

# OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO NOVA SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA SUA AÇÃO SANITIZANTE

## OPTIMIZATION OF PRODUCTION OF SILVER NANOPARTICLES PRODUCED BY NEW SYNTHESIS AND EVALUATION OF ITS SANITIZING ACTION

Adayane Aparecida PEREIRA<sup>1</sup>; Emiliane Andrade ARAÚJO<sup>2</sup>; Lorena RIBEIRO<sup>1</sup>; Flávia Regina PASSOS<sup>3</sup>; Diego Alvarenga BOTREL<sup>4</sup>; Patrícia Campos BERNARDES<sup>5</sup>; José Felício Queiroz Fialho JÚNIOR<sup>6</sup>; Nélio José de ANDRADE<sup>7</sup>

1. Estudante s de Ciência de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Campus Rio Paranaíba - CRP; 2. Professora Adjunta UFV – CRP, Rio Paranaíba, MG, Brasil. [emiliane.araujo@ufv.br](mailto:emiliane.araujo@ufv.br); 3. Estudante de Mestrado, UFV-CRP; 4. Professor assistente UFV - CRP; 5. Professora Adjunta Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil; 6. Engenheiro de Alimentos, UFV, Viçosa, MG, Brasil; 7. Professor Titular UFV, Viçosa, MG, Brasil.

**RESUMO:** Sanitizantes químicos são utilizados na higienização de superfícies que entram em contato com os alimentos, de forma a eliminar patógenos e reduzir deterioradores assegurando a inocuidade dos alimentos para os consumidores. Atualmente, tem-se o interesse no desenvolvimento de novos antimicrobianos, em razão do aumento no número de bactérias resistentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de nanopartículas de prata a partir de uma nova síntese, bem como avaliar sua capacidade antimicrobiana por diferentes metodologias. Observou-se que o rendimento na produção das nanopartículas de prata aumentou à medida que a concentração do surfactante usado na dispersão foi também aumentada, isto pode ser explicado pelo fato da reação de formação das nanopartículas se caracterizar como uma catálise micelar. Pelos resultados obtidos no teste de adesão bacteriana, observou-se que a adesão de *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua* foi menor nas superfícies condicionadas com as nanopartículas de prata. As nanopartículas de prata também foram capazes de reduzir o número de bactérias aderidas em diferentes superfícies de aço inoxidável, superfícies estas, comumente utilizadas nas indústrias de alimentos. Portanto, as nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese apresentam-se eficientes como agentes antimicrobianos, com potencial uso como sanitizantes, na indústria de alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanopartículas de prata. Antimicrobiano. Adesão.

## INTRODUÇÃO

A contaminação de superfícies por micro-organismos patogênicos e deterioradores é uma preocupação constante na indústria de alimentos. Adesão e consequente formação de biofilmes no ambiente de processamento de alimentos resultam em produtos com inocuidade comprometida e possíveis riscos à saúde humana.

A adesão bacteriana depende das propriedades físico-químicas do material do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e superfície depende da composição química da superfície e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE et al., 2008). Propriedades da superfície da célula, como a presença de flagelo, pili, adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico e cápsula podem influenciar positivamente o processo de aderência.

A sanitização, última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir micro-organismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa

qualidade higiênico-sanitária. Dentre os diversos agentes químicos disponíveis para uso como sanitizantes encontram-se compostos à base de cloro, iodo, amônia quaternária, ácido peracético, água oxigenada, extrato de semente de grape-fruit e clorhexidina (MORAES et al., 1997).

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. 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 descoberta da penicilina, e sua introdução na medicina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu. Entretanto, com a descoberta de antibióticos houve seleção de cepas resistentes a antibióticos. Portanto, atualmente, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em razão da necessidade de desenvolvimento de sínteses de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

O uso de nanopartículas de prata como agente antibacteriano é relativamente novo e sua atividade tem sido estudada em diferentes campos, como na medicina para reduzir infecções, bem como prevenir colonização bacteriana em superfícies de prótese, cateteres, materiais odontológicos e na indústria de alimentos em superfícies de aço inoxidável. As nanopartículas de prata também podem ser empregadas no controle microbiano em têxteis e no tratamento de água (GUZMÁN et al., 2009).

