

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**PAULA LUIZA ALVES PEREIRA ANDRADA SILVA**

**NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADA COM PRATA:  
ALTERNATIVA PARA CONTROLE DE BIOINDICADORES, PREVENÇÃO DA  
FORMAÇÃO DE BIOFILMES E PASSAGEM DE *Salmonella* spp. PARA O  
INTERIOR DE OVOS DE PERUS**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

PAULA LUIZA ALVES PEREIRA ANDRADA SILVA

NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADA COM PRATA: ALTERNATIVA  
PARA CONTROLE DE BIOINDICADORES, PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE  
BIOFILMES E PASSAGEM DE *Salmonella* spp. PARA O INTERIOR DE OVOS DE  
PERUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal.

Orientador (a): Prof. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca.

UBERLÂNDIA

2017

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

---

S586n  
2017 Silva, Paula Luiza Alves Pereira Andrada, 1990  
Nanopartículas de óxido de zinco dopada com prata: alternativa para controle de bioindicadores, prevenção da formação de biofilmes e passagem de Salmonella spp. para o interior de ovos de perus / Paula Luiza Alves Pereira Andrada Silva. - 2017.  
67 f. : il.

Orientadora: Belchiolina Beatriz Fonseca.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.720>  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Salmonella enteritidis - Teses. 3. Nanotecnologia - Teses. 4. Ovos - Contaminação - Teses. I. Fonseca, Belchiolina Beatriz, 1978. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de Dissertação de MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de mestrado acadêmico nº PPGCV/020/2017

Data: 29/08/2017

Discente: *Paula Luiza Alves Pereira Andrada Silva* – Matrícula – 11512MEV021

Título da Dissertação: **NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADA COM PRATA: ALTERNATIVA PARA CONTROLE DE BIOINDICADORES, PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E PASSAGEM DE *Salmonella* spp PARA O INTERIOR DE OVOS DE PERUS**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: Clínica Médica dos Animais Domésticos

Projeto de Pesquisa de vinculação: EPIDEMIOLOGIA DE ZOOSESES

No dia 29 de Agosto do ano de 2017 às 14:00 horas na sala 2D54, Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores(as)/Doutores(as): **Luiz Ricardo Goulart Filho** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Virginia Leo de Almeida Pereira** – UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE e **Paulo Lourenço da Silva** coorientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Paulo Lourenço da Silva concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para uma exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADA.

Esta defesa de dissertação de mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou os trabalhos às 16 horas e 30 minutos, lavrou esta ata que será assinada por todos os membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 29 de Agosto de 2017.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Profa. Dra. Virginia Leo de Almeida Pereira  
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva  
COORIENTADOR

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus, fonte de amor e serenidade.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser fonte de tudo o que conduz a minha vida. Durante o período de mestrado muitas coisas não aconteceram da forma que eu imaginei que seriam. Por vezes me perguntei se estava no caminho certo e se todo o investimento de tempo e dedicação eram mesmo válidos. Confesso, quis desistir. Mas Deus esteve comigo, me fazendo crer que haveria um novo caminho a cada passo. Confiei e o caminho foi sendo criado e trilhado. Obrigada, Pai amado, por nunca me desamparar.

Aos meus pais por todos os valores e ensinamentos passados. Por me fazerem crer, desde a infância, que o estudo seria a melhor forma de obter um futuro melhor. Agradeço em especial à minha mãe, que mesmo não concordando com as minhas escolhas sempre me amparou e intercedeu por mim. Ao meu pai pelas conversas sempre inspiradoras e pela grande confiança na minha capacidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Bia Fonseca, pelas oportunidades concedidas, pela paciência e dedicação ao meu aprendizado. É inspirador o seu profissionalismo e dedicação. Sou muito grata por me “adotar” no meio do caminho, e mesmo com pouco tempo para desenvolvimento da pesquisa, recursos limitados e inúmeros percalços, permanecer confiante no processo.

Ao Prof. Dr. Paulo Lourenço, por ter me aceitado como orientada e ter contribuído com a minha formação. O admiro e respeito muito, como pessoa e profissional.

À Profa. Dra. Daise, por ter concedido, com toda boa vontade, espaço para execução do trabalho e tudo mais que fosse possível. Foi ótimo poder conhecê-la e conviver um pouco mais, meu respeito e admiração só aumentaram.

Às Dras. Roberta e Eliane, por terem sido como coorientadoras para mim! Sempre com muita boa vontade e disposição...aprendi muito com vocês! Grata pelas muitas ideias, ensinamentos e ajuda. Muito obrigada!

Aos companheiros de jornada, em especial ao Otávio e Phelipe, que foram parceiros em noites e finais de semana em muitas etapas do experimento. Agradeço também à Thaís, Priscila, Aline, Pedro e Wesley pela valiosa ajuda.

Aos queridos do LABIO, Marcelo, Guilherme, Francesca, Silvia e Renata, por compartilharem tantos conhecimentos e práticas, sou muito grata. Especialmente ao Marcelo, que muito me ajudava, autoclavando materiais, enxaguando...sempre com boa vontade e alegria e ao Guilherme pelas muitas conversas, que tanto me ajudaram. Muito obrigada, não somente pela ajuda de todos, mas pela amizade de vocês.

Ao Prof. Dr. Marcelo Belleti, por toda a disponibilidade, ideias e conhecimentos passados.

Aos técnicos do setor de microscopia confocal e eletrônica, Mariani, Rafael e Roseane, por toda ajuda no processamento e análise das amostras.

Ao Alexandre, técnico do laboratório de inspeção de leite, pela imensa ajuda com a preparação de materiais e também pela descontração e apoio em momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo, pelas ideias, concessão de matérias e por aceitar o convite para participar da banca.

Aos professores e funcionários da UFU, por estarem sempre dispostos a ensinar e ajudar.

À Profa. Dra. Kênia, que é professora, orientadora, amiga e guia. Muito obrigada por todas as conversas e conselhos, aprendo e me inspiro muito com você.

Ao meu irmão, Mark, e à minha cunhada, Laura, por compartilharem momentos e torcerem sempre por mim.

Ao Pedro, pelo carinho, amparo e motivação em todos os momentos, principalmente naqueles de maiores incertezas e dificuldades. Agradeço também por sempre orar e interceder por mim, isso é muito precioso e jamais será esquecido.

Aos meus alunos, do curso de Auxiliar de Veterinário, por me fazerem ver o quanto é mágico compartilhar o conhecimento e me motivarem a seguir a carreira acadêmica.

Aos meus amigos, Giovanna, Anaís, Fernanda e Gustavo, pela amizade, companheirismo e apoio sempre poderoso. À Gi também pela ótima contribuição no texto!

Às queridas amigas Marina, Laíse e Isis, por sempre apoiarem e serem suporte, nas alegrias e dificuldades.

À minha avó, tios (as), primos (as) e demais familiares e amigos, agradeço a torcida.

À CAPES pelo suporte financeiro durante o período do mestrado.

À empresa que concedeu os ovos utilizados na pesquisa e a todos os funcionários que foram muito solícitos, especialmente a Paulinha Braga.

À Profa. Dra. Virginia Léo por se disponibilizar e aceitar o convite de participar da banca.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, que torceram, deram palavras amigas e de incentivo, muito obrigada! Estive cercada de pessoas maravilhosas, sem as quais não teria conseguido concluir mais essa etapa! Muito obrigada!

*“Porque a sua ira dura só um momento; no seu favor está a vida. O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã.” Salmos 30:5*

## RESUMO

*Salmonella* spp. é frequentemente associada a casos de infecções em humanos no mundo todo. O consumo de alimentos contaminados, destacando os produtos de origem avícola (carne e ovos), são os mais associados a esses casos. Controlar a presença de *Salmonella* spp. e de outros micro-organismos na produção avícola é um desafio, principalmente devido à capacidade de produzir biofilmes. Nesse contexto, a nanotecnologia, com o desenvolvimento de nanopartículas surge com novas possibilidades de controle e prevenção de contaminações. No presente trabalho objetivou-se avaliar nanopartículas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO-Ag) no controle de micro-organismos bioindicadores, prevenção da formação de biofilmes e da passagem de *Salmonella* spp. para o interior de ovos de perus. Observou-se efetividade da ação biocida da nanopartícula no controle de micro-organismos indicadores (mesófilas, coliformes totais, *Escherichia coli* e bolores/leveduras), redução na carga contaminante de *S. Enteritidis* em biofilmes em cascas de ovos e inibição da formação de biofilmes de *S. Heidelberg* em ovos tratados com a nanopartícula previamente à contaminação com a bactéria. Também foi verificado comportamento diverso entre diferentes sorovares de *Salmonella* spp. para características de adesão e formação de biofilmes. Ainda foram geradas imagens, em microscopia Confocal e eletrônica de varredura, que permitiram observar características rugosa da estrutura da casca de ovos de perus e evidenciar a não interferência da nanopartícula de óxido de zinco dopada com prata na superfície das cascas dos ovos de perus. Os resultados de efetividade das nanopartículas de ZnO-Ag no controle de micro-organismos bioindicadores e de *Salmonella* spp., além da redução na contaminação de ovos e menor passagem de *Salmonella* spp. para o interior dos ovos, apresentam a nanopartícula de ZnO-Ag como potencial substância para uso na avicultura. No entanto, são necessários resultados que evidenciem a segurança toxicológica do uso da mesma e a determinação precisa de doses e concentrações efetivas.

**Palavras chave:** Nanotecnologia. *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella* Heidelberg.

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. is often associated with cases of human infections worldwide. The consumption of contaminated foods, especially products of poultry origin (meat and eggs), are the most associated with these cases. Control the presence of *Salmonella* spp. and other microorganisms in poultry production is a challenge, mainly due to the ability to produce biofilms. In this context, nanotechnology with the development of nanoparticles appears with new possibilities of control and prevention of contaminations. The objective of this study was to evaluate silver-doped zinc oxide (ZnO-Ag) nanoparticles in the control of bioindicator microorganisms, the prevention of biofilm formation and the passage of *Salmonella* spp. to the inside of turkey eggs. Effect of the biocidal action of the nanoparticle on the control of indicator microorganisms (mesophiles, total coliforms, *Escherichia coli* and molds / yeasts), reduction of the contaminating load of *S. Enteritidis* on biofilms in egg shells and inhibition of biofilm formation of *S. Heidelberg* in eggs treated with the nanoparticle prior to contamination with the bacterium. It was also verified diverse behavior among different serovars of *Salmonella* spp. for adhesion characteristics and formation of biofilms. Still images were generated in Confocal microscopy and scanning electron, which allowed to observe rough characteristics of the turkey egg shell structure and to show the non - interference of silver - doped zinc oxide nanoparticle on the surface of the eggshells of turkeys. The results of the ZnO-Ag nanoparticles in the control of bioindicators and *Salmonella* spp., in addition to the reduction in egg contamination and lower passage of *Salmonella* spp. to the interior of the eggs, present the ZnO-Ag nanoparticle as a potential substance for use in poultry farming. However, results are needed to demonstrate the toxicological safety of its use and the precise determination of effective doses and concentrations.

**Keywords:** Nanotechnology. *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella* Heidelberg.

## Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 Características <i>Salmonella</i> spp. ....	14
2.2 Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp.....	16
2.3 Biofilme .....	17
2.3.1 Aspectos gerais.....	17
2.3.2 Biofilmes de <i>Salmonella</i> spp. e fatores de virulência.....	19
2.4 Controle de micro-organismos e biofilmes.....	21
2.5 Nanopartículas.....	23
2.5.1 Prata e nanopartículas de óxido de prata .....	25
2.5.2 Óxido de zinco.....	26
3. Material e Métodos.....	28
3.1 Formação das nanopartículas e cepas avaliadas .....	28
3.2 Avaliação da inibição de diferentes dosagens da dopagem de prata sobre <i>Salmonella</i> spp em placa.....	29
3.3 Avaliação da inibição de micro-organismos biocidas em ovos embrionados de perus	29
3.4 Formação de biofilme em placas de poliestireno .....	30
3.4.1 Teste da Adesão e quantificação da formação de biofilmes .....	31
3.4.2 Teste qualitativo da formação de biofilmes .....	31
3.5 Biofilme em ovo .....	31
3.5.1 Avaliação da eficiência do Óxido de zinco dopado em prata no controle de biofilmes de <i>Salmonella</i> Enteritidis formados em ovos .....	32
3.5.2 Avaliação da eficiência do Óxido de zinco dopado com prata no controle de biofilmes de <i>Salmonella</i> Heidelberg formados em ovos.....	33
3.6 Confirmação das espécies e identificação de genes de virulência .....	34
3.7 Avaliação dos poros das cascas dos ovos testados para nanopartículas em <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	36
3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
3.9 Análise Estatística .....	36
4. Resultados .....	38
4.1 Análise da inibição das nanopartículas de ZnO-Ag pelo método de difusão em disco .....	38
4.2 Avaliação nos ovos embrionados .....	38
4.3 Avaliação de biofilme.....	39

4.3.1 Habilidade de aderir em poliestireno .....	39
4.3.2 Classificação e quantificação dos biofilmes de <i>Salmonella</i> em placas .....	40
4.3.3 Diferença entre número de bactérias do inóculo inicial, adesão e biofilme .....	41
4.4 Nanopartículas (ZnO-Ag) no controle de biofilmes de <i>Salmonella</i> Enteritidis formados em cascas de ovos e sua passagem para clara e gema .....	43
4.5 Nanopartículas (ZnO-Ag) no controle e prevenção de biofilmes de <i>Salmonella</i> Heidelberg formados em cascas de ovos e sua passagem para clara e gema .....	44
4.6 Avaliação das espécies e genes de virulência.....	46
4.7 Poros e rugosidades das cascas dos ovos .....	46
4.8 Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
5. Discussão .....	51
6. Considerações finais.....	57
REFERÊNCIAS .....	58

## 1. Introdução

O controle de micro-organismos é pauta essencial na avicultura. A *Salmonella* spp. está dentre os agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns em todo o mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO), inclusive no Brasil (BRASIL, 2015; WHO, 2016). Os produtos de origem avícola, constituem os principais responsáveis por ocorrências de surtos de salmoneloses, sendo associados a cerca de 47% das infecções em humanos (CDC, 2016). Além da *Salmonella* spp., outros microrganismos patogênicos para as aves, embriões ou seres humanos geram perdas para a indústria e para saúde pública. O Brasil como segundo maior produtor, primeiro exportador de carne de frangos e terceiro maior exportador de perus do mundo (ABPA, 2014; ABPA, 2017) tem o dever de cumprir as normas estabelecidas pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelos países importadores no controle da *Salmonella* spp. e de outros microrganismos.

Vários são os métodos para o controle e prevenção de *Salmonella* spp. e outros micro-organismos encontrados no campo e em indústrias. Sem dúvidas um controle efetivo dos ovos embrionados torna-se crucial para evitar a passagem de bactérias presentes em granjas de reprodutoras para a progênie, evitando assim perdas embrionárias, infecção dos lotes de perus e frangos no campo, contaminação do produto final e por consequência, maior segurança para saúde dos consumidores e menor prejuízo econômico.

A desinfecção de ovos após a postura é feita com diferentes tipos de desinfetantes dentre eles o formol, cujo uso atualmente é restrito, e o ácido peracético que tem sido o usual. Produtos que sejam mais efetivos no controle de micro-organismos, não exponham as pessoas, animais e meio ambiente a riscos, e que apresentem um custo viável surgem como possíveis estratégias de aplicação na avicultura. Nesse contexto pode-se citar as nanopartículas que devido ao pequeno tamanho e elevada relação entre superfície e volume, as nanopartículas são potenciais agentes biocidas, capazes de realizar interações íntimas com as membranas de micro-organismos (ALLAKER, 2010). Por serem estáveis mesmo em temperatura e pressão elevadas, conseguirem atravessar a matriz dos biofilmes, possuírem potencial inativador e praticamente não apresentarem efeitos sobre células humanas, são vistas como promissoras (COSTA et al., 2011; LU et al., 2012).

Com a finalidade de se manter e sobreviver 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). A formação de biofilmes é uma grande preocupação, pois a capacidade de permanecer em ambientes, resistindo a sanitizantes e antimicrobianos, permite a existência de uma constante fonte de micro-organismos, favorecendo a veiculação de patógenos nas cadeias produtivas e, conseqüentemente, nos alimentos (SCHLISSELBERG; YARON, 2013).

