



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MEIRIELE DA SILVA DAS NEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA  
SALMONELLA E DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM  
BIODEGRADÁVEL**

MEIRIELE DA SILVA DAS NEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA  
*SALMONELLA* E DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM  
BIODEGRADÁVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do Título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2019

## Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N518a Neves, Meiriele da Silva das.

Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas contra *Salmonella* e desenvolvimento de embalagem biodegradável / Meiriele da Silva das Neves. – Londrina, 2019.

74 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Patógeno alimentar– Teses. 2. Agentes antimicrobianos – Teses. 3. Nanopartículas de prata – Teses. 4. Embalagem biodegradável – Teses. I. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. II. Título.

CDU: 579

MEIRIELE DA SILVA DAS NEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA  
SALMONELLA E DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM  
BIODEGRADÁVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do Título de Doutor em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato ()  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fabio Yamashita  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Giovana Carolina Bodnar  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Renata K. T. Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de setembro de 2019.

Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu noivo Alan Bittencourt, que me apoiaram durante essa jornada e acreditaram que todo esforço valeria a pena.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar o doutorado, por me dar suporte nos momentos difíceis e por me fazer entender que todas as coisas acontecem com um propósito.

Aos meus pais, Rui Inácio das Neves e Rosangela A. da S. das Neves, que nunca deixaram de me apoiar, orar por mim e demonstrar o quanto eles têm orgulho das minhas escolhas e da minha trajetória. Sempre foram o meu porto seguro e nos momentos difíceis estiveram ao meu lado me consolando e trazendo palavras de conforto. Agradeço também meu irmão Anderson A. da S. das Neves pela torcida, e meu sobrinho Caio Gabriel por todo amor e carinho.

Ao meu noivo, Alan Bittencourt Borrero, pela paciência e persistência durante esses quatro anos. Por acreditar em mim e me dar suporte de todas as formas possíveis para que esse doutorado fosse concluído. Por me dar amor e carinho mesmo nos momentos em que não estávamos próximos fisicamente. E principalmente por ser meu parceiro, enfrentar as dificuldades e desafios junto comigo.

À minha amiga de muitos anos, Thamara Regina Pergentino da Silva, que compartilhou minhas alegrias e me consolou durante as dificuldades. Obrigada por todas as palavras de apoio e carinho, pelos momentos de descontração e risada, foram essenciais durante todo esse processo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, que a muito tempo está presente na minha carreira acadêmica e tem me ajudado a traçar meu caminho profissional. Obrigada pela paciência nas explicações, por todo conhecimento compartilhado e por sempre fazer questão de que o ambiente de trabalho seja leve e divertido.

À Profa. Dra. Renata K. T. Kobayashi, que foi como uma co-orientadora durante todo o projeto, deu ótimos conselhos e sugestões de como prosseguir com os experimentos, e por sempre se preocupar com o bem-estar de todas as pessoas do laboratório. Obrigada por ter me aceitado no laboratório a 11 anos atrás e por ter sido esse exemplo maravilhoso de profissional.

Aos meus amigos e colegas do laboratório NIP 3, por toda a colaboração com o meu projeto, sugestões e ajuda nos experimentos. Por terem me recebido de volta tão bem e por termos compartilhado tantos momentos divertidos.

À minha amiga e colega de laboratório, Sara Scandorieiro, pela paciência em me explicar as técnicas que eu não conhecia, por ter tirado tantas dúvidas sobre os detalhes experimentais, por ter debatido sobre os resultados comigo, e principalmente pelas nossas conversas sobre a vida profissional e pessoal.

Aos meus amigos Erick Nishio, Paula Cyoia e Vanessa Koga, pelas caminhadas, conversas e desabafos sobre as dificuldades da nossa profissão. Nossos momentos de lazer e descontração ajudaram nos dias estressantes e trouxeram um novo animo para continuar.

Aos professores, técnicos e alunos dos outros laboratórios do Departamento de Microbiologia (NIP 5, NIP 9, Laboratório de Bacteriologia, Laboratório de Ecologia Microbiana), que me ajudaram no fornecimento de materiais e aparelhos necessários para realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Fabio Yamashita e sua aluna de doutorado Adriana Passos Dias, pela parceria no desenvolvimento e testes da embalagem biodegradável com nanopartícula de prata incorporada.

Ao prof. Dr. Marcelo Brocchi, que cedeu as amostras de *Salmonella* utilizadas durante o projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de desenvolver esse projeto e trabalhar com tantos profissionais capacitados e dispostos a compartilhar seus conhecimentos.

À Universidade Estadual de Londrina, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Araucária, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, nada seria possível sem a colaboração de vocês.

