

JOSÉ FELÍCIO QUEIROZ FIALHO JÚNIOR

**ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS EM
SUPERFÍCIES DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS
FUNCIONALIZADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F438a Fialho Júnior, José Felício Queiroz, 1989-
2015 Adesão e formação de biofilmes bacterianos em superfícies
de processamento de alimentos funcionalizadas com
nanopartículas de prata / José Felício Queiroz Fialho Júnior. –
Viçosa, MG, 2015.

xi, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélío José de Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.42-49.

1. Biofilmes bacterianos - Adesão em aço inoxidável.
2. Polietileno. 3. Nanopartículas de prata. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

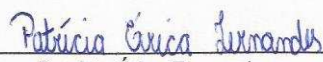
CDD 22. ed. 664.07

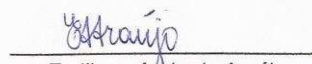
JOSÉ FELÍCIO QUEIROZ FIALHO JÚNIOR

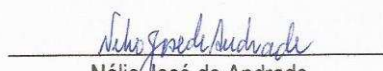
**ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS EM
SUPERFÍCIES DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS
FUNCIONALIZADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de julho de 2015.


Patrícia Érica Fernandes


Emiliane Andrade Araújo


Nélcio José de Andrade
(Orientador)

*À minha mãe, Aparecida, por todo seu amor,
carinho e por ser sempre meu porto seguro.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por me acolher bem desde os tempos de Coluni.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Nélio José de Andrade, pelos ensinamentos, pela amizade e pelas oportunidades de ser seu orientado pelos últimos seis anos.

À professora Emiliane, pela primeira oportunidade no LHMA, pela amizade, pelos muitos ensinamentos e pela duradoura parceria que foi construída.

À professora Patrícia Bernardes, pela valiosa orientação e colaboração em todas etapas deste trabalho.

À professora Ana Clarissa, pelas sugestões durante a defesa do projeto e por me acolher sempre com boas palavras.

Aos professores Sukarno e Luis Henrique, pela ajuda e disponibilidade em participar desse trabalho.

Ao meu pai, que mesmo partindo tão cedo, está sempre presente. Tenho certeza que está no céu vibrando por esse momento e olhando sempre por mim.

À minha mãe, por participar ativamente de toda minha vida, torcendo muito e sofrendo junto em todos os momentos.

À Camila, minha esposa, que me acompanha desde os tempos da graduação. Sofreu, torceu e me deu carinho ao longo de todos esses anos.

Às minhas irmãs, Fabiana e Flaviana, pelo apoio e torcida constantes.

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Laura, Luisa e Guilherme, simplesmente por existirem em minha vida!

Ao meu avô Nenzico, por ser um exemplo de vida.

Aos meus cunhados, Ulisses, Alexandre e Carol.

Aos meus sogros, Célia e Marco Túlio, por me acolher tão bem e por me fazer ser parte de sua família.

Aos meus amigos de graduação, Isa, Philippe, Caio, Ana e Luana, que nunca deixaram de estar presentes.

Aos colegas do Laboratório, Patrícia, Evelyn, Roberta, Paula, Jorge, Guilherme, Hiasmyne, Daiene, Carmelita, Jacqueline, Carolina, Valéria e Nayara.

Ao meu amigo João, pela amizade em todos esses anos e por ter me auxiliado desde o primeiro dia de LHMA.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, pela excelente convivência.

A todos os funcionários do DTA, pelo auxílio, direto ou indireto.

E a todos que ajudaram de alguma forma a realização dos experimentos.

BIOGRAFIA

JOSÉ FELÍCIO QUEIROZ FIALHO JÚNIOR, filho de José Felício Queiroz Fialho e Maria Aparecida Barbosa Fialho, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 02 de janeiro de 1989.

Em março de 2007, iniciou o curso de Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em maio de 2013.

Em agosto do mesmo ano, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Nanopartículas de prata.....	4
2.2. Adesão bacteriana, formação de biofilmes e fatores físico-químicos e termodinâmicos de relevância.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Superfícies.....	12
3.2 Adesão das células bacterianas nos cupons de aço inoxidável e de polietileno revestidos com nanopartículas de prata	13
3.3 Determinação da energia livre de interação hidrofóbica e da energia livre de adesão	13
3.3.1 Determinação do ângulo de contato.....	13
3.3.2 Determinação da variação da energia livre de interação hidrofóbica e da variação da energia livre de adesão	14
3.4 Adesão de células vegetativas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em superfície de cilindros de aço inoxidável revestida com nanopartículas de prata	17
3.5 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da dispersão de nanopartículas de prata.....	21
3.6 Avaliação da liberação de prata para o meio simulante por espectrometria de absorção atômica.....	22
3.7 Avaliação da microtopografia das superfícies de aço inoxidável e polietileno controle por microscopia de força atômica (MFA)	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23

4.1	Estudo da termodinâmica de adesão microbiana	23
4.2	Análise da adesão de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em cilindros de aço inoxidável revestidos com nanopartículas de prata	31
4.3	Análise da concentração mínima inibitória (CMI) da dispersão e do pó de nanopartículas de prata	32
4.4	Análise da espectrometria de absorção atômica	35
4.5	Análise da rugosidade e da microtopografia das superfícies	36
5.	CONCLUSÃO.....	40
6.	REFERÊNCIAS	42

RESUMO

FIALHO JÚNIOR, José Felício Queiroz, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Adesão e formação de biofilmes bacterianos em superfícies de processamento de alimentos funcionalizadas com nanopartículas de prata.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientador: Patrícia Campos Bernardes.

A nanotecnologia representa um grande avanço na ciência em diversos campos com desenvolvimento de novos materiais com diferentes funcionalidades e potenciais de aplicação. Desta forma, destacam-se as nanopartículas de prata (Ag NPs) como agentes antimicrobianos promissores para inibição de adesão bacteriana em superfícies de processamento de alimentos. A contaminação de superfícies de processamento de alimentos, principalmente com patógenos, é de grande preocupação, por se tratar de um problema de saúde pública. Neste contexto, este trabalho objetivou estudar o efeito antimicrobiano das superfícies de aço inoxidável e de polietileno (PE) funcionalizadas com Ag NPs sobre a adesão de diferentes espécies bacterianas, bem como avaliar possíveis alterações nas características físico-químicas dessas superfícies que possam influenciar no processo de formação de biofilmes de micro-organismos. Observou-se que de acordo com o critério quantitativo, ou seja, com base nos resultados da variação da energia livre da interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT}), tanto as superfícies de aço inoxidável analisadas quanto as superfícies poliméricas foram consideradas hidrofóbicas por apresentarem o valor ΔG_{sas}^{TOT} negativo; além disso, houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores de ΔG_{sas}^{TOT} encontrados para ambas as superfícies funcionalizadas quando comparadas às superfícies controles. No estudo das superfícies bacterianas em termos de ΔG_{sas}^{TOT} , verificou-se que são hidrofílicas. A partir da variação da energia livre de adesão ($\Delta G_{adesão}$), verificou-se que para todas as superfícies analisadas a $\Delta G_{adesão}$ foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} < 0$) sendo que, para todas as superfícies funcionalizadas com

Ag NPs, obteve-se diferença ($p < 0,05$) no valor de $\Delta G_{adesão}$ em relação à superfície controle. Em adição, a superfície de PE funcionalizado com Ag NPs tornou a superfície de processamento termodinamicamente mais favorável à adesão para as três bactérias avaliadas em comparação com o controle. Em relação à adesão das células vegetativas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. fluorescens*, observou-se que não houve diferença ($p < 0,05$) entre as superfícies controle e funcionalizadas, embora o resultado da termodinâmica de adesão ter sugerido diferença. No estudo da adesão de *P. fluorescens* em cilindro de aço inoxidável revestido com Ag NPs, simularam-se as forças de cisalhamento e a turbulência provocadas pelo bombeamento do fluido, encontrando-se $4,47 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ no cilindro controle e $4,17 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ no cilindro funcionalizado, não havendo diferença entre eles ($p < 0,05$). A concentração mínima inibitória (CMI) da dispersão de Ag NPs determinada foi de $12,50 \text{ mg.L}^{-1}$ para as três bactérias avaliadas: *S. aureus*, *E. coli* e *P. fluorescens*. Para as em cilindro de aço inoxidável revestido com Ag NPs em pó a CMI foi de $6,25 \text{ mg.L}^{-1}$ para todos micro-organismos. Utilizando a técnica de espectroscopia de absorção atômica, verificou-se que não houve lixiviação de Ag NPs da superfície de aço funcionalizada para os dois simulantes testados (água e leite desnatado reconstituído), reforçando a hipótese de uma forte interação na matriz do aço entre as Ag NPs e o silano, formando uma ligação ordenada e complexa que interferiu na efetividade do antimicrobiano. As topografias das superfícies também foram observadas por meio da microscopia de força atômica (MFA), sendo a rugosidade média da superfície de aço controle de $325 \pm 21,9 \text{ nm}$, a de aço funcionalizada de $343 \pm 20,6 \text{ nm}$, a de PE controle $370 \pm 55,9 \text{ nm}$ e a de PE funcionalizado de $425 \pm 24,7 \text{ nm}$. Os resultados mostraram que as Ag NPs não foram eficientes para inibição de adesão bacteriana nas superfícies consideradas, necessitando, portanto, de mais estudos físico-químicos para compreensão do aprisionamento da prata nas superfícies de processamento.

ABSTRACT

FIALHO JÚNIOR, José Felício Queiroz, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Adhesion and formation of bacterial biofilms on food processing surfaces functionalized with silver nanoparticles.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-adviser: Patrícia Campos Bernardes.

The nanotechnology represents a huge advance through science in several areas with development in new materials and possible uses. Thus, we can stress the silver nanoparticles (Ag NPs) as promising antimicrobial agents to inhibition of bacteria access in food processes areas. The surface's contamination of food processes areas, mainly by pathogens, is worry's target because it is a public health problem. In this sense, this search aimed to study the antimicrobial effect from surfaces made of stainless steel and coated by polyethylene with Ag NPs affected by different bacterial species besides possible changes in the physical-chemical characteristics in these surfaces that could influence the micro-organisms access process. We could observe that according to the quantity criterion, so, based on the energy variety of free hydrophobic interaction results (ΔG_{sas}^{TOT}) both, the stainless steel surfaces analyzed and the polymer surfaces were considered hydrophobic because they present the negative value for (ΔG_{sas}^{TOT}) besides there was a huge difference ($p < 0,05$) between the values of (ΔG_{sas}^{TOT}) found for both surfaces used when compared to the control surfaces. In the study of bacterial surfaces in ΔG_{sas}^{TOT} we checked they are hydrophilic. From the variation of free energy of access $\Delta G_{adesão}$, we checked that for all the analyzed surfaces to $\Delta G_{adesão}$ was favorable thermodynamicly ($\Delta G_{adesão} < 0$) being for all used surfaces with Ag NPs, we obtained a huge difference ($p < 0,05$) in the value of $\Delta G_{adesão}$ related to the control surface. In addition, the surface of polymer used with Ag NPs became the process surface thermodynamically more favorable to access for three bacteria evaluated. About the access from vegetative cells from *E. coli*, *S. aureus* e *P. fluorescens*, we observed that didn't have important difference ($p < 0,05$) between the control surfaces and used, although the results from the

thermodynamic access suggested difference. In the study of access from *P. fluorescens* in stainless steel cylinder functionalized and control, we simulate the forces of deformation and the disturb promoted by pumping fluid, there wasn't relevant difference between them ($p < 0,05$). The minimum inhibition concentration (CMI) from the dispersion Ag NPs determined was of 12, 50 mgL^{-1} for the three bacteria evaluated: *S. aureus*, *E. coli* e *P. fluorescens*. In order to the poder of Ag NPs the CMI was from 6,25 mg.L^{-1} for all micro-organisms. Using the spectroscopy technique of atomic absorption, we concluded that there wasn't silver diffusion from the used steel surface to two tested simulants (water and skim reconstituted milk), reinforcing the hypothesis from a strong interaction in the steel matrix between Ag NPs and the silane, making na ordenated and complex connection that interfered in the effectiveness of the antimicrobial. The surface topographies also were observed by the atomic force microscopy (MFA), resulting the media roughness of steel surface control was $325 \pm 21,9$ nm, the steel one used was de $343 \pm 20,6$ nm, the control polymer $370 \pm 55,9$ nm and the used polymer from $425 \pm 24,7$ nm. The results showed that in this study, the nanoparticles of silver wasn't efficient to inhibition of bacterial access in the considered surfaces, requiring therefore, from more physical-chemical studies to comprehension of imprisonment of silver in the surface of the processing.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, materiais em tamanho nanométrico têm emergido como novos antimicrobianos, destacando-se as Ag NPs com potencial de aplicação em superfícies utilizadas no processamento de alimentos. As Ag NPs apresentam potencial para inibir a adesão microbiana em superfícies de aço inoxidável ou polímeros que são comumente utilizadas nas indústrias de alimentos prevenindo assim a formação de biofilmes.

