alimentos, particularmente, naqueles de origem avícola (CORCORAN, 2013, CDC, 2015). Carnes, ovos e derivados podem conter a bactéria devido a vários fatores, dentre eles, ruptura intestinal na cadeia de abate, contaminação na incubação ou manipulação dos ovos, contaminação transovariana, e ainda contato com superfícies contaminadas (biofilmes) (BERCHIERI et al., 2001; CORCORAN, 2013).

Salmonella pode ser responsável por um quadro clínico em humanos de diarreia severa, dores abdominais, náusea e febre que pode perdurar por 2 a 7 dias. Normalmente é uma infecção auto limitante, em que não se faz necessário o uso de antibióticos, apenas tratamento suporte com hidroterapia (EFSA, 2014; CDC, 2015).

A maioria dos casos no mundo de intoxicações por alimentos contendo bactérias estão relacionados ao gênero *Salmonella*. Os EUA tiveram 1,2 milhões de toxinfecções causadas por *Salmonella*, ocasionando cerca de 19 mil hospitalizações e 380 mortes por ano (CDC, 2015).

Há uma estimativa de que a cada ano nos EUA, 31 patógenos são responsáveis por 37,2 milhões de casos de doenças, e que a fonte de 9,1 milhões dos casos são alimentos. Destes, 59% são causados por vírus, 39% por bactérias, sendo que 11% seria por *Salmonella* spp. e 2% por parasitas (SCALLAN, 2011).

Em território brasileiro foram identificadas 2,7% das carcaças de aves positivas para *Salmonella* em 2011, sendo que o sorovar prevalente foi Enteritidis (48%), seguido de Infantis (7,6%), Thyphimurium (7,2%) e Heidelberg (6,4%) (MEDEIROS et al., 2011). Em 2015 encontraram-se 50 sorotipos de *Salmonella* em frangos de corte no Brasil. Sendo que, o mais frequente foi Minnesota (40,2%), em segundo, Infantis (14,63%) e por último Heidelberg (7,3%) (VOSS – RECH et. al., 2015). Na região do Paraná, em suabes de arrasto foram detectados mais frequentemente os sorovares Heidelberg, Mbandaka, Newport, Schwarzengrund e Enteritidis (PANDINI et al., 2015).

Em 2016 ocorreu a publicação da Instrução Normativa nº 20 que estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor (BORSOI, 2017).

2.2 Biofilme

2.2.1 Aspectos gerais

Trata-se de uma estrutura contendo micro-organismo sésseis e uma matriz extracelular produzida por eles mesmo. Basicamente a matriz é composta por polissacarídeos e proteínas especializadas aderentes à superfície (DOLAN; COSTERTON, 2002; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014). A produção de um biofilme promove ao micro-organismo proteção ambiental, garantindo a sua sobrevivência, de modo que continua capaz de absorver nutrientes, água, íons, realizar atividades metabólicas e transferir material genético (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Micro-organismos em forma livre são mais sensíveis a desinfecção e ação antimicrobiana do que aqueles em biofilme. Os biofilmes, comparados aos micro-organismos livres, são cem vezes mais resistentes à antibióticos, uma vez que existe a dificuldade do agente transpassar a barreira da matriz extracelular (NICOLAEV; PLAKUNOV, 2007; TOMIHAMA; NISHI; ARAI, 2007). Essa característica dificulta a eliminação de um biofilme no ambiente, mesmo lançando mão de uma lavagem e desinfecção adequadas e frequentes, não há garantia

de eliminação, principalmente quando existem sulcos e rugosidades na superfície, o que contribui para formação de biofilme (MAUKONEN et al., 2003).

O desenvolvimento do biofilme conta com cinco etapas: adesão reversível, adesão irreversível, crescimento do biofilme, maturação do biofilme e o desprendimento das células planctônicas.

Para a adesão reversível ocorrem interações físico-químicas inespecíficas (superfície inorgânicas) ou ligações moleculares do tipo receptor-ligante (superfície orgânica). Esta etapa permite que a lavagem seja competente na remoção de bactérias. Durante a adesão irreversível, os micro-organismos deixam de ligar fracamente a superfície e produzem a matriz polissacarídea, o que torna a ligação à superfície muito resistente. Na fase de maturação, o biofilme é circundado por canais de água, os quais adentram a matriz, garantindo distribuição de nutrientes, água, enzimas, metabólitos e comunicação celular. Finalmente, o biofilme está apto a produzir e liberar células planctônicas e/ou micro colônias, permitindo que ele seja capaz de disseminar a contaminação (BOLES; THOENDEL; SINGH, 2005; TRENTIN GIORDANI; MACEDO, 2013; BOARI et al., 2009). Características físico-químicas do substrato, composição do meio envolvente e condições do micro-organismo, são fatores que podem influenciar na adesão de um micro-organismo a uma superfície. (CHMIELEWSKI; FRAN, 2003).

A comunicação celular que os canais de água garantem é denominada *quorum sensing* (QS), que é regulada por sinais químicos secretados pelas próprias bactérias (BOYEN et al., 2009), e ainda é relacionada a produção de biofilmes em *Salmonella* (YOON; SOFOS, 2008).

Fimbrias e flagelos também são estruturas que facilitam a formação do biofilme. O flagelo garante o movimento e, conseqüentemente, torna-se mais fácil o ato de vencer as forças eletrostáticas que repelem a bactéria da superfície, no momento que se interagem pela primeira vez. As fimbrias, no entanto, colaboram com a adesão entre células bacterianas e moléculas inorgânicas da matriz (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

2.2.2 Biofilme de *Salmonella* e fatores de virulência

Apesar do genoma da *Salmonella* ter sido inteiramente sequenciado, alguns genes ainda possuem função biológica desconhecida. Esta bactéria dota de genes de virulência, que foram adquiridos principalmente por transferência horizontal, que garantem adesão em células do

hospedeiro e/ou superfícies, invasão celular, sobrevivência intracelular e sobretudo evasão do sistema imune (FORTES et al., 2012).

A *Salmonella* pode ser difícil de ser eliminada devido ao fato de ser capaz de formar biofilme. Ela dota de estruturas que facilitam essa formação: fimbrias, polissacarídeos capsulares e lipossacarídeos (LPS) (CORCORAN, 2013).

A capacidade de adesão à célula denota um potencial patogênico à bactéria, que, uma vez aderida dá início as suas atividades patogênicas (GIBSON et al., 2007). Os genes responsáveis pela adesão estão no operon *IpfABCDE*: *IpfA* codifica as fimbrias mais longas, fimbrias longas polares, que são relacionadas ao tropismo que a bactéria possui pelas placas de Peyer do hospedeiro. Além disso, essas fimbrias estão ligadas ao reconhecimento entre diferentes sorovares, o que se nomeia imunidade cruzada (NORRIS; BAUMLER, 1999; OCHOA; RODRÍGUES, 2005). Para a invasão na célula, o gene responsável é o *invA*. É um gene muito comum a todos sorovares de *Salmonella*, foi observado em 100% dos sorovares isolados de alimentos por Rowlands e colaboradores (2014).

Outra fimbria muito importante para esta bactéria é a SEF14, relacionada à sobrevivência da *Salmonella* dentro dos macrófagos, após colonização cecal no hospedeiro e está relacionada as etapas seguintes da infecção. Esta fimbria é formada graças a ação do operon *sefABCD*, em que cada gene terá uma função no processo de formação da fimbria: A, codifica a subunidade da proteína *sefA* que compõe a fimbria; B, atua na formação da membrana externa; C, condiciona o maior componente da fimbria e D, formação de uma adesina (MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008).

Dentre as fimbrias, outras que possuem grande importância são as fimbrias Tafi (Thin aggregative Fimbriae) são codificadas pelo operon *agf*, presente na maioria dos sorovares de *Salmonella*. Essas fimbrias estão relacionadas a interação inicial entre bactéria e hospedeiro. Além disso, as fimbrias agregativas fazem a auto-agregação das *Salmonellas*, diminuindo a superfície de contato e garantindo maior proteção a antimicrobianos (WHITE et al., 2003; GIBSON et al., 2007).

Fimbrias Curli são componentes da matriz expolissacarídeos (EPS) e são estruturas muito finas (ROMLING, et al., 1998), são expressadas pelo gene *csgD*, organizado em dois operons *csgBAC* e *csgDEFG* (GERSTEL; ROMLING, 2003). Essas fimbrias são relacionadas a produção de biofilme, invasão de hospedeiro, colonização, contato com outras bactérias e motilidade (STEENACKERS et al., 2012).