NEVES, Meiriele da Silva das. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas contra *Salmonella* e desenvolvimento de embalagem biodegradável.** 2019. 74 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Doenças de origem alimentar ainda são uma grande preocupação em nível mundial. Tanto os países desenvolvidos como países subdesenvolvidos sofrem com um alto número de pessoas infectadas e muitos gastos com o tratamento dessas doenças. Um dos maiores responsáveis pela toxinfecção alimentar é a bactéria do gênero *Salmonella*, que tem apresentado cepas multirresistentes aos antibióticos, característica que pode dificultar o tratamento. Compostos naturais, ou sintetizados com o auxílio de microrganismos são uma alternativa ao combate de infecções causadas por bactérias resistentes, como as nanopartículas de prata biogênicas, as quais tem demonstrado uma potente ação antimicrobiana. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antibacteriana de nanopartículas de prata produzidas por *Fusarium oxysporum* (bio-AgNP) contra cepas de bactérias padrão e isolados de *Salmonella*, além de desenvolver uma embalagem biodegradável incorporada com essa nanopartícula e testar sua eficiência. A análise da migração de prata dos filmes contendo bio-AgNP para a carne de frango foi realizada através de espectrofotometria de absorção atômica eletrotérmica, e a carne analisada foi envolta pela embalagem e estocada em geladeira e no freezer. Os resultados demonstraram que a bio-AgNP tem ação contra diferentes sorotipos de *Salmonella*, sendo que a faixa de concentração inibitória mínima foi de 4,24 a 16,98 µg/mL, inclusive para *Salmonella* Saint Paul e *Salmonella* Enteritidis resistentes a múltiplas drogas. As curvas de crescimento e morte mostraram que a bio-AgNP elimina a população bacteriana de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em 1 hora. Os filmes biodegradáveis incorporados com bio-AgNP foram capazes de inibir o crescimento bacteriano na área de contato direto com o microrganismo e apresentaram um pequeno halo de inibição ao redor do filme. A quantificação do número de bactérias inibidas pelo filme incorporado com bio-AgNP, mostrou que este apresenta a capacidade de inibir de  $10^5$  a  $10^6$  UFC de patógenos alimentares. Os resultados da análise da migração da prata para o alimento indicaram a presença de prata na carne de frango estocada com a embalagem contendo bio-AgNP e revelaram uma tendência de maior migração em temperaturas mais altas. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram um alto potencial de utilização da bio-AgNP em filmes biodegradáveis para evitar a contaminação de alimentos, principalmente por manter a migração da prata dentro dos parâmetros estipulados por lei.

**Palavras-chave:** Doenças transmitidas por alimento. *Salmonella*. Nanopartícula de prata. Embalagem biodegradável. Migração da prata.

NEVES, Meiriele da Silva das. **Evaluation of biogenic silver nanoparticles antimicrobial activity of against *Salmonella* and biodegradable packaging development.** 2019. 74 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Foodborne diseases are still a major concern worldwide. Developed and underdeveloped countries suffer with an elevated number of infected people and a high cost of treating these diseases. One of the major responsible for food contamination is the bacterium of the genus *Salmonella*, which has shown multidrug-resistant antibiotics strains, a characteristic that can make treatment difficult. Natural compounds or synthesized with the aid of microorganisms have been an alternative against infections caused by resistant bacteria, and biogenic silver nanoparticles have shown a potent antimicrobial action. Therefore, the aim of this work was to evaluate the antibacterial action of silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* (bio-AgNP) against standard bacteria strains and *Salmonella* isolates, and develop a biodegradable packaging incorporated with this nanoparticle and test its efficiency. Silver migration analysis of films containing bio-AgNP to chicken was performed by electrothermal atomic absorption spectrophotometry, and analyzed meat was wrapped by packaging and stored in the refrigerator and freezer. The results showed bio-AgNP has action against different *Salmonella* serotypes, and the minimum inhibitory concentration range was 4.24 to 16.98 µg/mL, including multi-drug resistant *Salmonella* Saint Paul and *Salmonella* Enteritidis. Time-Kill curves showed that bio-AgNP eliminates the bacterial population of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in 1 h. Biodegradable films incorporated with bio-AgNP were able to inhibit bacterial growth in contact microorganism area and showed a small inhibition halo around the film. Quantification of the number of bacteria inhibited by the bio-AgNP film showed that it has the ability to inhibit  $10^5$  to  $10^6$  CFU of food pathogens. Results of silver migration analysis indicated the presence of silver in poultry stored with bio-AgNP packaging and revealed a tendency for higher migration at higher temperatures. The results obtained in this work showed a potential bio-AgNP use in biodegradable films to avoid food contamination, mainly for keeping the silver migration within the parameters stipulated by law.

**Keywords:** Foodborne diseases. *Salmonella*. Silver nanoparticles. Biodegradable packaging. Silver migration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Mecanismo de ação antibacteriana de nanopartículas de prata .....	21
<b>Figura 2</b> – Várias abordagens para a síntese de nanopartículas de prata .....	22
<b>Figura 3</b> – Mecanismo hipotético da biossíntese de nanopartículas de prata.....	24
<b>Figura 4</b> – Porcentagem da presença dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA que ocorrem no Brasil entre 2009 e 2018 .....	31