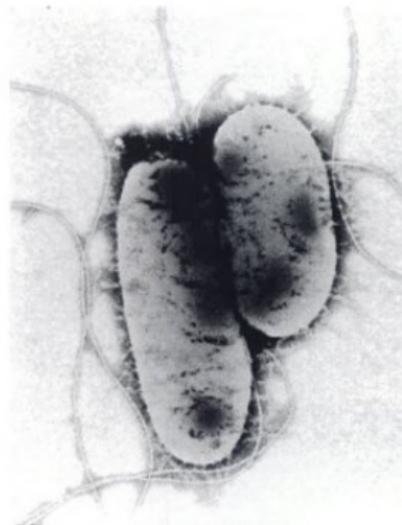
Devido a importância do controle de *Salmonella* spp, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da nanopartícula de óxido de zinco dopada com prata (ZnO-Ag) sobre o controle e prevenção de micro-organismos tendo como modelo os micro-organismos bioindicadores e sorotipos de *Salmonella* (*S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*) em biofilmes formados em ovos embrionados oriundos de reprodutoras de perus industriais.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Características *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi descrito pela primeira vez por Daniel Elmer Salmon, em 1885. Salmonelas são bactérias em formato de bastonetes, gram-negativas, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas. São catalase positiva e oxidase negativa, fermentam a glicose e geram ácidos, reduzem o nitrato a nitrito e não produzem citocromo oxidase. O pH ótimo para o crescimento e desenvolvimentos dessas bactérias está entre 6,5 e 7,5, podendo também se desenvolverem na faixa de pH de 4 a 9. A temperatura ideal para o desenvolvimento de tais micro-organismo é 37° C, sendo ainda factível o desenvolvimento a temperaturas entre 5 e 45°C (D'AOUST; MAURER, 2007; GAST, 2008; LOUREIRO et al., 2010). As Salmonelas são bactérias móveis, com exceção dos sorotipos Pullorum e Gallinarum, que são imóveis, (GERMANO; GERMANO, 2008), possuem flagelos, fímbrias e proteínas associadas à membrana externa que participam da adesão e/ou invasão do epitélio intestinal e de outros mecanismos de sobrevivência (BERNDT et al., 2007). Na Figura 1 é possível visualizar uma foto micrografia de *Salmonella* spp..

**Figura 1:** Micrografia eletrônica de *Salmonella* spp. Adaptado de Wray e Wray (2000).



O gênero *Salmonella* compreende bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e é dividido em duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*. A espécie *S. bongori* é composta por 23 sorovares a *S. enterica* 2.587 sorovares que estão distribuídos em seis subespécies: I- *S. enterica*, II- *S. salamae*, IIIa- *S. arizonae*, IIIb- *S. diarizonae*, IV- *S. houtenae* e VI- *S. indica*. As subespécies possuem diferenças bioquímicas, estruturais e genômicas, e a identificação das

mesmas é feita com números romanos do sorovar e identificação de antígenos flagelares (H), capsulares ligados à virulência (Vi) e somáticos (O) de natureza lipossacarídea (BRENNER et al., 2000; TINDALL et al., 2005; GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). A denominação dos sorotipos e as fórmulas antigênicas estão listadas em um documento denominado Kauffmann-White-Le Minor (KWL) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Cada subespécie possui diversos sorovares, perfazendo aproximadamente 2.579 sorovares identificados. Desse total, cerca de 59% pertencem ao grupo *Salmonella enterica* subespécie enterica, sendo tais cepas responsáveis por aproximadamente 99% das infecções por *Salmonella* acometidas em humanos e animais de sangue quente (BRENNER et al., 2000; GRIMONT; WEILL, 2007).

Outra classificação também usada para *Salmonella* spp. é baseada na especificidade do hospedeiro e no padrão de determinação do quadro clínico da doença. São três categorias: (1) Salmonellas muito adaptadas aos animais, *Salmonella Pullorum* (aves) e *Gallinarum* (aves) causadoras da pulorose e tifo aviário respectivamente, *Salmonella Choleraesuis* e *Salmonella Thyphisuis* (suínos), *Salmonella Dublin* (bovinos); (2) Salmonelas muito adaptadas aos humanos, *Salmonella Thyphi* e *Salmonella Paratyphi* A, B e C agentes causadores da febre entérica; (3) Salmonellas zoonóticas que incluem sorovares ubíquos que afetam humanos e animais, são frequentemente isoladas de animais domésticos e silvestres e comumente como agentes responsáveis por quadros de toxinfecções alimentares (RODRIGUES, 2011).

As salmonelas são muito sensíveis a temperaturas elevadas, sendo destruídas quando expostas à temperatura superior a 60°C por 15 a 20 minutos. Por outro lado, a redução de temperaturas à níveis de congelamento não são letais, embora possa causar redução significativa no número de micro-organismos viáveis (D'AOUST; MAURER, 2007).

A multiplicação das salmonelas acontece por divisão celular simples, mas pode ocorrer transferência de material genético por transferência vertical, em que os genes são passados de um micro-organismo para os seus descendentes, e por transferência horizontal, em que um micro-organismo pode adquirir genes de outro micro-organismo, não necessariamente de uma mesma espécie e gênero, da mesma geração (BAUMAN et al., 2012). Tais bactérias podem adquirir material genético também por transferência de plasmídeos, transposos e bacteriófagos (NORDMANN; POIREL, 2005). Acredita-se que 25% do genoma de *Salmonella* spp. patogênicas tenham sido adquirido por transferência horizontal (PORWOLLIK; McCLELLAND, 2003).

Os micro-organismos possuem genes relacionados à sobrevivência e outros mais ligados a fatores de virulência. Relacionados à sobrevivência os micro-organismos possuem genes que

determinam respiração e aquisição de nutrientes, o que permite a manutenção das bactérias. Os genes ligados à virulência condicionam as bactérias a situações de competição, configurando como vantagens evolutivas, por exemplo resistência a antimicrobianos e enterotoxinas (LANGRIDGE et al., 2009).

## **2.2 Ocorrência de *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp são encontradas no trato gastrointestinal de animais e a principal forma de contaminação é a oro-fecal. O micro-organismo pode contaminar água, alimentos ou o ambiente e ser fonte de disseminação, especialmente observada em produtos de origem avícola (carnes, ovos e derivados) (CORCORAN, 2013, CDC, 2015). A *Salmonella* spp. pode chegar ao produto final por diversas formas, dentre elas, contaminação com extravasamentos de conteúdo intestinal de aves portadoras da bactéria, durante os procedimentos de abate, contato com superfícies contaminadas (biolfimes), contaminação de ovos durante a manipulação ou incubação e contaminação vertical (transovariana) (BERCHIERI et al., 2001; CORCORAN, 2013).

A salmonelose em humanos tem como sintoma principal a ocorrência de diarreias intensas, muitas vezes acompanhadas de cólicas abdominais, febre, náuseas e vômitos que podem durar entre 2 e 7 dias. O início da sintomatologia relacionada à infecção pode variar entre 6 e 72 horas. De forma geral é uma infecção auto limitante, não sendo necessária antibioticoterapia e sim tratamento suporte com o monitoramento da perda de líquidos e constante reposição de volumes perdidos (EFSA, 2014; CDC, 2015).

O gênero *Salmonella* spp. constitui um grupo de bactérias com maior associação a casos de toxinfecções alimentares em todo o mundo. Estimativa realizada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (2015), apontou a ocorrência de 1,2 milhões de casos de toxinfecções alimentares por *Salmonella* no Estados Unidos da América (EUA), que levaram a cerca de 19 mil casos de hospitalizações e 380 mortes por ano. Nos anos de 2013 e 2014 foram notificados 17 surtos de *Salmonella* nos EUA, sendo os principais sorovares envolvidos foram Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Infantis, Hadar e Mbandaka (SCALLAN et al., 2011).

Estudo realizado no Brasil no ano de 2011, demonstrou presença de salmonelas em cerca de 2,7% das carcaças de aves. O sorovar Enteritidis foi o mais prevalente, 48% dos isolados, seguido de 7,6% do sorovar Infantis, 7,2% o sorovar Thyphimurium e 6,4% sorovar Heidelberg (MEDEIROS et al., 2011). Voss-Rech et al. (2015), avaliando frangos de corte no Brasil, identificaram 50 sorotipos de *Salmonella*. O sorovar Minnesota foi o mais frequente

(40,2%), seguido do Infantis (14,63%) e da Heidelberg (7,3%). Avaliando suabes de arrasto em granjas, no Paraná, foram observados, como mais frequentes os sorovares Heidelberg, Mbandaka, Newport, Schwarzengrund e Enteritidis (PANDINI et al., 2015).

A importância do patógeno em saúde pública e a frequência na ocorrência de casos de salmonelose em humanos, culminou na necessidade de uma legislação com medidas específicas. Essa legislação discrimina a inviabilidade do consumo e comércio de produtos em que sejam isoladas *Salmonellas* (SPRICIGO et al., 2008), destacando a necessidade de cuidados ao longo da cadeia de produção de alimentos, em especial de origem avícola, para que sejam livres de tal agente.

## **2.3 Biofilme**

### **2.3.1 Aspectos gerais**

Biofilmes são estruturas compostas por micro-organismos sésseis e uma matriz extracelular autoproduzida, formada principalmente por exopolissacarídeos e proteínas especializadas, que se aderem a uma superfície (DOLAN; COSTERTON, 2002; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014). A formação de um biofilme possibilita a sobrevivência de micro-organismos, protegendo-os de situações ambientais adversas e permitindo que continuem absorvendo água, íons, nutriente, tendo atividades enzimáticas e trocando informações genéticas (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

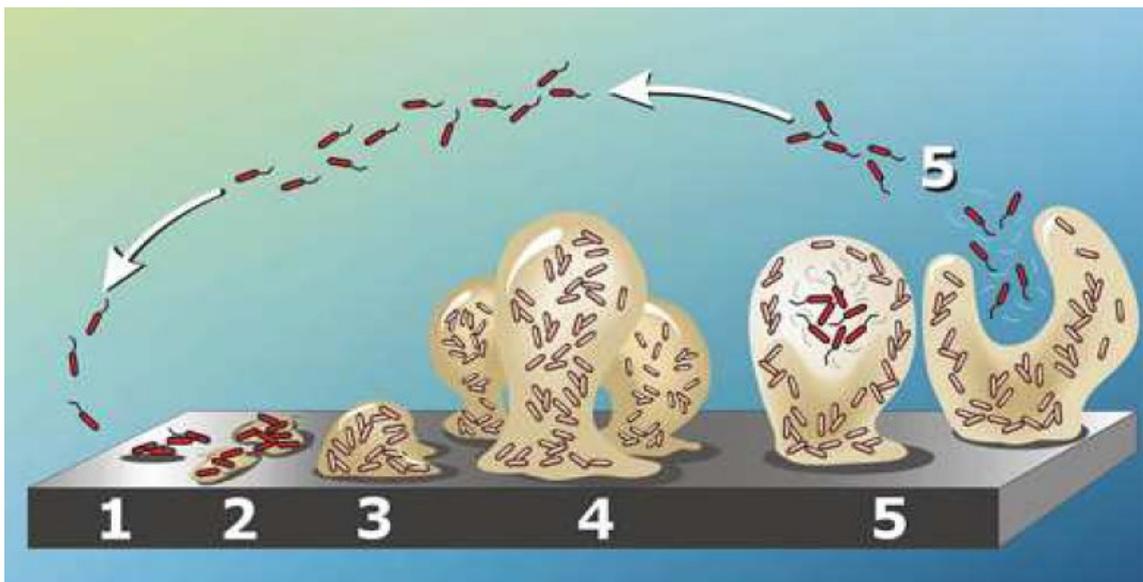
Devido às características dos biofilmes, esses são mais resistentes a agentes antimicrobianos e detergentes do que os micro-organismos na forma de vida livre. Os biofilmes podem ser até 100 vezes mais resistentes a antimicrobianos do que as suas células em forma planctônicas, podendo ser atribuído tal fato à dificuldade de passagem do agente pela matriz extracelular (NICOLAEV; PLAKUNOV, 2007; TOMIHAMA; NISHI; ARAI, 2007). A eliminação dos biofilmes torna-se uma tarefa árdua. Mesmo com lavagem e sanitização frequentes, não se garante a eliminação dos mesmos principalmente se houver sulcos ou rugosidades nas superfícies, que facilitam o desenvolvimento dos biofilmes (MAUKONEN et al., 2003).

A formação dos biofilmes acontece em cinco grandes etapas: adesão reversível, adesão irreversível, crescimento do biofilme, maturação do biofilme e o desprendimento das células planctônicas. A Figura 2 ilustra as etapas de formação do biofilme (STOODLEY et al., 2002).

Na adesão reversível são realizadas interações físico-químicas inespecíficas (superfície inorgânicas) ou ligações moleculares do tipo receptor-ligante (superfície orgânica). Nesse

estágio as bactérias podem ser facilmente removidas por lavagem. Na adesão irreversível, os micro-organismos, até então fracamente ligados à superfície, efetivam a adesão com a produção da matriz polissacarídea, tornando-os fortemente aderidos. No processo de maturação dos biofilmes, os mesmos passam a ser envoltos por canais de água que entremeiam a matriz e, por fim, os biofilmes tornam-se capazes de produzir e liberar células planctônicas ou micro colônias, permitindo a disseminação de contaminações (BOLES; THOENDEL; SINGH, 2005; TRENTIN GIORDANI; MACEDO, 2013). O processo de adesão do micro-organismo à uma superfície pode ser influenciada de acordo com as características físico-químicas do substrato, composição do meio envolvente e também pelas condições do micro-organismo (CHMIELEWSKI; FRAN, 2003).

**Figura 2:** Fases da formação de biofilme oriundo de bactérias. 1. Adesão reversível; 2. Adesão irreversível; 3. Crescimento do biofilme; 4. Maturação do biofilme. 5. Dispersão da contaminação. Adaptado de Stoodley (2002).



Do total de massa de biofilmes, acredita-se que somente 10% sejam referentes à micro-organismos e o restante trata-se de matriz extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Os micro canais que se formam na matriz madura são essenciais para distribuição de nutrientes, água, enzimas, metabólitos e comunicação celular (BOARI et al., 2009). Esse mecanismo de comunicação é denominado *quorum sensing* (QS), e é mediado por sinais químicos que são produzidos e secretados pelas próprias bactérias (BOYEN et al., 2009), sendo correlacionado à capacidade de produção de biofilmes em bactérias, por exemplo nas *Salmonella* spp. (YOON; SOFOS, 2008).

Além do QS, a presença de flagelo e fímbrias também corroboram com a formação de biofilmes. O flagelo facilita os movimentos das bactérias favorecendo a superação de forças eletrostáticas repulsivas entre as bactérias e a superfície, ao interagirem primariamente (SAUER; CAMPER, 2001). As fímbrias participam facilitando a adesão a outras células bacterianas e de moléculas inorgânicas que formem a matriz (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

### **2.3.2 Biofilmes de *Salmonella* spp. e fatores de virulência**

O genoma da *Salmonella* spp. foi completamente sequenciado, no entanto existem genes cuja função biológica ainda é desconhecida. Esses micro-organismos possuem genes de virulência que foram adquiridos por transferência genética horizontal e se encontram agrupados em ilhas de patogenicidade que reúnem genes relacionados à adesão das bactérias no hospedeiro ou superfícies, invasão celulares, sobrevivência dentro da célula e mecanismos de sobrevivência frente ao sistema imunológico (FORTES et al., 2012).

Há uma grande necessidade de manter os alimentos livres de Salmonellas, no entanto a eliminação de tal micro-organismo é dificultada principalmente por conta da sua capacidade de formar biofilmes. Salmonellas possuem componentes que corroboram com a capacidade de formação de biofilmes: fímbrias, polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos (LPS) (CORCORAN, 2013).

O processo de adesão das bactérias confere poder patogênico, pois, como primeiro contato, as enterobactérias aderem-se e fixam-se nas células intestinais onde passarão a desenvolver suas atividades patogênicas (GIBSON et al., 2007). O gene *invA* codifica a função de invasão das células epiteliais, atividade importante para manutenção da virulência das bactérias. Trata-se de um gene muito observado em sorovares de *Salmonella* spp., tendo sido detectado a presença do gene em 100% das amostras avaliadas por Rowlands et al. (2014) em estudo de 237 cepas de *Salmonella entérica* isoladas de alimentos no Brasil.