Uma molécula importante para formação do biofilme é a celulose, juntamente com as fimbrias Curli, forma a matriz do biofilme (GERSTEL; ROMLING, 2003). Composta por

glicoses, sua expressão é mediada pelos genes *adrA* e *csgD* (SOLANO et al., 2002; ROMLING et al., 2003).

A formação de biofilmes é dependente dos lipossacarídeos capsulares, a deleção dos genes associados a eles culmina na redução ou até a perda da capacidade de formação de biofilmes. Além disso, lipossacarídeos capsulares facilitam a permanência da bactéria no ambiente e a formação de biofilme (KIM; WEI, 2009; CORCORAN, 2013).

Para o estabelecimento do sistema *quorum sensing* é necessário a enzima LuxS, codificada pelo gene *luxS*, esta enzima vai atuar diretamente neste sistema de comunicação entre as células componentes do biofilme (HARDIE; HEURLIER, 2008).

Além disso, outro fator de virulência das *Salmonellas* é a conversão dos radicais de superóxido em oxigênio e peróxido de oxigênio fora da célula bacteriana. Essa conversão é mediada pela enzima SOD (superóxido-dismutase), que por sua vez é codificada pelo gene *sodC* (KROLL et al., 1995; BATTISTONI, 2003).

2.3 Controle de micro-organismos e biofilmes

No decorrer do século 20 o uso de antimicrobianos foi de suma importância para a redução de mortes causadas por infecções (HUH; KWON, 2011). Ultimamente, tem-se visto que o uso exacerbado das substâncias é capaz de auxiliar na criação de resistência por parte dos micro-organismos, resultando em ineficácia do tratamento com antibióticos em casos que antes eram assim resolvidos, resultando em um problema de saúde pública (SIRELKHATIM et al., 2015).

A fim de atingir uma maior segurança alimentar, é imprescindível que medidas para combate e prevenção de biofilmes sejam tomadas (SREY, et al., 2013). Para tal, a ação mecânica sobre os biofilmes é muito eficiente, uma vez que ela é capaz de desestruturar a matriz do biofilme de modo que os micro-organismos fiquem expostos (MAUKONEN et al., 2003). Esta organização das bactérias dentro de uma matriz polimérica, configura ao micro-organismo resistência à desinfetantes e dificulta o alcance dos antimicrobianos (ZIECH et al., 2016).

Uma desinfecção tem por objetivo reduzir ao máximo a carga de micro-organismos patogênicos do ambiente. Para conseguir sucesso, deve ser feita após uma limpeza das superfícies lançando mão de produtos alcalinos ou tensoativos, que irá remover a matéria orgânica, atuando no emulsionamento das gorduras, desnaturação proteica e dissolvimento de resíduos orgânicos (MAUKONEN et al., 2003; SREY et al., 2013).

Para ser considerado um desinfetante ideal, este requer eficácia na eliminação do micro-organismo, segurança ao manipulador, facilidade no uso, a não interferência no produto final do consumidor e sobretudo deve ser removido facilmente com água. Geralmente, após uma limpeza malfeita, os desinfetantes não são eficazes contra biofilmes, devido à dificuldade de penetração na sua matriz (SIMÕES et al., 2006). A combinação de uma temperatura elevada durante a desinfecção diminui a intensidade da força mecânica necessária (MAUKONEN et al., 2003; SREY et al., 2013).

O ácido peracético é um agente químico originado da mistura de peróxido de hidrogênio e de ácido acético (PEREIRA, 2015). É um agente oxidante que desnatura proteínas rompendo a membrana celular, e possui amplo espectro de atuação, incluindo micobactérias e esporos bacterianos (SALLE, 2009; BARAH, 2013). Além disso, inativa as bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como os fungos (STOPIGLIA et. al., 2011). Não diferente dos outros desinfetantes, sua ação contra biofilmes é questionada (WESSELS et al., 2013). Apesar de seu custo ser elevado, a dose utilizada é baixa, com isso torna-se viável sua utilização (KITIS, 2004).

Dentro da avicultura, um dos mais significativos desinfetantes usados foi o formaldeído, tanto na desinfecção de ovos pós postura, como também nos processos de incubação (STEINLAGE et al., 2002). Consiste de um gás, geralmente utilizados em solução de 37% de massa e contendo de 1 a 3% de metanol, agindo na prevenção à polimerização das moléculas. É um composto incolor, apresenta odor irritativo e é miscível em água (FREITAS, 2007). É um desinfetante de amplo espectro contra micro-organismos, inclusive possui ação contra vírus. Contudo, nos últimos anos seu uso tornou-se restrito devido seu potencial cancerígeno, cedendo espaço para desinfetantes menos agressivos aos manipuladores (MORGULIS; SPINOSA, 2005).

Como nova alternativa para controle de micro-organismos surge a utilização de nanopartículas. O fato de serem estáveis em temperaturas e pressão elevadas, serem capazes de penetrarem a matriz do biofilme, possuírem a capacidade de inativação e sobretudo o não prejuízo às células humanas, tornam, as nanopartículas, desinfetantes promissores (COSTA et al., 2011; LU et al., 2012). Este cenário conta com alguns potenciais elementos bactericidas no intuito de minimizar os efeitos da resistência bacteriana. Como exemplo, óxido de zinco, óxidos de prata e óxido de titânio (DASTJEDI; MONTAZER, 2010).

2.4 Nanopartículas

Avanços tecnológicos nos anos 80, como a evolução da ciência *cluster* e a invenção do microscópio de tunelamento, propiciaram o aceleraram o desenvolvimento da nanotecnologia e o uso de nanomateriais em várias áreas (PAN; XING, 2008).

Nanomateriais possuem tamanho muito reduzido, são bem menores que muitas células animais, o que possibilita a entrada no meio intracelular, favorecendo diversas aplicações tecnológicas (RASMUSSEN et al., 2010).

O fato de possuir tamanho reduzido faz com que uma partícula tenha seus átomos em maiores proporções na superfície, ou seja, comparado à partícula maiores, as nanopartículas possuem maior superfície por unidade de massa do que partículas maiores. Uma vez que as reações químicas acontecem na superfície de partículas, as nanopartículas são bem mais reativas que partículas maiores (GUOZHONG, 2004; GOGOTSI, 2006).

Nos últimos 10 anos tem-se observado aumento nas pesquisas acadêmicas envolvendo nanotecnologia e produção de nanopartículas, por dotarem de ação bactericida, ópticas, catalíticas eletrônicas e magnéticas (SIFONES, 2010). Nanopartículas tem destaque em diversas áreas: computacional, médicas, alimentícia, mecatrônica, toxicológica, entre outras (PAN; XING, 2008).

Apesar de ser uma tecnologia relativamente recente, está empregada em diversos produtos. Fármacos encapsulados em nanopartículas são capazes de transportar a droga ao local específico e realizar sua liberação controlada. Semelhantemente, em tratamentos quimioterápicos as nanopartículas garantem que o fármaco atinja o alvo diretamente, poupando o paciente de efeitos colaterais (GAUI, 2016; BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Existem dois métodos para a síntese de nanopartículas, um físico (*top - down*) e outro químico (*bottom - up*). O método físico consiste em obter, a partir de um material maior, a nano partícula, através de moagem, decomposição térmica e irradiação. Já o método químico realiza a agregação de moléculas e ions (que são menores que as nanopartículas), e desta junção tem-se os nanomateriais como resultado (HABIBA et al., 2014). Estas metodologias distintas para a formação dos nanomateriais asseguram o controle em forma, tamanho e estrutura cristalina dos mesmos, o que garante diferenças em suas propriedades físicas e funcionais. O controle do tamanho geralmente é feito em escala nanométricas, menores que células humanas ($\sim 7 \mu\text{M}$), o que favorece a entrada e disponibilidade de fármacos, e também o reconhecimento de proteínas específicas (BHATTACHARYYA et al., 2009).

As nanopartículas metálicas e seus óxidos, especialmente, são eficientes no controle de micro-organismos. Devido seu tamanho nanométrico e sua alta relação superfície/volume, seu

poder bactericida é alto, sendo capaz de ser reativas às superfícies dos micro-organismos (GARCIA, 2011; ALLAKER, 2010).