Em razão de diversos fatores, como o aumento de concorrência com os produtos importados, consumidores mais exigentes e fiscalização sanitária mais efetiva, muitas indústrias aumentaram os investimentos na qualidade microbiológica dos produtos e gradativamente aprimoraram tecnologias e desenvolveram novos processos para aumentar a qualidade e inocuidade dos alimentos.

Estratégias têm emergido com potencial para inibir a adesão microbiana, como por exemplo, a aplicação de cobertura contendo compostos que possuam propriedade antiadesiva à bactéria e a outros micro-organismos colonizadores.

Diversos fatores influenciam na adesão bacteriana: fatores microbiológicos como genótipo específico do micro-organismo, formação de exopolissacarídeos, ocorrência de apêndices celulares, estrutura e condições ambientais do filme como temperatura, pH, suprimento e demanda de oxigênio e aspectos físico-químicos das superfícies interatuantes como rugosidade, hidrofobicidade, carga elétrica.

Sendo assim, diferentes compostos têm sido aplicados nas superfícies de processamento de alimentos na tentativa de prevenir a adesão bacteriana a partir da modificação de suas características físico-químicas, o que corrobora com a importância do estudo da viabilidade de aplicação de novas superfícies de processamento na indústria de alimentos.

Assim, este estudo teve como objetivos:

- I. Avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartícula de prata presente na superfície de aço inoxidável e de polietileno sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*;
- II. Determinar a variação da energia livre de interação hidrofóbica das superfícies antimicrobianas e das espécies bacterianas a variação da energia livre de adesão entre as superfícies antimicrobianas e as bactérias;
- III. Quantificar as células aderidas de *Pseudomonas fluorescens* em cilindros de aço inoxidável revestidos com nanopartículas de prata;
- IV. Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) do antimicrobiano sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*;
- V. Avaliar a ocorrência o resíduo de prata liberado pela superfície de aço inoxidável condicionada no leite e na água (controle);
- VI. Avaliar a rugosidade e a microtopografia das superfícies controle e funcionalizadas com nanopartículas de prata de aço inoxidável e de polietileno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A indústria alimentícia aprimora gradativamente as tecnologias e desenvolve novos processos para aumentar a qualidade e inocuidade dos alimentos. Recentemente, em razão de diversos fatores, como o aumento de concorrência com os produtos importados, consumidores mais exigentes e fiscalização sanitária mais efetiva, muitas indústrias aumentaram os investimentos na qualidade microbiológica dos produtos.

Na última década, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em função da necessidade de desenvolvimento de sínteses de novos antimicrobianos, em virtude do aumento no número de bactérias resistentes a antibióticos. Seu efeito microbiano é amplamente conhecido, porém o mecanismo de ação da prata sobre o micro-organismo ainda não está bem esclarecido (MORONES et al., 2005).

A contaminação de superfícies por micro-organismos patogênicos e deterioradores é causa de preocupação na indústria de alimentos. A adesão e consequente formação de biofilmes no ambiente de processamento de alimentos resultam em produtos com inocuidade comprometida e possíveis riscos à saúde humana. O envolvimento dos micro-organismos no processo de adesão e formação de biofilmes nas superfícies de equipamentos e utensílios para processamento de alimentos ocorre em vários níveis de intensidade. A liberação desses micro-organismos poderá trazer consequências indesejáveis à qualidade do alimento produzido, como a alteração desses e veiculação de patógenos (ANDRADE, 2008).

Considerando que a superfície de adesão é essencial para o desenvolvimento de um biofilme, o entendimento de como as propriedades das superfícies influenciam o processo de adesão bacteriana, pode ajudar a desenvolver alterações ou agentes que entrem em contato com essas superfícies de forma que a adesão seja controlada (BERNARDES, 2008).

Os aspectos físico-químicos da adesão são explicados pelas teorias de Derjaguin e Landau, em 1941 e Verwey e Overbeek, em 1948

(DLVO) e complementada por van Oss e colaboradores em 1994 (DLVO Estendida), usadas para predizer a adesão microbiana.

2.1. Nanopartículas de prata

Atualmente, materiais em nanoescala têm sido empregados como novos antimicrobianos. O termo “nano” é usado para indicar a bilionésima parte de um metro ou 10^{-9} m. As nanopartículas são agrupamentos de átomos com tamanho variando de 1-100 nm (RAI et al., 2009). O uso de Ag NPs como agente antibacteriano é relativamente novo e sua atividade pode ser aplicada na medicina para reduzir infecções, bem como prevenir a colonização bacteriana em superfícies de próteses, cateteres, materiais odontológicos e na indústria de alimentos em superfícies de processamento. Podem ser empregadas também no controle microbiano em têxteis e no tratamento de água (GUZMÁN et al., 2009). Na síntese das Ag NPs, deve-se dar ênfase no controle do tamanho das partículas, pois o efeito bactericida é influenciado pelas dimensões da partícula, tendo as menores partículas os melhores efeitos (SHAHVERDI et al., 2007).

O efeito antimicrobiano da prata tem sido reconhecido há muitos anos. Na antiguidade, a prata era utilizada em recipientes de água e também na prevenção de deterioração de líquidos e alimentos. Em 1884, gotas de nitrato de prata foram introduzidas como tratamento profilático em olhos de recém-nascidos para prevenir infecções causadas por *Neisseria gonorrhoeae* transmitida durante o parto por mães infectadas (RODRIGUEZ et al., 2007). Os íons de prata eram geralmente utilizados no tratamento de queimaduras e como agentes quimioterápicos contra patologias provocadas por bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Em 1940, após a introdução da penicilina em procedimentos médicos, o uso da prata como agente bactericida diminuiu. Entretanto, com o uso indiscriminado de antibióticos houve seleção de cepas resistentes a antibióticos. Portanto, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em razão da necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

O efeito antimicrobiano da prata foi verificado pela primeira vez por *von Naegelis* contra algas, na forma de íons de prata. Em documentos científicos do fim do século XVIII, o uso de colóides de prata, ou seja, partículas nanométricas em solução com tamanho variando de 10^{-9} m a 10^{-6} m foi relatado, sendo seu uso intensificado entre 1910 e 1920. Além da prata, muitos outros metais foram estudados, resultando na seguinte escala de toxicidade contra micro-organismos: $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Au} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mo} > \text{Sn}$. Adicionalmente, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais (NETO et al., 2008).

Os mecanismos de ação de íons Ag^+ e das Ag NPs sobre micro-organismos ainda não são bem estabelecidos e diferenciados. Alguns mecanismos têm sido propostos e aceitos para os íons de prata. Acredita-se que ocorra ligação extracelular ou precipitação de prata na parede e membrana celular (BELLANTONE et al., 2002). A parede celular contém peptidoglicano carregado negativamente que provavelmente irá interagir eletrostaticamente com alguns íons Ag^+ . A prata poderá interagir com proteínas celulares, incluindo enzimas por meio de grupos sulfidrílicos ($-\text{SH}$) levando à inativação das proteínas e, conseqüentemente, das bactérias. Estas enzimas são chaves e participam da geração de energia transmembrana e transporte de íons podendo levar ao bloqueio da respiração e da transferência de elétrons (FENG et al., 2000; KLUEH et al., 2000). Outra ação proposta refere-se à interação da prata com o ácido desoxirribonucléico (DNA) por meio de deslocamento das ligações de hidrogênio entre as bases purínicas e pirimidínicas impedindo sua replicação. Por último é também aceito que a prata se liga a grupos doadores de elétrons, como aminas, hidroxilas e fosfatos que contêm nitrogênio, oxigênio e enxofre (RODRIGUEZ et al., 2007).

A prata é um metal que consta na lista positiva de aditivos para matérias destinadas à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. Segundo a RDC nº 17 de 2008 da ANVISA, que está de acordo com as legislações americanas e do MERCOSUL, o limite de migração específica total (LME (T)) estabelecido é de 0,05 mg de Ag/kg de simulante (BRASIL, 2008). Já segundo a Organização Mundial

de Saúde (OMS), a água potável pode conter até 0,1 mg/L de prata sem trazer riscos para saúde humana.

Panacek et al. (2006) verificaram que a toxicidade de Ag NPs depende da sua forma e tamanho. Segundo Pal et al. (2007), Ag NPs com tamanhos variando de 1 a 10 nm são mais prejudiciais às células bacterianas do que nanopartículas maiores.

Araújo et al. (2012) conduziram um estudo para determinar os efeitos de Ag NPs na forma concentrada ($60 \mu\text{g.L}^{-1}$) em *Pseudomonas aeruginosa*. Foram imersos cupons de aço inoxidável, previamente limpos e esterilizados, em meio de cultura apropriado contendo inóculo de *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Após o período de incubação, os cupons foram removidos, secos e imersos nas soluções contendo Ag NPs concentrada ou água (controle) por 30 ou 60 min. Após o tempo de contato houve redução de 5 ciclos logarítmicos do número inicial de *P. aeruginosa* nos cupons imersos em nanopartículas de prata concentrada em relação ao controle, tanto para 30 como 60 min de contato. Deste modo, as Ag NPs podem ser usadas na indústria de alimentos como antimicrobiano, já que para uma solução sanitizante ser considerada eficaz deve reduzir, no mínimo, 3 ciclos log do número inicial de células aderidas (ANDRADE, 2008).

2.2. Adesão bacteriana, formação de biofilmes e fatores físico-químicos e termodinâmicos de relevância

A adesão e consequente formação de biofilmes bacterianos podem ser indesejáveis sob inúmeros aspectos na indústria de alimentos. Do ponto de vista microbiológico, a adesão pode representar um sério problema de higiene e de saúde pública já que pode ser constituído de micro-organismos alteradores e/ou patogênicos (ANDRADE, 2008), que estão diretamente ligados a veiculação de doenças associadas ao consumo de alimentos.

Segundo o Ministério da Saúde, representado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), apenas em 2012 o sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) registrou 792 surtos no país – episódio

em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sintomas após ingerir alimentos e/ou água da mesma origem, ou um caso de doença rara – com aproximadamente 12 mil pessoas hospitalizadas. Em razão da ação antimicrobiana da prata, estas se tornam uma estratégia em potencial para inibir a adesão microbiana em superfícies de processamento de alimentos, reduzindo assim a possibilidade de formação de biofilmes e reduzindo o risco à saúde pública.

A adesão de micro-organismos em superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e depende das propriedades superficiais, como tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, dentre outros, dos suportes de adesão como aço, polímeros e mármore e das membranas dos micro-organismos. Além disso, as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, como temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes, determinam, em muitos sistemas, o processo de adsorção (UBBINK et al., 2007).

A adsorção é um processo espontâneo em que um componente do sistema concentra-se em maior quantidade na interface do que nas outras fases em contato. A molécula difunde-se para a interface devido ao excesso de energia livre de Gibbs que existe nesta interface e também em virtude de interações energeticamente favoráveis que podem ocorrer entre o sólido adsorvente e o soluto, ou interações desfavoráveis entre soluto e componentes da solução (SOMASUNDARAN et al., 2003). A Equação 1 fornece o número de moléculas adsorvidas na interface (Γ), sendo que a adsorção um fenômeno dependente da tensão interfacial (γ) e do potencial químico (μ):

$$\Gamma_1 = -\frac{d\gamma}{d\mu_1} \quad (1)$$

Alguns fatores podem afetar o mecanismo do fenômeno de adsorção na interface. A natureza da superfície, por exemplo, determina a área disponível para ocorrer a adsorção, e a natureza química dos compostos da interface direciona a interação que ocorre entre as moléculas e a superfície (DAS et al., 2006).

A formação de um biofilme inclui muitas etapas, mas um pré-requisito é a adesão das células microbianas à superfície. Estudos das propriedades de adesão de bactérias têm mostrado que as características físico-químicas da superfície da célula contribuem determinantemente no processo de adesão (CHAVES, 2004).

As interações dos micro-organismos com a interface do substrato, no processo de adesão, podem ser específicas ou não específicas. Interações específicas envolvem o reconhecimento de um determinado sítio, de uma molécula receptora que se encontra na interface do micro-organismo, enquanto a interação não específica é dirigida pelas propriedades físico-químicas das duas interfaces interatuantes: micro-organismo e superfície na adesão (ABBASNEZHAD et al., 2008).