### ARTIGO

<b>Figura 1</b> – Size distribution by intensity (%) of bio-AgNP produced by <i>Fusarium oxysporum</i> .....	46
<b>Figura 2</b> – The average zeta potential of bio-AgNP was -36.4 mV.....	47
<b>Figura 3</b> – Transmission electron micrograph of bio-AgNP produced by <i>Fusarium oxysporum</i> .....	47
<b>Figura 4</b> – Time kill curves of bacterial exposed to bio-AgNP .....	49
<b>Figura 5</b> – Antimicrobial activity of bio-AgNP films against bacteria .....	50
<b>Figura 6</b> – Inhibited growth bacteria after contact with bio-AgNP films.....	51
<b>Figura 7</b> – Growth curve of bacterial after contact with biodegradable films .....	52
<b>Figura 8</b> – Quantification of silver migration from bio-AgNP films to chicken meat stored in refrigerator (A) and freezer (B) .....	53

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Aplicação de nanopartículas em embalagens de alimentos.....26

### ARTIGO

Tabela 1 – Values of minimal inhibitory and bactericidal concentrations of bio-AgNP, MIC and MBC respectively.....48

Tabela 2 – The concentration of bacteria (CFU/cm<sup>2</sup>) inhibited by bio-AgNP films.....50

Tabela 3 – Antibiotics resistance of *Salmonella* sp. isolates from poultry farms provided by The University of Campinas .....59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{M}$  - Micromolar

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial

$\text{Ag}^+$  - Íon prata

$\text{Ag}^0$  – Prata metálica

AgNP – Nanopartículas de prata

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

bio-AgNP – Nanopartículas de prata biogênica

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CFU – *Colony Forming Unit*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm – Centímetro

$\text{CO}_2$  - Dióxido de carbono

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration

g - Grama

h – Hora

$\text{H}^+$  - íon hidrogênio

$\text{H}_2\text{O}$  - Água

Kg - Kilograma

log - Logarítimo

M – Molar

MCTIC - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

MDR - *Multi-drug Resistance*

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

mg - Miligrama

MHA - *Mueller-Hinton agar*

MHB - *Mueller-Hinton broth*

MIB – *Minimal Bactericidal Concentration*  
MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*  
min – Minutos  
mL – Mililitro  
mM - Milimolar  
mV – milivolts  
NADP<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (forma oxidada)  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (forma reduzida)  
ng - Nanograma  
NH<sub>2</sub> – Nitrito  
NH<sub>3</sub> – Nitrato  
nm – Nanômetro  
NPs – Nanopartículas  
NTS – *Salmonella* não tifóide  
°C – Graus Celsius  
p<0,05 - Probabilidade menor que 5%  
PBAT – Poly (butylene adipate-co-terephthalate)  
PCL - Policaprolactona  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PLA - Ácido polilático  
rpm – Rotação por minuto  
SGI - *Salmonella Genomic Island*  
SH - Sulfídrico  
TiO<sub>2</sub> - dióxido de titânio  
UEL - Universidade Estadual de Londrina  
UK – *United Kingdom*  
US\$ - Dólares americanos  
USA - *United States of America*  
UV – Ultravioleta  
WHO – *World Health Organization*  
ZnO - óxido de zinco

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	156
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos .....	16
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1	Nanotecnologia.....	17
3.2	Nanopartículas .....	18
3.2.1	Nanopartículas de Prata .....	20
3.3	Embalagens ativas .....	25
3.4	<i>Salmonella</i> sp .....	28
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33
<b>5.</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	43
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos acometem milhares de pessoas ao redor do mundo todos os anos. A contaminação alimentar acarreta grandes gastos econômicos tanto pela perda do produto como pelo tratamento de pessoas infectadas. Um dos patógenos mais importantes e frequentes nas doenças alimentares é a bactéria do gênero *Salmonella*. Essa bactéria apresenta a capacidade de causar desde doenças gastrointestinais até casos graves de salmonelose, como a febre tifoide, que podem levar a morte.

O massivo uso de antimicrobianos na medicina humana e animal, contribuiu para a emergência de diversas espécies bacterianas resistentes a múltiplas drogas, inclusive *Salmonella*. Essas cepas multirresistentes dificultam o tratamento das infecções e por isso pesquisas buscam desenvolver novos antimicrobianos capazes de eliminá-las. As alternativas terapêuticas incluem compostos naturais, principalmente extraídos de plantas, e também substâncias metálicas em tamanho nanométrico.

Uma substância que tem sido bastante estudada e apresenta um grande potencial antimicrobiano é a nanopartícula de prata (AgNP). Essas nanopartículas possuem ação contra vírus, fungos e bactérias, inclusive tem a capacidade de eliminar cepas multirresistentes, sendo uma alternativa no tratamento de infecção causadas por esses microrganismos.