O operon *IpfABCDE*, formado por cinco genes, está relacionado à capacidade de adesão das Salmonellas às células M do intestino. O gene *IpfA* codifica as fímbrias longas polares, que são as mais longas das fímbrias, e estão ligadas ao tropismo das bactérias pelas placas de Peyer do intestino onde as Salmonellas se instalam primariamente para desenvolver a infecção. Também está associado à fímbria longa polar o reconhecimento comum entre diferentes

sorovares, o que se denomina imunidade cruzada (NORRIS; BAUMLER, 1999; OCHOA; RODRÍGUES, 2005).

O operon *sef*ABCD, possui quatro genes, que são necessários para a formação e translocação da fimbria SEF14, importante fimbria do gênero *Salmonella*. O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína *sefA* que compõe a fimbria, o *sefB* condiciona a formação da membrana externa, *sefC* leva a formação do maior componente da fimbria e *sefD* a uma adesina. Trata-se de uma fimbria de grande importância para a sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos, por estar ligada às etapas posteriores da infecção, logo após a colonização do epitélio cecal do hospedeiro (MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008).

Outra fimbria importante é a Tafi (Thin aggregative Fimbriae) que é codificada pelo operon *agf*, unidade conservada na maior parte dos sorovares de *Salmonella*. A subunidade *AgfA* da fimbria se liga às proteínas do hospedeiro e facilita a associação da bactéria com o epitélio intestinal, promovendo interação inicial. As fimbrias agregativas também são relacionadas aos processos de auto-agregação das *Salmonellas*, reduzindo a superfície de contato das bactérias e tornando-as mais resistentes a agentes bactericidas, em um hospedeiro ou em ambientes abióticos (WHITE et al., 2003; GIBSON et al., 2007).

As fimbrias Curli são estruturas muito finas que compõe a matriz de exopolissacarídeos (EPS) (ROMLING, et al., 1998), sua expressão é controlada pelo gene *csgD* (gene da subunidade Curli) e está organizado em dois operons o *csgBAC* e *csgDEFG* (GERSTEL; ROMLING, 2003). Tais fimbrias são associadas a processos da formação do biofilme, invasão de hospedeiro, colonização, contato com outras bactérias e motilidade (STEENACKERS et al., 2012). O gene *avrA*, por sua vez, codifica informações referentes à capacidade de invasão do trato intestinal, levando à proliferação bacteriana no intestino e assim reduz a efetividade das respostas de defesa do organismo infectado (SUN et al., 2004).

A celulose é uma molécula formada por glicoses cuja expressão é controlada pelo gene *adrA* e pode ser co-regulada pelo gene *csgD* (SOLANO et al., 2002; ROMLING et al., 2003). A celulose desempenha um papel muito importante na formação dos biofilmes (SOLANO et al., 2002), juntamente com o Curli, formam a matriz dos biofilmes (GERSTEL; ROMLING, 2003).

Os lipopolissacarídeos capsulares permitem que as bactérias permaneçam no ambiente, atuando diretamente na formação dos biofilmes (CORCORAN, 2013). Sabe-se que a deleção dos genes relacionados aos lipopolissacarídeos leva à redução significativa ou mesmo à perda da capacidade de formação de biofilmes (KIM; WEI, 2009; CORCORAN, 2013).

O sistema de *quorum sensing*, o qual permite a interação por meio de sinais químicos entre as células componentes de um biofilme, é dependente da formação de uma enzima, que promove a maturação do sistema. O gene *luxS* é o responsável pela codificação da enzima LuxS, que atua diretamente no desenvolvimento do sistema de comunicação entre os micro-organismos (HARDIE; HEURLIER, 2008).

*Salmonella* spp. podem ainda expressar o gene *sodC* que é responsável pela codificação da enzima SOD (superóxido-dismutase). Essa enzima catalisa a conversão dos radicais de superóxido em oxigênio e peróxido de oxigênio fora da célula bacteriana o que contribui com a virulência da mesma (KROLL et al., 1995; BATTISTONI, 2003).

## 2.4 Controle de micro-organismos e biofilmes

A redução significativa nos índices de mortalidade por causas infecciosas, decorridas ao longo do século 20, foi atribuída à utilização de substâncias antimicrobianas (HUH; KWON, 2011). No entanto, uso indiscriminado e incorreto desses agentes tem sido responsável pelo surgimento de resistências dos micro-organismos aos antimicrobianos, tornando ineficazes muitos tratamentos consagrados, o que constitui um grande risco para a saúde humana (SIRELKHATIM et al., 2015).

Prevenir a formação e combater os biofilmes já formados requer estratégias importantes, e o sucesso das operações culminarão em maior segurança alimentar (SREY, et al., 2013). A ação mecânica, na forma de atrito, é uma das mais eficientes estratégias de eliminação e controle do biofilme, por desconfigurar a matriz do biofilme e expor os micro-organismos (MAUKONEN et al., 2003). Resistências de micro-organismos por desinfetantes está 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).

Desinfecção tem como finalidade reduzir o nível de contaminação a níveis aceitáveis e realizar a eliminação de micro-organismos patogênicos. É efetuada após a limpeza das superfícies com uso de produtos alcalinos ou tensoativos, que levam à desnaturação de proteínas, emulsão de gorduras e dissolução de alguns resíduos orgânicos remanescentes (MAUKONEN et al., 2003; SREY et al., 2013).

É desejável que os desinfetantes sejam seguros, eficazes no combate a micro-organismos, fáceis de manipular, não deixem resíduos nos produtos finais que afetem os consumidores, e devem ser facilmente removíveis com água. De forma geral, os desinfetantes

não são capazes de adentrar à matriz do biofilme após uma limpeza ineficiente, não eliminando todas as bactérias presentes no mesmo (SIMÕES et al., 2006). A elevação da temperatura, durante o processo de ação dos desinfetantes reduz a necessidade de utilização da força mecânica (MAUKONEN et al., 2003; SREY et al., 2013).

Dentre os produtos químicos mais comumente utilizados para processos de desinfecção estão os compostos ácidos, cáusticos, produtos à base de aldeídos, cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, ácido peracético, fenóis e ozônio (SIMÕES et al., 2006). A escolha do desinfetante geralmente é influenciada pelo preço e pelo volume necessário para atuação eficiente.

O ácido peracético ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) é produzido a partir de peróxido de hidrogênio 90%, ácido cético e ácido sulfúrico como catalisadores. Sua ação biocida ocorre por aumento da permeabilidade da membrana das células, levando à destruição das ligações sulfidrílicas e de enxofre, além de desnaturar as proteínas e enzimas celulares. É considerado potente biocida tendo atividade contra fungos, vírus, bactérias e esporos (BARAH, 2013), no entanto, assim como acontece com outros desinfetantes, a sua eficiência é influenciada pela presença de biofilmes (WESSELS et al., 2013). O custo do ácido peracético é relativamente elevado, porém o uso em uma concentração baixa é suficiente para obter uma resposta biocida, o que justifica sua utilização (KITIS, 2004).

O formaldeído é historicamente um dos desinfetantes mais utilizados dentro da avicultura, principalmente em desinfecções de ovos, pós eclosão e em processos de incubação (STEINLAGE et al., 2002). Trata-se de um gás, normalmente utilizado em solução, concentração de 37% em massa, contendo metanol (1 a 3%) que atua prevenindo a polimerização das moléculas. O composto apresenta-se incolor, possui odor irritante e é miscível em água (FREITAS, 2007). O formaldeído possui amplo espectro de ação contra micro-organismos, sendo eficaz inclusive no combate de vírus. No entanto, por ser considerado com potencial carcinogênico, vem sendo substituído por outros desinfetantes que sejam mais seguros para os trabalhadores (MORGULIS; SPINOSA, 2005).

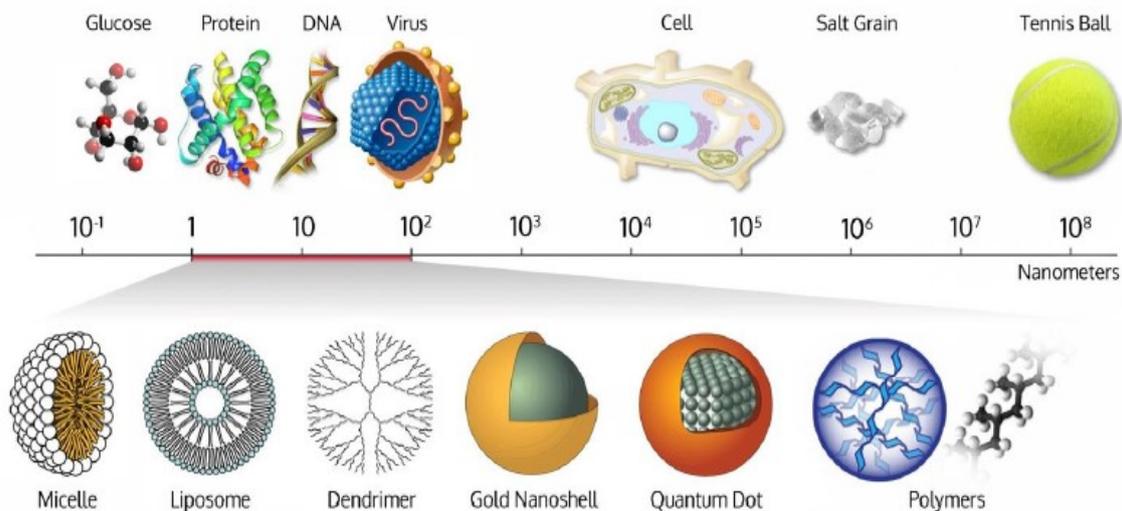
As nanopartículas também surgem como alternativa para eliminar e prevenir a formação de biofilmes. Por serem estáveis mesmo em temperaturas e pressão elevadas, conseguem atravessar a matriz dos biofilmes, possuem potencial inativador e praticamente não apresentam efeitos sobre células humanas são vistas como promissoras (COSTA et al., 2011; LU et al., 2012). Nesse contexto, vários materiais são testados a fim de criar alternativas para tratar as resistências bacterianas. Óxido de zinco, óxidos de prata, óxido de titânio apresentam-se como bons potenciais antibacterianos (DASTJEDI; MONTAZER, 2010).

## 2.5 Nanopartículas

A nanotecnologia teve seu desenvolvimento impulsionado nos anos 80, com a evolução da ciência *cluster* e a invenção do microscópio de tunelamento. Tais avanços propiciaram o desenvolvimento e utilização da nanotecnologia e de nanomateriais em diversas áreas (PAN; KING, 2008). A nanotecnologia foi definida pelo engenheiro japonês Taniguchi, quem primeiro utilizou o termo, da seguinte forma: “Nanotecnologia consiste principalmente no tratamento de separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou molécula” (TANIGUCHO, 1974).

Os nanomateriais são menores do que muitas células animais, o que favorece a entrada dos mesmos em células, possibilitando ações diversas e aplicações tecnológicas (RASMUSSEN et al., 2010). A Figura 3 permite comparar em escala de tamanho os nanomateriais com estruturas como proteínas, DNA e vírus, sendo menores do que células de aproximadamente  $10^4$  nm e maiores que vírus de aproximadamente  $10^2$  nm.

**Figura 3:** Escala nanométrica comparando nanomateriais com estruturas biológicas (WICHLAB, 2016)



Quando uma partícula decresce em tamanho grande proporção de seus átomos é encontrada na superfície. Assim, as nanopartículas possuem uma maior superfície por unidade de massa comparadas a partículas maiores. Como as reações químicas ocorrem nas superfícies

as nanopartículas são extremamente mais reativas do que uma massa de material composta de partículas maiores (GUOZHONG, 2004; GOGOTSI, 2006).

Especialmente nos últimos 10 anos, a produção de nanopartículas tem sido alvo de inúmeras pesquisas acadêmicas, devido às propriedades bactericidas, ópticas, catalíticas eletrônicas e magnéticas apresentadas por tais substâncias (SIFONES, 2010). Destaca-se o uso de nanomateriais em áreas médicas, computacional, mecatrônica, alimentícia, toxicológica, entre outras (PAN; XING, 2008).

Embora a nanotecnologia ainda seja uma ciência relativamente nova, muitos produtos já são aplicados. Na área médica, como exemplo, são produzidos fármacos encapsulados em nanopartículas, como capacidade de transportar a droga até o local de ação específica e liberá-la de forma controlada (ALVES FILHO, 2005). Propriedades semelhantes são aplicadas em tratamento quimioterápicos, buscando a ação dos fármacos diretamente no tecido alvo, evitando o acometimento de tecidos saudáveis e os efeitos colaterais secundários adversos (náuseas, perda de cabelo, comprometimento imunológico) (BOISSEAU; LOUBATON, 2011). Além das muitas funcionalidades já conhecidas da nanotecnologia, inúmeros artigos científicos são cotidianamente publicados trazendo novas moléculas, aperfeiçoamento de técnicas e aplicações.

Apesar de no Brasil haver uma regulamentação sanitária muito ampla, a área de nanoproductos ainda é discutida e requer aprimoramentos da regulamentação de produtos. Como não existem determinações claras de parâmetros do que são nanomateriais não é possível ter segurança quanto ao que se adquire, como foi debatido no Fórum de competitividade de nanotecnologia (2012). No mesmo evento foi levantada a ocorrência de casos de produtos onde declarava-se o uso de nanopartículas e na realidade não as usavam e também casos que utilizam nanopartículas sem que as mesmas fossem citadas nos rótulos de produtos.

A síntese de nanopartículas ocorre com a utilização de métodos físicos (*top-down*) e métodos químicos (*bottom-up*). Nos métodos físicos a formação do nanomaterial se dá a partir de amostras maiores que o objetivo final, assim, são empregados processos como moagem, decomposição térmica e irradiação. Nos métodos químicos a formação das nanopartículas ocorre por reações químicas entre moléculas e íons (elementos menores que as nanopartículas), levando à agregação de íons, o que resulta na formação dos nanomateriais (HABIBA et al., 2014). Tendo em vista as diversas formas de obtenção dos nanomateriais, com base em metodologias distintas é possível controlar características físicas como tamanho, forma e estrutura cristalina, que levam a diferenças nas propriedades físicas e funcionais das mesmas. O controle do tamanho dos nanomateriais, sendo a maior parte definidos em escala

nanométrica, menores que o diâmetro de células humanas ( $\sim 7 \mu\text{M}$ ), favorece a entrada e a disponibilização de fármacos, bem como o reconhecimento de proteínas específicas (BHATTACHARYYA et al., 2009).

Em especial, as nanopartículas metálicas e de seus óxidos, apresentam-se como promissores agentes antimicrobianos (GARCIA, 2011), devido ao aparecimento de resistências por parte de muitos micro-organismos, frente a inúmeros antibióticos. Sabe-se que as nanopartículas menores que 100 nm, em virtude do pequeno tamanho e elevada relação entre superfície e volume, são potenciais agentes biocidas, capazes de realizar interações íntimas com as membranas de micro-organismos (ALLAKER, 2010).

O uso de agentes antimicrobianos inorgânicos apresenta como vantagem, frente aos agentes orgânicos, maior estabilidade. São exemplos de agentes antimicrobianos naturais a prata, cobre, selênio, óxido de zinco e dióxido de titânio (SONDI, 2004; GRUMEZESCU, 2016). Diversas formas de nanomateriais a base de prata são considerados promissores como agente antimicrobianos (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

A agregação de nanopartículas metálicas é feita principalmente por dois métodos: dopagem (substituição) ou por impregnação do metal (SAHA; WANG; PAL, 2008). A forma de síntese dos nanomateriais define o tamanho e forma de estrutura cristalina, permitindo novas propriedades físicas a cada definição (BHATTACHARYYA et al., 2009).

### **2.5.1 Prata e nanopartículas de óxido de prata**

O uso da prata metálica como agente bactericida foi utilizado na antiguidade, principalmente no tratamento de queimaduras e controle bacteriano, devido à grande eficiência associada a uma baixa toxicidade. Tais tratamentos foram substituídos por volta de 1940, com a ascensão da penicilina. Com o desenvolvimento das resistências aos antibióticos, tornou-se repensável a utilização da prata como agente bactericida (DASTJERDI; MONTAZER, 2010; UHU; KWON, 2011).