A hidrofobicidade celular é considerada de relevância no estudo das propriedades da superfície bacteriana visando o entendimento do processo de adesão não específica da bactéria ao substrato. Este parâmetro reflete as inúmeras interações intermoleculares, incluindo-se entre elas, as ligações covalentes, as pontes de hidrogênio e as forças de dispersão, que ocorrem entre as moléculas da interface bacteriana e da interface do substrato, sendo todas estas formas de interação fundamentais para o processo de adsorção/adesão (SOMASUNDARAN et al., 2003).

Existem na literatura dados de experimentos que mostram que a adesão microbiana depende fortemente da estrutura hidrofóbica e/ou, hidrofílica das superfícies de interação. Somente as interações interfaciais são relevantes para a definição de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade. A diferença básica entre essas interações é a competição entre a energia livre interfacial de coesão do sólido, imersos na água, e a energia livre de coesão do líquido (van OSS; GIESE, 1995).

A importância do caráter hidrofóbico da superfície das células na adesão foi explicada por van Loosdrecht et al. (1990) que ressaltou que para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interatuantes contribui para a facilidade dessa remoção. Portanto, a interface bactéria e líquido e a interface

superfície de adesão e líquido terão que ser substituídas pela interface bactéria e superfície de adesão. Segundo a teoria termodinâmica, a adesão só se verifica se o processo conduzir a uma redução da variação da energia livre de Gibbs de adesão, obtendo-se valores negativos de $\Delta G_{\text{adesão}}$. A comparação é expressa em termos da variação da energia livre de adesão (Equação 2):

$$\Delta G_{\text{Adesão}} = \gamma_{bs} - \gamma_{bl} - \gamma_{sl} \quad (2)$$

em que $\Delta G_{\text{adesão}}$ é a energia livre de Gibbs, γ_{bs} a tensão superficial entre a superfície e bactéria, γ_{bl} a tensão superficial entre bactéria e líquido e, por fim γ_{sl} a tensão superficial entre superfície e líquido.

Devido ao comprimento da bactéria, de aproximadamente 1 μm , seu formato e cobertura com biomacromoléculas e carga global negativa, as bactérias são consideradas partículas coloidais vivas, e portanto, as propriedades físico-químicas de um sistema formado por muitas bactérias assemelham-se às dos colóides. Importantes aspectos da interação bacteriana com a superfície e da adesão podem ser entendidos baseados no conhecimento das propriedades físico-químicas e coloidais da bactéria (DUFRENE, 2003). As bactérias podem modificar a composição da superfície celular durante a fase de multiplicação, ou em função de mudanças na composição do meio. Assim, essas alterações causam mudanças nas propriedades coloidais e influenciam no processo de adesão.

A topografia da superfície também é um fator que pode influenciar no processo de adesão de bactérias na superfície. A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de micro-organismos, pois representam locais de abrigo menos influenciados pelas forças do fluido. O efeito da rugosidade da superfície é importante quando ocorre a adesão da primeira camada de micro-organismos tendo menor influência quando uma superfície de adesão já tem biofilme formado (MACHADO, 2005).

Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície (rugosidade), podendo apresentar fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar micro-organismos, principalmente bactérias. A ocorrência dessas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização, favorecendo a multiplicação microbiana e o desenvolvimento de micro-organismos.

Desta forma, a aplicação de cobertura contendo compostos que possuam propriedades antiadesivas à bactéria e a outros micro-organismos colonizadores têm sido empregados para prevenir a adesão. Os mecanismos principais para evitar a interação entre bactéria e substrato consistem no desenvolvimento de superfícies com propriedades antiadesivas ou com propriedades antimicrobianas. Diferentes compostos têm sido aplicados na tentativa de prevenir a adesão bacteriana.

Machado (2013) impregnou Ag NPs em etileno vinil acetato (EVA), usando sílica como suporte, e avaliou a atividade antimicrobiana de pellets de EVA em água sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* utilizando três diferentes amostras: pellets com Ag NPs; pellets sem tratamento com Ag NPs e o inóculo do micro-organismo em avaliação. Avaliando-se as médias da redução de UFC.mL⁻¹ observou-se que houve redução de 100% no número de UFC.mL⁻¹ após 24 h de contato da água ultrapura inoculada com as quatro espécies de micro-organismos e os pellets com Ag NPs.

Estudos recentes mostram que tubos endotraqueais com revestimento antimicrobiano têm sido utilizados na área médica para evitar formação de biofilmes e consequente colonização de bactérias nos pulmões causando pneumonia. Na concepção dos biomateriais impregnados com antimicrobianos, tanto a seleção quanto a taxa de liberação do antimicrobiano do dispositivo devem ser considerados. Berra et al. (2008) estudaram diferentes revestimentos para os tubos endotraqueais e observaram que em estudos *in vitro*, os tubos revestidos com sulfadiazina de prata (SP) apresentaram propriedades antimicrobianas contra *P. aeruginosa* prevenindo a formação de biofilmes durante 72 h.

Bernardes et al. (2014) estudaram membranas de polissulfona (PSF) modificadas com Ag NPs obtidas por nova síntese (nAgNS), Ag NPs obtidas comercialmente (nAgC), SP, brometo de dodeciltrimetilamônio (DOTAB), cloreto de benzalcônio (CB) ou dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS) com a finalidade de melhorar a eficiência do processo de filtração de água pela diminuição do *biofouling*. As propriedades antimicrobianas e *anti-biofouling* foram avaliadas pelo teste de difusão em ágar, capacidade de retenção de *E. coli* e teste da adesão de *E. coli*. No teste da difusão em ágar, *E. coli* foi considerada sensível ao efeito antimicrobiano das membranas nAgNS 1%, 3%, 6%, 10% e DOTAB 10% enquanto *S. aureus* foi sensível a nAgNS 1%, 3%, 6%, 10%, DOTAB 10%, CB 0,22%, 2% e 10%. Em relação à capacidade de retenção de *E. coli*, as membranas que apresentaram os melhores resultados foram PSF, nAgNS 1%, 3%, 6%, 10%, nAgC 0,22% e 3%. As membranas de polissulfona modificadas com Ag NPs obtidas por nova síntese nas concentrações de 6% e 10% foram as que apresentaram os melhores resultados para obtenção de membranas com características *anti-biofouling* para serem utilizadas no processo de filtração de água, visando à obtenção de água potável.

Kong e Jang et al. (2008) compararam as propriedades antibacterianas de nanofibras de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo Ag NPs com SP e com AgNO₃ na mesma concentração de prata contra *E. coli* e *S. aureus*. As nanofibras proporcionaram maior taxa de morte. SP e AgNO₃ apresentaram propriedade antimicrobiana por liberação de íons de prata. Quando os íons de prata entraram em contato com a bactéria, precipitados pretos foram formados via redução do íon ou formação de sal. Os precipitados comprometeram a eficiência antimicrobiana. Por outro lado, as nanofibras liberaram Ag NPs com diâmetro de 7 nm e o contato com a bactéria não resultou em precipitação. Por essas razões, concentração efetiva de Ag NPs pode ser muito menor que de íons de prata.

Araújo et al. (2012) avaliaram a capacidade de Ag NPs em removerem células vegetativas aderidas em superfícies de aço inoxidável; bem como a capacidade das nanopartículas em alterar as características

termodinâmicas de superfície de aço inoxidável a fim de reduzir o processo de adesão e formação de biofilmes. Observou-se que as Ag NPs, na concentração de 60 mg.L⁻¹ foram eficientes na remoção de células aderidas de *Bacillus cereus* em cilindros de aço inoxidável (área interna de 336,5 cm²). Verificou-se também que a termodinâmica de adesão se tornou desfavorável após a superfície de aço inoxidável ter sido condicionada com Ag NPs para *S. aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *B. cereus*. Portanto, as nanopartículas de prata estudadas apresentaram ser uma estratégia interessante na indústria de alimentos para controle de adesão e consequente formação de biofilmes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), no Laboratório de Química Verde Coloidal e Macromolecular do Departamento de Química e no Laboratório de Raios X e Nanoscopia do Departamento de Física, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1 Superfícies

As superfícies utilizadas para a adesão das células bacterianas foram cupons de aço inoxidável AISI 304 com 10 x 10 x 1 mm e de polietileno com 20 x 20 x 1 mm, adquiridos comercialmente de uma empresa brasileira contendo as Ag NPs. Para a realização do experimento, os cupons foram higienizados por imersão em detergente neutro durante 1 h, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada esterilizada, secos por 2 h a 60 °C e autoclavados a 121 °C/15 min (ARAUJO, 2010).

3.2 Adesão das células bacterianas nos cupons de aço inoxidável e de polietileno revestidos com nanopartículas de prata

Estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) foram ativadas separadamente em 3,0 mL de BHI e incubados de 18-24 h em estufa a 35-37 °C. A seguir os cupons funcionalizados com nanopartículas de prata e controle (sem revestimento) foram colocados em tubos *falcon* contendo 6 mL de caldo BHI cada e 1 mL da cultura bacteriana. Os tubos foram incubados sob agitação de 120 rpm, a 37 °C para *S. aureus* e *E. coli* e a 7 °C para *P. fluorescens* por 72 h, sendo que a cada 24 h o meio foi trocado. Em seguida, os cupons foram removidos e lavados com tampão fosfato salino (PBS pH 7,4) esterilizado, removendo-se assim as células não aderidas (MARQUES, 2005). Em sequência, os cupons foram imersos no mesmo tampão com a finalidade de remoção das células sésseis por meio de agitação em vortex durante 1 min. Diluições adequadas foram preparadas a partir deste último tampão e alíquotas foram plaqueadas em ágar padrão para contagem (PCA), determinando-se o número de células (UFC.cm⁻²) aderidas.

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5% de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram utilizando-se o software estatístico SAS[®] (*Statistical Analytical Software, version 9.1*).

3.3 Determinação da energia livre de interação hidrofóbica e da energia livre de adesão

3.3.1 Determinação do ângulo de contato

3.3.1.1 Medida do ângulo de contato para superfícies

Para as superfícies de aço inoxidável e de PE revestidas e para as superfícies controles, o ângulo de contato entre a superfície e água, formamida e α -bromonaftaleno foi determinado usando o goniômetro (Kruss, Germany). Foi feita a medição do ângulo de contato de uma gota

de 2,0 µL a cada segundo durante 30 s consecutivos para todos os líquidos e superfícies avaliadas. As medidas foram realizadas à temperatura de 25 °C. Foram feitas três repetições para cada líquido em cada superfície.

3.3.1.2 Medida do ângulo de contato para micro-organismos

Para a medição do ângulo de contato da superfície das células bacterianas, as medidas foram realizadas sobre uma camada de células vegetativas usando o método descrito por Busscher et al. (1984). Primeiramente, as bactérias foram ativadas, três vezes em caldo BHI com a finalidade de obter-se uma suspensão da cultura ativa com, aproximadamente, 10^7 UFC.mL⁻¹. Posteriormente, 30 mL da suspensão ativa foram centrifugados a 12.000 x g por 10 min, sendo em seguida lavada por três vezes em tampão PBS 0,1 M. A massa celular foi ressuspendida neste mesmo tampão sendo depositada sobre um filtro de membrana de acetato celulose de 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro por filtração utilizando pressão negativa. Foram adicionados 30 mL de água ultrapura no momento da filtração. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para Placas de Petri contendo 1% de ágar (m/v) e 10% de glicerol (v/v). As membranas foram cortadas em três partes sendo cada parte usada para medição do ângulo de contato com cada líquido diferente. As medidas de ângulos de contato foram realizadas para três líquidos com diferentes polaridades (água, formamida e α-bromonaftaleno).

3.3.2 Determinação da variação da energia livre de interação hidrofóbica e da variação da energia livre de adesão

A variação da energia livre de interação hidrofóbica ΔG_{sas}^{TOT} entre as moléculas da superfície (s) imersas em água (a) foi calculada pelo somatório dos componentes apolar e polar da energia livre de interação, ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} respectivamente (van OSS, 1994).

$$\Delta G_{sas}^{tot} = \Delta G_{sas}^{LW} + \Delta G_{sas}^{AB} \quad (3)$$

Aplicando as equações 4 e 5, foi possível chegar ao valor de ΔG_{sas}^{tot} ou ΔG_{bab}^{tot} e prever em relação à hidrofobicidade de um substrato (s) ou de uma superfície celular (b):

$$\Delta G_{sWS}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_w^{LW}} \quad (4)$$

$$\Delta G_{sWS}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_s^-}\right) \quad (5)$$

em que, γ_s^{LW} , γ^+ e γ^- são os componentes da tensão interfacial da superfície e γ_w^{LW} , γ^+ e γ^- são os componentes da tensão interfacial da água.