O uso das AgNPs tem sido explorado por diversos setores industriais, incluindo o setor alimentício. Devido a sua capacidade antimicrobiana, as AgNPs têm sido incorporadas em embalagens de alimentos com o objetivo de diminuir o risco de contaminação e aumentar a vida útil do produto. Além da preocupação em manter os alimentos apropriados para o consumo humano, a indústria alimentar tem buscado diminuir o uso de plásticos em sua produção, por isso pesquisas têm sido realizadas para desenvolver embalagens ativas utilizando polímeros biodegradáveis.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a ação antibacteriana das nanopartículas de prata contra o patógeno alimentar *Salmonella*, incluindo cepas multirresistentes, e desenvolver uma embalagem biodegradável incorporada com nanopartícula de prata, com um potencial uso comercial.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo da tese foi avaliar a ação antibacteriana da nanopartícula de prata biogênica (bio-AgNP) frente a cepas padrões e isolados de *Salmonella* sp, e desenvolver uma embalagem biodegradável com bio-AgNP incorporada.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação antimicrobiana da nanopartícula de prata biogênica contra cepas padrões e isolados de *Salmonella*;
- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da bio-AgNP.
- Avaliar o tempo de ação da bio-AgNP em cepas de *Salmonella* padrão.
- Desenvolver uma embalagem biodegradável com bio-AgNP incorporada.
- Analisar a ação antimicrobiana da embalagem e determinar a quantidade de bactéria capaz de ser eliminada.
- Avaliar a ação antimicrobiana da embalagem após exposição à luz ultravioleta e após autoclavagem.
- Determinar a quantidade de prata capaz de migrar da embalagem para a carne de frango.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia envolve a produção e estudo de materiais em escala nanométrica. A manipulação dos produtos em escala atômica e molecular permite realizar mudanças nas propriedades físicas e químicas, potencializando sua funcionalidade e reduzindo a concentração necessária para seu uso. Alterações na cor, combustão, eletrostática, ponto de fusão, entre outras, estão relacionadas com escalas de tamanho, e podem ser realizadas através de procedimentos nano tecnológicos. Nano é uma dimensão muito pequena, sendo que 1 nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo do metro, e geralmente os materiais de importância em nanotecnologia estão entre 1 e 100 nm (ABDI, 2010; RESCH, 2015).

As nanopartículas, produto gerado através da nanotecnologia, estão amplamente distribuídas em produtos presentes no nosso cotidiano. Elas são utilizadas em produtos têxteis, calçados, eletrônicos, cosméticos e na área da saúde são amplamente exploradas nos produtos médicos e farmacêuticos, e em materiais de uso odontológico (KHAN et al, 2017).

A União Europeia (2011) considera que os nanomateriais são constituídos por partículas de diferentes tamanhos e distribuição variada, por isso, seria necessário determinar a distribuição número-tamanho. Assim, a definição de um nanomaterial seria um material natural ou fabricado que contém partículas livres ou na forma de um agregado, e que em distribuição número-tamanho, 50% ou mais das partículas tenham pelo menos uma dimensão externa na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm.

As nanoestruturas podem ser produzidas de duas formas: “de cima para baixo” (*top-down*) e “de baixo para cima” (*botton-up*). No *top-down* são utilizadas partes maiores no sistema, e essas partes são estruturadas em padrões definidos menores, sendo necessário o uso de maquinaria capaz de reproduzir os padrões, como é o caso da confecção de chips. O *botton-up* baseia-se no comportamento quântico intramolecular, de partes atômicas e/ou moleculares especificamente desenhadas e sintetizadas. Neste processo

aproveita-se da auto-organização, onde inicia-se com um “bloco de construção” e o sistema avança na direção de sua condição de maior estabilidade. De maneira geral, os processos *top-down* são realizados em sistemas secos, enquanto que os *botton-up* são realizados em meio aquoso ou solvente orgânico (ABDI, 2010; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que consegue estar presente em diferentes áreas como física, química, materiais, informática, biologia e outras, e tem contribuído para o desenvolvimento de novos produtos. Percebendo a importância dessa ciência, vários setores buscaram se adequar a esse novo mercado e começaram a investir em desenvolvimento e lançamento de produtos obtidos com auxílio da nanotecnologia, e essa mudança causou um impacto econômico. De acordo o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), estima-se que quase 13 mil empresas de 56 países utilizam nanotecnologia, movimentando cerca de US\$ 3 trilhões anuais, valor que deve aumentar para US\$ 5 trilhões até 2020. O Brasil tem participado dessa revolução dentro da indústria com a abertura de empresas especializadas, que juntas apresentaram um faturamento que ultrapassa os R\$ 175 milhões, com um crescimento de 27% ao ano (ABDI, 2018).

### **3.2 Nanopartículas**

As nanopartículas apresentam diferentes formas e tamanhos, e podem apresentar as mais variadas composições, como metais, lipídios, proteínas, cerâmicas, polímeros e outros. Essas propriedades são importantes para definir onde essas NPs podem ser aplicadas. Um exemplo da importância das suas características na aplicação são as nanopartículas utilizadas na liberação controlada de fármacos, onde os princípios ativos estão incorporados de formas diferentes. Elas podem se estruturar de duas maneiras, em nanoesferas ou nanocápsulas. Nas nanoesferas as moléculas são associadas covalentemente ou por interações estáveis com a nanopartícula e nas nanocápsulas, o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica (MOHANRAJ; CHEN, 2006; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012).