As nanopartículas assim como os íons de prata apresentam efeito antimicrobiano, devido à interação com proteínas compostas de enxofre nas células, bem como com os compostos contendo fósforo como o DNA. Além disto, as nanopartículas de prata apresentam propriedades antimicrobianas eficientes, em virtude de sua grande área superficial que proporciona melhor contato com as bactérias (MORONES et al., 2005; SONG et al., 2006).

Neste contexto, as nanopartículas de prata também podem ser propostas como alternativa estratégica para redução de adesão bacteriana e prevenção de formação de biofilmes, em que os

micro-organismos tornam-se sésseis e a matriz forma uma barreira protetora contra os agentes antimicrobianos.

Este trabalho objetivou otimizar a produção de nanopartículas de prata por meio de combinação de diferentes variáveis (pH, força iônica, sulfadiazina de prata e surfactante), bem como comparar a ação sanitizante das nanopartículas de prata com a ação do hipoclorito de sódio, sanitizante comumente utilizado na indústria de alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Otimização do processo de síntese das nanopartículas de prata

A otimização da síntese de nanopartículas sob a influência de três reagentes e diferentes valores de pH requer um grande número de experimentos. O planejamento e análise dos experimentos foram realizados dentro do contexto da metodologia de superfície de resposta. Neste estudo, foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^4$ , com 8 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 28 ensaios (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tratamentos e planejamento experimental do DCCR

Ensaio	Trat.	M	pH	Surfactante	SAg
1	1	-1	-1	-1	-1
2	2	+1	-1	-1	-1
3	3	-1	+1	-1	-1
4	4	+1	+1	-1	-1
5	5	-1	-1	+1	-1
6	6	+1	-1	+1	-1
7	7	-1	+1	+1	-1
8	8	+1	+1	+1	-1
9	9	-1	-1	-1	+1
10	10	+1	-1	-1	+1
11	11	-1	+1	-1	+1
12	12	+1	+1	-1	+1
13	13	-1	-1	+1	+1
14	14	+1	-1	+1	+1
15	15	-1	+1	+1	+1
16	16	+1	+1	+1	+1
17	17	-2	0	0	0
18	18	+2	0	0	0
19	19	0	-2	0	0
20	20	0	+2	0	0
21	21	0	0	-2	0
22	22	0	0	+2	0
23	23	0	0	0	-2
24	24	0	0	0	+2
25	25	0	0	0	0
26	25	0	0	0	0
27	25	0	0	0	0
28	25	0	0	0	0

Os fatores foram as diferentes concentrações do surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio (Dotab), de sulfadiazina de prata (SAg), de cloreto de sódio (NaCl) e diferentes

valores de pH. O NaCl foi usado para o ajuste da força iônica ( $\mu$ ). A Tabela 2 apresenta o delineamento do experimento que foi conduzido.

**Tabela 2.** Variáveis e níveis do delineamento composto central rotacional (DCCR).

Variável	Nível				
	-2	-1	0	1	2
Força Iônica ( $\mu$ )	0,5	0,875	1,25	1,625	2
pH	3	5	7	9	11
Surfactante (DOTAB)					
Concentração em CMC	0,3	2,725	5,15	7,575	10
Sulfadiazina de prata (SAg)	0,3	0,475	0,65	0,825	1

As nanopartículas de prata foram sintetizadas segundo uma nova metodologia desenvolvida por Fernandes (2010). Estas foram preparadas a partir de uma solução aquosa composta do surfactante (Dotab) (Sigma, São Paulo, Brasil), cuja concentração micelar crítica (CMC) é 0,0156 M, SAg (Sigma, São Paulo, Brasil) e (NaCl). Após a mistura dos reagentes, o pH foi ajustado de acordo com a Tabela 1. A dispersão foi submetida a uma agitação suficiente para garantir mistura completa e em seguida realizou-se centrifugação da dispersão a  $15.000 \times g$  durante 5 minutos em centrífuga. Após centrifugação, o sobrenadante de coloração amarela obtida que supostamente contém as nanopartículas foi separado do pellet. Em seguida, cada amostra produzida foi conduzida para a espectroscopia de absorção atômica, a fim de quantificar as nanopartículas de prata produzidas. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro de absorção atômica Specttr AA-200 (VARIAN), por meio de absorção atômica com emprego de chama.

#### Determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de prata por espalhamento dinâmico de luz

As nanopartículas de prata na concentração de 60 mg/L, aplicadas nos estudos microbiológicos, foram conduzidas para determinação do diâmetro hidrodinâmico. O espalhamento dinâmico de luz foi medido no Laboratório de Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas, em temperatura ambiente (25 °C), com ângulo de 30°, utilizando um laser de estado sólido de 150 mW (661 nm e um fotodiodo de avalanche como detector). As funções correlações foram calculadas pelo correlacionador Turbocorr (Brookhamben Co.)

#### Condicionamento da superfície

Cupons (10 mm x 10 mm x 0,05 mm) de aço inoxidável AISI 304 #4 previamente higienizados foram imersos em água (controle), em nanopartículas de prata na concentração de 60 mg/L e em hipoclorito de sódio na concentração de 100 mg/L. Os cupons permaneceram imersos nestas dispersões durante 24 h. à temperatura de 25 °C, de modo a condicionar e alterar as características da superfície. Após este período, os cupons foram secos à temperatura de 25 °C e conduzidos para a adesão bacteriana.

#### Adesão bacteriana

Os estudos de adesão foram conduzidos usando suspensões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria innocua* (ATCC 33090).

Para o estudo da adesão bacteriana, foram utilizados os cupons de aço inoxidável condicionados com as nanopartículas de prata. Os cupons condicionados foram imersos em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente acrescido de um volume de suspensão de células vegetativas, de forma a obter uma contagem aproximada de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. As amostras foram incubadas por 24 h na temperatura ideal de crescimento de cada micro-organismo.

Posteriormente, os cupons de cada tratamento foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M) por 1 minuto para remoção de células planctônicas. Em seguida, novamente, imersos em solução tampão fosfato de sódio, com a finalidade de remoção das células sésseis, por meio de agitação em vortex durante 1 minuto. Diluições adequadas foram preparadas a partir deste último tampão e alíquotas foram plaqueadas em ágar padrão para contagem (PCA, Merck). O número de células (UFC/cm<sup>2</sup>) aderidas foi determinado de acordo com Parizzi et al. (2004).

### Imersão de superfícies de aço inoxidável com bactérias aderidas em dispersões contendo antimicrobianos

Cupons de aço inoxidável foram previamente higienizados e imersos em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) (Merck). No caldo foi adicionado o inóculo da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e procedeu-se a incubação à 28 °C por 18-24 h. Após o período de incubação, os cupons foram retirados, secos à temperatura de 25 °C e imersos em nanopartículas de prata na concentração de 60 mg/L, na solução de hipoclorito de sódio de concentração 100 mg/L e na água (controle) por 30 minutos. Posteriormente, os cupons de cada tratamento foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M) e o mesmo procedimento do experimento anterior foi adotado para a remoção de células aderidas. O número inicial de células aderidas no cupom de aço

inoxidável foi determinado sem a imersão dos cupons nos antimicrobianos.

### Remoção de células vegetativas de *Bacillus cereus* aderidas a cilindros de aço inoxidável

Em amostras de 100 mL de leite esterilizado (UHT) foram adicionadas, individualmente, 1 mL de suspensão de *B. cereus* na concentração aproximada de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Esta suspensão de *B. cereus* foi preparada com micro-organismo isolado de leite pasteurizado e foi ativada por duas vezes, em BHI a 32 °C por 24 h. O leite UHT juntamente com a suspensão de *B. cereus* foram adicionados em tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm (Figura 1) com o intuito de simular o processo de remoção bacteriana utilizando o processo de limpeza CIP (*Cleaning in place*) (SALUSTIANO, 2007).