Os antimicrobianos inorgânicos possuem a vantagem de serem mais estáveis do que aqueles orgânicos, como exemplo de inorgânicos naturais pode-se citar: prata, óxido de zinco, selênio, cobre e dióxido de titânio (SONDI, SONDI, 2004; GRUMEZESCU, 2016). A partir da nanotecnologia, diversos nanomateriais a base de prata podem ser formados e utilizados como biocidas (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Para a agregação de nanopartícula metálicas dois métodos são utilizados: dopagem (substituição) ou impregnação do metal (SAHA; WANG; PAL, 2008).

2.4.1 Prata e nanocristais de oxido de prata

Na antiguidade a prata metálica era utilizada como agente bactericida e tratamento de queimaduras, devido à alta eficiência e baixa toxicidade. Com a ascensão da penicilina seu uso foi substituído. Contudo, com o surgimento de resistência bacteriana o uso de prata como bactericida novamente está em pauta (DASTJERDI; MONTAZER, 2010; HUH; KWON, 2011).

Nanopartículas de prata estão sendo amplamente utilizadas em medicamentos e cosméticos. No intuito de divulgar novos produtos relacionados à nanotecnologia a “The nanotech project consumer inventory” listou mais de 1800 produtos que contém prata, sendo que a maioria deles contém nanopartículas como antimicrobiano, sendo aplicados em cosmético, produtos de limpeza, sanitizantes para pele humana, aditivo de curativo, suplementos e outros.

Devido ao fato da prata possuir íons (Ag^+) com uma carga positiva, ocorre uma atração com os micro-organismos carregados negativamente e essa atração eletroestática relaciona-se com a ação inibitória da prata (DIBROV et al., 2002). Sobretudo, a utilização de nanopartículas de prata estáveis é mais segura e possui menores níveis de toxicidade quando comparada aos íons de prata livres (MOHANTY et al., 2011).

Existem outros mecanismos de ação da prata sobre bactérias que estão sendo estudados. A geração de espécies reativas oxidativas nas bactérias, que levam à ruptura da membrana celular (SU et al., 2009), interação direta na parede celular, promovendo rompimento da membrana e extravasamento do conteúdo celular (SMETANA et al., 2008) e deslocamento da

membrana devido oxidação e conseqüentemente extravasamento celular (ASHARANI et al., 2009). Além disso, a prata pode atuar em sinergismo com outras substâncias antimicrobianas, devido aos mecanismos de ação inconclusivos da sua atuação biocida (MOHANTY et al., 2011).

Os óxidos de prata com alta valência de Ag possuem alta capacidade antimicrobiana. Acredita-se que o poder biocida mais elevado dos óxidos de prata seja devido ao fato de estes liberarem mais ions do que nanopartículas unicamente de prata (SHEN, et. al., 2011; CHEN, et. al., 2016; RATTE, 1999).

2.4.2 Óxido de zinco

Por ser considerado um semicondutor, capaz de realizar emissão e absorção da radiação ultravioleta, tem sido empregado em diversos setores, como por exemplo, na indústria farmacêutica, têxtil, eletro-tecnológica, fotocatalise, dentre outras (KOLODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014; SIRELKHATIM, et al., 2015).

Desde que sua produção seja utilizando boas práticas, o óxido de zinco é seguro e possui baixa toxicidade (FDA, 2016; STOIMENOV et al., 2002; FU et al., 2005; ZHANG et al., 2013). Além disso é um agente bactericida capaz de destruir esporos (KARUNAKARAN et al., 2011).

Existem alguns mecanismos de ação possíveis para o ZnO: liberação de íons antimicrobianos, principalmente Zn^{2+} (LI et al., 2011); contato da nanopartícula com a parede celular das bactérias, gerando sua destruição (ZHANG et al., 2007); formação de espécies reativas de oxigênio na superfície do óxido de zinco que são tóxicas para as bactérias (SAWAI, YOSHIKAWA, 2004).

A penetração da nanopartícula de zinco na parede da bactéria pode ser influenciada por suas características estruturais e morfológicas, sendo assim pode desempenhar melhor ou pior papel como agente biocida. Os formatos de bastão (rods) e fios (wires) das nanopartículas de ZnO penetram as paredes bacterianas com maior facilidade que as de formato esférico (YANG et al., 2009). Sobretudo, o tamanho da nanopartícula de ZnO também influencia na sua função biocida, sendo que as maiores possuem pior desempenho, uma vez que as menores possuem mais facilidade de entrar na parede do micro-organismo (ZHANG et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Formação dos nanocristais e cepa avaliada

Os nanocristais de óxido de zinco dopados com prata (ZnO-Ag) foram sintetizados e processados no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), localizado no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

O estudo biológico, realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, consistiu na avaliação da inibição da formação de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg em ovos de perus e no controle das bactérias formadas nesses biofilmes. Os ovos utilizados eram de matriz de peruas em início de produção (aproximadamente 30 semanas) e foram doados por uma grande empresa do setor avícola, da região do Triângulo Mineiro, estado de Minas Gerais. Após a postura esses ovos permaneceram na granja durante aproximadamente 24 horas e foram enviados ao Laboratório no dia seguinte. A cepa utilizada foi advinda de doação da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), estado do Rio de Janeiro, onde foi caracterizada e realizada a tipificação antigênica. A cepa estava armazenada em Ágar Nutriente (AN) (Difco®) e foi reativada em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid®) onde permaneceu incubada a 37° C durante 24 horas. Após tal período, foi semeada em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Merck®), sendo incubada por mais 24 horas a 37° C.

3.2 Avaliação da inibição de diferentes dosagens da dopagem de prata sobre *Salmonella* spp em placa

Para determinação do nível de dopagem de prata que seria utilizada no experimento, foram feitos antibiogramas, como descrito por Bauer e colaboradores (1966), inoculando uma suspensão de bactérias em placas de ágar Mueller Hinton e adicionando discos de papel filtro impregnados com as nanopartículas em três diferentes dosagens de dopagem de prata. Os papéis filtros foram embebidos com 10 µL dos nanocristais de ZnO dopados com três diferentes concentrações de prata (5, 9 e 11) diluídos em água estéril, concentração de 1,4 mG/mL. Em paralelo foi utilizado discos de sulfonamida (300 µg) (LABORCLIN®) como controle. As placas foram incubadas por 20 horas a 37° C. Após a incubação foram analisados o padrão de crescimento ou de inibição ao redor de cada disco, sendo medidos os halos para a determinação do espectro de inibição.

3.3 Biofilme em ovo

3.3.1 Avaliação da eficiência do Óxido de zinco dopado com prata no controle de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg formados em ovos

Um total de 96 ovos foram divididos em seis grupos, sendo cada grupo composto por 16 ovos e cada unidade amostral formada por dois ovos, totalizando 8 repetições. Em dois grupos (G1 e G3) foram realizados a desinfecção antes e depois da formação do biofilme. Nos grupos G2 e G4 a desinfecção foi realizada apenas após a formação do biofilme. Um grupo controle positivo (G5) foi utilizado além do controle negativo (G6). Para formação do biofilme, os ovos foram colocados dois a dois em suspensão de 100 mL de TSB contendo 10^5 UFC/mL de *S. Heidelberg* por um período de 24 horas a 25° C que é o protocolo, proposto por Koopman et. al (2015), para formação de biofilmes de *Salmonella*. No grupo controle negativo, os ovos também permaneceram submersos por 24 horas, porém em TSB estéril sem a presença da bactéria. Após o período de 24 horas os ovos foram lavados por três vezes em água ultrapura, obtida através da autoclavagem de água destilada, para retirada de bactérias livres dos biofilmes. Aguardou-se a secagem dos mesmos para realização dos tratamentos. A identificação dos grupos está descrita abaixo:

-G1: Tratamento com nanopartícula prévia: Duas aspersões de nanopátículas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO-Ag) (dopagem de prata não especificada, patente não depositada), sendo aproximadamente 1,2 mL (1,4 mg/mL) por ovo em cada aplicação. Uma aspersão foi realizada 24 horas antes do contato com as *S. Heidelberg* e outra por 30 minutos após formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-G2: Tratamento com nanopartícula pós formação do biofilme: Aspersão de aproximadamente 1,2 mL (1,4 mg/mL) de nanopátículas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO-Ag) por ovo, na mesma concentração de prata descrita no grupo 1, por 30 minutos após a formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-G3: Tratamento com ácido peracético prévio: Duas aspersões de ácido peracético sendo aproximadamente 1,2 mL de uma solução de 2,5% (25.000 ppm) por ovo. Sendo uma aspersão 24 horas antes do contato com as *S. Heidelberg* e outra aspersão por 30 minutos após a formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-G4: Tratamento com ácido peracético pós formação do biofilme: Aspersão de aproximadamente 1,2mL de uma solução de ácido peracético na concentração de 2,5% (25.000

ppm) por ovo por 30 minutos após a formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-G5 (controle positivo): Aspersão de água ultrapura 24 horas após formação do biofilme e retirada das bactérias livres;