Nanopartículas de prata são amplamente usadas em medicamentos e cosméticos. A “*The nanotech project consumer inventory*”, com papel de divulgar novos produtos que envolvam nanotecnologia, apresenta uma lista de 1.827 produtos contendo prata. A maior parte desses produtos contém nanopartículas como antimicrobiano, sendo aplicados em cosmético, produtos de limpeza, sanitizantes para pele humana, aditivo de curativo, suplementos e outros.

Estudos realizados por Dibrov et al. (2002), demonstraram que os íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) têm ação inibitória relacionada à atração eletrostática existente entre a parede celular dos microorganismos carregadas negativamente e a carga positiva dos íons de prata. O uso de nanopartículas de prata estáveis permite maior segurança em relação ao uso dos íons de prata livres, oferecendo riscos de toxicidade muito reduzidos (MOHANTY et al., 2011).

Outros estudos sugerem diferentes mecanismos de ação para a bioatividades das nanopartículas de prata sobre as bactérias. Entre eles, a geração de espécies reativas oxidativas nas bactérias, que levam à ruptura da membrana celular (SU et al., 2009), interação direta na membrana celular, causando ruptura da membrana e vazamento do conteúdo celular (SMETANA et al., 2008), deslocamento da membrana, causado por dissolução oxidativa, causando vazamento celular (ASHARANI et al., 2009). A prata pode entrar como componente de ação sinérgica junto a outras substâncias antimicrobianas, devido aos mecanismos de ação não conclusivos da atuação antibacteriana da mesma, (MOHANTY et al., 2011) potencializando a ação bactericida de outros materiais.

Shen et al. (2011) avaliaram diversos materiais à base de prata (Ag) e verificaram que o desempenho em tratamentos bactericidas foi mais eficiente para o óxido de prata ( $\text{AgO}$ ) do que comparado ao  $\text{Ag}_2\text{O}$  e a Ag (pior desempenho). Chen e colaboradores (2016) concordaram que os óxidos com elevada valência de Ag são potentes agentes bactericidas. Acredita-se que o efeito bactericida dos óxidos de prata seja devido à capacidade de liberação de íons de prata, (que é superior às nanopartículas unicamente de prata) (RATTE, 1999; BELANTONE et al., 2002).

### 2.5.2 Óxido de zinco

Devido a sua característica de semicondutor com capacidade de emissão e de absorção na região do ultravioleta, o óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ) tem sido visto com prospecto positivo em diversas aplicações, com na indústria farmacêutica, têxtil, eletro-tecnológica, fotocatalise, dentre outras (KOLODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014; SIRELKHATIM, et al., 2015).

O  $\text{ZnO}$  foi considerado pela *Food and Drug Administration* (FDA) um material seguro quando produzido utilizando boas práticas (FDA, 2016). Pesquisas realizadas (STOIMENOV et al., 2002; FU et al., 2005; ZHANG et al., 2013) também demonstraram a baixa toxicidade do  $\text{ZnO}$  e, portanto, a segurança de utilização do mesmo. Trata-se de um material bactericida e que também age destruindo esporos (KARUNAKARAN et al., 2011).

Os mecanismos de ação bactericida das nanopartículas de ZnO ainda não são totalmente esclarecidos, havendo algumas formas possíveis: liberação de íons antimicrobianos, principalmente  $Zn^{2+}$  (LI et al., 2011); contato da nanopartícula com a parede celular das bactérias, gerando destruição da mesma (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).

Sabe-se que as características estruturais e morfológicas das nanopartículas de ZnO podem influenciar na capacidade de penetração nas paredes de micro-organismos e assim apresentar melhor ou pior desempenho 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). Além do formato, existe uma relação da eficiência como agente antimicrobiano com o tamanho das nanopartículas de ZnO, sendo que as menores apresentam melhores desempenho como bactericidas, também devido à maior facilidade de adentrar às células (ZHANG et al., 2007).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Formação das nanopartículas e cepas avaliadas

Os nanopartículas 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. As propriedades físicas desses nanopartículas foram investigadas pela técnica de Difração de Raios-X (DRX).

O processo de síntese das nanopartículas foi realizado por meio do método de coprecipitação, que se baseia na nucleação seguida pelo crescimento das nanopartículas. Esses dois processos controlam a forma e o tamanho final das nanopartículas, que são fortemente afetados por diversos parâmetros, tais como, velocidade de agitação, temperatura de síntese, natureza alcalina das soluções, taxa de adição, tempo de digestão e pH. Diante disso, a técnica de coprecipitação é uma das técnicas mais versáteis.

As nanopartículas de ZnO dopados de prata foram sintetizados a temperatura ambiente via soluções aquosas de cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>, 99,9%, 2M) e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>, 99%, variando de 0,1 a 11% de Ag em relação Zn). O pH da solução foi ajustado para 11 usando uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH 98%). As nanopartículas formadas foram purificadas via centrifugação a 6000 rpm/1 minutos. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Foram sintetizadas nanopartículas de ZnO dopados com três diferentes concentrações de prata.

O estudo biológico, realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, foi dividido em quatro etapas: (i) avaliação da inibição da *Salmonella* spp por nanopartículas em cultivo em placa, (ii) avaliação da inibição de bioindicadores em ovos de perus no final do período embrionário, (iii) avaliação da formação de biofilme em placas de poliestireno e (iv) avaliação da inibição de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg na forma livre em ovos de perus.

Para avaliação da formação dos biofilmes em placas de poliestireno foram utilizadas seis cepas de *Salmonellas* (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante, *S. Minnesota*, *S. Heidelberg* e *S. Gallinarum*), advindas de doações da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), estado do Rio de Janeiro, onde as cepas foram caracterizadas e realizada a tipificação antigênica.

Os ovos utilizados eram de matriz de perus 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. Nas avaliações referentes à formação de biofilme em ovo foram usadas as cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*.

As cepas advindas da FIOCRUZ estavam armazenadas em Ágar Nutriente (AN) (Difco®) e foram reativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid®) onde permaneceram incubadas a 37° C durante 24 horas. Após esse período as cepas foram semeadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Merck®), sendo incubadas 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 et al. (1966), inoculando uma suspensão de 10<sup>5</sup> UFU/ml 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 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 Avaliação da inibição de micro-organismos biodicadores em ovos embrionados de perus**

Foram recebidos 120 ovos embrionados de perus aproximadamente duas horas após a postura. Imediatamente após a chegada no Laboratório de Incubação da Universidade Federal de Uberlândia, os ovos foram igualmente divididos em quatro grupos, que receberam os seguintes tratamentos:

-Grupo 1: Aspersão de aproximadamente 1,2 mL (1,4 mG/mL) de nanopartículas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO-Ag) (dopagem de prata não especificada, patente em processo de depósito) por ovo;

- Grupo 2: Imersão em peracético 2,5% (25.000 ppm) por 40 minutos;
- Grupo 3: Aspersão de formol a 10% aproximadamente 2,2 mL por ovo;
- Grupo 4 (controle positivo): Aspersão de água ultrapura.

Após a desinfecção os ovos permaneceram armazenados por 48 horas, e então foram levados para máquina de incubação (36,6° C, 65% de umidade e viragem a cada hora), onde ficaram por 28 dias. Após esse período os ovos foram abertos e as cascas encaminhadas à análises microbiológicas (micro-organismos Mesófilos, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e bolores/leveduras).

Para análises de micro-organismos mesófilos, *Escherichia Coli* e bolores e leveduras foram pesadas amostras de 10 gramas de cascas, adicionadas em 90 mL de solução salina, amplamente homogeneizado e então passaram por diluições sucessivas obtendo a concentração  $10^{-5}$ , sendo as três últimas concentrações plaqueadas para posterior contagem. Para avaliação de mesófilas foi plaqueado 1 mL, em profundidade, em ágar PCA (Oxoid®) e incubados a 36° C por 48 horas. *E. coli* e bolores/leveduras foram cultivadas em *Compact Dry* de crescimento seletivo (IDEXX®) específico para cada micro-organismo, volume e temperatura de incubação recomendadas pelo fabricante.

Para avaliação da presença/ausência de *Salmonella* spp., também foram pesadas 10 gramas de cascas e adicionou-se 90 ml de água peptonada e foi incubado por 24 horas a 36° C. Após a incubação foi adicionado 1 mL desse cultivo em 9 mL de Tetracionato (Merck®) (incubado a 36°C, 24 horas) e 0,1 mL em meio Rappaport (Oxoid®) (incubado a 42°C, 24 horas). Decorridas as 24 horas os cultivos foram esgotados em XLD e incubados por mais 24 horas a 37° C.

### **3.4 Formação de biofilme em placas de poliestireno**

Para avaliação da formação do biofilme em placas de poliestireno foram utilizadas seis cepas de *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis*, *S. Tiphymurium*, *S. Tiphymurium* variante, *S. Minnesota*, *S. Heidelberg* e *S. Gallinarum*). O inóculo inicial das bactérias foi reativado no ágar XLD, esgotado em ágar Tripton de Soja (TSA) (Merck®) e incubado a 37° C por 24 horas. Uma amostra de cada uma das seis cepas de *Salmonellas* spp. estudadas foi colocada em caldo Soja Tripticaseína (TSB) (Merck®) e incubadas sobre agitação de 100 rpm a 37° C por 24 horas.

Uma alíquota de 100 µl da amostra processada foi adicionada em 10 mL de caldo TSB, ficando o inóculo inicial com aproximadamente  $10^7$  UFC/mL.

#### **3.4.1 Teste da Adesão e quantificação da formação de biofilmes**

O protocolo foi baseado no estudo publicado por Sulaeman e colaboradores (2009) com adaptações pertinentes. Amostras de 200 µl da solução bacteriana (inóculo inicial) preparada em caldo TSB, descrita no item anterior, foram condicionadas em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 ° C, sob agitação de 100 rpm por um período de duas horas para teste de adesão. Para o teste da quantificação e formação do biofilme esse tempo foi de 24 horas. Após esse período as células bacterianas aderentes foram lavadas com solução de NaCl a 0,9% por três vezes e cada poço foi raspado por 90 segundos. A suspensão resultante, após o processo de raspagem, foi submetida a diluições seriadas e subsequentemente cultivadas em ágar TSA para determinação do número de UFC. As avaliações foram realizadas em triplicatas, para cada cepa, e três repetições independentes.

#### **3.4.2 Teste qualitativo da formação de biofilmes**

Após a formação do biofilme e as lavagens das placas com solução de NaCl, conforme descrito no item anterior, a capacidade de formação de biomassa foi avaliada. Após secagem a 55° C por 30 minutos das placas, foi adicionado o fixador Crystal Violeta (LaborClin®) que permaneceu nos poços por 5 minutos, depois foram lavadas por três vezes em água ultrapura e dispostas à nova secagem por 15 minutos a 55° C. Adicionou-se uma solução eluente de álcool-acetona, 80% de etanol e 20% de acetona (Synth®), que após homogeneização foi transferida para novas placas de 96 poços para a realização da leitura da DO<sub>595</sub>. Todas as análises foram feitas com oito réplicas para cada cepa e três repetições.

A determinação do Índice de Formação de Biofilme (BIF) foi feita pela subtração da densidade óptica advinda da mistura das bactérias que aderiram (BA) pela absorbância obtida nos poços controle (sem micro-organismos) (PC) dividido pela densidade óptica obtida das culturas suspensas (BS) (Naves et al., 2008).

### **3.5 Biofilme em ovo**

Essa etapa do experimento foi realizada em dois momentos distintos, sendo avaliada a capacidade de formação de biofilmes nas cascas de ovos de perus, eficiência de desinfecção do ácido peracético e do óxido de zinco dopado com prata e a capacidade de invasão de albúmen (clara) e vitelo (gema). Após a chegada no laboratório os ovos foram manuseados assepticamente em fluxo laminar.

### **3.5.1 Avaliação da eficiência do Óxido de zinco dopado em prata no controle de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis formados em ovos**

Um total de 64 ovos foram divididos em quatro grupos, sendo cada grupo composto por 16 ovos e cada unidade amostral formada por dois ovos. Três grupos foram submersos, separadamente dois a dois, em suspensão de 100 mL de TSB contendo  $10^5$  UFC/mL de *S. Enteritidis* por um período de 24 horas a 25° C. No quarto grupo, controle negativo, os ovos também permaneceram submersos por 24 horas, porém em TSB estéril sem a presença da bactéria. Após esse período os ovos foram lavados por três vezes em água ultrapura para retirada de bactérias livres dos biofilmes, aguardou-se a secagem dos mesmos e então foram feitos os tratamentos desinfetantes em dois dos grupos, que foram assim determinados:

- Grupo 1: Aspersão de aproximadamente 1,2 mL de uma solução de 1,4 mG/mL de nanopátulas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO-Ag) (dopagem de prata não especificada, patente em processo de depósito) por ovo, durante 30 minutos;
- Grupo 2: Imersão em ácido peracético 2,5% (25.000 ppm) por 15 segundos;
- Grupo 3 (controle positivo): Aspersão de água ultrapura;
- Grupo 4 (controle negativo): Aspersão de água ultrapura;

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 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* Enteritidis. 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* spp. foram submetidas ao teste de urease, produção de indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato de Simmons. Além disso, as colônias típicas de *Salmonella* spp. crescidas em XLD foram submetidas a reação de PCR.

Os mesmos procedimentos para avaliação de presença ou ausência de *Salmonellas* em casca foi utilizada para albúmen e vitelo, sendo um total de 1 mL de cada unidade amostral de albúmen e vitelo, separadamente, pré-enriquecida por 24 horas em BHI.

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

Foram realizados os mesmos procedimentos citados no item anterior para a reativação da cepa de *S. Heidelberg* e os procedimentos de inoculação das bactérias e análise dos ovos foram realizado da mesma forma. No entanto adicionou-se dois grupos de teste, ficando assim divididos:

-Grupo 1: 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 (25 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 as 24 horas que é o tempo da formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-Grupo 2: Tratamento com nanopartícula pós formação do biofilme: Aspersão de aproximadamente 1,2 mL (25 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 o contato dos ovos com as *S. Heidelberg* por 24 horas que é o tempo da formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-Grupo 3: 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 as 24 horas que é o tempo da formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-Grupo 4: Tratamento com ácido peracético pós: 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 o contato dos ovos com as *S. Heidelberg* por 24 horas que é o tempo da formação do biofilme e a retirada das formas livres da bactéria;

-Grupo 5 (controle positivo): Aspersão de água ultrapura 24 horas após o contanto com as bactérias;

-Grupo 6 (controle negativo): Aspersão de água ultrapura 24 horas após imersão em TSB estéril;

### 3.6 Confirmação das espécies e identificação de genes de virulência

A partir das colônias com características típicas de *Salmonella* crescidas em ágar XLD, dos cultivos de cascas, claras e gemas, citados nos dois itens anteriores (*S. Enteritidis* e de *S. Heidelberg*), foram realizadas PCR avaliando a presença do gene *ompC* (tabela 1) para identificação da espécie. Também foi realizada a detecção de genes de virulência com o objetivo de avaliar se as cepas testadas tinham os principais genes para formação de biofilme, resistência ao ambiente e virulência. Foram avaliadas por PCR genes ligados a processos de invasão (*invA*), adesão e biofilme (*agfA*, *sefA* e *IpfA*), *quorum sensing* (*luxS*), estresse oxidativo (*sodC*) e relacionados a processos apoptóticos (*avrA*) (tabela 1).

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.

**Tabela 1:** *Primers* a serem utilizados na identificação de genes específicos nas cepas de *Salmonella*.

Gene	Concentração	Amplicon (PB)	Primer	Referência
<i>ompC</i>	10pmol	204	ATCGCTGACTTATGCAATCG CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	Alvarez et al. (2004)
<i>avrA</i>	20pmol	385	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	Prager et al. (2003)
<i>sodC</i>	20pmol	500	ATGAAGCGATTAAGTTTAGCGATGG TTTAATGACTCCGCAGGCGTAACGC	Sanjay et al. (2010)
<i>invA</i>	10pmol	284	GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	Oliveira et al. (2002)
<i>sefA</i>	10 pmol	488	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGGATCTGCAGTAGC	Oliveira et al. (2002)
<i>agfA</i>	10 pmol	350	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	Collinson et al. (1993)
<i>lpfA</i>	10 pmol	250	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	Heuzenroeder et al. (2000)
<i>luxS</i>	20 pmol	1080	GATAATCCTGAACTAAGCTTCTCCGC GGTTATGAGAAAAGCATGCACCGATCA	Choi et al. (2007)

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 (*ompC*); 58°C por 30 segundos (*invA*); 50°C por 30 segundos (*sefA* e *lpfA*), 66°C por 30 segundos (*agfA*), 62°C (*avrA*, *sodC* e *luxS*); 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.