**Figura 1.** Tubos de prova de aço inoxidável AISI 304

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.

Em seqüência, os tubos foram incubados à 32 °C por 24 horas, para promover o processo de adesão do micro-organismo no aço inoxidável. A temperatura e o tempo de adesão simularam as condições ideais de multiplicação para *B. cereus*. Após a adesão, os inóculos contidos nos tubos de

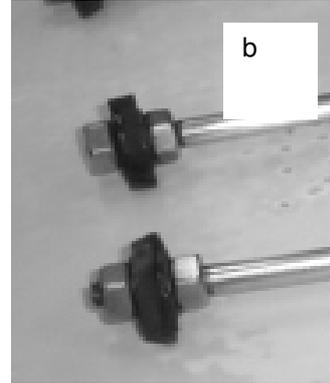
prova foram descartados e os tubos foram preenchidos com os diferentes tratamentos: água destilada a 25 °C (controle), hipoclorito de sódio (100 mg/L) e nanopartículas de prata (60 mg/L) para avaliar a eficiência na remoção de células aderidas. Após o preenchimento, os tubos foram submetidos aos rolamentos, conforme previamente mencionados.

O número de células aderidas às superfícies dos tubos de prova e que resistiram aos procedimentos de remoção de células 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 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, 0,021 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio, 0,012 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio anidro, 0,01 g.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio e 10 g.L<sup>-1</sup> 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 2). Nas extremidades da haste há um disco de neopreno com 3,25 cm de diâmetro e apresenta quatro orifícios de

3 mm de diâmetro cada, distribuídos um em cada quadrante, uniformemente, para a passagem da solução Ringer. 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. Em seguida, foram submetidos aos movimentos rotatórios novamente.



**Figura 2.** 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).

A partir da rinsagem final com solução Ringer foram realizadas diluições apropriadas em PCA e incubação à 32 °C por 24 h (APHA 2001). Os resultados foram expressos em UFC.cm<sup>-2</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização da produção de nanopartículas de prata

O estudo estatístico, aplicando o DCCR, mostrou-se adequado para avaliação dos parâmetros

que exercem maior influência sobre o processo de otimização de produção de nanopartículas de prata. O rendimento na produção de nanopartículas foi avaliado utilizando as seguintes variáveis independentes: força iônica, pH, surfactante e sulfadiazina de prata (Tabela 3). Através da análise estatística verificou-se que o fator linear “concentração do surfactante” foi o parâmetro que mais influenciou, significativamente, o rendimento das nanopartículas. A interação entre força iônica- $\mu$  e surfactante também foi significativa.

**Tabela 3.** Condições experimentais do delineamento e variáveis de resposta

Ensaio	Trat.	M	pH	Surfactante	Sulfadiazina	conc. final mg/L
1	1	-1	-1	-1	-1	8,0475
2	2	1	-1	-1	-1	12,8875
3	3	-1	1	-1	-1	9,3975
4	4	1	1	-1	-1	11,97
5	5	-1	-1	1	-1	24,7375
6	6	1	-1	1	-1	25,65
7	7	-1	1	1	-1	26,235
8	8	1	1	1	-1	24,775
9	9	-1	-1	-1	1	8,1075
10	10	1	-1	-1	1	13,77
11	11	-1	1	-1	1	10,7275
12	12	1	1	-1	1	18,18
13	13	-1	-1	1	1	28,08

14	14	1	-1	1	1	20,01
15	15	-1	1	1	1	28,245
16	16	1	1	1	1	30,3
17	17	-2	0	0	0	20,04
18	18	2	0	0	0	24,3825
19	19	0	-2	0	0	29,5525
20	20	0	2	0	0	20,445
21	21	0	0	-2	0	15,31
22	22	0	0	2	0	29,98
23	23	0	0	0	-2	21,1575
24	24	0	0	0	2	19,315
25	25	0	0	0	0	19,5475
26	25	0	0	0	0	20,53
27	25	0	0	0	0	20,8175
28	25	0	0	0	0	20,0475