As nanopartículas cerâmicas apresentam várias aplicações devido a importantes características como resistência a alta temperatura e inércia química. Ela tem sido muito explorada na área biomédica por apresentar um bom resultado como carreadoras de fármacos, genes e proteínas. Essa função tem sido utilizada no tratamento de doenças como glaucomas, infecções bacterianas e câncer (THOMAS et al., 2015).

As nanopartículas poliméricas são produzidas utilizando polímeros naturais ou sintéticos, e também são utilizadas como veículos para liberação controlada de fármacos. Os polímeros naturais apresentam um nível baixo de toxicidade enquanto que os polímeros sintéticos apresentam uma resistência mecânica maior, que reduz sua taxa de degradação. As nanopartículas poliméricas têm sido aplicadas em diferentes áreas por elevar a eficácia terapêutica dos medicamentos e reduzir os efeitos adversos. A liberação do fármaco pode ser influenciada pelo ambiente, e pode ocorrer de forma constante ou cíclica, sendo que essa liberação ocorre através da difusão, osmose ou erosão do polímero (SHAIK; KORSAPATI; PANATI, 2012; MANSOOR et al., 2019).

Os lipídios também podem se comportar como nanopartículas, pois apresentam a capacidade de se automontar em nanofilmes ou nanoestruturas, como micelas e lipossomas. Essas nanopartículas são caracteristicamente esféricas e possuem um núcleo sólido feito de lipídios e uma matriz que contém moléculas lipofílicas solúveis. Para estabilizar seu núcleo externo são utilizados surfactantes ou emulsionantes. Sua utilização pode ser como carreadores de moléculas, e tem um papel promissor no carreamento de RNA de interferência, utilizado principalmente no tratamento de câncer (MASHAGHI et al., 2013; GUJRATI et al., 2014; KHAN et al., 2017).

As nanopartículas metálicas e semicondutoras também apresentam uma aplicação bastante explorado pela indústria. Diferentes elementos metálicos podem ser utilizados na produção das nanopartículas, sendo que alguns metais, como a prata e ouro, são mais estudados em comparação com outros. Estudos com nanopartículas de ferro têm aumentado, devido ao seu superparamagnetismo, baixa toxicidade e simples metodologia de separação. Essas características possibilitam o uso dessa nanopartícula em imobilização de proteínas, terapia térmica e diagnóstico através de imagem por ressonância

magnética (ALI et al., 2016). Além da área médica, a indústria de cosméticos e dermatologia também apresenta produtos com nanopartículas implementadas. NPs de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (ZnO) tem capacidade de bloquear os raios ultravioletas, UVA e UVB, protegendo a pele de danos causados pelos raios UV (HERMAN; HERMAN, 2014).

Além das diversas propriedades e diferentes possibilidades de uso das nanopartículas metálicas, elas apresentam um grande potencial antimicrobiano devido a sua extensa área superficial, onde há uma alta quantidade de átomos, que permite uma melhor interação com o microrganismo (HERMAN; HERMAN, 2014; DURAN et al., 2016a).

### **3.2.1 Nanopartículas de Prata**

O efeito antimicrobiano da prata tem sido bastante explorado nas últimas décadas, mas seu uso na medicina começou por volta do século XVIII, quando o nitrato de prata era usado no tratamento de úlceras. Com a descoberta da penicilina e início da era dos antibióticos, o uso da prata diminuiu. No entanto, o aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos comerciais, e o contínuo avanço da nanotecnologia, contribuíram para que a prata voltasse a ser utilizada em tratamentos médicos (CHOPRA, 2007).

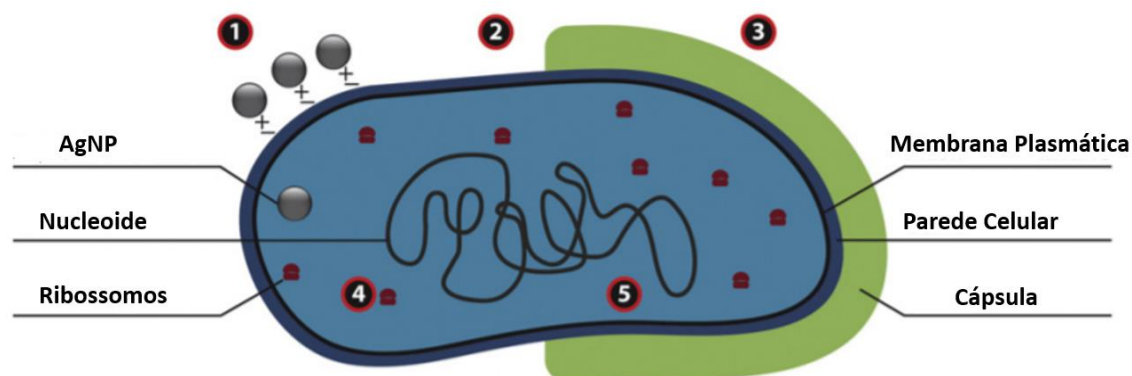
Pesquisas na área da nanotecnologia fizeram o uso da prata em escala nanométrica se difundir para diferentes setores, e seu efeito antimicrobiano, mesmo em baixa concentração, aumentasse sua utilização em produtos do cotidiano. É possível encontrar diversos itens de uso regular que contenham nanopartículas de prata, como em produtos têxteis, cosméticos, tintas, curativos, cateteres, equipamentos odontológicos, mamadeiras, embalagens de comida, e outros (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013; HE; HWANG, 2016; CHOI et al., 2018; QING et al., 2018).