### **3.7 Avaliação dos poros das cascas dos ovos testados para nanopartículas em *Salmonella Heidelberg***

Visando avaliar possíveis influências do diâmetro de poros das cascas dos ovos sobre os tratamentos com nanopartículas (desinfecção prévia à contaminação seguida de desinfecção após a contaminação (grupo nanopartícula prévia) e desinfecção somente após a contaminação com as bactérias (grupo nano pós) foram realizadas análises de imagens dos ovos testados para *S. Heidelberg*. Usando Confocal Raman foram obtidas imagens da região equatorial das cascas dos ovos dos grupos controle, nanopartícula prévia e nanopartícula pós. As imagens foram avaliadas pelo programa *Gwyddion* com obtenção das figuras com altura das rugosidades da casca e medição do diâmetro dos poros.

### **3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para a visualização das biomassas amostras de cascas dos ovos expostos à *Salmonella Heidelberg*, item 3.5.2, 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.

### **3.9 Análise Estatística**

Para avaliação dos dados foi realizada a retirada dos *outliers*. O teste de D'Agostino e Pearson foi utilizado para verificar se os dados de contagem bacteriana e diâmetro dos poros eram paramétricos. Optou-se pela transformação logarítmica dos dados não paramétricos. Nos dados que seguiram a distribuição normal foi utilizada Análise da Variância seguida pelo teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias. Para os dados que não seguiram distribuição

normal, mesmo após a transformação logarítmica, foi utilizado 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

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

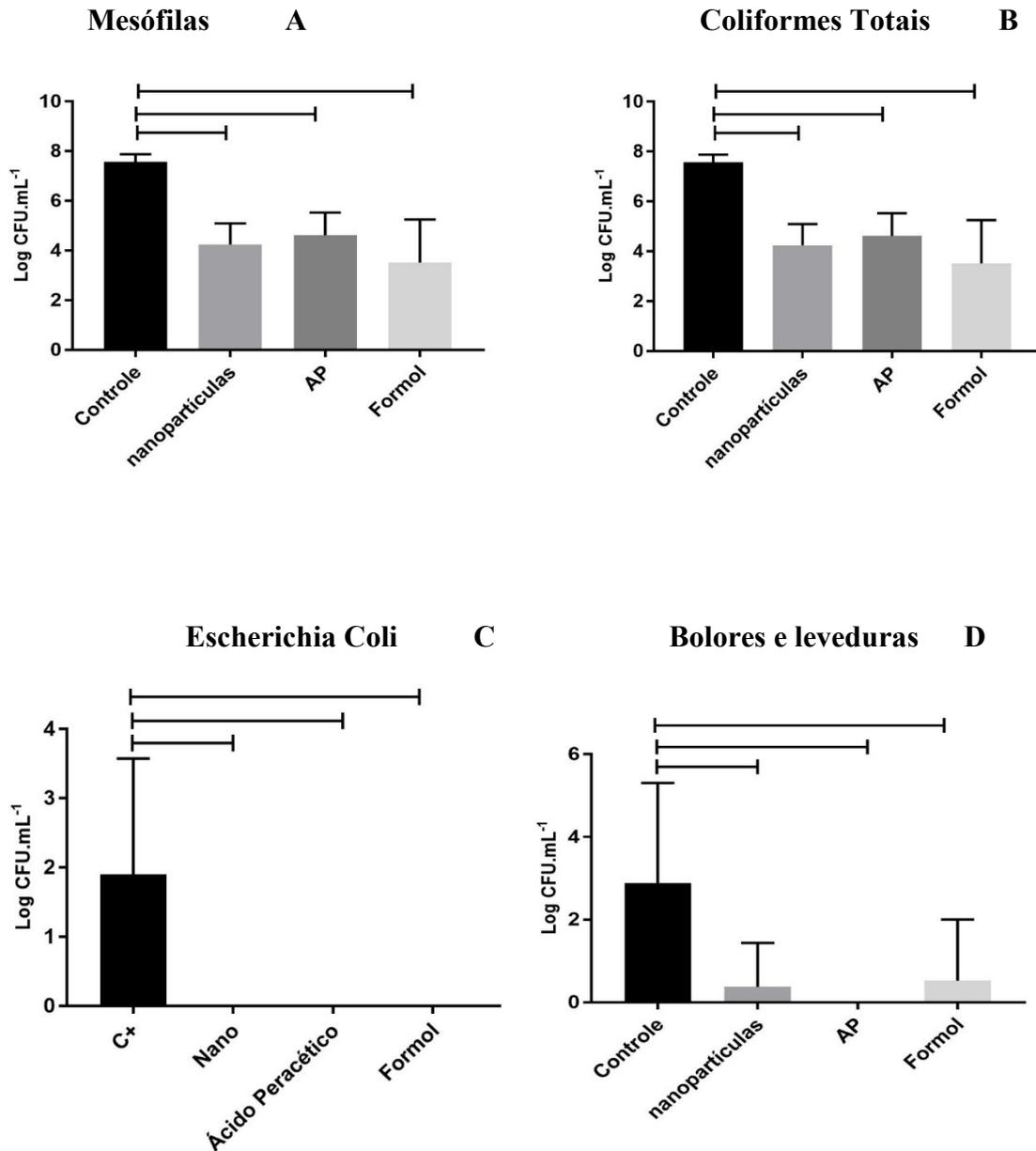
Para todos os grupos testados foram incluídos um controle negativo (água ultrapura, veículo das nanopartículas) em que o halo inibitório não se formou. As três concentrações de dopagem de prata testadas apresentaram resultados melhores que a sulfonamida. No entanto, entre as dopagens não houve diferença 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 Avaliação nos ovos embrionados

Não foram identificadas *Salmonellas* spp. nas cascas dos ovos embrionados em nenhum dos grupos analisados, incluindo o grupo controle positivo. Os resultados encontrados para análises do controle de micro-organismos mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli* e bolores/leveduras foram semelhantes com diferentes desinfetantes utilizados. Todos os grupos tratados (nanopartículas de ZnO-Ag, ácido peracético (25.000 ppm/40min) e formol (10%)) apresentaram melhores resultados que o grupo controle (sem desinfecção), com redução significativa do número de micro-organismos. Para bactérias mesófilas houve uma queda de 3,34 log CFU.mL<sup>-1</sup>, coliforme total 1,68 log CFU.mL<sup>-1</sup>, *E. coli* 1,91 zerando totalmente esse micro-organismo e bolor e levedura 2,598 log CFU.mL<sup>-1</sup> no tratamento com as nanopartículas. Entre os tratamentos com diferentes desinfetantes, não foram observadas diferenças, como pode ser visto na Figura 4.

**Figura 4:** Análises de micro-organismos bioindicadores em cascas de ovos embrionados de perus que passaram por diferentes tratamentos desinfetantes. **A:** resultados de contagens de colônias de bactérias mesófilas presentes nas cascas de ovos de perus condicionados a diferentes tratamentos (controle – sem desinfecção-, nanopartículas de ZnO-Ag, ácido peracético (25.000ppm/40min) e formol (10%)). **B:** resultados das contagens de colônias de coliformes totais encontradas em cascas de ovos de perus submetidos a diferentes tratamentos desinfetantes. **C:** resultados das contagens de colônias de *Escherichia coli* encontradas em

cascas de ovos de perus submetidos a diferentes tratamentos desinfetantes. **D**: resultados das contagens de bolores e leveduras encontrados em cascas de ovos de perus submetidos a diferentes tratamentos desinfetantes.

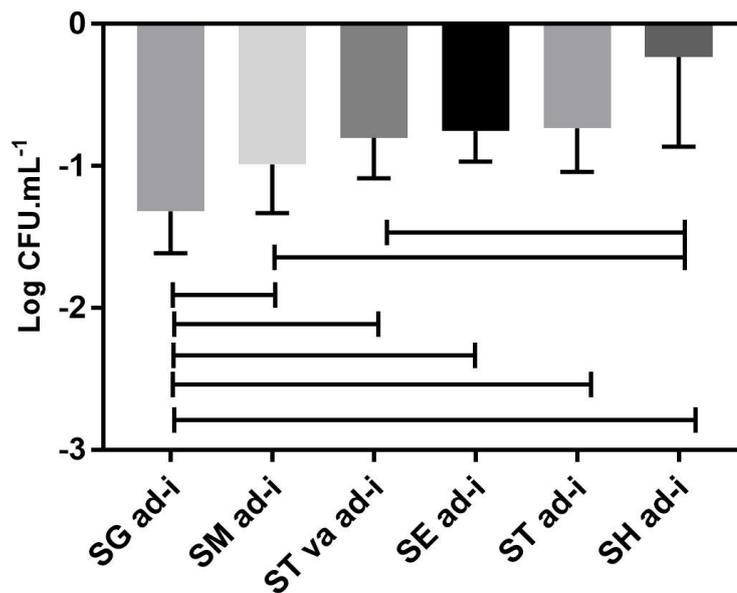


### 4.3 Avaliação de biofilme

#### 4.3.1 Habilidade de aderir em poliestireno

O índice de aderência à placa de poliestireno foi calculado com base na diferença de contagens (log de CFU/mL) entre o processo de adesão e o inóculo inicial. Houve diferentes capacidades de aderência para as cepas estudadas, sendo a *S. Gallinarum* a menos aderente e a *S. Heidelberg* a mais aderente (Figura 5).

**Figura 5:** Índice de aderência das cepas de *Salmonella* em placa de poliestireno calculados pela diferença entre adesão e a contagem inicial do inóculo (log de UFC/mL). SG ad-i: índice de aderência *Salmonella* Gallinarum; SM ad-i: índice de aderência *Salmonella* Minnessota; ST va ad-i: *Salmonella* Tiphymurium variante; SE ad-i: índice de aderência *Salmonella* Enteritidis; ST ad-i: índice de aderência *Salmonella* Tiphymurium; SH ad-i: índice de aderência *Salmonella* Heidelberg.



#### 4.3.2 Classificação e quantificação dos biofilmes de *Salmonella* em placas

A avaliação da formação de biofilme pode ser vista na Tabela 2. De acordo com a classificação de Naves et al. (2008), apenas os sorotipos *S. Minnessota* e *S. Gallinarum* e foram capazes de formar biofilme em placas de poliestireno.

**Tabela 2.** Índice de formação de biofilme das cepas de *S. Minnessota* (SM), *S. Gallinarum* (SG), *S. Heidelberg* (SH), *S. Tiphymurium* (ST), *S. Tiphymurium* variante e *S. Enteritidis* em placa de poliestireno.

	SM	SG	SH	ST	STva	SE
<b>IFB</b>	<b>0,91</b>	<b>0,75</b>	<b>0,32</b>	<b>0,28</b>	<b>0,24</b>	<b>0,19</b>

#### 4.3.3 Diferença entre número de bactérias do inóculo inicial, adesão e biofilme

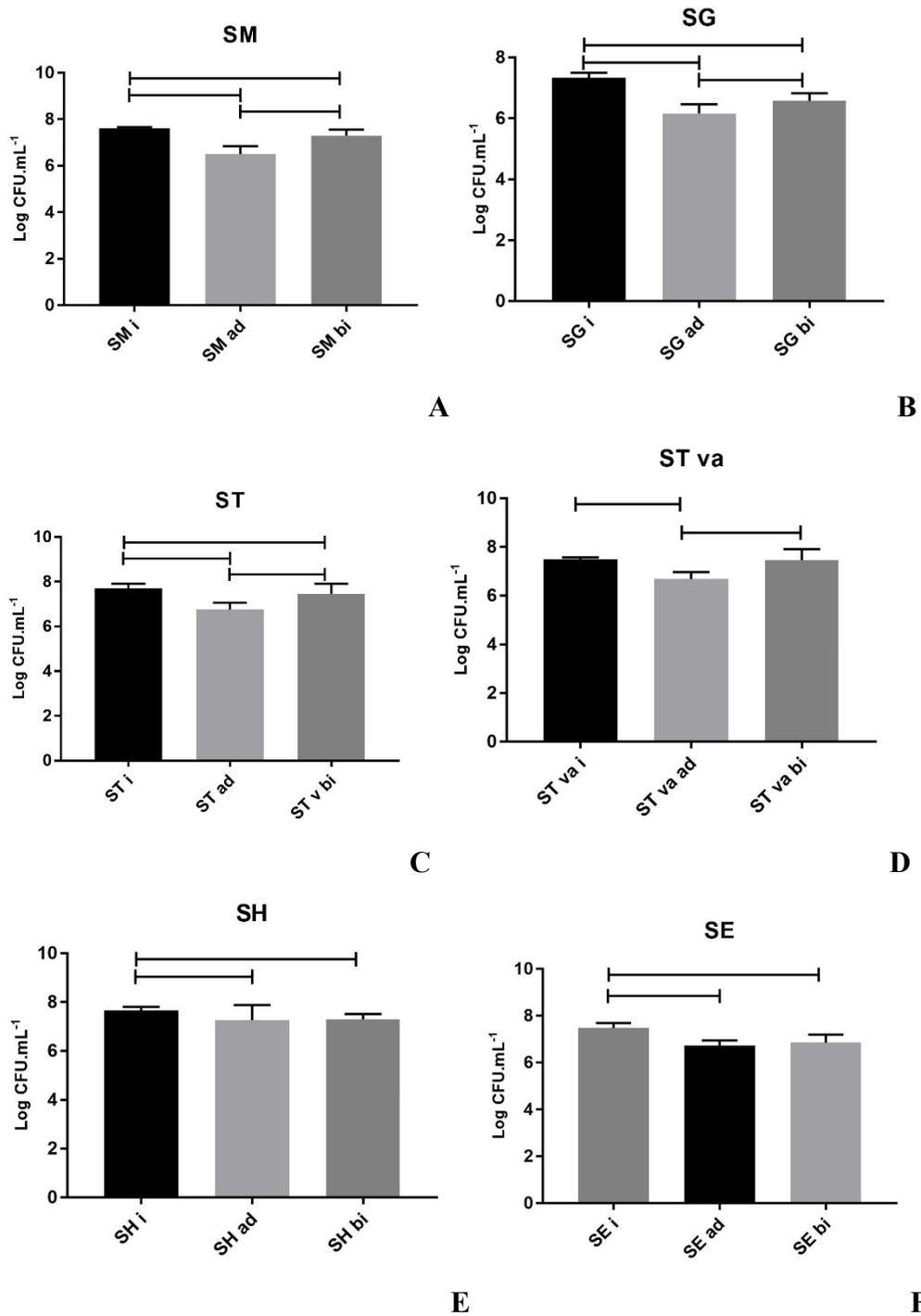
Observa-se comportamento semelhante entre as cepas de *S. Minnessota*, *S. Gallinarum* e *S. Tiphymurium*. Nos três casos a quantidade de bactérias encontradas no inóculo inicial foi maior, diferente estatisticamente, que a obtida no processo de adesão. No entanto, o número de células bacterianas obtidas na formação dos biofilmes é maior, também significativamente diferentes, que o número observado no processo de adesão, como é possível visualizar na figura 6 (A, B e C).

Para a cepa de *S. Tiphymurium* variante, observa-se que o número de bactérias encontradas no processo de adesão foi menor do que o obtido no inóculo inicial. A quantidade de células bacterianas durante a formação do biofilme é crescente, assim, observa-se que o número de células na formação do biofilme voltou a valores idênticos ao inóculo inicial, como visto na figura 6 (D).

As *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis* apresentaram comportamentos semelhantes. Em ambos os casos houve redução no número de célula bacterianas do inóculo inicial em relação ao processo de adesão, e o mesmo não difere significativamente do número de células observadas no processo de formação do biofilme, como observa-se na figura 6 (E e F).