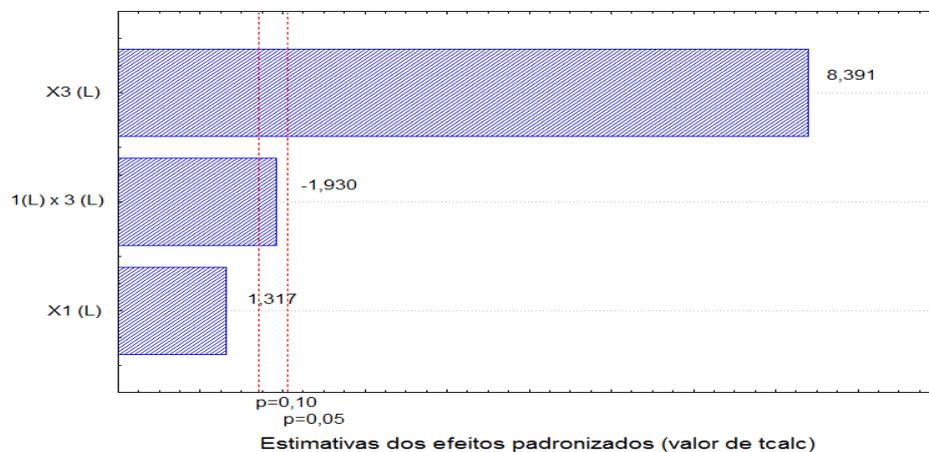
A Tabela 4 apresenta os efeitos da variável resposta, concentração final de nanopartículas de prata, considerando os parâmetros: força iônica -  $\mu$  (X1) e surfactante (X3) e a interação entre eles (X1  $\times$  X3). Observou-se que o efeito foi significativo para a concentração de surfactante usada aplicando nível de significância de 5%. O efeito linear positivo do surfactante indica que o aumento no valor desta variável provoca aumento no rendimento de

nanopartículas de prata. No entanto, quando se analisa o gráfico de Pareto (Figura 3), verifica-se significância a 10% também para a interação dos dois parâmetros avaliados (força iônica -  $\mu$  e surfactante). Portanto, a combinação de parâmetros de força iônica-  $\mu$  e de surfactante apresenta contribuição significativa na concentração final de nanopartículas de prata.

**Tabela 4.** Estimativa para os efeitos da variável resposta concentração final de nanopartículas de prata (mg/L)

Fator	Efeito	Erro Padrão	T (24)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. + 95%
Média	20,080	0,663	30,274	0,000	18,711	21,449
X1 (L)	1,888	1,433	1,317	0,200	-1,070	4,845
X3 (L)	12,024	1,433	8,391	0,000	9,066	14,981
1(L) x 3(L)	-3,386	1,755	-1,930	0,066	-7,008	0,236