As nanopartículas de prata apresentam ação antimicrobiana, com a capacidade de eliminar bactérias, fungos e vírus (LARA et al., 2010; LONGHI et al., 2016; SINSINWAR et al., 2018; BOCATE et al., 2019). Seu uso como antibacteriano é muito explorado, uma vez que tem ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, inclusive em cepas multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina e *Staphylococcus epidermidis*

resistentes à metilicina podendo ser uma alternativa no tratamento de infecções causadas por essas bactérias (CARDOZO et al., 2013; ANSARI et al., 2015; SCANDORIEIRO et al., 2016).

O mecanismo de ação das nanopartículas de prata ainda não foi totalmente elucidado, mas os estudos mostram que elas apresentam mais de um alvo de ação (Figura 1). Dois importantes passos para a ação das nanopartículas de prata é contato delas com a célula e a liberação dos íons de prata, que podem interagir com outras estruturas celulares (LOK et al., 2007; BONDARENKO et al., 2013). Estudos apontam que as mesmas interagem com o DNA, induzem a formação de radicais livres, danificam proteínas e enzimas contendo enxofre, e desestabilizam a membrana celular, afetando sua permeabilidade, e alterando o funcionamento da cadeia respiratória (KIM, 2007; XU, 2012; VISHNUPRIYA, 2013; YUAN, 2013; DURAN, 2016a).

Os múltiplos alvos de ação da nanopartícula de prata podem explicar a sua rápida ação contra bactérias, principalmente na fase de crescimento exponencial onde o microrganismo apresenta uma elevada taxa metabólica (SCANDORIEIRO et al., 2016; LOO et al., 2018).

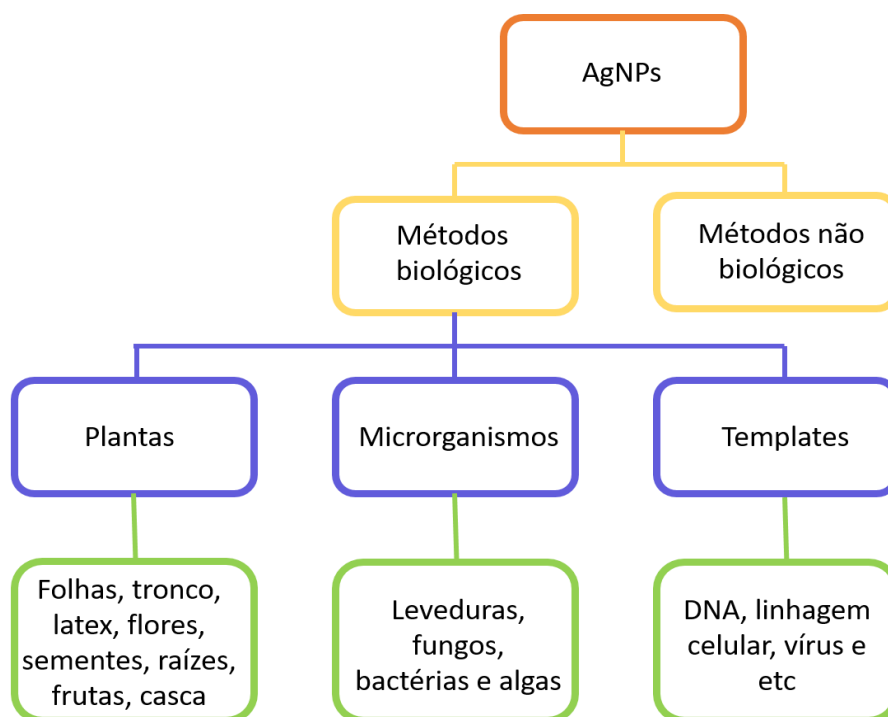


**Figura 1** – Mecanismo de ação antibacteriano de nanopartículas de prata. 1 – Atracção eletrostática; 2 – Produção de radicais livres; 3 – Modulação no perfil de fosfotirosina da proteína; 4 – Interação com grupos SH; 5 – Interação com o DNA.

Fonte: adaptado de Duran et al. (2016).

As propriedades físico-químicas das nanopartículas influenciam sua ação. O formato e principalmente o tamanho delas têm um grande impacto na quantidade necessária para eliminar um microrganismo, uma vez que a atividade antimicrobiana aumenta quando o tamanho diminui, porque a área de contato com a célula é maior em partículas menores (AGNIHOTRI; SOUMYO; SUPARNA, 2014; ZHANG et al., 2016).

As nanopartículas de prata podem ser sintetizadas através de processos físicos, químicos e biológicos (Figura 2). Normalmente o nitrato de prata é utilizado como precursor, e agentes redutores são adicionados para que ocorra a síntese das nanopartículas. Como os processos químicos e físicos são mais caros e geram poluentes para o meio ambiente, a síntese biológica, utilizando bactérias, fungos e plantas, tem sido bastante estudada e aprimorada (DURAN et al., 2011; SIDDIQI et al., 2018). Esse tipo de síntese é conhecido como “síntese verde”, uma vez que causa menos danos ao meio ambiente.