Os componentes da tensão interfacial das superfícies nas condições avaliadas foram determinados pela Equação 6.

$$(1 + \cos\theta)\gamma_1 = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_1^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_1^+}) \quad (6)$$

Para se determinar as três componentes da tensão interfacial das superfícies determinou-se o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes. Foram utilizados dois líquidos polares (água e formamida) e um líquido apolar (α -bromonaftaleno) cujas fórmulas estruturais estão representadas na Figura 1.

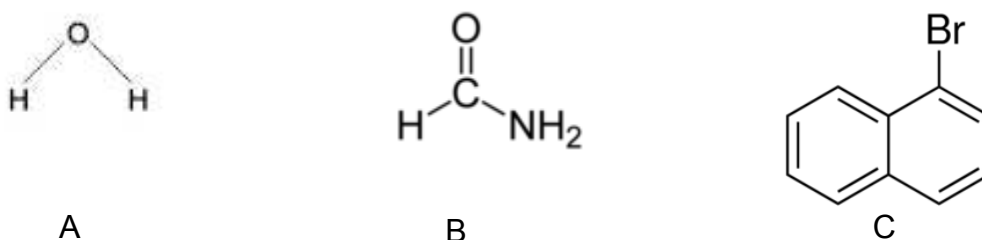


Figura 1 – Estrutura química dos líquidos: água, formamida e α -bromonaftaleno usados para medidas dos ângulos de contato nas superfícies de aço inoxidável e de polietileno.

Com os valores contidos na Tabela 1 aplicando-se a Equação 6 para cada um dos líquidos usados chegou-se ao seguinte sistema de equações:

$$a) \gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos\theta_B)^2 \quad (7)$$

$$b) 5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} = 36,4(1 + \cos\theta_W) - 15,55(1 + \cos\theta_B) \quad (8)$$

$$c) 6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos\theta_F) - 20,806(1 + \cos\theta_B) \quad (9)$$

Tabela 1 – Componentes da tensão de interfacial de líquidos de diferentes polaridades a 25 °C

Líquido	Tensão Interfacial (mJ/m ²)			
	γ_i^{Tot}	γ_i^{LW}	γ_i^+	γ_i^-
α -Bromonaftaleno	44,40	44,40	0,00	0,00
Água	72,80	21,80	25,50	25,50
Formamida	58,00	39,00	2,28	39,60

Pela resolução destas três últimas equações, temos as três componentes da tensão interfacial da superfície, γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^- , que permitiram calcular a tensão interfacial global de uma superfície (s), γ_s^{TOT} .

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial é possível determinar a variação da energia livre de Gibbs de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre as duas superfícies: célula microbiana (b) e superfícies de processamento (s):

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (10)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW}\gamma_s^{LW}} \quad (11)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_b^+\gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^-\gamma_s^+}\right) \quad (12)$$

em que γ_{bs} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão; γ_{bs}^{LW} é a componente apolar, interação de Lifshitz-van der Waals entre bactéria e superfície; γ_s^{AB} é a componente polar (interação de

ácido base de Lewis) entre bactéria e superfície e γ^+ refere-se ao parâmetro receptor de elétrons e γ^- refere-se ao parâmetro doador de elétrons da tensão superficial de uma substância.

As mesmas equações (10, 11 e 12) foram empregadas no cálculo da tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido (γ_{bl}) e tensão interfacial entre as superfícies superfície de adesão/líquido γ_{sl} .

Como a energia livre está diretamente relacionada à tensão interfacial, $\Delta G_{adesão}$ pode ser representado da seguinte forma:

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (13)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (14)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (15)$$

O valor de $\Delta G_{adesão}$ permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando $\Delta G_{adesão} < 0$ e desfavorável quando $\Delta G_{adesão} > 0$.

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5% de probabilidade

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico SAS® (*Statistical Analytical Software, version 9.1*).

3.4 Adesão de células vegetativas de *Pseudomonas fluorescens* em superfície de cilindros de aço inoxidável revestida com nanopartículas de prata

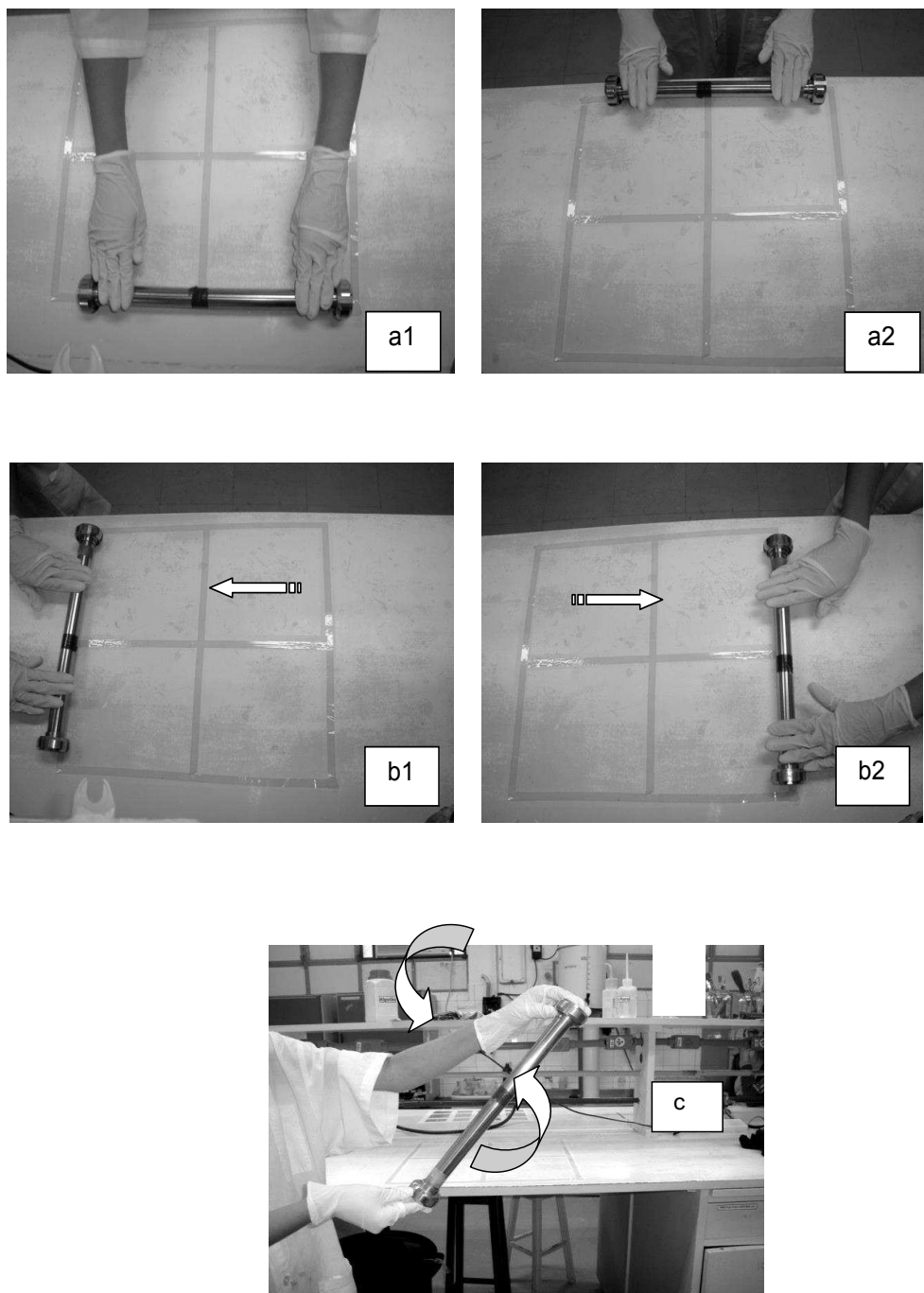
Em amostras de 100 mL de leite em pó desnatado reconstituído (10% m/v) com água destilada esterilizada em autoclave a 121 °C/15 min foi adicionado 1 mL de suspensão de *P. fluorescens* – ativada por duas vezes em BHI a 25 °C por 24 h. Estas amostras foram adicionadas em tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm, revestido com as Ag NPs (Figura 2) e submetidas à movimentos rotatórios para simular a turbulência provocada pelo bombeamento dos fluidos na indústria de alimentos (SALUSTIANO,

2007). O mesmo procedimento foi realizado para os tubos de aço inoxidável controle, sem o revestimento com as nanopartículas de prata.



Figura 2 – Tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm e extremidades fechadas com tampas rosqueáveis.

Para simular o fluxo, os tubos de prova foram submetidos a movimentos rotatórios, colocando-os em uma superfície plana a partir de um ponto central e movimentando-os três vezes, no sentido longitudinal para cima, três vezes longitudinalmente para baixo, três vezes, no sentido lateral para direita, três vezes lateralmente para esquerda e por fim três movimentos tipo baliza, realizados manualmente. Este procedimento de movimentos rotatórios foi realizado por seis vezes seguidas, sobre um molde quadrado (46 cm de dimensão) delimitado na bancada do laboratório (Figura 3).



Fonte: Salustiano, 2007

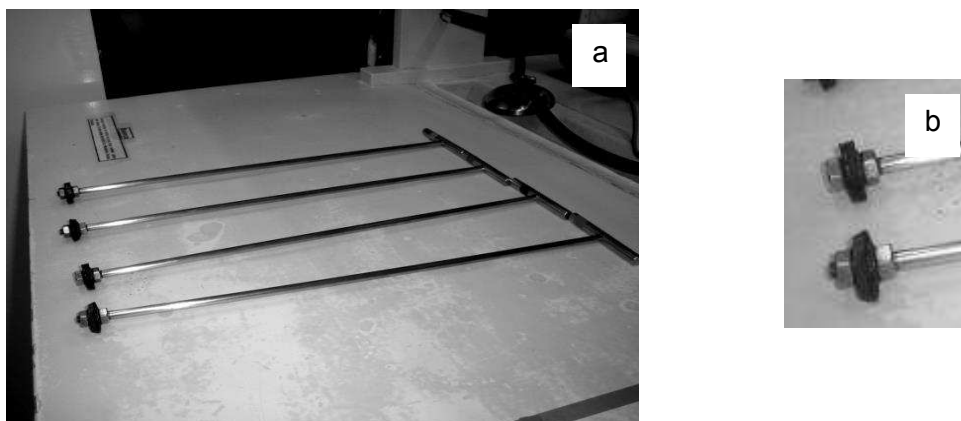
Figura 3 – Movimentos rotatórios, no sentido longitudinal para baixo (a1), longitudinal para cima (a2), lateral para a esquerda (b1), lateral para a direita (b2) e tipo baliza (c).

Em sequência, os tubos foram incubados a 7 °C por 24 h, para promover o processo de adesão do micro-organismo no aço inoxidável. A temperatura simulou a usual do fluxo de leite na tubulação de um laticínio.

Após a adesão, os inóculos contidos nos tubos de prova foram descartados.

O número de células aderidas às superfícies dos tubos de prova foi determinado da seguinte forma: inicialmente as células planctônicas foram removidas pelo preenchimento dos tubos de prova com 100 mL de solução Ringer ($0,45 \text{ g.L}^{-1}$ de cloreto de sódio, $0,021 \text{ g.L}^{-1}$ de cloreto de potássio, $0,012 \text{ g.L}^{-1}$ de cloreto de cálcio anidro, $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e 10 g.L^{-1} de tiosulfato de sódio); os tubos foram submetidos a seis movimentos tipo baliza, sendo a solução Ringer descartada.

Novamente, os tubos foram preenchidos com 100 mL solução Ringer e as células aderidas foram removidas das paredes dos tubos, usando-se uma haste de aço inoxidável (Figura 4) tendo em uma das extremidades um disco de neopreno com 3,25 cm de diâmetro. O disco de neopreno apresenta quatro orifícios de 3 mm de diâmetro cada, distribuídos um em cada quadrante, uniformemente, para a passagem da solução Ringer.



Fonte: Salustiano, 2007

Figura 4 – Haste de aço inoxidável com disco de neopreno (3,25 cm de diâmetro) em uma das extremidades (a); e detalhe do disco de neopreno (b).

Essa haste foi empurrada até o fundo dos tubos de prova, por seis vezes seguidas. Os tubos de prova foram fechados novamente, para que a solução Ringer permanecesse em contato com a superfície por um

minuto, e então, mais uma vez, submetidos aos movimentos rotatórios (SALUSTIANO, 2007).