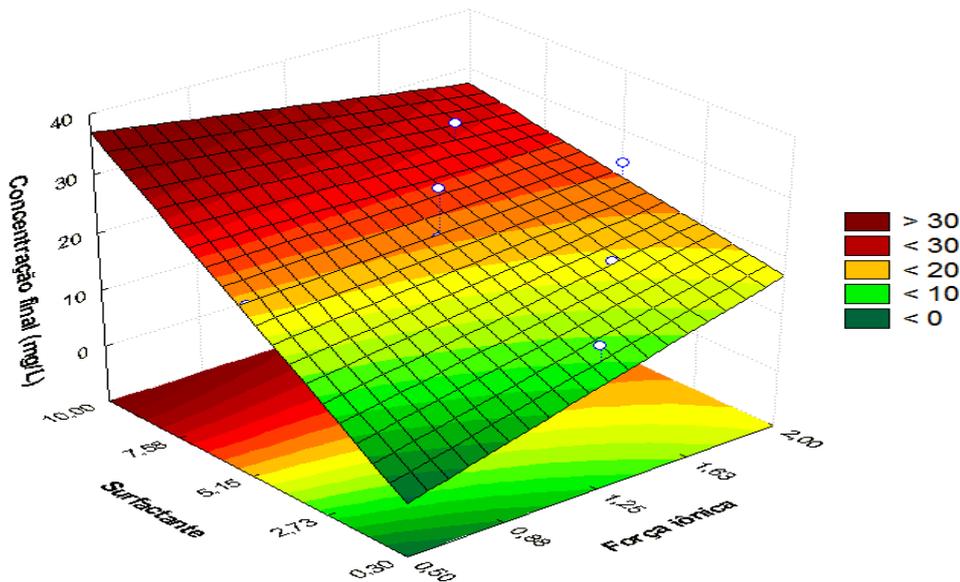
X1 – força iônica ( $\mu$ ) X3 – surfactante



**Figura 3.** Diagrama de Pareto com os valores dos efeitos

A Figura 4 apresenta a relação por meio do gráfico de superfícies de resposta para produção de nanopartículas de prata, em função da concentração de surfactante e da força iônica -  $\mu$ . Nota-se que ao aumentar as concentrações de surfactante e força iônica-  $\mu$ , aumenta-se também o rendimento da produção de nanopartículas de prata. No trabalho de Araújo (2010) também houve esta dependência entre a concentração do surfactante e o aumento na produção de nanopartículas de prata. Empregou-se para a produção de nanopartículas de prata, surfactante em concentração acima da CMC e quantificaram-se as nanopartículas formadas por absorção atômica. De acordo com este trabalho, a presença de micelas do surfactante Dotab foi fundamental na síntese de nanopartículas confirmando uma reação de catálise micelar. Quanto maior a quantidade de micelas presentes, maior a produção de nanopartículas de prata. Já com relação

à força iônica-  $\mu$ , de acordo com a autora, o sal apresenta contribuição relevante apenas na dispersão das nanopartículas de prata dificultando a agregação das mesmas. Percebe-se ainda que, um aumento nos valores da variável força iônica-  $\mu$ , mantendo-se a concentração de surfactante alta, ocorre diminuição no rendimento das partículas de prata. Por outro lado, mantendo-se valores baixos de surfactante o efeito observado foi inverso. Resultados estimados para o rendimento de nanopartículas de prata alcançaram valores ao redor de 38 mg/L, quando utilizada alta concentração de surfactantes (próxima a  $10 \times$  CMC) e baixa força iônica-  $\mu$  (próxima a 0,50 M). No entanto, quando as duas variáveis (concentração de surfactante e força iônica -  $\mu$ ) estão em seus níveis máximos não se observa máxima concentração final de nanopartículas de prata.



**Figura 4.** Superfícies de resposta para produção de nanopartículas de prata em função da concentração de surfactante e da força iônica ( $\mu$ ).

Após análise de regressão das variáveis quantitativas (Tabelas 5 e 6) constatou-se correlação linear entre as duas variáveis, e esta evidência foi dada pelo teste de significância em que o  $F_{\text{calc}} = 25,2911$  foi maior que o  $F_{\text{tab}} = 3,01$ . Desta forma, usou-se um modelo de regressão para as variáveis

codificadas com o objetivo de descrever esta relação descrita na Equação 1. Quanto à qualidade de ajuste do modelo, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 75,97 %. Este valor é aceitável e reflete a variação total da concentração de nanopartículas de prata que é explicada pelo modelo (Equação 1).