**Figura 6.** Comparação da contagem dos isolados de *Salmonella* do inóculo inicial (i), nos processos de adesão (ad) e de formação de biofilme (bi). **A:** avaliação da contagem de *S. Minnessota* (SM) isolada no inóculo inicial, processo de adesão e de formação de biofilmes; **B:** avaliação da contagem de *S. Galinarum* (SG) isoladas no inóculo inicial, processo de adesão e de formação de biofilmes; **C:** avaliação da contagem de *S. Tiphymurium* (ST) isolada no

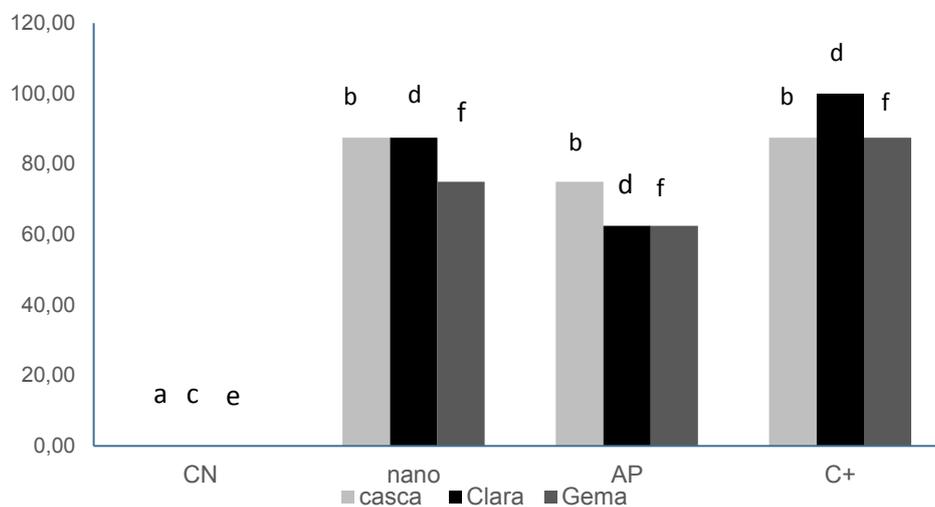
inóculo inicial, processo de adesão e de formação de biofilmes; **D**: avaliação da contagem de *S. Thiphymurium* variante (STva) isolada no inóculo inicial, processo de adesão e de formação de biofilmes; **E**: avaliação da contagem de *S. Heidelberg* (SH) isolada no inóculo inicial, processo de adesão e de formação de biofilmes; **F**: avaliação da contagem de *S. Enteritidis* (SE) isolada no inóculo inicial, processo de adesão e de formação de biofilmes;



#### 4.4 Nanopartículas (ZnO-Ag) no controle de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis formados em cascas de ovos e sua passagem para clara e gema

Houve formação de biofilme em todos os grupos expostos a bactéria e houve passagem da bactéria para o interior de clara e gema. A percentagem de ovos positivos na casca, clara e gema não diferenciaram entre os grupos tratados e o controle positivo (Figura 7).

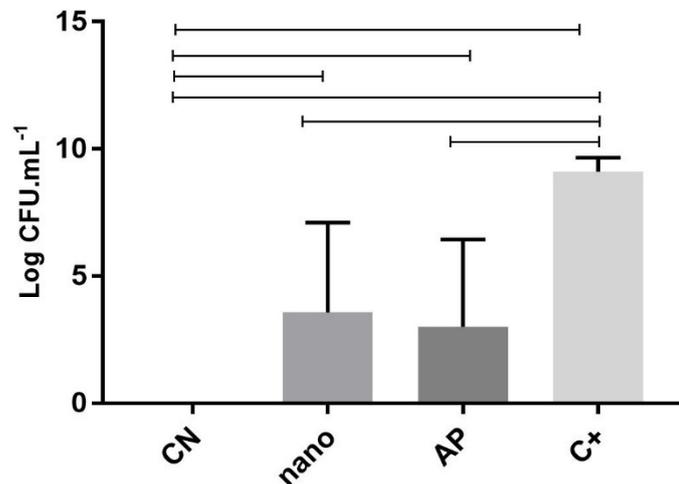
**Figura 7:** Percentual de amostras positivas para *S. Enteritidis*, para casca, clara e gema, nos grupos CN (controle negativo), nano (nanopartícula, ZnO-Ag), AP (ácido peracético) e C+ (controle positivo).



As letras diferentes (a,b) representam diferenças estatística para presença de *S. Enteritidis* na casca dos ovos; Letras c,d) significam diferenças estatística para presença de *S. Enteritidis* na clara dos ovos; Letras (e,f) significam diferenças estatística para presença de *S. Enteritidis* nas gemas dos ovos;

Na avaliação da inibição de bactérias em biofilme de *S. Enteritidis* na casca dos ovos, observou-se que o tratamento com nanopartículas de óxido de zinco dopados com prata e com ácido peracético não foram capazes de inibir totalmente a presença das bactérias em biofilmes. No entanto reduziram expressivamente a carga contaminante, ácido peracético reduziu 6,092 Log UFC/mL e a nanopartícula de ZnO-Ag reduziu 5,538 Log UFC/mL quando se compara ao grupo controle positivo (sem desinfecção), como observa-se na Figura 8.

**Figura 8:** Resultados da inibição da carga microbiana em biofilmes de *S. Enteritidis* em ovos de perus submetidos a diferentes tratamentos desinfetantes: CN (controle negativo), nano (nanopartículas de ZnO-Ag), AP (ácido peracético) e C+ (controle positivo).



#### 4.5 Nanopartículas (ZnO-Ag) no controle e prevenção de biofilmes de *Salmonella* Heidelberg formados em cascas de ovos e sua passagem para clara e gema

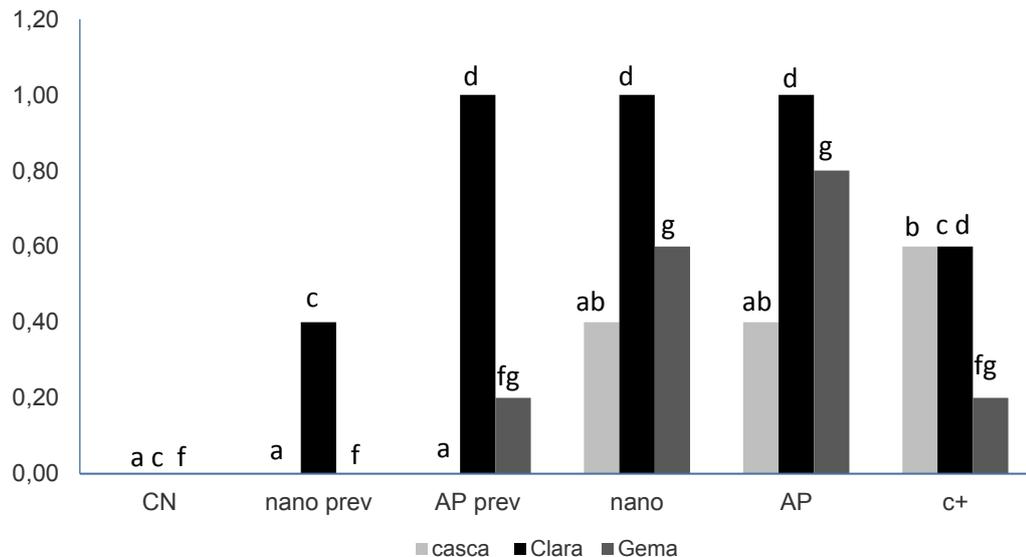
Os ovos que receberam tratamentos prévios à contaminação com a *S. Heidelberg*, tanto de nanopartículas ZnO-Ag quanto de ácido peracético, não foram identificadas *Salmonella* spp. na casca e, portanto, não houve formação de biofilmes. Os demais tratamentos apresentaram *S. Heidelberg* na casca, como se observa na figura 9.

A presença de *S. Heidelberg* nos albumens foi estatisticamente menor no grupo de tratamento com nanopartículas de ZnO-Ag previamente à contaminação com a *S. Heidelberg* em comparação com os demais grupos tratados. Entre os tratamentos com ácido peracético prévio, nanopartícula pós contaminação com *Salmonella* spp. e ácido peracético após a contaminação com a *Salmonella*, não houve diferença significativa para invasão na clara.

Nas gemas do grupo nano prévia, 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 tratados com ácido peracético previamente e no grupo controle positivo, eles não diferiram estatisticamente do grupo tratado previamente com nanopartículas de ZnO-Ag.

**Figura 9:** Percentual de amostras de ovos que formaram biofilme de *S. Heidelberg* e com passagem de bactérias para clara e gema no grupos controle negativo (CN), nano prev

(nanopartículas de ZnO-Ag aplicadas 24 horas antes da exposição às bactérias e 30 minutos após 24 horas de contato com as bactérias), AP prev (ácido peracético aplicado 24 horas antes da exposição às bactérias e 30 minutos após 24 horas de contato com as mesmas), nano (aplicação de nanopartículas de ZnO-Ag por 30 minutos, após 24 horas de contato com as bactérias), AP (aplicação de ácido peracético por 30 minutos, após 24 horas de contato com as bactérias), C+ (controle negativo).

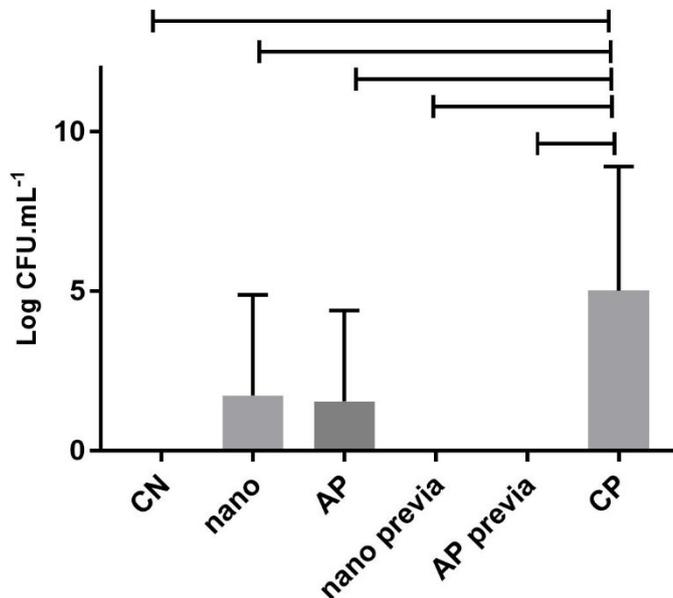


Letras diferentes (a,b) indicam diferenças estatísticas para presença de *S. Heidelberg* nas cascas; Letras diferentes (c,d,e) indicam diferenças estatística para presença de *S. Heidelberg* para claras; Letras diferentes (f,g,h) indicam diferenças estatísticas para presença de *S. Heidelberg* nas gemas;

A desinfecção dos ovos realizada previamente ao contato com *S. Heidelberg*, usando nanopartículas de ZnO-Ag e ácido peracético, apresentaram os melhores resultados no controle de biofilmes. De forma geral todos os tratamentos propostos causaram expressiva redução da quantidade de *Salmonella* encontradas nas cascas dos ovos em comparação com o observado no grupo controle positivo, como pode ser observado na Figura 10.

**Figura 10:** Avaliação da inibição da produção de biofilmes de *S. Heidelberg* em cascas de ovos de perus tratados com nano (ZnO-Ag 30 minutos após 24 horas de contato com as bactérias), AP (25.000 ppm de ácido peracético 30 minutos após 24 horas de contato com as bactérias), nano prévia (ZnO-Ag aplicado 24 horas antes do contato com as bactérias e 30 minutos após as 24 horas de contato com as mesmas), AP prévio (25.000 ppm de ácido peracético 24 horas antes

do contato com as bactérias e 30 minutos após as 24 horas de contato com as mesmas), CP (controle positivo, expostas às bactérias e não receberam nenhuma desinfecção) e CN (não expostos a bactérias e a desinfetantes).



#### 4.6 Avaliação das espécies e genes de virulência

As cepas de *Salmonella* Enteritidis e de *Salmonella* Heidelberg foram confirmadas nas amostras de albúmen, vitelo e também nas colônias típicas de *Salmonellas* isoladas das cascas dos ovos nas avaliações de biofilmes, por PCR tendo sido encontrado o gene *ompC*. Além desse gene, as cepas também foram positivas para os sete genes de virulência avaliados: *invA*, *agfA*, *sefA*, *IpfA*, *luxS*, *sodC* e *avrA*.

#### 4.7 Poros e rugosidades das cascas dos ovos

Não foi observada diferença estatística entre os diâmetros de poros dos ovos tratados com nanopartículas de ZnO-Ag, que receberam desinfecção prévia ou não, e o grupo controle negativo (tabela 3). Conforme a figura 11 é possível verificar as porosidades dos ovos de perus. Além disso, a figura mostra também a presença de rugosidades maiores e menores na casca.

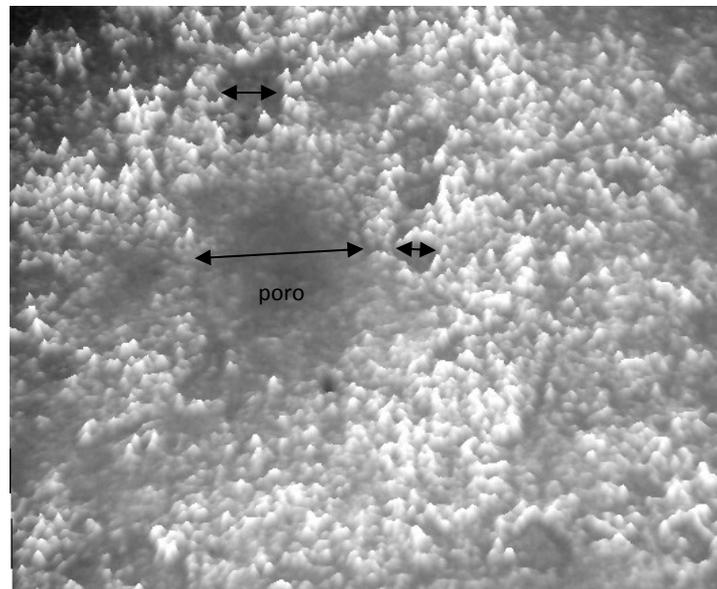
**Tabela 3:** Médias dos diâmetros dos poros e alturas de rugosidades das cascas de ovos de perus grupos: Controle negativo (ovos não expostos a bactérias e à desinfetantes), Nano pós (ovos aplicados nanopartículas de ZnO-Ag por 30 minutos após 24 horas de contato com *Salmonellas*)

e Nano prévia (ovos que foram aplicadas nanopartículas de ZnO-Ag 24 horas antes do contato com as *Salmonellas* e por 30 minutos após as 24 horas de exposição às bactérias).

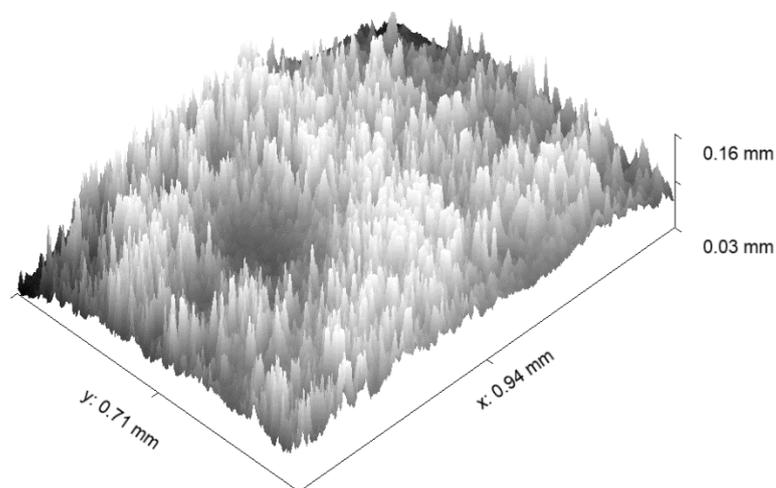
	Controle	Nano pós	Nano prévia
Diâmetro dos poros ( $\mu\text{m}$ )	4,032	4,095	4,536

**Figura 11:** Imagem gerada em microscopia Confocal de Raman, onde é possível visualizar a característica rugosa das cascas de ovos de perus e bem a conformação dos poros existentes nas mesmas. A seta preta mostra os poros nas cascas. **A** mostra a superfície da casca e **B** é uma figura em 3D de casca de ovo de peru.