A partir da rinsagem final com solução Ringer, foram realizadas diluições apropriadas, que foram inoculadas em profundidade (em placas contendo ágar para contagem padrão) com incubação a 25 °C por 24 h, segundo metodologia da APHA (2001) para determinação de *P. fluorescens*. Os resultados foram expressos em UFC.cm⁻².

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5 % de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico SAS® (*Statistical Analytical Software, version 9.1*).

3.5 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da dispersão de nanopartículas de prata

Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) da dispersão e do pó de Ag NPs que utilizadas na funcionalização das superfícies de aço inoxidável e do PE, respectivamente.

Os estudos foram conduzidos usando suspensões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e as concentrações dos antimicrobianos testadas foram: 0 mg.L⁻¹ (controle); 0,78 mg.L⁻¹; 1,56 mg.L⁻¹; 3,125 mg.L⁻¹; 6,25 mg.L⁻¹; 12,5 mg.L⁻¹; 25 mg.L⁻¹; e 50 mg.L⁻¹.

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo BHI em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços para leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA (Thermo Scientific® Multiskan™ FC Microplate Photometer) para determinar a concentração mínima inibitória (CMI).

Após as inoculações, as placas foram incubadas aerobicamente a 35 °C e as leituras de absorbância foram feitas a 600 nm nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 e 11 h de incubação em leitora de ELISA (PIMENTEL FILHO, 2010).

A CMI foi considerada a menor concentração de nanopartículas de prata capaz de inibir a multiplicação microbiana por 11 h.

3.6 Avaliação da liberação de prata para o meio simulante por espectrometria de absorção atômica

No cilindro de aço inoxidável funcionalizado com Ag NPs e no cilindro controle permaneceu a 7 °C por 6 h, uma solução de 100 mL de leite em pó desnatado reconstituído com água destilada (10% m/v) e apenas água destilada para quantificar se houve liberação de prata da superfície funcionalizada para o alimento. O experimento com leite reconstituído e água pretende elucidar se há interferência da matriz alimentícia na difusão de prata da superfície para o meio simulante.

Foi realizado o procedimento simulando a turbulência do leite nas tubulações – movimentos rotatórios e do tipo baliza por seis vezes – objetivando o contato da solução de leite em pó desnatado em toda a superfície do tubo de aço inoxidável funcionalizado, tal qual acontece no transporte do fluido na indústria de alimentos.

As concentrações de prata foram determinadas em um aparelho Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Chama Modelo AA-240 (VARIAN) do Laboratório de Química Verde Coloidal e Macromolecular do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas lâmpadas monoelemento de cátodo oco para as análises (BERNARDES, 2012).

As concentrações das amostras foram analisadas com base na leitura de nove diferentes concentrações das soluções padrão do elemento em questão: 0,00 mg.L⁻¹ (branco), 0,010 mg.L⁻¹, 0,100 mg.L⁻¹, 0,250 mg.L⁻¹, 0,500 mg.L⁻¹, 0,750 mg.L⁻¹, 1,00 mg.L⁻¹, 1,25 mg.L⁻¹ e 1,50 mg.L⁻¹.

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5% de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico SAS® (*Statistical Analytical Software, version 9.1*).

3.7 Avaliação da microtopografia das superfícies de aço inoxidável e polietileno controle por microscopia de força atômica (MFA)

A avaliação da microtopografia das superfícies de aço inoxidável e PE funcionalizadas com Ag NPs e controle foi feita utilizando-se o microscópio de força atômica (Universal SPM System Ntegra Prima/NT-MDT) do Laboratório de Nanoscopia da Universidade Federal de Viçosa. As análises das imagens obtidas permitiram a determinação da rugosidade das amostras por meio da rugosidade média (R_a , medida como a média das diferenças de altura observadas. No microscópio, as medidas foram realizadas no modo semi-contato ou contato intermitente, no qual a sonda fica em contato intermitente com a superfície. A sonda utilizada foi a de silício, com raio igual a 10 nm. A frequência de ressonância foi de 328 kHz e a constante de força igual a 30 N/m.

Antes da análise microscópica, todas as superfícies avaliadas foram lavadas e higienizadas. A área total de varredura foi de 100 μm^2 no MFA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da termodinâmica de adesão microbiana

Os valores dos ângulos de contato das superfícies controle e funcionalizadas estão apresentados na Tabela 2. De acordo com o sistema de classificação proposto por Vogler (1998), com exceção da superfície de PE controle, todas as demais superfícies foram consideradas hidrofóbicas por formarem ângulo de contato maior que 65° com a água. O ângulo de contato com a água é um critério qualitativo usado para classificar a hidrofobicidade de superfícies. De acordo com o ângulo de contato formado, observou-se que a energia de coesão do líquido foi maior que a energia de adesão entre líquido e sólido.

Tabela 2 – Valores dos ângulos de contato (°) entre superfícies de aço inoxidável e de polietileno funcionalizadas com Ag NPs e água ou formamida ou α -bromonaftaleno

Superfícies	Água	Formamida	α -bromonaftaleno
Aço inoxidável/ controle	80,80 $\pm$ 5,6	75,40 $\pm$ 8,9	17,80 $\pm$ 7,1
Aço inoxidável/ Ag NPs	98,80 $\pm$ 18,5	67,70 $\pm$ 8,3	27,30 $\pm$ 4,5
Polietileno/ controle	52,50 $\pm$ 6,0	76,60 $\pm$ 6,5	37,40 $\pm$ 7,6
Polietileno/ Ag NPs	87,50 $\pm$ 6,0	81,00 $\pm$ 4,7	31,70 $\pm$ 2,0

*média de três repetições

Tendo a mesma proposta classificatória, todas as superfícies bacterianas foram consideradas hidrofílicas (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores dos ângulos de contato (°) entre diferentes superfícies bacterianas e água, formamida ou α -bromonaftaleno

Bactérias	Água	Formamida	α -bromonaftaleno
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,40 $\pm$ 0,3	41,90 $\pm$ 2,1	44,03 $\pm$ 1,6
<i>Escherichia coli</i>	16,53 $\pm$ 0,8	22,30 $\pm$ 0,7	52,07 $\pm$ 3,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17,68 $\pm$ 0,1	16,23 $\pm$ 0,2	42,73 $\pm$ 1,8

*média de três repetições

Araújo et al. (2009) avaliaram a hidrofobicidade de células de *Bacillus cereus* isoladas de indústria de laticínios e reportaram que os valores dos ângulos de contato com a água foram menores que 65° indicando comportamento de superfícies hidrofílicas. Mediram-se também a hidrofobicidade das superfícies de granito, aço inoxidável e vidro e verificaram que as superfícies de vidro e granito também foram classificadas como hidrofílicas enquanto a superfície de aço inoxidável como hidrofóbica.

Ao analisar a Tabela 4 observou-se que de acordo com o critério quantitativo, ou seja, com base nos resultados da variação da energia livre da interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT}), as superfícies de aço inoxidável e

PE analisadas foram consideradas hidrofóbicas por apresentarem o valor ΔG_{sas}^{TOT} negativo. Além disso, verificou-se que houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores de ΔG_{sas}^{TOT} encontrados para ambas as superfícies funcionalizadas quando comparadas às superfícies controles, sendo possível afirmar que o tratamento das superfícies de aço e de polietileno com Ag NPs contribuiu para o aumento da hidrofobicidade das superfícies.

Tabela 4 – Valores dos componentes apolares (ΔG_{sas}^{LW}) e polares (ΔG_{sas}^{AB}) da energia livre total de interação das superfícies funcionalizadas de aço inoxidável

Superfícies	ΔG_{sas}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{TOT} (mJ/m ²)
Aço inoxidável/ controle	-6,733	-59,180	-65,913 ^a
Aço inoxidável/ Ag NPs	-5,270	-96,199	-101,468 ^b
Polietileno/ controle	-3,429	-13,797	-17,226 ^A
Polietileno/ Ag NPs	-4,483	-67,092	-71,575 ^B

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas ou minúsculas, na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O parâmetro ΔG^{TOT} calculado expressou a variação da energia livre de interação interfacial entre as moléculas do material imersas em água, e é a mais apropriada medida da hidrofobicidade, sendo considerado um critério quantitativo. Esse critério quantitativo define a superfície quanto à hidrofobicidade de uma forma mais eficiente, uma vez que leva em consideração as interações do tipo van der Waals, interações eletrostáticas, além das forças de interação de caráter polar podendo estas ser atrativas ou repulsivas. De acordo com as informações cedidas pela empresa fornecedora das superfícies, há a presença do silano, composto responsável pela fixação da prata na superfície. Desta forma, em virtude da estrutura química do silano possuir um radical orgânico, pode ter havido contribuição para o aumento na hidrofobicidade nas superfícies funcionalizadas.

A Tabela 4 também fornece os valores de ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} , ou seja, apresentam os valores das interações do tipo Lifshitz-van der Waals e interações do tipo ácido-base de Lewis. Observou-se forte contribuição no valor final das interações do tipo ácido-base que do tipo van der Waals. As interações ácido-base constituem o balanço das interações que são responsáveis pela tensão interfacial. Estas interações ocorreram entre as moléculas que estão muito próximas. Pode-se dizer que em ambas as superfícies, as moléculas de água evitaram interações desfavoráveis (menor energia de adesão entre líquido e sólido) com as superfícies apolares (aço inoxidável e polietileno). No caso de superfícies hidrofóbicas, as moléculas de água preferem interagir entre elas (maior energia de coesão do líquido) a adsorverem na interface hidrofóbica. Portanto, as moléculas de água adquiriram maior grau de liberdade o que provocou o aumento de entropia do sistema e a obtenção da variação da energia livre de Gibbs de interação hidrofóbica negativa. Pode-se dizer que a remoção do filme de água da superfície hidrofóbica é espontânea sempre quando o ΔG^{TOT} for menor que zero.

Os valores de ΔG^{TOT} para as superfícies bacterianas estudadas estão apresentados na Tabela 5. Observou-se a mesma tendência, ou seja, a interação mais contribuinte para o valor final da energia de interação global foi o ΔG_{sas}^{AB} , no entanto, para essas superfícies as forças de adesão entre líquido e sólido são maiores que a coesão entre as moléculas do líquido; o que tornou a superfície hidrofílica. Pôde-se observar também que a superfície da bactéria *S. aureus* foi a mais hidrofílica diferindo estatisticamente das demais ($p < 0,05$). Para esta interface, a remoção do filme de água não é espontânea, sendo o ΔG^{TOT} maior que zero e menor grau de liberdade das moléculas de água presentes.

Tabela 5 – Valores dos componentes apolares (ΔG_{sas}^{LW}) e polares (ΔG_{sas}^{AB}) da energia livre total de interação das superfícies bacterianas

Superfícies	ΔG_{sas}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{TOT} (mJ/m ²)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-2,239	58,818	56,579 ^a
<i>Escherichia coli</i>	-1,010	30,921	29,911 ^b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-2,464	29,379	26,915 ^b

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Kim et al. (2007) observaram que bactérias Gram-negativas foram mais susceptíveis à ação das Ag NPs em relação as bactérias Gram-positivas, relacionando esse fato com a diferença estrutural entre os grupos de bactérias, com as Gram-negativas apresentando uma membrana externa composta de proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos, seguida uma fina camada de peptideoglicano (~ 10 nm), enquanto as Gram-positivas apresentam uma camada bem mais espessa (~ 20-80 nm) e não apresentam membrana externa, o que se sugere conferir uma maior proteção à ação das Ag NPs (FERNANDES, 2014). Para esta interface, a remoção do filme de água não é espontânea, sendo o ΔG^{TOT} maior que zero e menor grau de liberdade das moléculas de água presentes.

A hidrofiliidade das células bacterianas pode ser explicada pelo caráter doador de elétrons (γ^-) predominante. As biossuperfícies são predominantemente doadoras de elétrons como consequência da presença do oxigênio na atmosfera da Terra e da hidratação da superfície da célula microbiana (STREVETT, 2003).

Santos et al. (2011) mediram a hidrofobicidade de cupons de borracha e silicone, materiais presentes em ordenhadeiras mecânicas, após 0, 30, 90 e 180 d de exposição das superfícies aos procedimentos de higienização comumente empregados. Medidas da hidrofobicidade de superfícies bacterianas também foram feitas. As superfícies de borracha e silicone foram consideradas hidrofóbicas ($\Delta G_{sws}^{TOT} < 0$) para todos os

tratamentos, enquanto a superfície bacteriana de *Streptococcus agalactiae* analisada foi considerada hidrofílica ($\Delta G_{\text{SWS}}^{\text{TOT}} > 0$).