**Tabela 5.** Análise de variância para a concentração de nanopartículas de prata

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F calc
Regressão	934,6661	3	311,5554	25,2911
Resíduo	295,6506	24	12,31877	
Total	1230,317	27		

$$F_{\text{tab}}(3, 24) = 3,01$$

**Tabela 6.** Coeficientes de regressão para variável resposta produção de nanopartículas de prata

Média	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	T (24)	p-valor	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. + 95%
Média	20,080	0,663	30,274	0,000	18,945	21,215
X1 (L)	0,944	0,716	1,317	0,200	-0,282	2,169
X3 (L)	6,012	0,716	8,391	0,000	4,786	7,238
1 (L) x 3 (L)	-1,693	0,877	-1,930	0,066	-3,194	-0,192

X1 = Força Iônica ( $\mu$ ); X3 = Surfactante; Equação 1. Modelo da regressão: Nanopartículas de prata (mg/L) = 20,080 + 0,944.X1 + 6,012.X3 - 1,693.X1.X3; R<sup>2</sup> = 75,97 %

### Determinação do raio hidrodinâmico das nanopartículas de prata

O diâmetro médio das nanopartículas de prata foi 3,0 nm para as nanopartículas de prata na concentração de 60 mg/L. O tamanho formado das nanopartículas de prata é importante na ação antimicrobiana, pois quanto menor o tamanho maior a ação antimicrobiana. O aumento na área superficial proporciona melhor contato com as células bacterianas.

### Adesão bacteriana

A Tabela 7 apresenta o número de células aderidas de *S. aureus* e *L. innocua* em superfícies

condicionadas com nanopartículas de prata e hipoclorito de sódio nas concentrações de 60 mg/L e 100 mg/L, respectivamente. Estes resultados estão em acordo com resultados da literatura sobre a termodinâmica de adesão que mostrou que a adesão é desfavorável para as superfícies condicionadas com nanopartículas de prata. Tanto as células vegetativas de *S. aureus* quanto às células de *L. innocua* aderiram em menores quantidades na superfície modificada com nanopartículas de prata. Observou-se redução de quatro ciclos logarítmicos para *S. aureus* quando comparado com o controle (água) e dois ciclos logarítmicos para *L. innocua*.

**Tabela 7.** Log do número de células aderidas (Log UFC/mL) em cupons de aço inoxidável após o condicionamento com antimicrobianos

Cupons condicionados	<i>S.aureus</i>	<i>L.innocua</i>
Água	8,31	8,03
Nanopartículas de Prata	4,09	5,86
Hipoclorito de sódio	6,92	7,87

As nanopartículas de prata modificam a característica de hidrofobicidade da superfície tornando-a hidrofílica. Esta hidrofílicidade associada à característica hidrofílica da superfície celular dificulta termodinamicamente a adesão, pois se torna mais difícil a remoção da camada de água que existe entre as superfícies interatuantes. A eliminação da camada de água é importante para que o contato físico da célula na superfície seja estabelecido e a adesão consolidada.

### Imersão de superfícies de aço inoxidável com bactérias aderidas em dispersões contendo antimicrobianos

Observou-se que a condição mais eficaz para remoção de células aderidas de *P. fluorescens*, ocorreu nas superfícies que foram imersas em nanopartículas de prata (Tabela 8). É preconizado que três reduções decimais (RD) são necessárias para considerar uma solução de sanitizante eficiente para remoção de células aderidas (ANDRADE, 2008). Portanto, o tratamento com nanopartículas de prata apresentou alta eficiência, com capacidade de 4 RD.

**Tabela 8.** Log do número de células sobreviventes de *Pseudomonas fluorescens* após exposição de 30 minutos em diferentes antimicrobianos

Antimicrobianos	Log UFC/mL
Água	7,25
Hipoclorito de sódio 100 mg/L	5,23
Nanopartículas de prata 60 mg/L	3,00

### Remoção de células vegetativas de *B. cereus* aderidas a cilindros de aço inoxidável

O processo de adesão do micro-organismo *B. cereus* e os procedimentos de remoção de células realizados mostraram que a eficiência na remoção depende dos agentes antimicrobianos aplicados (Tabela 9). Observou-se que após toda simulação do procedimento CIP, o número final de células aderidas foi 6,19 log UFC/cm<sup>2</sup>; 5,93 log UFC/cm<sup>2</sup> e 0,40 log UFC/cm<sup>2</sup> para água, hipoclorito de sódio e

nanopartículas de prata, respectivamente. Assim, entre os tratamentos avaliados, as nanopartículas de prata apresentaram maior eficiência na remoção das células de *B. cereus* aderidas ao aço inoxidável. O efeito final proporcionado pelas nanopartículas atende a recomendação da comunidade europeia que preconiza 1 log UFC/cm<sup>2</sup> de mesófilos aeróbios para considerar uma superfície de aço inoxidável que entra em contato com alimento, em boas condições higiênico-sanitárias.