-G6 (controle negativo): Aspersão de água ultrapura 24 horas após imersão em TSB estéril;

Após a desinfecção, os ovos foram abertos em fluxo laminar, separados e coletados assepticamente casca, clara e gema. Foram pesadas duas amostras de 10 gramas de casca de cada unidade amostral para duas análises diferentes realizadas simultaneamente. Um total de 10g da amostra foi adicionada em 90 mL de solução NaCl 0,9%, amplamente homogeneizado e submetido a diluições seriadas para posterior plaqueamento em superfície de ágar TSA para contagem de *Samonella* Heidelberg. Paralelamente foi realizada a avaliação da presença e ausência em que a amostra de 10 gramas foi adicionada de 90 ml de água peptonada (Isofar®) e incubada por 24 horas a 37° C, posteriormente uma alíquota de 1mL dessa foi inoculada em meio de cultura Rappaport (Oxoid®) e 1 mL em meio de cultura Tetrionato (Merck®), após crescimento de 24 horas ambos foram esgotados em XLD. As colônias com características morfológicas de *Salmonella* foram selecionadas e três a cinco UFC por placa foram transferidas para tubos contendo tríplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C/24h. As culturas em TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidas a reação de PCR. Os mesmos procedimentos para avaliação de presença ou ausência de *Salmonellas* em casca foram utilizadas para albúmen e gema, sendo um total de 1 mL de cada unidade amostral de albúmen e vitelo, separadamente, pré-enriquecida por 24 horas em BHI.

3.4 Confirmação das espécies por PCR

A partir das colônias com características típicas de *Salmonella* crescidas em ágar XLD, dos cultivos de cascas, claras e gemas, citado no item anterior, foram realizadas PCR avaliando a presença do gene ompC (204PB ATCGCTGACTTATGCAATCG CGGGTTGCGTTATAGGTCTG) (ALVAREZ, et. al., 2004) para identificação da espécie. As cepas foram repicadas em BHI e mantidas a 37° C por 24 horas, então uma alíquota de 1mL foi utilizada para a extração do DNA genômico. Esse procedimento foi realizado por meio de Kit disponível comercialmente (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação do DNA foi feita pelo aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 260nm, observando a relação 260/280 a fim

de verificar a integridade do DNA (relação entre 1,8-2,0). Para a identificação dos genes específicos, o preparo da reação PCR constou da utilização de 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1µL DNA a 10ng/µL, 1µL do primer na concentração indicada na tabela 1 e 10,5 µL de água miliQ.

Os microtubos contendo os reagentes da PCR foram transferidos para o termociclador (Eppendorf®) para amplificação, obedecendo aos seguintes ciclos: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, amplificadas em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 57° C por 1 minuto e extensão à 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo das reações foi utilizada a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076. Os produtos amplificados (8µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular, o marcador de 100pb (Invitrogen®). Os géis de agarose (Afllymetrix®) foram corados pela solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz UV, no transiluminador (Loccus Biotecnologia) após 90 minutos de corrida do gel à 100W de potência, 80V de voltagem e 80A de corrente elétrica.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a visualização das biomassas amostras de cascas dos ovos expostos à *Salmonella* Heidelberg, item 3.3.1, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e mantidas refrigeradas (4° C) para posterior preparação para microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada de acordo com Brown et al. (2014) com adaptações. Após 24 horas, as amostras foram lavadas três vezes com tampão PBS, fixadas com tetróxido de ósmio 1% por 2 horas e novamente lavadas três vezes com tampão PBS. A partir de então, as amostras foram desidratadas passando por soluções de etanol em diferentes concentrações (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e três vezes 100%) permanecendo 20 minutos em cada uma delas. As amostras foram secas no Ponto Crítico de Secagem (Critical Drying Point 030, Baltec, Alemanha) tendo como fluido de transição o dióxido de carbono líquido. As amostras de cascas foram revestidas com uma camada de 20 nm de ouro (SCD 050, Baltec, Alemanha) e então visualizadas em MEV VP Zeiss Supra 55 SEM FEG a 5 kV.

3.6 Análise estatística

Para avaliação dos dados foi realizado a retirada dos outliers. Os testes de D'Agostino e Pearson verificou que os dados de contagem bacteriana não eram paramétricos. Logo,

utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a diferença entre percentagens foi utilizado o teste do quiquadrado seguido pelo teste Fisher-Irwin de dois por dois. O programa estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da inibição das nanopartículas de ZnO-Ag pelo método de difusão em disco

Para todos os grupos testados foram incluídos um controle negativo (água ultrapura, veículo das nanopartículas) em que o halo inibitório não se formou. As três concentrações de dopagem de prata testadas apresentaram resultados melhores que a sulfonamida. No entanto, entre as dopagens não houve diferença significativa nos halos de crescimento inibitório para as cepas de *Salmonella* avaliadas. Dessa forma, optou-se por trabalhar com a menor dopagem de prata durante todo o experimento.

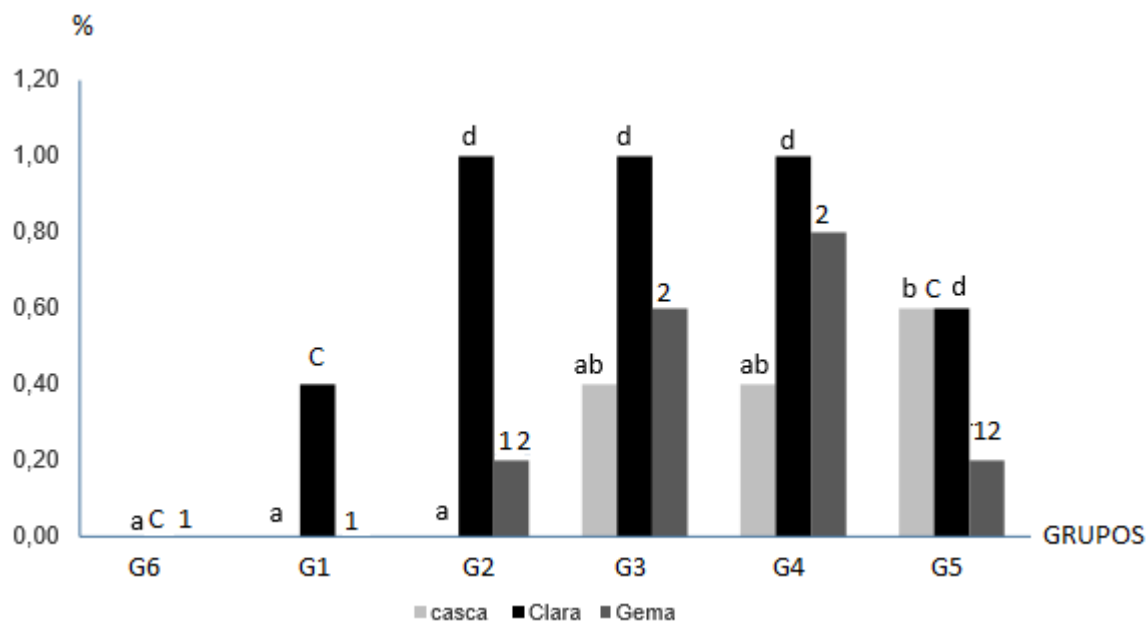
4.2 Nanopartículas (ZnO-Ag) no controle e prevenção de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg formados em cascas de ovos e sua passagem para albúmen e vitelo

Todos os resultados discutidos a partir desse trecho foram confirmados por PCR não deixando dúvidas que a discussão abaixo é sobre a *S. Heidelberg*. Nos ovos dos G1 e G3, não foram identificadas *Salmonellas* na casca e, portanto, não houve formação de biofilmes. No entanto a *S. Heidelberg* foi capaz de atingir o interior do ovo. Os demais tratamentos apresentaram *S. Heidelberg* na casca, como se observa na figura 1.

A presença de *S. Heidelberg* nos albumens foi significativamente menor no grupo 1 em comparação com os demais grupos tratados. Entre os grupos G3, G2 e G4, não houve diferença significativa para invasão de albúmen.