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial foi possível determinar a variação da energia livre de adesão ($\Delta G_{\text{adesão}}$) entre as duas superfícies: célula microbiana (b) e as superfícies de processamento (s) conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Energia livre de adesão (mJ/m^2) entre diferentes espécies bacterianas e superfícies de aço inoxidável e de polietileno funcionalizadas com nanopartículas de prata e controles

Espécie Bacteriana/Superfície	Energia Livre de Adesão (mJ/m^2)		
	$\Delta G_{\text{bls}}^{\text{LW}}$	$\Delta G_{\text{bls}}^{\text{AB}}$	$\Delta G_{\text{adesão}}$
<i>S. aureus</i> / aço_controle	-3,8825	-10,6731	-14,5556
<i>S. aureus</i> / aço_nanopartículas	-3,4343	-6,7225	-10,1569
<i>E. coli</i> / aço_controle	-2,6076	-4,6275	-7,2350
<i>E. coli</i> / aço_nanopartículas	-2,3066	-1,3064	-3,6129
<i>P. fluorescens</i> / aço_controle	-4,0730	-9,0293	-13,1023
<i>P. fluorescens</i> / aço_nanopartículas	-3,6028	-6,1626	-9,7654
<i>S. aureus</i> / PE_controle	-2,7704	-5,5629	-8,3333
<i>S. aureus</i> / PE_nanopartículas	-3,1677	-12,1272	-15,2948
<i>E. coli</i> / PE_controle	-1,8607	-3,2862	-5,1469
<i>E. coli</i> / PE_nanopartículas	-2,1275	-5,3933	-7,5208
<i>P. fluorescens</i> / PE_controle	-2,9063	-6,9875	-9,8939
<i>P. fluorescens</i> / PE_nanopartículas	-3,3231	-9,8985	-13,2216

Verificou-se que para todas as superfícies analisadas a $\Delta G_{\text{adesão}}$ foi termodinamicamente favorável, visto que possui valor negativo. Além disso, para todas as superfícies funcionalizadas com Ag NPs observou-se que houve diferença ($p < 0,05$) do valor do $\Delta G_{\text{adesão}}$ em relação à superfície controle. Neste contexto, pode-se afirmar que o PE funcionalizado com Ag NPs tornou a superfície de processamento mais

favorável à adesão tanto para as células de *S. aureus* quanto para as células de *E. coli* e *P. fluorescens*, sendo o valor mais negativo para *S. aureus* na superfície de PE funcionalizada com Ag NPs. Apesar da adesão ter sido favorável para todos os micro-organismos testados ($\Delta G_{adesão} < 0$), as superfícies de aço inoxidável funcionalizadas com Ag NPs foram menos favoráveis à adesão, com $\Delta G_{adesão}$ menos negativo em relação às superfícies controle, inclusive com diferença entre os dois tratamentos ($p < 0,05$).

Para que as duas partículas se unam, é preciso remover as moléculas de água que estão ligadas a ela, e isto ocorre com o aumento da entalpia, uma vez que é necessária energia para romper as ligações. No entanto, ao mesmo tempo, a entropia do sistema aumenta, porque as moléculas de água passaram a ter maior grau de liberdade. Portanto, a entropia aumenta mais do que o aumento da entalpia. Assim, o ΔG é reduzido como pode ser observado pela Equação 16.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (16)$$

A Tabela 7 apresenta os resultados de adesão das células vegetativas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. fluorescens* nas superfícies controles e superfícies funcionalizadas. Observou-se que não houve diferença ($p < 0,05$) entre as superfícies controles e as superfícies com a presença do antimicrobiano. Os resultados observados na adesão das bactérias às superfícies corroboram com resultados encontrados no cálculo da energia livre de adesão, em que foi observada adesão termodinamicamente favorável em todas as superfícies testadas. Assim, pode-se afirmar que neste estudo, a funcionalização da superfície com as Ag NPs não foi eficiente para tornar a superfície menos aderente.

Tabela 7 – Médias do log UFC.cm⁻² de células vegetativas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* aderidas em cupons de aço inoxidável e de polietileno funcionalizados com nanopartículas de prata (Ag NPs)

Tratamentos/Cupons	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
Aço inoxidável/ controle	8,17 ^a	7,81 ^a	6,42 ^a
Aço inoxidável/ Ag NPs	7,73 ^a	7,36 ^a	6,38 ^a
Polietileno/ controle	7,73 ^a	8,01 ^a	6,78 ^a
Polietileno/ Ag NPs	8,02 ^a	7,94 ^a	6,70 ^a

Médias seguidas por letras iguais (minúsculas), na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

As Ag NPs foram adicionadas à superfície de aço inoxidável pelo processo chamado de *dip-coating* que consiste na imersão da superfície a ser funcionalizada na dispersão contendo Ag NPs e posterior secagem. Para este condicionamento foi usado o composto silano como agente de acoplamento das nanopartículas à superfície. O silano (SiH₄) pode possuir um radical orgânico em uma extremidade e na outra um radical inorgânico. Trabalhos semelhantes foram encontrados na literatura com o mesmo objetivo de funcionalizar a superfície com nanopartículas sendo ancoradas pelo silano. Chen et al. (2010) utilizaram o 3-aminopropiltrietoxissilano para condicionar as superfícies de aço inoxidável com Ag NPs, sendo o grupo amino responsável pela interação química do silano com as Ag NPs e o radical –Si, da outra extremidade, interage com o óxido de cromo (Cr₂O₃) presente na superfície do aço inoxidável. De acordo com Andrade (2008) essa fina película de Cr₂O₃ apresenta característica de proteção ao aço.

Em virtude da baixa eficiência antimicrobiana da superfície neste estudo, supõe-se que a prata ficou indisponível para interagir com a superfície microbiana e ou difundir para o meio e inativar as células testadas. A forte interação na matriz do cupom de aço inoxidável entre nanopartícula e silano pode ter prejudicado a eficiência antimicrobiana da superfície funcionalizada. As Ag NPs e o silano podem ter formado uma

ligação ordenada e complexa interferindo na efetividade do antimicrobiano.

Para a superfície polimérica, a incorporação das Ag NPs ocorreu via processo de injeção/sopro, em que o pó contendo 5000 mg.L⁻¹ de Ag NPs foi misturado à resina de polietileno e processados juntos para a obtenção da superfície. Nesse caso, é também provável que as nanopartículas de prata tenham ficado empacotadas na matriz estando indisponível para exercerem o efeito antimicrobiano.

Lv et al. (2009) verificaram que quando o aço inoxidável com uma camada de silano é imerso numa solução de nanopartículas de prata, os grupos -NH₂ nas extremidades da molécula de silano são coordenadas com os átomos de prata na superfície das Ag NPs, ligando-as fortemente à superfície do aço inoxidável. A força de adesão aço-silano-Ag NPs foi definida pelos autores como forte o suficiente para garantir a fixação das Ag NPs à superfície, já que eles verificaram experimentalmente que a superfície funcionalizada permaneceu ativa mesmo após lavagem com água por três vezes, seca e testada.

Chen et al. (2010) estudaram a influência do tempo de contato do aço inoxidável com o silano e as Ag NPs, concluindo que quanto maior a concentração de íons de prata no meio e quanto mais longo for o tempo de contato entre a superfície e as Ag NPs, maior será a eficiência antimicrobiana da superfície.

Os resultados antimicrobianos das superfícies funcionalizadas deste trabalho vão de encontro aos apresentados na literatura; pode-se ter havido alguma falha durante a execução da técnica de adsorção das Ag NPs na superfície do aço inoxidável, bem como no preparo da superfície de polietileno com o agente antimicrobiano.

4.2 Análise da adesão de *Pseudomonas fluorescens* em cilindros de aço inoxidável revestidos com nanopartículas de prata

No experimento no qual foram simuladas as forças de cisalhamento e a turbulência provocada pela higienização CIP (*cleaning in place*) no interior do tubo de cilindro de aço inoxidável funcionalizado com

Ag NPs, observou-se que não houve diferença significativa entre o cilindro controle - sem revestimento - e com as Ag NPs. No cilindro controle o log UFC.cm⁻² foi de 4,47 de *P. fluorescens* aderidas, enquanto o cilindro funcionalizado com Ag NPs apresentou log de 4,17. Os resultados deste experimento corroboraram com os resultados obtidos para a adesão de *E. coli*, *S. aureus* e da própria *P. fluorescens* nos cupons de aço inoxidável funcionalizados com Ag NPs, em que não houve diferença significativa quando comparado aos resultados do cupom de aço controle.

Na literatura encontram-se diferentes mecanismos de ação das Ag NPs sobre as células vegetativas. As Ag NPs têm capacidade de ancorarem na parede celular da bactéria e, portanto, causarem mudanças estruturais na membrana celular como alteração da permeabilidade e morte celular (PERCIVAL et al., 2005). A alteração na permeabilidade pode estar relacionada à formação de radicais livres pelas próprias Ag NPs podendo levar à formação de poros e eventual lise celular (SAMBHY et al., 2006). Caso haja liberação de íons de prata, estes podem interagir com os grupos tiol de enzimas e inativar as células. Os íons de prata são capazes de inibir enzimas da via respiratória com liberação de espécies reativas de oxigênio, os quais danificam as células. Resultados sugerem que as espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas na atividade antimicrobiana das Ag NPs (FERNANDES, 2014). Outra teoria refere-se à interação das nanopartículas com o enxofre e fósforo do DNA prejudicando o processo de replicação celular (PAL et al., 2007).

Nesse estudo, possivelmente, as Ag NPs ficaram impossibilitadas de exercerem suas funções antimicrobianas, preferindo no caso do aço inoxidável, interação coordenada com o silano, usado para ancoragem das mesmas.

4.3 Análise da concentração mínima inibitória (CMI) da dispersão e do pó de nanopartículas de prata

A Tabela 8 apresenta os valores da CMI para *E. coli*, *S. aureus* e *P. fluorescens* para a dispersão de nanopartículas de prata que foi aplicada

na funcionalização do aço inoxidável e para o pó de Ag NPs utilizado no preparo do polímero.

Tabela 8 – Concentração mínima inibitória (MIC) da dispersão de nanopartículas de prata e da nanopartículas de prata em pó para as espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens*

Antimicrobianos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Dispersão de Ag NPs	12,50 mg.L ⁻¹	12,50 mg.L ⁻¹	12,50 mg.L ⁻¹
Ag NPs em pó	6,25 mg.L ⁻¹	6,25 mg.L ⁻¹	6,25 mg.L ⁻¹

Tanto para *E. coli*, *S. aureus* e *P. fluorescens* foi observada inibição do crescimento nas concentrações de 50,0 mg.L⁻¹, 25,0 mg.L⁻¹ e 12,50 mg.L⁻¹, sendo o valor da CMI de 12,50 mg.L⁻¹ para dispersão; já para o pó foi verificada a inibição nas concentrações de 50,0 mg.L⁻¹, 25,0 mg.L⁻¹, 12,50 mg.L⁻¹ e 6,25 mg.L⁻¹, sendo a CMI 6,25 mg.L⁻¹ para as Ag NPs em pó. Logo, não foi verificada diferença entre a CMI para as três espécies bacterianas testadas, indo de encontro a outros autores que identificaram diferença no espectro de ação das Ag NPs em relação a bactérias Gram-negativas (mais susceptíveis) e Gram-positivas (menos susceptíveis), sugerindo um efeito protetor promovido pela camada mais espessa de peptideoglicano bactérias em Gram-positivas (FERNANDES, 2014; KIM et al., 2007; GHOSH et al., 2010).

Goswani et al. (2015) sintetizaram Ag NPs pelo método de redução química a partir de folhas *Camelia sinensis* L. e AgNO₃, encontrando uma concentração mínima de inibição de 3,0 mg.L⁻¹ para *S. aureus* e de 5,0 mg.L⁻¹ para *E. coli*. Radzig et al. (2013) determinaram que a menor concentração inibitória de Ag NPs para *P. aeruginosa* foi de 8,0 mg.L⁻¹.

A variabilidade nos resultados observados pode ser explicada de acordo com vários aspectos relevantes na estrutura das Ag NPs, que é dependente do seu tamanho, da sua forma, do seu método de síntese, da

composição química (WEI, 2015). Há diversos métodos de produção de nanopartículas metálicas relatados, mas, de modo geral, a síntese de Ag NPs se dá pela redução química de uma solução de sal de prata reduzida por um agente redutor, como o citrato e o ascorbato (PANACEK, 2006). Ag NPs menores que 10 nm interagem com bactérias de maneira eletrostática, aumentando a reatividade em relação à nanopartículas maiores, confirmando que o efeito bactericida das Ag NPs depende do seu tamanho (RAIMONDI, 2005). Morones et al. (2005) comprovaram a influência da forma das Ag NPs sobre seu efeito bactericida.