**Figura 2** – Várias abordagens para a síntese de nanopartículas de prata. Exemplos dos diferentes meios de se produzir nanopartículas dentro do processo de síntese biológica.

Fonte: adaptado de Ahmad et al., 2019.

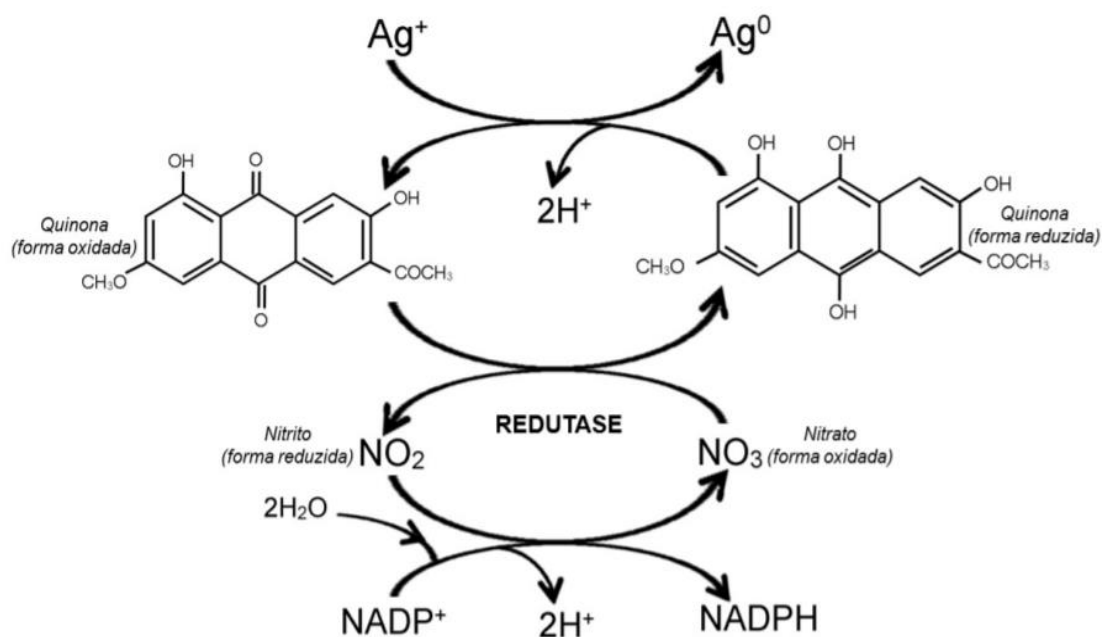
Extratos de plantas são muito utilizados na síntese de nanopartículas porque os fitoquímicos apresentam uma boa redução e estabilização. Como observado no diagrama sobre síntese biológica, diferentes partes da planta podem ser utilizados e estudados na produção de nanopartículas. O extrato de folhas de pimenta atuou reduzindo e como agente estabilizador na produção de nanopartículas de prata de 5 - 60 nm (MALLIKARJUNA et al, 2014). Extratos de frutas, como de *Nitraria schoberi* e *Adansonia digitata*, atuaram como agentes redutores na síntese das nanopartículas (RAD et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

O uso de bactérias na produção de nanopartículas é bastante promissor, uma vez que tais microrganismos apresentam um rápido crescimento e alto metabolismo, além da facilidade em realizar manipulação gênica, permitindo ajustes e melhorias no processo de síntese. Diferentes espécies bacterianas podem ser utilizadas na produção de nanopartículas, *Rhodococcus* foi utilizada na síntese intracelular de nanopartículas, enquanto *Bacillus subtilis* realizou a biossíntese de nanopartículas extracelularmente (KANNAN; SUBBALAXMI, 2011; OTARI et al., 2015).

As algas também podem ser utilizadas como agentes redutores na síntese de nanopartículas de prata. Tanto as algas microscópicas (picoplankton) como as macroscópicas (Rhodophyta) podem participar desse processo. *Gelidium amansii* e *Chaetomorpha linum* são exemplos de macroalgas utilizadas na síntese de nanopartículas de prata, e *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis gracilis* são algumas microalgas usadas na biossíntese de NPs (MERIN et al., 2010; KANNAN et al., 2013; PUGAZHENDHI et al., 2018).

Outra alternativa para a síntese verde de nanopartículas é o uso de fungos, eles apresentam melhor tolerância a bioacumulação de metais além de uma econômica produção em larga escala. Diversos fungos apresentam a capacidade de atuarem como agentes redutores no processo de biossíntese de nanopartículas. *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum* são alguns exemplos de fungos usados nesse processo (BHAINSA; D'SOUZA, 2006; BANU; RATHOD; RANGANATH, 2011). Durán et al. (2005) padronizaram o método de biossíntese de nanopartículas de prata utilizando o fungo *F. oxysporum*, e sugeriram que a redução dos íons metálicos de nitrato

de prata ocorre por ação da nitrato redutase e quinona transportadora de elétrons (Figura 3).