**A**



**B**



#### 4.8 Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura

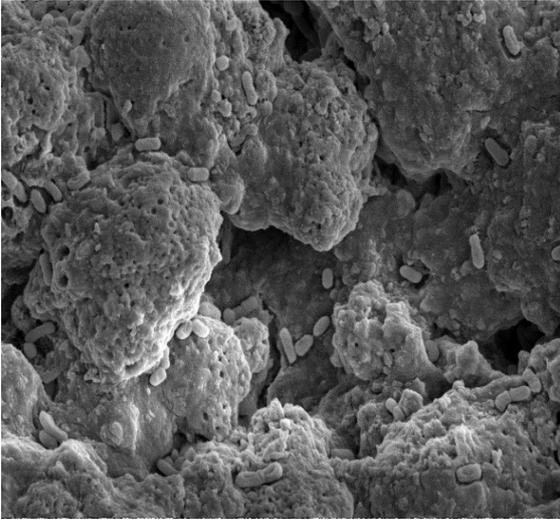
Foram geradas imagens que permitem conhecer um pouco mais das características dos biofilmes de *Salmonella* spp. bem como os aspectos físicos das matrizes que compõem as biomassas. No grupo controle positivo foram visualizadas, abundantemente, formações características de biofilmes e um grande número de bactérias livres na superfície desses biofilmes (Figura 12: A, B, C, D e E).

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 as mesmas não eram morfologicamente compatíveis com as observadas no grupo controle. Além disso, não se encontrou bactérias livres em tamanhos e formatos típicos de *Salmonella* spp.

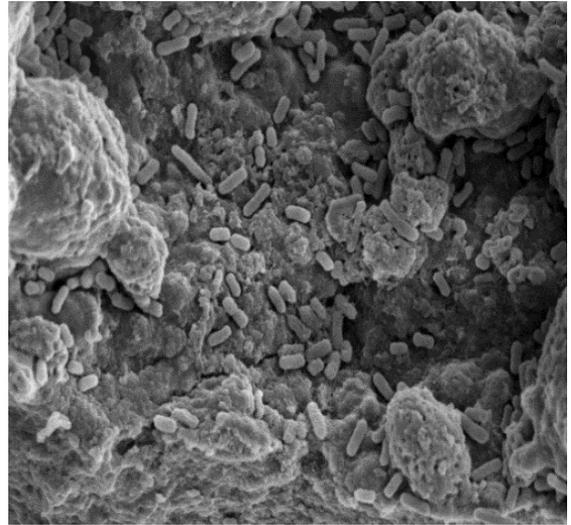
No grupo controle negativo também não visualizou-se estruturas semelhantes às formações observadas no grupo controle positivo. Foram vistos micro-organismos em formatos de bastões, porém mais alongados que as *Salmonellas*, juntos com outros arredondados e uma pequena quantidade de matriz também diferente da observada no controle positivo (figura 12: F e G).

**Figura 12:** Imagens geradas em microscopia eletrônica de varredura a partir de cascas de ovos de perus, submetidos a tratamentos desinfetante ou não e expostas a *S. Heidelberg* por 24 horas. **A:** Formação típica de matriz de biofilme de *Salmonella* spp. com a presença de bactérias adentrando a mesma. **B:** Matriz de biofilme de *Salmonella* spp. e grande número de bactérias livres na superfície da mesma. **C:** Biofilme de *Salmonella* spp. e presença de bactérias livres na superfície. Medida de comprimento (2,245  $\mu\text{m}$ ) de uma *Salmonella Heidelberg*. **D:** Biofilme de *Salmonella* e presença de bactérias livres na superfície. Medida de largura (703,1 nm) de uma *S. Heidelberg*. **E:** Biofilme de *Salmonella* em etapa de expansão, com visualização das bactérias liberando a matriz. **F:** Estrutura semelhante à matriz de biofilme de *Salmonella*, porém desconfigurada e visualizam-se bactérias em formatos diversos (grupo controle negativo). **G:** Grupo de células em formatos diversos verificadas próximas à matriz desconfigurada observada no grupo controle negativo.

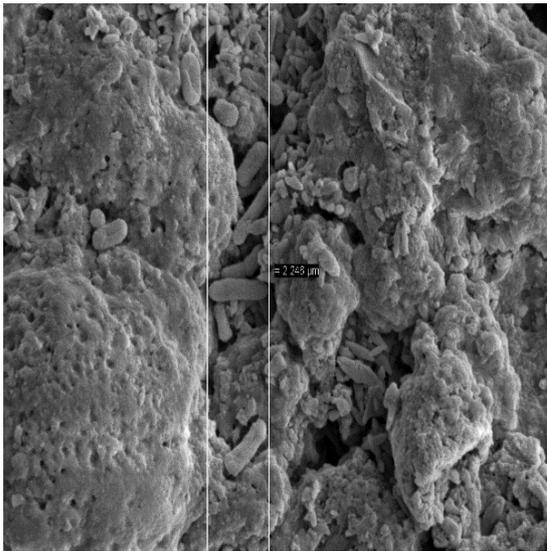
**A**



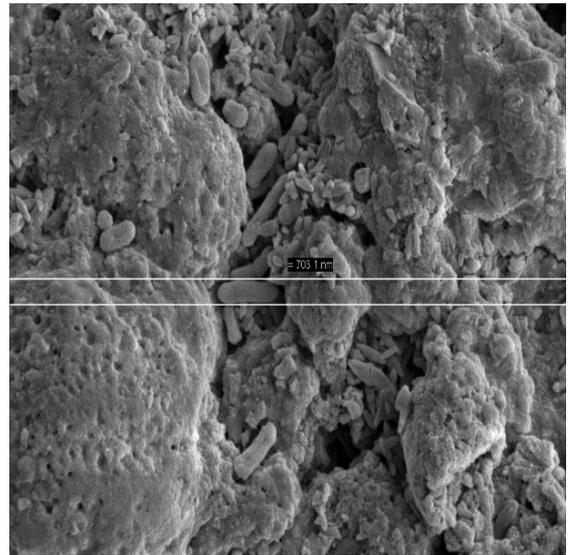
**B**



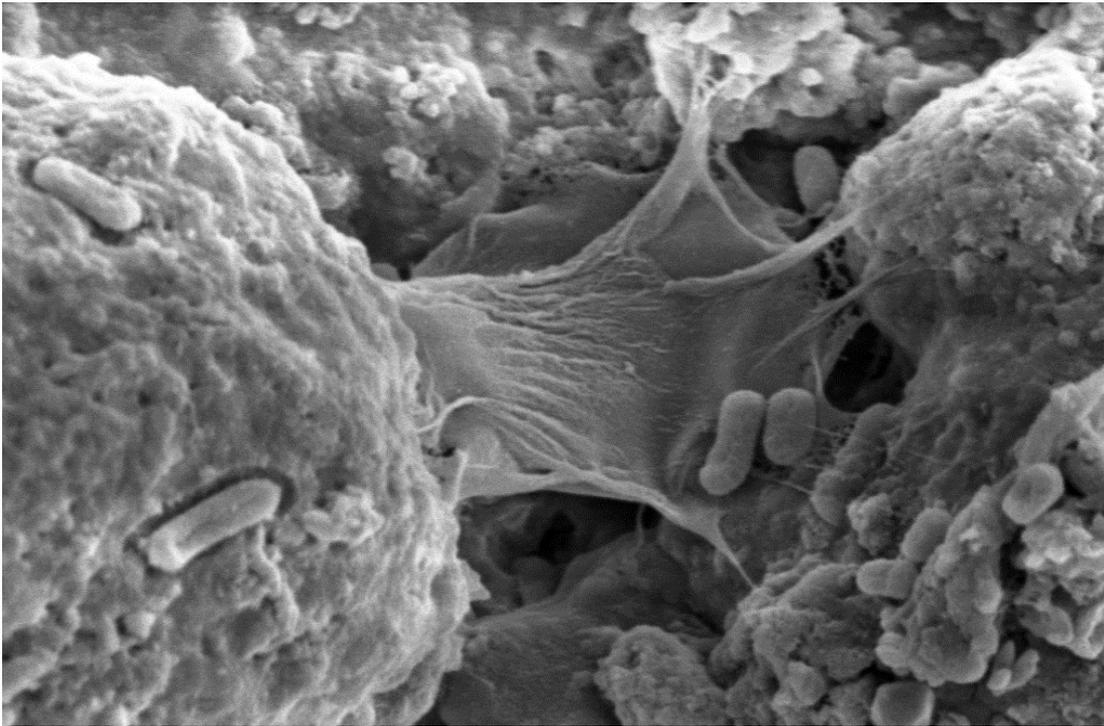
**C**



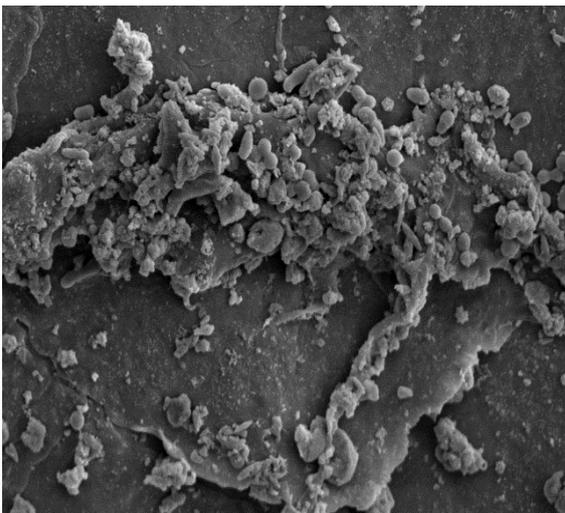
**D**



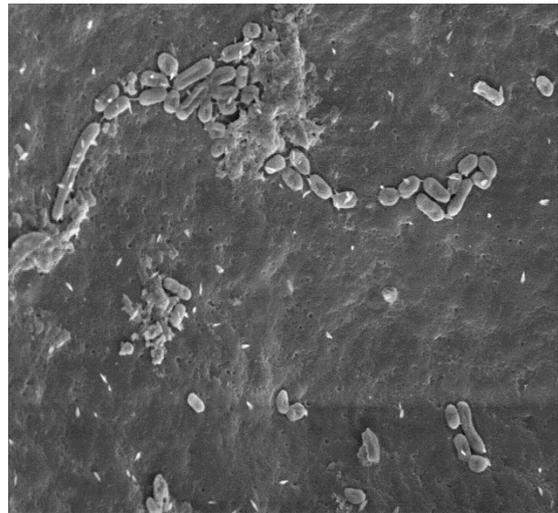
**E**



**F**



**G**



## 5. Discussão

O presente trabalho é pioneiro em nanotecnologia e demonstra pela primeira vez o uso de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata, utilizadas em aspersão, como método de controle e prevenção da formação de biofilme de *Salmonella* spp. O óxido de zinco é considerado seguro, sendo já utilizado na avicultura. A prata também tem grande aplicação em diversos produtos, sendo já considerada segura a sua utilização na forma de nanopartículas por alguns autores (DASTJERDI; MONTAZER, 2010; UHU; KWON, 2011). Quando se faz a dopagem de prata no óxido de zinco parece haver uma melhora substancial da atividade antimicrobiana já conhecida do óxido de zinco. Algumas pesquisas mostram os efeitos de toxicidade principalmente do óxido de prata, porém essas pesquisas muitas vezes são limitadas a trabalhos “in vitro” ou em dosagens muito superiores à utilizada nesse trabalho

Como as medidas dos halos de inibição das três dopagens de prata não foram diferentes para inibição das cepas de *Salmonella* spp. em placa, optou-se pela utilização da menor dopagem. A atividade inibitória similar entre as dopagens faz crer que a inserção da prata nas moléculas de ZnO tenha efeito potencializador da ação bactericida que não é dose-dependente para inibição de *Salmonella* spp, porém isso deve ser melhor avaliado em trabalhos futuros.

Não foram encontradas *Salmonella* spp. nos ovos avaliados, mas, como esperado, todos os micro-organismos bioindicadores estavam presentes nos ovos não tratados com os desinfetantes testados. De acordo com Aragon-Alegro et al. (2005) e Stringhini et al. (2009), processos de lavagem e a utilização de desinfetantes reduzem os riscos de contaminação dos ovos, propiciando uma melhor qualidade bacteriológica de cascas, conseqüentemente do ovo como todo. Todos os tratamentos testes realizados no presente trabalho levaram a uma significativa redução no número de micro-organismos (mesófilos, coliformes totais, *E. coli* e bolores/leveduras). Esses micro-organismos são indicadores importantes de qualidade e uma menor carga desses nas cascas dos ovos irá influenciar também a qualidade do ovo, visto que algumas bactérias e fungos podem penetrar nos poros dos ovos.

Mesmo com resultados semelhantes para o controle de micro-organismos bioindicadores em todos os grupos tratados, destaca-se a atuação da nanopartícula de ZnO-Ag, em virtude do desempenho tão efetivo quanto do ácido peracético e do formol. Apesar da Instrução Normativa nº 56, publicada em dezembro de 2007, não dispor sobre como deve ser feita a desinfecção dos ovos férteis, fica bem clara a obrigação de se proceder com limpeza e desinfecção dos ovos o mais breve possível após a postura. Sabe-se que o ácido peracético é um potente biocida tendo atividade contra fungos, vírus, bactérias e esporos (BARAH, 2013).

A indicação de desinfecção de ovos pelos fabricantes do ácido peracético é aproximadamente 200 ppm durante 10 segundos a 30 minutos e nesse trabalho foi utilizada uma concentração de 25.000 ppm por imersão durante 40 minutos. Devido a experiência de pesquisadores desse grupo de pesquisa e a relatos na literatura, já era esperado o controle de bioindicadores após o tratamento com as nanopartículas de ZnO-Ag. Porém, a intenção no presente estudo foi avaliar se as nanopartículas poderiam controlar os principais micro-organismos indicadores tão bem quanto ao ácido peracético em uma concentração e tempo de ação mais altos que normalmente indicado pelos fabricantes.

Em relação ao formaldeído, a literatura trata-o como um agente biocida de amplo espectro de ação, sendo eficaz inclusive no combate de vírus. No entanto, por ser considerado com potencial carcinogênico, vem sendo substituído por outros desinfetantes que sejam mais seguros para os trabalhadores (MORGULIS; SPINOSA, 2005). Nesse contexto, destacamos novamente a importância de desenvolvimento de novas moléculas e vemos que a nanopartícula de ZnO-Ag teve ação estatisticamente igual a dois dos mais importantes desinfetantes usados na avicultura.

A *Salmonella* spp. constitui o grupo de bactérias com maior associação a casos de toxinfecções alimentares em todo o mundo, e uma das características que a torna tão veiculada é a formação de biofilmes. Ao formar biofilme torna-se possível a sobrevivência das bactérias mesmo em ambientes hostis, dificultando a eliminação das mesmas. Assim, é importante conhecer sobre as características de formação de biofilme dessas bactérias.

Avaliando conjuntamente os resultados de inóculo inicial, adesão e formação de biofilme em placas de poliestireno, percebe-se que as diferentes cepas de *Salmonella* não seguem um padrão de crescimento, multiplicação e de formação de biofilme. De acordo com Steenackers et al. (2012), *Salmonella* spp. é capaz de formar biofilmes de maneira expressiva e em diferentes superfícies, sejam bióticas (células epiteliais, plantas) ou abióticas (plástico, borracha, vidro e aço inoxidável).

Seguindo a classificação proposta por Naves et al. (2008), somente os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Minnesota* foram capazes de produzir biofilmes, sendo ambos classificados como médios formadores de biofilme. A *S. Heidelberg*, apesar de um índice muito próximo (IFB = 0,32) para a classificação de fraca formadora, e as demais cepas estudadas, não seriam formadoras de biofilme. No entanto, ao se avaliar os resultados apresentados na figura 6 (A, B, C e D), referentes às cepas *S. Minnesota*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* variante, percebe-se que houve a adesão e formação do biofilme, pois mesmo após intensas lavagens houve recuperação no número de bactérias e também a sua multiplicação após o

processo de adesão. No caso da *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis* não houve multiplicação das bactérias, mas a carga bacteriana foi similar durante o processo de adesão e formação de biofilme. Esse resultado mostra que de alguma forma as bactérias conseguiram sobreviver e/ou se multiplicar em algum local que possivelmente era o biofilme. Dessa forma os resultados dos índices de formação de biofilme encontrados nesse trabalho, mostram que nas condições testadas houve a formação de biofilmes e que possivelmente o modelo proposto por Naves et al. (2008), não deve ser aplicado para todas as condições e laboratórios.

Os resultados da formação de biofilme encontrados nesse trabalho instigaram os pesquisadores do grupo a trabalhar com as cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*. Isso porque essas cepas não se multiplicaram após o processo de adesão em placas de poliestireno e seria interessante avaliar a formação de biofilme e sobrevivência desses sorovares em ovos.