Ghosh et al. (2010) sintetizaram uma fina película de ágar-ágar com Ag NPs esféricas incorporadas ao filme de ágar com tamanho das partículas variando entre 15 e 25 nm. Do ponto de vista antimicrobiano, os autores verificaram que a CMI do filme para o fungo *Candida albicans* foi de 14,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para a *E. coli* foi de 25,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *S. aureus* foi de 76,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que corresponde, no filme, as concentrações de 141 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, 258 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ e 762 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, respectivamente. Entretanto, nessas mesmas concentrações, o filme não inibiu o crescimento das bactérias, sendo eficiente apenas na inibição do fungo *C. albicans*, concluindo que as bactérias são mais resistentes às Ag NPs que o fungo testado quando estas estão embebidas na matriz do filme.

De acordo com os resultados encontrados no MIC, ficou claro que as Ag NPs, tanto na forma de dispersão quanto em pó, apresentam efeito antimicrobiano. O que os resultados anteriormente apresentados sugerem é a indisponibilidade das Ag NPs para interagirem com as superfícies bacterianas. Conclui-se que os métodos de impregnação das Ag NPs no aço inoxidável e a tecnologia de formação do polietileno sejam revistos, a fim de permitir o contato entre as Ag NPs e os micro-organismos.

Apesar da ausência do efeito antimicrobiano das superfícies com Ag NPs observadas neste estudo, há relatos na literatura que corroboram com essa proposta de uso (CHEN, 2005; VERRAN, 2006; HASIM, 2015).

4.4 Análise da espectrometria de absorção atômica

De acordo com a Resolução nº 105 da ANVISA de 19 de maio de 1999 – que contém as normas harmonizadas do MERCOSUL relacionadas a embalagens e equipamentos em contato com alimentos – o simulante para alimentos do TIPO I, que são alimentos aquosos não ácidos ($\text{pH} > 5$), deve ser água destilada.

A liberação de prata da superfície de aço para a amostra de água ficou abaixo do primeiro ponto da curva padrão que era de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$. Ou seja, pode-se concluir que a quantidade de prata liberada está entre 0 e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

Pode-se então considerar a difusão da prata para o simulante água, neste estudo, como segura, uma vez que o limite máximo estabelecido pela OMS é de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de prata em água potável.

O leite desnatado reconstituído em água destilada (10% m/v) foi também usado para simular as condições reais da indústria de alimentos; ou seja, a circulação do fluido no interior da tubulação durante o processamento. A liberação de prata da superfície de aço funcionalizada para a amostra de leite ficou abaixo do primeiro ponto da curva padrão que também era de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

Além disso, constatou-se que a difusão da prata para o simulante leite foi idêntica à difusão para a água destilada, sendo a matriz alimentícia não interferente no processo.

A liberação de prata de produtos comerciais constituídos de Ag NPs é uma preocupação, principalmente devido ao tamanho reduzido das partículas, grande área superficial e a consequente alta reatividade e complexa interação com o organismo. Alguns estudos sugerem que Ag NPs podem causar inflamação do trato digestivo (LOMER, et al., 2002) sendo encontrados traços de prata no sistema circulatório, linfático e no fígado (GAILLET, 2015). Nanopartículas com tamanho inferior a 10 nm apresentam maior toxicidade em relação às partículas maiores (WEI, 2015). Apesar disso, a toxicidade da prata é considerada baixa, visto que não há relatos regulares de alergias e outras intervenções médicas diretamente relacionadas ao seu uso ou ingestão (LEAPER, 2006).

4.5 Análise da rugosidade e da microtopografia das superfícies

As microtopografias das superfícies estudadas estão apresentadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8. Como pode ser observado nas Figuras 5 e 6, não se permite uma visualização clara da presença das Ag NPs na superfície do polietileno, o que pode indicar um empacotamento das mesmas na estrutura da matriz, reforçando novamente os resultados encontrados nos testes microbiológicos de adesão.

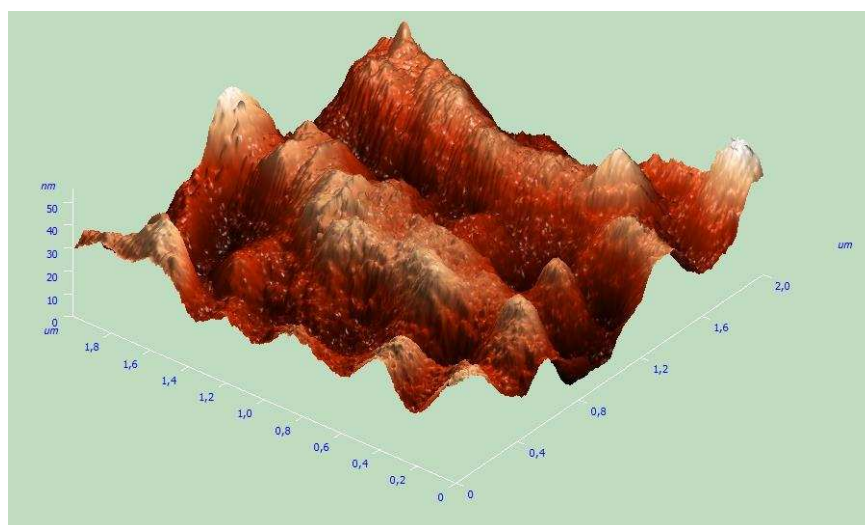


Figura 5 – Fotomicrografia da superfície de polietileno controle: sem a presença de nanopartículas de prata

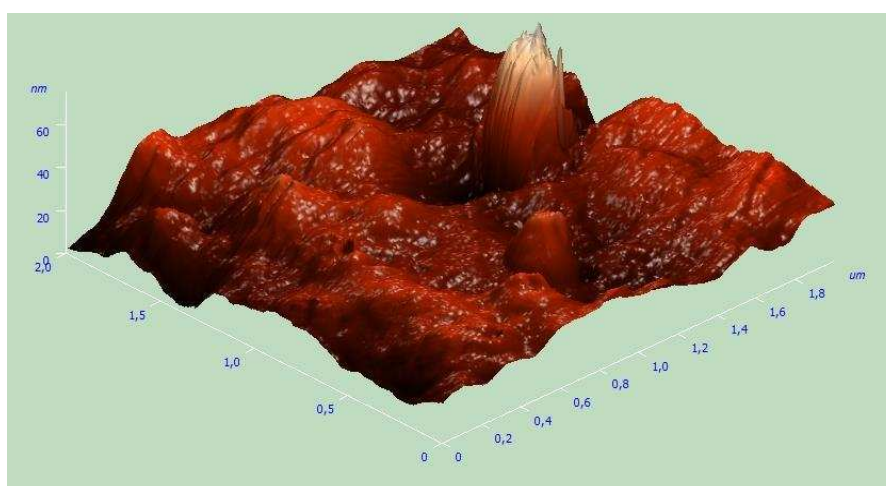


Figura 6 – Fotomicrografia da superfície de polietileno funcionalizada com nanopartículas de prata

Como pode ser visto na Tabela 9, a rugosidade média (R_a) da superfície controle do polietileno foi de $370 \pm 55,9$ nm, enquanto a R_a da superfície de polietileno funcionalizado com Ag NPs foi de $425 \pm 24,7$ nm. As Figuras 7 e 8 apresentam a topografia da superfície de aço inoxidável controle e da funcionalizada com Ag NPs, respectivamente, não sendo possível detectar a presença de Ag NPs na superfície funcionalizada. Ainda de acordo com a Tabela 9, a R_a para o aço controle foi de $325 \pm 21,9$ nm, enquanto para o aço funcionalizado foi de $343 \pm 20,6$ nm.

Tabela 9 – Rugosidade média (R_a) das superfícies de aço inoxidável controle, aço inoxidável funcionalizado com Ag NPs, polietileno controle e polietileno funcionalizado com Ag NPs, medida no microscópio de força atômica

Superfícies	Rugosidade Média (nm)
Aço inoxidável/ controle	$325 \pm 21,9$
Aço inoxidável/ Ag NPs	$343 \pm 20,6$
Polietileno/ controle	$370 \pm 55,9$
Polietileno/ Ag NPs	$425 \pm 24,7$

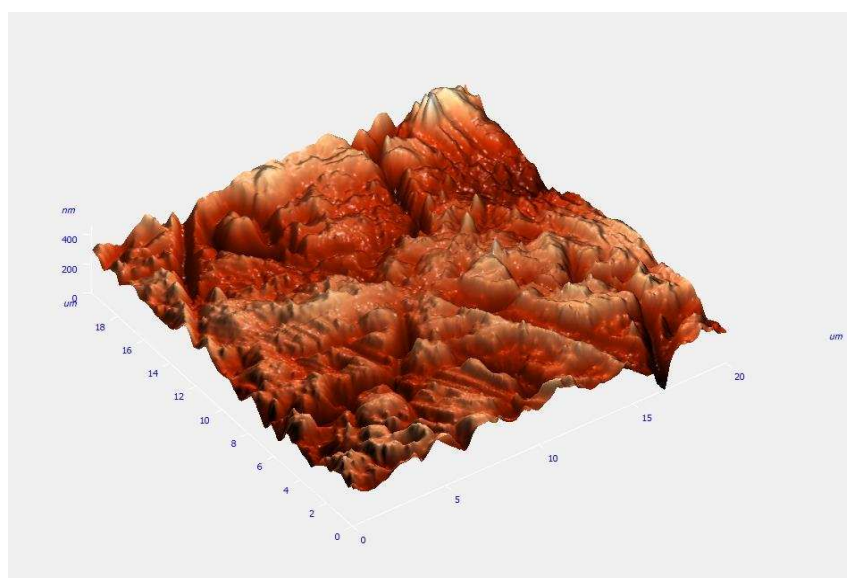


Figura 7 – Fotomicrografia da superfície de aço inoxidável controle: sem a presença de nanopartículas de prata

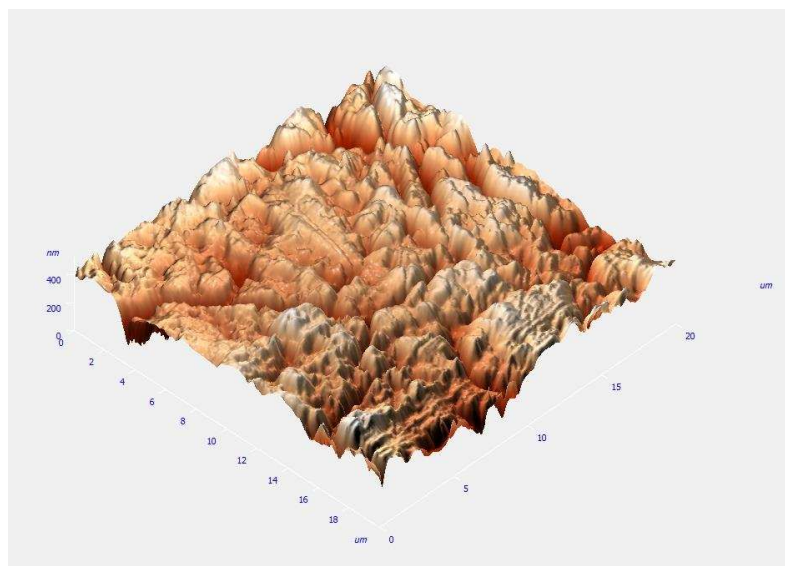


Figura 8 – Fotomicrografia da superfície de aço inoxidável funcionalizada com nanopartículas de prata

De uma forma geral, a topografia da superfície quando considerada irregular pode favorecer a retenção de resíduos de alimentos nas imperfeições. Em estudos observados, não existe uma relação direta entre rugosidade da superfície e a adesão, o que se pode inferir é que caso haja maior deposição de resíduos de alimentos, há maior possibilidade de pontos de adesão de micro-organismos e consequente formação de biofilmes.

Embora na literatura não se encontre uma relação direta entre adesão e rugosidade, os autores Verran e Whitehead (2006) encontraram maior adesão de micro-organismos em superfícies mais rugosas. Careli et al. (2009) verificaram a influência da rugosidade na adesão de células de *P. fluorescens* em nove tipos de superfícies usualmente utilizadas no processamento de alimentos, concluindo que as superfícies de mármore e granito apresentaram alta porosidade, fissuras, ondulações e depressões grandes o suficiente para proteger um elevado número de células aderidas.