Nas gemas do grupo 1, assim como do grupo controle negativo, não foi identificada a presença de *S. Heidelberg*. Embora tenha sido encontrada a *Salmonella* em vitelos dos ovos dos grupos 3 e controle positivo, eles não diferiram estatisticamente do grupo 1.

Figura 1: Percentual de formação de biofilmes de *S. Heidelberg*, em casca, e passagem de bactérias para clara e gema de ovos submetidos a diferentes tipos de desinfecção em Uberlândia – MG 2017.

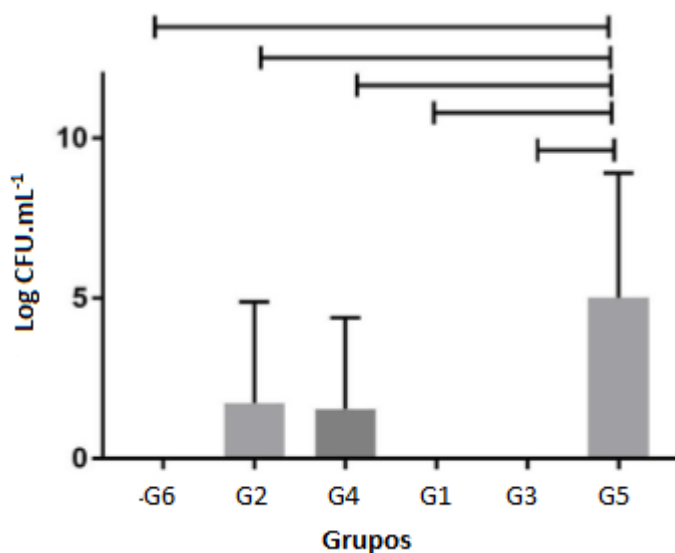


Letras diferentes (a,b) indicam diferenças estatísticas para presença de *S. Heidelberg* nas cascas; Letras diferentes (C,D,E) indicam diferenças estatística para presença de *S. Heidelberg* para claras; Números diferentes (1,2,3) indicam diferenças estatísticas para presença de *S. Heidelberg* nas gemas;

De acordo com Gustin (2003) a *Salmonella* consegue penetrar no conteúdo dos ovos aproximadamente em 24 horas após o contato com a casca, o que corrobora com os resultados observados no estudo dos ovos expostos à *S. Heidelberg*, em que observou-se a presença das bactérias em questão no albúmen e/ou vitelo de todos os grupos expostos, tendo recebido tratamento desinfetante ou não.

Além da percentagem de *Salmonella Heidelberg* presente em casca, clara e gema também foi realizada a contagem dessa bactéria nas cascas dos ovos. A figura 2 mostra esse resultado que, em relação ao controle, os índices a diminuição da contagem bacteriana ocorreu em todos os grupos quando se compara ao controle.

Figura 2: Avaliação da inibição da produção de biofilmes de *S. Heidelberg* em cascas de ovos submetidos a diferentes tipos de desinfecção em Uberlândia – MG



Avaliando-se o processo de inibição da produção de biofilmes das *S. Heidelberg* pelos desinfetantes e o grupo controle positivo, verifica-se que todos os tratamentos realizados reduziram expressivamente o número de micro-organismos presentes nas cascas dos ovos, em comparação ao grupo controle. A realização da desinfecção dos ovos previamente ao contato com a *S. Heidelberg* zerou o número bactérias na casca, tanto com uso de nanopartículas de ZnO-Ag quanto com o uso do ácido peracético (25.000 ppm). No entanto, a passagem da bactéria para o interior do ovo foi menor no G1 comparado ao G3. Isso porque, na clara houve menor percentagem de ovos com a presença da *Salmonella* e a bactéria não atingiu a gema dos ovos do G1 (figura 1) diferente do que ocorreu com G3.

Um fator interessante a ser considerado nos resultados desse trabalho é que em todos os tratamentos após a formação do biofilme a percentagem de ovos positivos na casca, gema e clara eram semelhantes ao controle positivo mesmo com uma quantidade de ácido peracético muito superior ao usada comumente na desinfecção de ovos. O intuito dessa dose alta era criar uma concorrência desleal contra a nanopartícula. Essa informação mostra a ineficiência da desinfecção tardia no controle de biofilmes de *S. Heidelberg*, além de questionar a viabilidade do uso do ácido peracético em ovos.

Os ovos possuem estruturas físicas que, quando íntegras, funcionam como barreiras, dificultando a entrada de micro-organismos: a cutícula é uma camada proteica hidrofóbica que reveste a casca (RUIZ; LUNAM, 2000). No entanto, as cascas de ovos contêm numerosos poros que podem permitir a entrada de micro-organismos (CARDOSO et al., 2001) e sabe-se que a contaminação dos ovos por *Salmonella* ocorre, na maioria das vezes, através da casca (SILVA JUNIOR, 2005).

Os resultados observados nos tratamentos desinfetantes para controle de *S. Heidelberg* em biofilmes em cascas de ovos de perus demonstraram redução expressiva da carga bacteriana nos grupos tratados. É importante destacar aqui que a concentração de ácido peracético utilizada foi muito superior, mais de cem vezes maior, àquelas praticadas nas indústrias avícolas. De forma geral os desinfetantes não conseguem eliminar toda a matriz de biofilmes, sendo necessária uma estratégia mais complexa para tal. Muitas vezes requer associação com atividade mecânica, promovendo a desconfiguração da matriz e assim expondo os micro-organismos. (MAUKONEN et al., 2003; SREY, et al., 2013). Micro-organismos apresentam resistências a desinfetantes claramente associada com a organização das células bacterianas dentro da matriz polimérica e essa organização reduz a penetração dos agentes antimicrobianos ao biofilme (ZIECH et al., 2016).

Outra observação pertinente é que devido as limitações de recursos financeiros é de conhecimento do grupo de pesquisa que as nanopartículas testadas nesse trabalho precisa ser melhoradas ainda (em termos de dispersão, dados não mostrados). Mas o sucesso que se tem tido com as mesmas para controle microbiano é importante para estudos futuros.

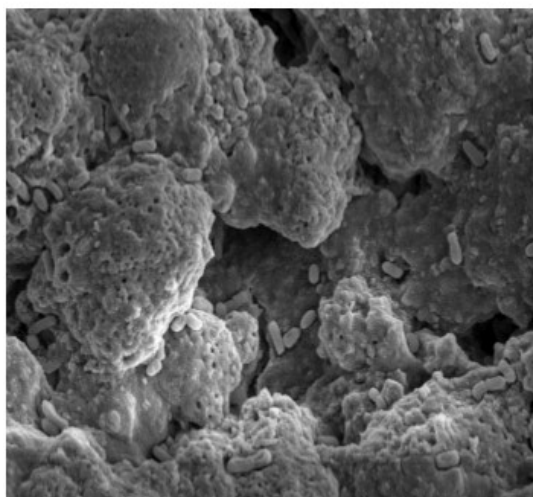
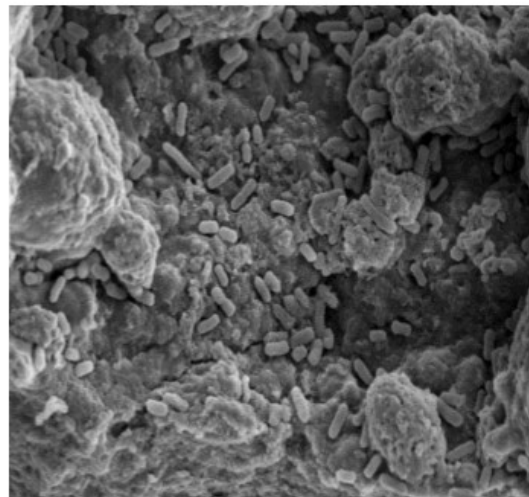
4.3 Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura

A MEV não deixou dúvida sobre a formação dos biofilmes. No grupo controle positivo observou-se com muita facilidade grandes extensões de biomassas em todas as amostras avaliadas com a presença de inúmeras bactérias (figura 3). Em todos os grupos tratados não foram observadas biomassas com tamanha quantidade e facilidade decorrida no grupo controle positivo. Nos grupos que receberam tratamentos prévios ao contato com as *S. Heidelberg*, com nanopartícula de ZnO-Ag ou ácido peracético, observou-se presença esparsa de matriz as quais não eram morfologicamente compatíveis com as observadas no grupo controle positivo. Além disso, não se encontrou bactérias livres em tamanhos e formatos típicos de *Salmonella* como pode ser visto na figura 3G.