De acordo com Gustin (2003), a *Salmonella* spp. 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. Enteritidis*, onde observou-se a presença das bactérias em questão no albúmen e vitelo de todos os grupos expostos, tendo recebido tratamento desinfetante ou não. Além disso, os procedimentos padronizados para a contagem das bactérias em biofilmes mostram que de alguma forma havia a presença da *S. Enteritidis* na forma livre.

Os ovos possuem estruturas físicas que, quando íntegras, funcionam como barreiras, dificultando a entrada de micro-organismos: a cutícula e uma camada formada de material denso que delimita a membrana da casca e a clara (RUIZ; LUNAM, 2002). 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* spp. ocorre, na maioria das vezes, através da casca (SILVA JUNIOR, 2005).

Os resultados observados nos tratamentos desinfetantes para controle de *S. Enteritidis* em biofilmes em cascas de ovos de perus demonstraram redução expressiva da carga bacteriana nos grupos tratados. No entanto, entre os tratamentos (nanopartículas de ZnO-Ag e ácido peracético) não foi observada diferença. É importante destacar aqui que a concentração de ácido peracético utilizada foi muito superior, mais de cem dez 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).

Os resultados com o tratamento das nanopartículas em biofilmes, apesar de não ser superior ao ácido peracético em alta dosagem, fez com que o grupo de trabalho procurasse mais alternativas de tratamento para verificar o sucesso ou não das nanopartículas de ZnO-Ag como desinfetante. Dessa forma, ao se trabalhar com a cepa de *S. Heidelberg* em ovos de perus, outros grupos de tratamentos foram adicionados e também outras análises. Em um primeiro momento, relacionando o resultado da análise de formação de biofilme *in vitro* (possível interpretação de não formação de biofilme da cepa de *S. Heidelberg*) e a metodologia consagrada de contagens para avaliação de biofilmes foi questionado se os biofilmes estavam realmente sendo formados. Para responder tal pergunta foi realizada a microscopia eletrônica de varredura para avaliar a formação do biofilme. Além disso foi avaliada a presença de alguns genes de virulência para verificar se as cepas estudadas tinham estruturas genéticas importantes para invasão, sobrevivência no ambiente e formação de biofilme.

Com os resultados da MEV a formação dos biofilmes fica evidenciada. No grupo controle positivo, como esperado, observou-se com muita facilidade grandes extensões de biomassas em todas as amostras avaliadas com a presença de um grande número de bactérias (Figura 12). 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 as mesmas não eram morfológicamente compatíveis com as observadas no grupo controle positivo. Além disso, não foram encontradas bactérias livres em tamanhos e formatos típicos de *Salmonella* spp. como pode ser visto na Figura 12.

No grupo controle negativo também não foram visualizadas estruturas semelhantes às formações observadas no grupo controle positivo apesar da possibilidade de haver formação de biofilmes por bactérias contaminantes naturais do próprio ovo já que esse grupo não foi tratado. Após uma intensa busca foram vistas uma pequena quantidade micro-organismos esparsos em formatos de bastões, porém mais alongados que a *Salmonella* spp., juntos com outros arredondados e uma pequena quantidade de matriz também diferente da observada no controle positivo (Figura 12- F e G).

Com o resultado da MEV o grupo traçou outra estratégia que foi o tratamento prévio dos ovos com as nanopartículas. 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 salmonelas testadas.

Avaliando-se o processo de inibição da produção de biofilmes com o controle da *S. Heidelberg*, 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, tanto com uso de nanopartículas de ZnO-Ag quanto com o uso do ácido peracético (25.000 ppm). No entanto, ao avaliar a passagem da bactéria para o interior do ovo verificou-se um resultado melhor das nanopartículas de ZnO-Ag frente ao ácido peracético em alta dosagem. Isso porque, na clara houve uma menor percentagem de ovos com a presença da salmonela e a bactéria não atingiu a gema dos ovos tratados previamente com nanopartícula (Figura 9) diferente do que ocorreu com tratamento prévio com ácido peracético. Esse resultado apresenta uma boa contribuição referente aos desafios epidemiológicos da avicultura frente à *Salmonella* spp. As nanopartículas de ZnO-Ag utilizadas antes da chegada da bactéria no ovo geram maior eficácia em controle da *S. Heidelberg* que o ácido peracético, não sendo observadas a presença das bactérias nas gemas dos ovos desse grupo.

Outro resultado alarmante, apresentado na Figura 9, está no fato do grupo controle positivo ter menor número, e significância diferente, de claras de ovos invadidas pela *S. Heidelberg* do que os grupos tratados com ácido peracético (preventivamente ou não) e nanopartículas de ZnO-Ag somente posterior ao contato com as bactérias. Tal resultado especialmente visualizando a altíssima concentração utilizada de ácido peracético, faz crer que o tratamento desinfetante atuou como surfactante para o processo de adentramento das bactérias nos ovos. Assim, verifica-se que o tratamento com as nanopartículas de ZnO-Ag previamente à exposição à *S. Hiedelberg* apresenta melhor resultado conseguindo atuar preventivamente na translocação bacteriana para o interior dos ovos, não sendo observada

A expressão de genes de que codificam fatores de virulência é o que muitas vezes determina se uma bactéria será patogênica ou não, favorecendo mecanismos de invasão, colonização e sobrevivência em situações adversas (VIEIRA, 2009). A formação gênica e a

expressão dos genes relacionados à virulência em *Salmonellas* spp. sobre constante regulação a fim de agregar capacidades que permitam a sobrevivência da bactéria (ZHANG, 2013).

No presente trabalho, estudamos principalmente cepas de *S. Enteritidis* e de *S. Heidelberg*, dois sorotipos muito frequentemente envolvidos em casos de intoxicações alimentares (MEDEIROS et al., 2011; SCALLAN et al., 2011; PANDINI et al., 2015). A identificação dos genes de virulência: *invA* (processo de invasão), *agfA*, *sefA* e *lpfA* (adesão e biofilme), *avrA* (gene ligado a processos de apoptose), *sodC* (estresse oxidativo) e *luxS* (*quorum-sensing*) demonstra a importância de estudos contínuos sobre as características de atuação desses micro-organismos, possibilitando melhor controle e a prevenção da disseminação dos mesmos.

Outra questão levantada no presente trabalho tratava sobre possíveis diferenças nas características dos ovos, apesar de serem de mesma origem, que pudessem influenciar no tratamento das nanopartículas antes e após a formação dos biofilmes. Dessa forma a avaliação dos ovos pelo confocal de Raman colaborou muito. Com as imagens obtidas foi possível realizar medidas dos diâmetros dos poros da região equatorial dos ovos testados e associar com o tamanho da *S. Heidelberg*, imagem gerada na MEV, e concluir que o diâmetro dos poros permite facilmente a entrada de tais bactérias nos ovos, achados que corroboram com o descrito na literatura (SILVA JUNIOR, 2005).

A observação de não alteração dos diâmetros dos poros das cascas dos ovos de perus submetidos a tratamentos com uso de nanopartículas de ZnO-Ag dopado com prata, mostra que a interferência na formação dos biofilmes ou na passagem da bactéria para o interior dos ovos é devido aos diferentes tratamentos com nanopartícula e em nenhuma interferência da variável espessura dos poros das cascas dos ovos de perus.

## 6. Considerações finais

Apesar do extenso conhecimento técnico-científico sobre *Salmonella* spp. na avicultura ela ainda é um problema real para o Brasil e nos principais países produtores e exportadores de aves. O desenvolvimento de novas tecnologias surge como alternativa para o controle de tais bactérias, assim as nanopartículas sem dúvida são alternativas factíveis. Esse trabalho mostra o sucesso do tratamento com a nanopartícula ZnO-Ag frente micro-organismos bioindicadores e formas livres de *Salmonella* spp. Além disso mostra que a nanopartícula utilizada preventivamente a contaminações, pode contribuir para menor passagem para o interior dos ovos e menor sobrevivência da *Salmonella* spp. nos mesmos. Devido a importância da saúde animal e da saúde pública esse grupo de pesquisa ainda avalia o depósito dos metais de prata e zinco nos ovos, toxicidade dessas nanopartículas para os animais, melhor forma de aplicação desse material e sua eficiência sobre outros micro-organismos. O grupo de pesquisas continua engajado em busca de resultados que contemplem informações completas para a comunidade científica e para que as empresas que possam utilizar de tal tecnologia.

## REFERÊNCIAS

ABPA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Mercado Mundial de Perus 2014**. Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial/peru>>. Acesso em 13 de julho de 2017.

ABPA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2017**. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em 13 de julho 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. doi:10.1177/0022034510377794

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. doi: 10.1128/JCM.42.4.1734-1738.2004

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.

ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n.3, p. 618-622, 2005. doi:10.1590/S0101-20612005000300036

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.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966. doi:10.1093/ajcp/45.4\_ts.493

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. doi:10.1128/IAI.00695-07

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. doi:10.1590/S0101-20612009000400029

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**; v.12, p. 620–636, 2011. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.001

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. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04743.x

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. doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.025

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos – Relatório 2015**. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em 07 agosto 2017.

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: 23 junho 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 07 agosto 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. doi:10.3390/ijerph13010099

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. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x

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. doi:10.1128/AEM.72.2.1055-1064.2006

COLLINSON, K. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.1, p.12-18, 1993. doi.org/10.1128/jb.175.1.12-18.1993

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. (2013). 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. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.005

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species, in: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 2007. doi:10.1128/9781555815912.ch10

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. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.03.029

DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholera*. **Antimicrobial agents 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. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

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](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf)>. Acesso em: 8 de julho 2017.

FDA (Food and Drug Administration). Food and Drugs. 2016. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.899>> Acesso em 13 de julho de 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.

Fórum de Competitividade de Nanotecnologia. Disponível em: <<http://forumnano.abdi.com.br/sitepages/noticias.aspx/?NoticiaID=74>>. Acessado em: 13 de agosto de 2012.

FREITAS, Adriana Garcia. **Efeito da fumigação de nascedouros sobre o trato respiratório e desempenho de frangos de corte**. 2007. 59 f. Pós-graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

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. doi:10.1002/adma.200400833

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.

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. doi:10.1016/j.resmic.2003.08.005

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. doi:10.1099/mic.0.2006/000935-0

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 13 de agosto 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. Disponível em: Acesso em: 06 jun. 2017.

GRUMEZESCU, A. M. Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials. 2016. Cap. 2, p. 29.

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. doi:10.1016/j.resmic.2009.10.002

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

GUSTIN, P.C. **Biossegurança no Incubatório**. Manejoda 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/wp-content/uploads/2015/01/CHAPTER-10-MF-30-LATEST-NEW.pdf>>.

HARDIE, K.R.; HEURLIER, K. Establishing bacterial communities by ‘word of mouth’: LuxS and autoinducer in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.8, p. 635-643, 2008. doi:10.1038/nrmicro1916

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.

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. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.002

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in microbiology**. v. 165, n. 7, p. 526 -530, 2014. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.004

KARUNAKARAN, C. et al. Optical, electrical, photocatalytic, and bactericidal properties of microwave synthesized nanocrystalline AgZnO and ZnO. **Solid State Sciences**, v. 13, p. 923-928, 2011. doi:10.1016/j.solidstatedsciences.2011.02.016

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. doi:10.4315/0362-028X-72.9.1841

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004. doi:10.1016/S0160-4120(03)00147-8

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, p. 2833-2881, 2014. doi:10.3390/ma7042833

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. doi:10.1099/13500872-141-9-2271

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. doi:10.1101/gr.097097.109

LI, M. et al Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environ. Sci. Technol**, 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. doi:10.5123/S2176-62232010000100014

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. doi:10.1093/jac/dks138

- 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. **J Nanopart Res**, v. 12, n.5, p. 1531–1551, 2010. doi:10.1007/s11051-010-9900-y
- MARTÍNEZ, L. C.; VADYVALOO, V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in Cellular na Infection Microbiology**, v.4, n. 38, p. 1-15, 2014. doi.org/10.3389/fcimb.2014.00038
- 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. doi:10.1007/s10295-003-0056-y
- MEDEIROS, M.A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamena de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011. doi:10.1590/S1020-49892011001200010
- 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. doi:10.3923/pjbs.2008.1497.1501
- 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. doi:10.1016/j.nano.2011.11.007
- 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. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x
- 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. doi:10.1134/S0026261707020014
- 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. doi:10.1093/jac/dki245
- 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. doi:10.1073/pnas.96.23.13393
- 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.

- PAL, S.; TAK, Y.; SONG, J. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1712–1720, 2007. doi:10.1128/AEM.02218-06
- PAN, B.; XING, B. S. Adsorption Mechanisms of Organic Chemicals on Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n.24, p. 9005-9013, 2008. doi:10.1021/es801777n
- PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n.2, p. 1-6, 2015. doi:10.1590/1808-1657000352013
- PORWOLLIK, S.; McCLELLAND, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v. 5, n.11, p. 977-989, 2003. doi:10.1016/S1286-4579(03)00186-2
- 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. doi:10.1517/17425247.2010.502560
- 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. **Jornal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 722–731, 1998. doi:10.1078/1438-4221-00268
- 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. doi:10.1590/S0036-46652014000600001
- 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. doi:10.1080/713654975
- SAHA, S.; WANG, J. M.; PAL, A. Nano silver impregnation on comercial TiO<sub>2</sub> and a comparative photocatalytic account to degrade malachite green. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 147-159, 2012. doi:10.1016/j.seppur.2012.01.012
- 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.

SAUER, K.; CAMPER, A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.22, p. 6579-6589, 2001. doi:10.1128/JB.183.22.6579-6589.2001

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. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02234.x

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011. doi:10.3201/eid1701.P21101

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. doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.005

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. doi:10.1016/j.cej.2011.09.121

SIFONES, A. B. et al., Preparación de nanopartículas de plata em ausência de polímeros esatabilizates. **Química nova**, v.33, n. 6, p.1266-1269, 2010. doi:10.1590/S0100-40422010000600009

SILVA JUNIOR, E. A. 2005. **Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação**. Ed. 6, Varela, São Paulo. 623 p.

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. doi:10.1205/fbp06022

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. doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008

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. doi:10.1007/s40820-015-0040-x

SMETANA, A. B. et al., Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles. **Langmuir**, v.24, n.14, p. 7457-7464, 2008. doi:10.1021/la800091y

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. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x

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. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012

- SPRICIGO, D. A. et al. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça fresca suína. **Cienc Tecnol Aliment.**, v.2, n. 4, p. 779-785, 2008. doi:10.1590/S0101-20612008000400003
- SREY, S. et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013. doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001
- 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. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038
- 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. doi:10.1637/0005-2086(2002)046[0964:COTFAM]2.0.CO;2
- STOIMENOV, P. K. et al. Metaloxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, v.18, n.17, p. 6679-6686, 2002. doi:10.1021/la0202374
- STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
- STRINGHINI, M. L. F. et al. Características bacteriológicas de ovos lavados e não lavados de granjas de produção comercial. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1317-1327, 2009.
- 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. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.030
- SULAEMAN, S. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test. **Journal Applied Microbiology**, v.108, p.1303-1312, 2009. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04534.x
- SUN, J. et al. Bacterial activation of -catenin signaling in human epithelia. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol*, v.287, n.2, p. 220 –227, 2004. doi:10.1152/ajpgi.00498.2003
- TANIGUCHI, N. Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974.
- TEPLITSKI, M.; AL-AGELY, A.; AHMER, B. M. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbiology**, v. 152, n. 11, p. 3411-3424, 2006. doi:10.1099/mic.0.29118-0
- 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. doi:10.1099/ijs.0.63580-0
- 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. 193-196, 2007. doi:10.1007/s10327-007-0005-0

- 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.
- VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.406-414, 2009.
- 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. doi:10.3382/ps/peu081
- 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. doi:10.1016/j.yrtph.2013.09.006
- WICHLAB, 2016. Disponível em <<http://www.wichlab.com/research/>>. Acesso em: 14 jun. 2017.
- 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. doi:10.1128/JB.185.18.5398-5407.2003
- 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 12 de julho de 2017.
- WRAY, C., WRAY, A. Salmonellosis in domestic animals. Editors: Cabi; Capítulo 1 Taxonomy of the Genus Salmonella, 2000.
- 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. doi:10.1002/jat.1385
- 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. 140-147, 2008. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00697.x
- 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. doi:10.1007/s11051-006-9150-1
- ZHANG, W. et al. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, p.344–54, 2013. doi.org/10.1111/1574-6941.12066
- 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. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.021