Rosado et al. (2011) promoveram a adesão de células de *P. fluorescens* em superfícies de aço inoxidável, mármore e granito, sendo o aço a superfície menos rugosa dentre todas. Os autores verificaram que o

número de células aderidas ao aço é cerca de 1 ciclo log menor se comparado ao número de células aderidas ao mármore e ao granito, sendo de 10^6 UFC.cm⁻² no aço e 10^7 UFC.cm⁻² no mármore e no granito, concluindo que os picos maiores e a rugosidade média maior nestas superfícies contribuíram para o condicionamento da superfície, facilitando o processo de adesão, além de poder proteger as células da ação dos sanitizantes químicos avaliados.

5. CONCLUSÃO

As superfícies de aço inoxidável controle, aço inoxidável funcionalizado com Ag NPs e a de polietileno controle foram consideradas hidrofóbicas, de acordo com critério qualitativo, já que o ângulo de contato formado entre as superfícies e água foi maior que 65°. Já a superfície de polietileno controle, foi considerada hidrofílica, com ângulo de contato menor que 65°.

Considerando o mesmo critério, todas as superfícies bacterianas estudadas (*S. aureus*, *E. coli* e *P. fluorescens*) foram consideradas hidrofílicas ($\theta < 65^\circ$).

De acordo com o critério quantitativo, ou seja, com base nos resultados da variação da energia livre da interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT}), tanto as superfícies de aço inoxidável analisadas quanto as superfícies de polietileno foram consideradas hidrofóbicas por apresentarem o valor negativo, havendo diferença ($p < 0,05$) entre os valores de ΔG_{sas}^{TOT} encontrados para ambas as superfícies funcionalizadas quando comparadas às superfícies controles.

A adesão das três bactérias estudadas foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} < 0$) para todas superfícies avaliadas, sendo que, para todas as superfícies funcionalizadas com Ag NPs houve diferença ($p < 0,05$) no valor de $\Delta G_{adesão}$ em relação às superfícies controle.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na adesão *in vitro* de células vegetativas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. fluorescens* entre as superfícies controle e funcionalizadas com Ag NPs.

Não houve diferença ($p < 0,05$) no número de células de *P. fluorescens* em cilindros de aço inoxidável funcionalizado com Ag NPs e controle simulando-se a higienização CIP. A CMI da dispersão de Ag NPs determinada foi de 12,50 mg.L⁻¹ para as três bactérias avaliadas: *S. aureus*, *E. coli* e *P. fluorescens*. Para as Ag NPs em pó a CMI foi de 6,25 mg.L⁻¹ para todas as bactérias testadas.

Os resultados indicaram que não houve difusão de prata da superfície de aço inoxidável funcionalizada com Ag NPs para os dois

simulantes testados (leite em pó desnatado reconstituído e água), utilizando a técnica de espectroscopia de absorção atômica.

As Ag NPs não alteraram a rugosidade média (R_a) das superfícies de aço inoxidável ou de polietileno.

Apesar da tendência de funcionalização de superfícies com agentes que tornam as superfícies de processamento menos aderentes ou que já agem inativando os micro-organismos, as superfícies de aço inoxidável e de polietileno revestidas com Ag NPs, estudadas neste trabalho, não atenderam a expectativa de redução do número de células aderidas. Sugerem-se futuros estudos físico-químicos das superfícies interatuantes para melhor compreensão do aprisionamento da prata nas superfícies de processamento analisadas.

6. REFERÊNCIAS

ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M. R.; FOGHT, J. M.; Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, p. 36-41, 2008.

ARAUJO, E. A. **Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010. 2010. 96p.

ARAUJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; BERNARDES, P. C.; TEIXEIRA, A. V. N. C.; SA, J. P. N.; FIALHO JUNIOR, J. F. Q.; FERNANDES, P. É. Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles against Bacterial Cells Adhered to Stainless Steel Surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 701-705, 2012.

ARAUJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. E.; SÁ, J. P. N. Gibbs free energy of adhesion of *Bacillus cereus* isolated from dairy plants on different food processing surfaces evaluated by the hydrophobicity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2519–2525, 2009.

BELLANTONE, M.; WILLIAMS, H. D.; HENCH, L. L. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 1940-1945, 2002.

BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008. 2008. 67p.

BERNARDES, P. C. **Modificação de membrana de polissulfona usada em processos de filtração de água para reduzir o *biofouling***. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012, 99f.

BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; PENÃ, W. E. L.; MINIM, L. A.; SÁ, J. P. N.; FERNANDES, P. E.; COLOMBARI, D. S. Modeling of the adhesion of *Bacillus cereus* isolated from a dairy plant as a function of time and temperature. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, p. 187-191, 2013.

BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CARVALHO, A. F.; ARAUJO, E. A.; LELIS, C. A.; MÓL, P. C. G.; SA, J. P. N. Modification of Polysulfone Membrane Used in the Water Filtration Process to Reduce

Biofouling. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 6355-6367, 2014.

BERRA, L.; CURTO, F.; BASSI, G. L.; PITTS, B.; BACCARELLI, A., KOLOBOW, T. Antimicrobial-coated endotracheal tubes: an experimental study. **Intensive Care Medicine**, v. 34, p.1020-1029, 2008.

BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens - mechanisms and pathogenesis. **West Lafayette: Springer**, p. 135-149, 2007.

BOS, R.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p.179-230, 1999.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 73-78, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999. Aprova os Regulamentos Técnicos: Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plásticos em contato com Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de maio de 1999. Seção 1, p. 20.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008. Dispõe sobre regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2008. Seção 1, p. 43-51.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; VAN DER, MEI H. C.; VAN PELT, A. W.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 980-983, 1984.

CARELI, R. T; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. S.; JÚNIOR, J. I. R.; ROSADO, M. S.; BERNARDES, P. C. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Minho, 2004.

CHEN, L.; ZHENG, L., LV, Y.; LIU, H.; WANG, G.; REN, N.; LIU, D.; WANG, J.; BOUGHTON, R. I. Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for antimicrobial applications. **Surface & Coatings Technology**, v. 204, p. 3871–3875, 2010.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 587-590, 2007.

DAS, S. K.; BHOWAL, J.; DAS, A. R.; GUHA, A. K.; Adsorption behavior of rhodamine B on *Rhizopus oryzae* biomass. **Langmuir**, v. 22, p. 7265-7272, 2006.

DUFRENE, Y. F.; Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 317-323, 2003.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHAN, A.; BERGE, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 260, p. 232–240, 2006.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BELLON-FONTAINE, M.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, n.8, p.728-738, 2002.

FENG, Q. I.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 52, p. 662-668, 2002.

FERNANDES, P. É. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014, 87p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

FERNANDES, P. É.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; ZERDAS, E. R. M. A.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, C. M.; SILVA, L. D. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. **Food Control**, v. 41, p. 21-26, 2014.

GAILLET, S.; ROUANET, J. M. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 58-63, 2015.

GHOSH, S; KAUSHIK, R.; NAGALAKSHMI, K.; HOTI, S. L.; MENEZES, G. A.; HARISH, B. N.; VASAN, H. N. Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar–agar matrix as a thin film. **Carbohydrate Research**, v. 107, p. 295-300, 2010.

GOMES, I. L. **Pesquisa de enterotoxinas em isolados alimentares do grupo *Bacillus cereus***. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, 2009, 91 f.

GOSWAMI, S. R.; SAHAREEN, T.; SINGHA, M.; KUMAR, S. Role of biogenic silver nanoparticles in disruption of cell–cell adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilm. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 26, p. 73-80, 2015.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2 n. 3, p. 104-111, 2009.

HASIM, S. A.; ROMERO, M. C. C.; GHOSHAL, T.; MORRIS, M. A.; CUMMINS, M. E. C.; KERRY, J. P. Application of silver nanodots for potential use in antimicrobial packaging applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 136-143, 2015.

JÄÄSKELÄINEN, E. **Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food**. University of Helsinki, Helsinki, p. 74, 2008.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 95-101, 2007.

KLUEH, U.; WAGNER, V.; KELLY, S.; JOHNSON A.; BRYERS, J. D. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, p. 621-631, 2000.

KONG, H.; JANG, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, p. 2051–2056, 2008.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. **Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections**, *Microbes and Infection*, v. 2, p. 189-198, 2000.

LEAPER, D. L. Silver dressings: their role in wound management. **International Wound Journal**, v. 3, p. 282–94, 2006.

LIANG, J. Z. Characteristics of melt shear viscosity during extrusion of polymers. **Polymer Testing**, v. 21, p. 307-311, 2002.

LOMER, M. C., THOMPSON, R. P., POWELL, J.J. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and

association with Crohn's disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 123–130, 2002.

LV, Y.; LIU, H.; WANG, Z.; LIU, S.; HAO, L.; SANG, Y.; LIU, D.; WANG, J.; BOUGHTON, R. I. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 331, p. 50-56, 2009.

MACHADO, F. M. **Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade antimicrobiana para tratamento de águas**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013. 2013. 111p.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho. Braga, 2005.

MARQUES, C. S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por discodifusão**: norma aprovada. 8.ed. 2003. M2-A8, v. 23, n. 1.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. **Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens**. São Carlos, SP, 2008. (Comunicado técnico 99).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Silver: water disinfection and toxicity**. Centre for Research into Environment and Health. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/Silver_water_disinfection_toxicity_2014V2.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2015.

PAL, S., TAK, Y. K., SONG, J. M., 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.

PANACEK, A., KVITEK, L., PRUCEK, R., KOLAR, M., VECEROVA, R., PIZUROVA, N., SHARMA, V.K., NEVECNA, T., ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p.16248-16253, 2006.

PERCIVAL, S.L.; BOWLER, P.G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005.

PIMENTEL FILHO, N. J. **Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

PORTARIA nº 146, de 07 de março de 1996. **Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996. (DOU, seção I, p.3977. 11 mar. 1996).

QUIRYNEN, M.; VAN DER MEI, H. C.; BOLLEN, C. M. L.; GEERTSEMADOORNBUSCH, G. I.; BUSSCHER, H. J.; VAN STEENBERGHE, D. Clinical relevance of the influence of surface free energy and roughness on the supragingival and subgingival plaque formation in man. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, p. 25-31, 1994.

RADZIG, M. A.; NADTOCHENKO, V. A.; KOKSHAROVA, O. A.; KIWI, D. J.; LIPASOVA, V. A.; KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 300-306, 2013.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A.; Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

RAIMONDI, F.; SCHERER, G.G.; KOTZ R.; WOKAUN, A. Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 190–209, 2005.

REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI JR., O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A.. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1563-1569, 2007.

RODRIGUEZ, N. S.; SICAIROS-RUELAS, E. E.; GERBA, C. P.; BRIGHT, K. R. Silver as a disinfectant. In: WARE, G. W. (Ed.) **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, 2007. p. 23-45.

ROSADO, M. S.; ANDRADE, N. J.; PENA, W. E. L.; CARELI, R. T.; PIAZZA, J. L.; MINIM, L. A. Modeling *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation on marble, granite and stainless steel as a function of time and temperature. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, p. 1623-1638, 2011.

SALUSTIANO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite**. 2007, 85 f. Tese (Doutorado em

Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; LIMA, J. C.; BERNARDES, P. C.; LUIZ, L. M. P.; FERNANDES, P. E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v. 20, p. 439-442, 2009.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M. M.; PETERSON, B. R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 9798-9808, 2006.

SANTOS, A. L.; PIRES, A. C. S.; B, J. J. S.; ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F. Effect of Cleaning Treatment on Adhesion of *Streptococcus agalactiae* to milking machine surfaces. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1868-1872, 2011.

SHAHVERDI A. R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H. R.; MINAIAN, M. S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine**, v. 3, p.168-171, 2007.

SOMASUNDARAN, P.; MARKOVIC, B.; YU, X.; KRISHNAKUMAR, S. In BIRDI, K. S. (Ed.) **Handbook of Surface and Colloid Chemistry**, CRC Press: Lincoln, 2003.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 329-335, 2003.

UBBINK, J.; SCHAR-ZAMMARETTI, P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 263-270, 2007.

van LOOSDRECHT, M.; NORDE, W.; LYKLEMA, L.; ZEHNDER, J. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. **Aquatic Sciences**, v. 51, p. 103-114, 1990.

van OSS, C. J. **Interfacial forces in aqueous media**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. 440 p.

van OSS, C. J.; GIESE, R. F. The Hydrophilicity and Hydrophobicity of Clay Minerals. **Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VERRAN, J.; WHITEHEAD, K. A.; Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. **Food and Bioprocess Processing**, v. 84, 260-264, 2006.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WEI, L.; LU, J.; XU, H.; PATEL, A.; CHEN, Z. S.; CHEN, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, p. 59-601, 2015.

WEN, X., WANG, X.; ZHANG, N. Microrough surface of metallic biomaterials: a literature review. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 6, p. 173–189, 1996.