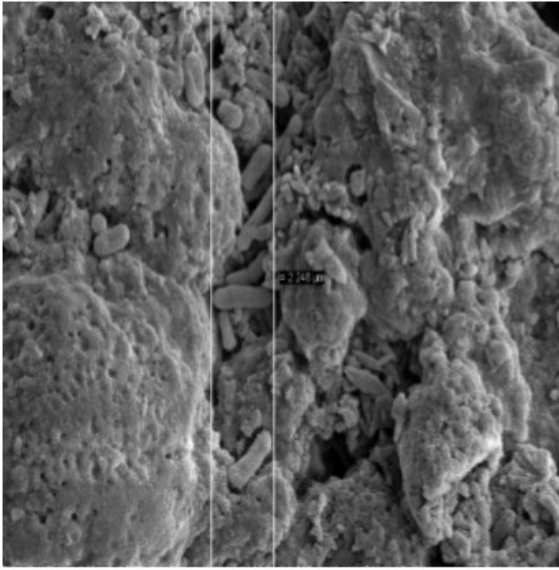
Foram geradas imagens que permitem conhecer um pouco mais das características dos biofilmes de *Salmonellas*, bem como os aspectos físicos das matrizes que compõem as biomassas. No grupo controle positivo foram visualizadas, abundantemente, formações características de biofilmes e um grande número de bactérias livres na superfície desses biofilmes (figura 3: 3A, 3B, 3C, 3D e 3E). Em todos os grupos tratados não foram observadas biomassas com tamanha quantidade e facilidade decorrida no grupo controle positivo. Nos grupos que receberam tratamentos prévios ao contato com as *S. Heidelberg*, com nanopartícula de ZnO-Ag ou ácido peracético, observou-se presença esparsa de matriz e que não eram morfologicamente compatíveis com as observadas no grupo controle. Além disso, não se encontrou bactérias livres em tamanhos e formatos típicos de *Salmonella*. No grupo controle negativo também não visualizou-se estruturas semelhantes às formações observadas no grupo controle positivo. Foram vistos micro-organismos em formatos de bastões, porém mais alongados que as *Salmonellas*, juntos com outros arredondados e uma pequena quantidade de matriz também diferente da observada no controle positivo (figura 3: 3F e 3G).

Nos grupos que receberam tratamentos prévios ao contato com as *S. Heidelberg*, com nanopartícula de ZnO-Ag ou ácido peracético, observou-se presença esparsa de matriz morfologicamente incompatíveis com as observadas no grupo controle positivo. Além disso, não se encontrou bactérias livres em tamanhos e formatos típicos de *Salmonella* como pode ser visto na figura 3G.

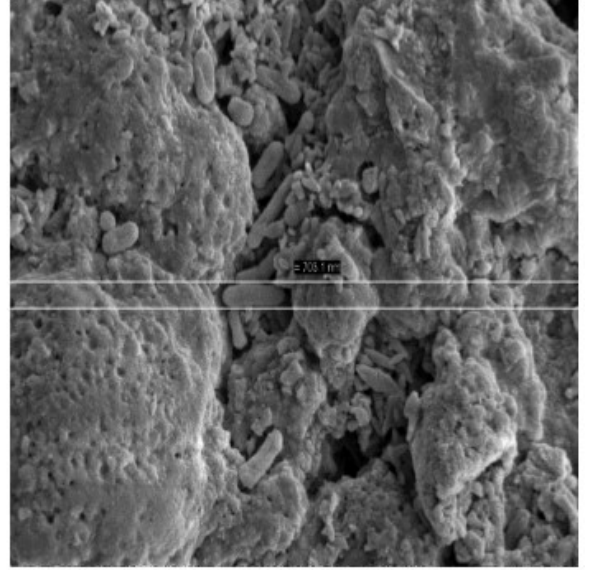
Figura 3: Imagens geradas em MEV a partir de cascas de ovos de perus, submetidos a tratamentos desinfetante ou não e expostas a *S. Heildelbeg* por 24 horas em Uberlândia - MG.