**Tabela 9.** Logaritmo de UFC/cm<sup>2</sup> de células *Bacillus cereus* aderidos em tubos de aço inoxidável após o tratamento com diferentes antimicrobianos

Tratamentos	Log UFC/cm <sup>2</sup>
Água	6,19
Hipoclorito de sódio	5,93
Nanopartículas de prata	0,40

Trabalhos semelhantes foram realizados por Galeano et al. (2003) que avaliaram superfícies de aço inoxidável cobertas com zeólitos contendo 2,5% de íons de prata e 14% de íons de zinco. Estes autores demonstraram redução significativa (3 RD) dentro de 24 h para células vegetativas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*. Já os esporos de *Bacillus* sp. foram completamente resistentes nas mesmas condições.

### CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos sugere-se o uso de nanopartículas de prata como método alternativo aos agentes químicos no procedimento de sanitização.

As nanopartículas apresentaram efeito antimicrobiano destacado na higienização de

superfícies que entram em contato com os alimentos. Este agente antimicrobiano alternativo possui capacidade em alcançar os sítios de colonização microbianos que, muitas vezes, estão em fissuras presentes nas superfícies.

Resultados estimados para o rendimento de nanopartículas de prata alcançaram valores ao redor de 38 mg/L, quando utilizada alta concentração de surfactantes (próxima a 10 ×CMC) e baixa força iônica- μ (próxima a 0,50 M).

### AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

**ABSTRACT:** Sanitizers are used to clean surfaces that come in contact with food in order to eliminate pathogens and reduce spoilage ensuring food safety for consumers. Actually, there is interest in developing new antimicrobial agents, due to the increase in the number of resistant bacteria. In this context, the work aimed to optimize the production of silver nanoparticles obtained by a new synthesis, and assess their antimicrobial ability. We observed that the yield in production of the silver nanoparticles increases as is also increased the concentration of surfactant used in the dispersion, since the reaction produced is characterized in a micellar catalyst. Results obtained during testing of bacterial adhesion showed us that the adherence of *S. aureus* and *L. innocua* was lower when the surfaces were covered with the silver nanoparticles. The nanoparticles were also able to reduce the number of attached bacteria on surfaces of stainless steel. Therefore, the silver nanoparticles obtained by a new synthesis have to be effective antimicrobial agents with the potential use as sanitizing in the food industry.

**KEYWORDS:** Silver nanoparticles. Antimicrobial. Adherence.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 412 p., 2008.

ARAUJO, E. A. **Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopar-tículas de prata obtidas por uma nova síntese**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em ciência e Tecnologia de Alimentos) - Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 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.

Compendium of methods for microbiological examination of foods. 3. ed. Washington: American Public Health Association - APHA, 1992.

FERNANDES, P. E. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

GALEANO, B.; KORFF, E.; NICHOLSON, W. L. Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver and zinc containing zeolite formulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4329-4331, 2003.

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.

MORAES, M. S. V.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; PASSOS, F. J. V.; GOMIDE, L. A. M. . Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n.7, p. 1836-1842, 1997.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; SILVA, C. A. S.; MONTEIRO, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives Biological and Technology**, Curitiba, v. 47, n.1, p.77-83, 2004.

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) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

SONG, H. Y.; KO, K. K.; OH, L. H.; LEE, B. T. Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. **European Cells and Materials**, v. 11, p. 58, 2006.

VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R.; SÁNCHEZ, S. R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 61-66, 2002.