A**B**

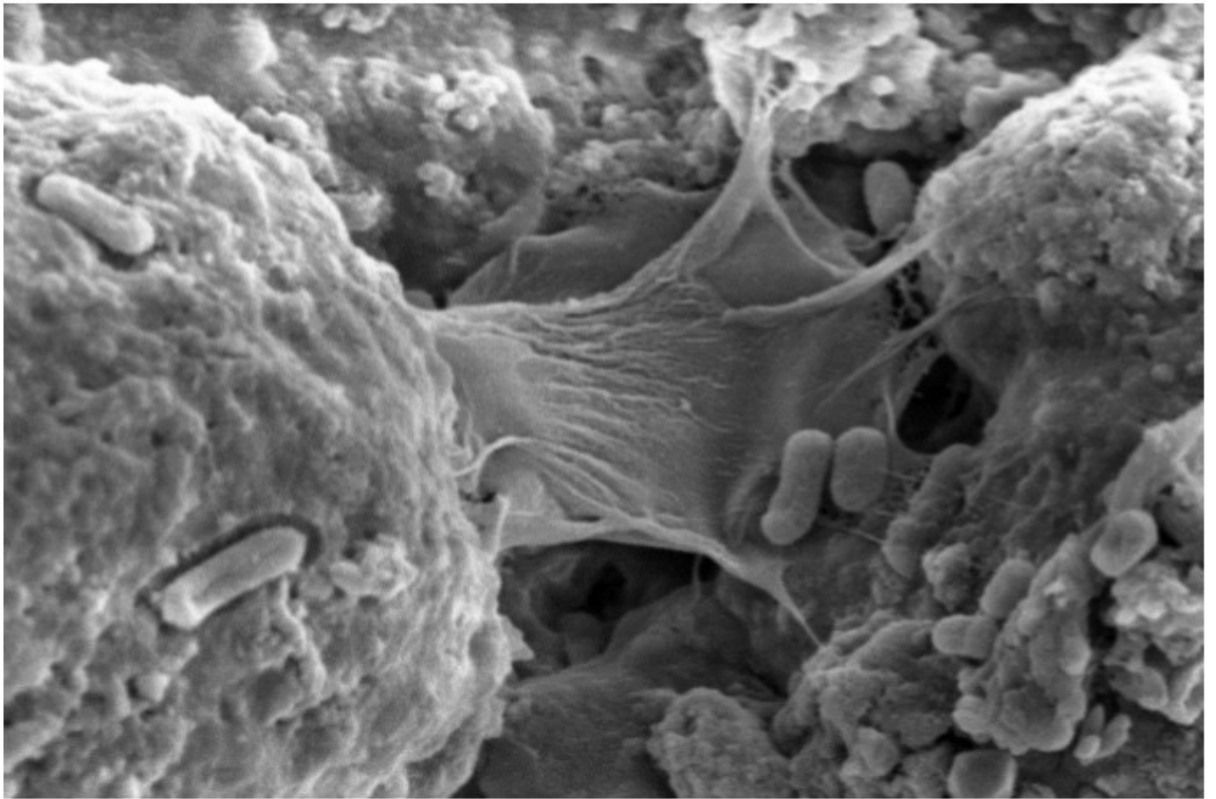
C



D



E



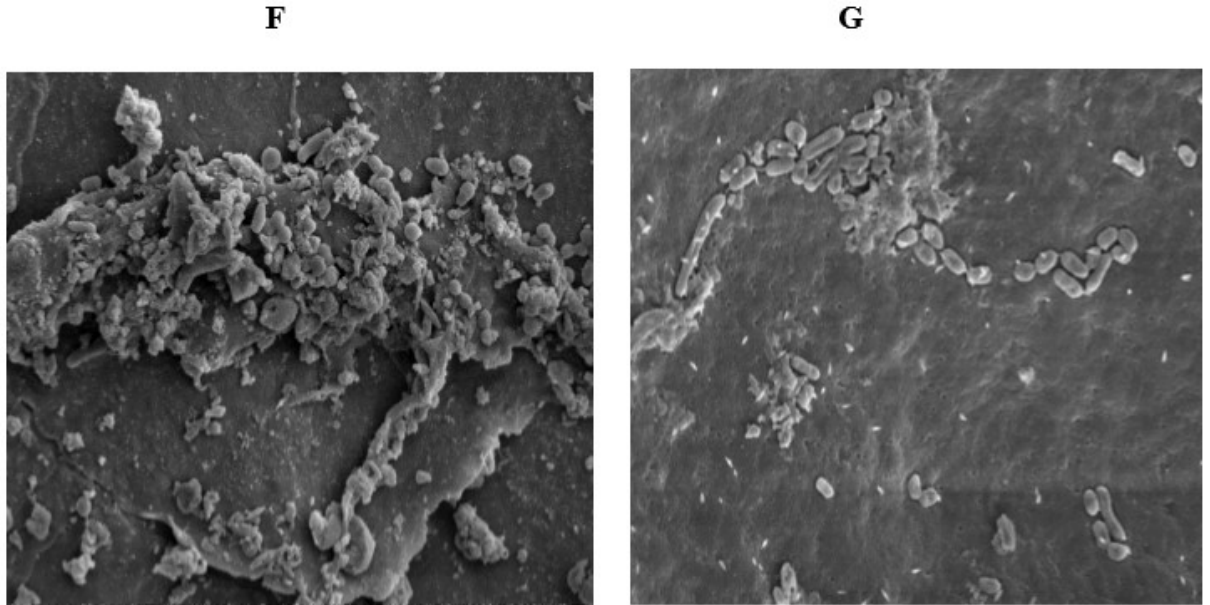


Figura 3A: Formação típica de matriz de biofilme de *Salmonella*, com invasão de bactérias. Figura 3B: Matriz de biofilme de *Salmonella* e grande número de bactérias livres na superfície da mesma. Figura 3C: Biofilme de *Salmonella* e presença de bactérias livres na superfície. Medida de comprimento (2,245 μm) de uma *Salmonella* Heidelberg. Figura 3D: Biofilme de *Salmonella* e presença de bactérias livres na superfície. Medida de largura (703,1 nm) de uma *S. Heidelberg*. Figura 3E: Biofilme de *Salmonella* em etapa de expansão, com visualização das bactérias liberando a matriz. Figura 3F: Estrutura semelhante à matriz de biofilme de *Salmonella*, porém desconfigurada e visualizam-se bactérias em formatos diversos (grupo controle negativo). Figura 3G: Grupo de células em formatos diversos verificadas próximas à matriz desconfigurada observada no grupo controle negativo.

Observando todos os grupos expostos à *Salmonella* Heidelberg verifica-se que, como era esperado, a passagem para o interior do ovo aconteceu alcançando clara e gema. Na clara (albúmen) existem substâncias antimicrobianas (GANTOIS et al., 2009) com elevadas concentrações de ovotransferrina, que tem a função de quelar o ferro, inibindo o crescimento bacteriano, e de lisozimas que são peptídeos catiônicos capazes de promover interação com a camada de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias Gram negativas, promovendo a formação de poros que favorecem o extravasamento de albumina para o citoplasma bacteriano (CLAVIJO et al., 2006). Mas as enzimas do albúmen não foram capazes de controlar a passagem das *Salmonella* testadas.

4 CONCLUSÕES

Salmonella Heidelberg é capaz de formar biofilme na superfície de ovos e o óxido de zinco dopado com prata atua na inibição da sua formação, assim como na entrada da *S. Heidelberg* para o interior do ovo e, sobretudo, diminui a carga bacteriana de *S. Heidelberg* em biofilmes formados. Além disso pode-se concluir que se nanopartículas de ZnO-Ag forem utilizadas antes da chegada da bactéria no ovo a eficácia em controle da *S. Heidelberg* será superior ao ácido peracético.

REFERÊNCIAS

- ABPA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Mercado Mundial de Perus 2014**. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercadomundial/peru>>. Acesso 14 de novembro de 2017.
- ALVAREZ J. et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 4, p. 1734–1738, 2004.
- SANJAY, M.K. et al. Detection, amplification & sequence homology of *sodC* in clinical isolates of *Salmonella* sp. **Indian Journal of Medical Research**. 131:565-570, 2010.
- COLLINSON, K. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.1, p.12-18, 1993.
- HEUZENROEDER, M.W. et al. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. **Rural Industries R&D Corporation**, v.1, p.106, 2000.
- ABPA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2017**. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso 14 de novembro de 2017.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n.11, p. 1175–1186, 2010.
- ASHARANI, P. V. et al., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **American Chemical Society nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2009.
- BARAH, F. Non-Antibiotic Biocides: An Updated Review. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz, Spain: Formatex Research Centre, 2013. p.598-607.
- BATTISTONI, A. Roles of prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutase in pathogenesis. **Biochemical Society Transactions**. v. 31, p. 1326 – 1329, 2003.
- BAUMAN, R. W. et al. (2012) *Microbiology: With diseases by bodysystem.*: 3rd edition, Benjamin Cummings.
- BERCHIERI, A; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C. K.; BARROW, P. A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, v. 30, n. 4, p. 297–310, 2001.
- BERNDT, A. et al. Chicken cecum immune response to *Salmonella* enterica serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.
- BHATTACHARYYA, D. et al. Nanotechnology, Big things from a Tiny World: a Review. International Journal of u- and e- Service, **Science and Technology**, n.3, v. 2, p. 29-37, 2009.
- BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p. 886-895, 2009.
- BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**; v.12, p. 620–636, 2011.

- BOLES, B. R.; THOENDEL, M.; SINGH, P.K. Rhamonolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilm. **Molecular microbiology**, v.57, n. 5, p. 1210-1223, 2005.
- BORSOI, A. Passando a limpo a legislação brasileira sobre o controle de *Salmonella* spp. na avicultura. **Anais do Curso: Atualização sobre *Salmonella* e *Campylobacter* na avicultura industrial**, 2017, 17 – 18 out. Campinas. São Paulo. Brasil. FACTA, 2017.
- BOYEN, F. et al. Quorum sensing in veterinary pathogens; Mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n.3-4, p. 187-195, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos – Relatório 2015**.
- BRENNER, F. W. et al. B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.
- CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descalvado. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 68, n.1, p. 19-22, 2001.
- CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella*. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/Salmonella/index.html>>. Acesso em: 30 outubro 2017.
- CDC. Center for Disease Control. Making food safer to eat: reducing contamination from the farm to the table. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/>>. Acesso em: 30 outubro 2017.
- CHEN, C-C. et al. Synthesis of High Valence Silver-Loaded Mesoporous Silica with Strong Antibacterial Properties. **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 1, p. 99, 2016.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n.1, p. 22-30, 2003.
- CLAVIJO, R.I. et al. Identification of genes associated with survival of *Salmonella* enterica sorovar Enteritidis in chicken egg albumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n.2, p.1055-1064. 2006.
- CORCORAN, M. ***Salmonella* enterica - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces**. 2013. National University of Ireland Galway. Disponível: <<https://aran.library.nuigalway.ie/handle/10379/3515>>
- CORCORAN, M. et al. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella* Enterica biofilms from food contact surface materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.4, p.1507-1514, 2013.
- COSTA, F. et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1431–1440, 2011.
- D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species, in: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers**. Washington: ASM Press, 2007.
- DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.79, n. 1, p. 5-18, 2010.

- DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.79, n. 1, p. 5-18, 2010.
- DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholera*. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668-2670, 2002.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review.**, v.15, n.1, p.167-193, 2002.
- EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella*. 2014. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf>. Acesso em: 30 de outubro 2017.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**; London, v.8, n. 1, p.623-633, 2010.
- FORTES, T.P. et al. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 219-227, 2012.
- FU, L. et al. Beaded Cobalt oxide nanoparticles along carbon nanotubes: towards more highly integrated electronic devices. **Advanced Materials**, v.17, n. 2, p. 217-221, 2005.
- GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**. v.33, n.4, p.718-738.2009.
- GARCIA, M. V. D. Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. 2011. 77f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- GAST, R. K. *Salmonella* infections – Paratyphoid infections in Diseases of Poultry, eds. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne (Ames: Iowa State University Press; Blackwell Publishing), p. 636–655, 2008.
- GAUI, R. Modelagem Matemática e Computacional de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos baseado em Nanoestruturas. **Dissertação** (Mestrado em Processos Industriais). Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2016.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes Bacterianos de Toxinfecções. In: _____. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2008. p.277-356, 2008.
- GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 659–67, 2003.
- GIBSON, D.L. et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Society for General Microbiology Journals**, v.153, n.4, p.1131-1140, 2007.
- GOGOTSI, Y. **Nanomaterials Handbook, manuals**. 2006. Disponível em: <<http://blogs.cimav.edu.mx/daniel.glossman/data/files/Nanotecnolog%C3%ADa/Nanomateriais%20Handbook.pdf>>. Acesso em 14 de novembro 2017
- GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars**. 9th ed. Paris: Institut Pasteur, 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*.
- GRUMEZESCU, A. M. Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials. Cap. 2, p. 29. 2016.

GUIBOURDENCHE M. et al. Supplementt 2003 e 2007 (nº47) to the White-Kauffmann – Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n.1, p. 26-29, 2010.

GUOZHONG, C. Nanostructures and nanomaterials. **Imperial college press**, v.4, n.2, p. 36-42, 2004.

GUSTIN, P.C. Biossegurança no Incubatório. **Manejo da Incubação**. 2º ed. Campinas: Facta p. 297-349, 2003.

HABIBA, K.; MAKAROV, V. I.; WEINER, B. R.; MORELL, G. Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis. **Manufacturing Nanostructures**. 2014. Cap 10, p. 263-292. Disponível: <

<http://www.onecentralpress.com/wpcontent/uploads/2015/01/CHAPTER-10-MF-30-LATEST-NEW.pdf>>.

HUH, A.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v.156, n.2, p. 128-145, 2011.

KARUNAKARAN, C. et al. Optical, electrical, photocatalytic, and bactericidal properties of microwave synthesized nanocrystalline AgZnO and ZnO. **Solid State Sciences**, v. 13, p. 923928, 2011.

KIM, S.-H.; WEI, C.-I. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 on food contact surfaces. **Journal of food protection**, v. 72, n. 9, p. 1841–7, 2009.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, p. 2833-2881, 2014.

KOOPMAN, J.A.; MARSHALL, J.M.; BHATIYA, A.; EGUALE, T.; KWIEK, J.J., GUNN, J.S. Inhibition of *Salmonella enterica* biofilm formation using small-molecule adenosine mimetics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 59:76–84, 2015

KROLL, J. S, LANGFORD, P. R.; WILKS, K. E.; KEIL, A. D. Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all!. **Microbiology**, v.141, n.9, p.2271–2279, 1995.

LANGRIDGE, G. C. et al. Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. **Genome research**, v.19, n.12, p. 2308-2316, 2009.

LI, M. et al Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science & Technology**, v. 45, v.5, p. 1977–1983, 2011.

LOUREIRO, E. C. B. et al. *Salmonella* serovars of human origin identified in Pará state, Brazil from 1991 to 2008. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 1, p. 93-100, 2010.

LU, X. et al. Antimicrobial effect of diallyl sulfide on *Campylobacter jejuni* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1915-1926, 2012.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n.5, p. 1531–1551, 2010.

- MARTÍNEZ, L. C.; VADYVALOO, V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, n. 38, p. 1-15, 2014.
- MAUKONEN, J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, n. 6, p. 327-356, 2003.
- MEDEIROS, M.A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011.
- MIRMOMENI, M.H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the sopE gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.11, p.1497-1501, 2008.
- MOHANTY, S. et al. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.8, n.6, p. 916-924, 2011.
- MORGULIS, M. S. F. A.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos: Desinfetantes. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia Aplicada a Avicultura: Boas Práticas no manejo de Medicamentos**. São Paulo: Editora Rocca Ltda, 2005, Cap. 7. P. 105-113.
- NAVES, P. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method dependent. **Journal Applied Microbiology**, v.105, p.585-590, 2008
- NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm —“City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms. **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 149-163, 2007.
- NORDMANN P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, n.3, p. 463-469, 2005.
- NORRIS, T. L.; BÄUMLER, A. J. Phase variation of the lpf operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, n.23, p.13393-13398, 1999.
- OCHOA, I.M.F.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* sp. **Revista Latino Americana de Microbiología**, v.47, n.1, p.25-42, 2005.
- PAN, B.; XING, B. S. Adsorption Mechanisms of Organic Chemicals on Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n.24, p. 9005-9013, 2008.
- PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n.2, p. 1-6, 2015.
- PEREIRA, Tafaél Lucas de. Avaliação da ação sanitizante do ácido peracético em peças de carne bovina. 2015. 70 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2015.
- PORWOLLIK, S.; McCLELLAND, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v. 5, n.11, p. 977-989, 2003.
- RASMUSSEN, J. W. et al. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.7, n.9, p. 1063–1077, 2010.

- RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a Review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n.1, p. 89–108, 1999.
- RODRIGUES, D.P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: **Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária**. Rio de Janeiro. 2011.
- RÖMLING, U. et al. Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella* typhimurium and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation., v. 180, n. 3, p. 722–731, 1998.
- RÖMLING, U. et al. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International journal of medical microbiology**, v. 293, n. 4, p. 273–85, 2003.
- ROWLANDS, R.E.G. et al. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.56, n.6, p.461-567, 2014.
- RUIZ, J.; LUNAM, C.A. Ultrastructural analysis of the eggshell: contribution of the individual calcified layers and the cuticle to hatchability and egg viability in broiler breeders. **British Poultry Science**, v.41, n.5, p.584-592, 2000.
- SAHA, S.; WANG, J. M.; PAL, A. Nano silver impregnation on commercial TiO₂ and a comparative photocatalytic account to degrade malachite green. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 147-159, 2012.
- SALLE, C. T. P; MORAES, H. L. S. Prevenção de doenças/Manejo profilático/Monitoria. **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: Facta., 17 p. 2009
- SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **Journal Applied Microbiology**, v. 96, n.4, p. 803-809, 2004.
- SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.
- SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment biofilm formation and sensitivity to chlorine. **Food Microbiology**, v.35, n.1, p. 65–72, 2013.
- SHEN, W. et al. Ultrafine silver (II) oxide particles decorated porous ceramic composites for water treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, p. 592-599, 2011.
- SIFONES, A. B. et al., Preparación de nanopartículas de plata em ausência de polímeros estabilizantes. **Química nova**, v.33, n. 6, p.1266-1269, 2010.
- SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação**. Ed. 6, Varela, São Paulo. p. 623, 2005.
- SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants – Evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84. n. 4, p. 338-345, 2006.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, n.4, p. 573-583, 2010.
- SIRELKHATIM, A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-Micro Lett**, v. 7, n.3, p. 219-242, 2015.

- SMETANA, A. B. et al., Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles. **Langmuir**, v.24, n.14, p. 7457-7464, 2008.
- SOLANO, C. et al. Genetic analysis of *Salmonella* enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 3, p.793-808, 2002.
- SONDI, I., SONDI, S. B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n.1, p. 177-182, 2004.
- SPRICIGO, D. A. et al. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.2, n. 4, p. 779-785, 2008.
- SREY, S. et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.
- STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502-31, 2012.
- STEINLAGE, S. J. T.; SANDER, J. E.; WILSON, J. L. Comparison of two formaldehyde administration methods of in ovo-injected eggs. **Anvian Disease**, v. 46, n.4, p. 964-970, 2002.
- STOIMENOV, P. K. et al. Metaloxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, v.18, n.17, p. 6679-6686, 2002.
- STOPIGLIA, C. D. O.; CARISSIMI, M.; SCROFERNEKER, M. L.; FORTES, C. B. B. Microbiological evaluation of peracetic acid for disinfection of acrylic resins . **Revista odontologia e ciência [online]**, v. 26, n.º 3, p. 238-241, 2011.
- SU, H. et al. The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, n. 30, p. 5979-5987, 2009.
- TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n.1, p. 521–4, 2005.
- TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. theae. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 193196, 2007.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v.14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n. 3, p. 433-441, 2015.
- WESSELS, S. et al. Modes of action of three disinfectant active substances: a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.67, n.3, p.456-467, 2013.
- WHITE, A.P. et al. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.18, p.5398-5407, 2003.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Salmonellosis - United States of America, 2016. Disponível em:<<http://www.who.int/csr/don/28-april-2016-salmonellosis-usa/en/>> Acesso em 14 de novembro de 2017.

YANG, H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal Applied Toxicology**, v. 29, n.1, p.69-78, 2009.

YOON, Y.; SOFOS, J. N. Autoinducer-2 activity of gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. **Journal of food Science**, v. 73, n.3, p. 140147, 2008.

ZHANG, L. L. et al. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 3, p. 479-489, 2007.

ZHANG, W. et al. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, p.344–54, 2013.

ZIECH, R. E. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **Food Science and Technology**, v.68, p.85-90, 2016.