**Figura 3** – Mecanismo hipotético da biossíntese de nanopartículas de prata. A presença de antraquinona foi detectada através de cromatografia de camada delgada e espectro de fluorescência e através da reação do nitrito com reagente 2,3 diaminonaftaleno foi detectada a presença de nitrato redutase. Esses dados sugerem que a redução de íons de prata e síntese das nanopartículas ocorrem como resultado da ação conjunta da enzima nitrato redutase e quinona transportadora de elétrons.

Fonte: Duran et al. (2005).

Estudos recentes têm utilizado o DNA como agente redutor na síntese de nanopartículas. A forte afinidade das bases do DNA com a prata faz com que ele seja também um agente estabilizador. (NITHYAJA; MISHA; NAMPOOR, 2012; KASYANENKO et al., 2016).

### 3.3 Embalagens ativas

A nanotecnologia contribuiu na expansão do uso de nanopartículas em diferentes mercados. A indústria alimentícia não ficou fora dessa revolução, e desenvolveu produtos utilizando as nanopartículas, com o objetivo de aumentar a vida útil de alimentos, ou evitar a contaminação por microrganismos (HE; HWANG, 2016; BAJPAI et al., 2018; CHOI et al., 2018).

Embarcar os alimentos é um importante passo para a preservação dos produtos, mas nenhuma embalagem tem a capacidade de impedir totalmente o contato de substâncias naturais, gases atmosféricos e vapores de água com o alimento (FINNIGAN, 2009). No entanto, em embalagens de frutas e hortaliças frescas, o completo bloqueio da migração e permeabilidade dos gases não é desejável. Em contraste, a embalagem de bebidas deve eliminar o fluxo de oxigênio e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), para evitar oxidação e descarbonatação (ROBERTSON, 2006). Sendo assim, o emprego de nanocompostos na produção de embalagens pode contribuir para a resolução dessas complexidades (BAJPAI et al., 2018).

O desenvolvimento de embalagens ativas tem sido amplamente estudado, uma vez que a Organização Mundial da Saúde relata que uma em cada dez pessoas no mundo apresenta uma doença de origem alimentar, com 33 milhões de mortes decorrentes dessas doenças (WHO, 2018a). Diversos tipos de nanopartículas são aplicadas nas embalagens alimentares, com o objetivo de liberar compostos antioxidantes ou antimicrobianos (Tabela 1). Os antimicrobianos diminuem o risco de contaminação alimentar, e muitas vezes, também melhoram a estabilidade do alimento, através da remoção do oxigênio e vapores de água (DASGUPTA et al., 2015).

Com o objetivo de melhorar a efetividade e a funcionalidade das embalagens, substâncias bioativas são incorporadas nessas embalagens. Elas podem apresentar diferentes funcionalidades, como antioxidantes, antimicrobianas, absorvedoras de umidade e outras. Algumas dessas substâncias necessitam passar por um processo de microencapsulação para poder resistir ao processo de produção de embalagens, que normalmente envolve alta temperatura. A microencapsulação pode ser realizada através de

diferentes métodos como, emulsificação, coacervação, spray-drying e outras (SILVA et al., 2014).

Tabela 1 – Aplicação de nanopartículas em embalagens de alimentos.

Fonte: adaptado de BAJPAI et al., 2018.

<b>Tipos de Nano partículas</b>	<b>Matrix</b>	<b>Aplicação</b>
Prata	Aspargo, suco de laranja, carne de frango, melão fresco, carne bovina	Retarda o crescimento de psicotróficos aeróbicos, leveduras e bolores; efeito antimicrobiano contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>
Oxido de zinco	Suco de laranja, albumina de ovo líquida	Reduz efetivamente <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Salmonella</i> , leveduras e mofo sem mudanças nos parâmetros de qualidade
Oxido de titânio	Jujuba chinesa, morango	Reduz o escurecimento, amadurecimento lento, senescência e decadência
Oxido de prata	Pedaços de maçã	Retarda a deterioração microbiana

Um das substâncias bioativas bastante exploradas na produção das embalagens, são os óleos naturais e extratos de plantas, como óleo de orégano e menta, extrato de chá verde, extrato de erva-cidreira e outros. Os benefícios das plantas são conhecidos a milênios, e as pesquisas mostraram que eles atuam muito bem como antimicrobianos e antioxidantes, quando inseridos nas embalagens (BAKRY et al., 2015; MURIEL-GALET et al., 2015).

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata já é bastante estudada, e elas têm sido umas das substâncias incorporadas nas embalagens, com a finalidade de eliminar patógenos alimentares, e aumentar a vida útil dos alimentos (NAKAZATO et al., 2016). Vários trabalhos já relataram sua atividade contra fungos, bactérias e vírus, então ela apresenta uma abrangência interessante para ser utilizada comercialmente (OZAKI et al., 2016; WYRWA; BARSKA, 2017; SINSINWAR et al., 2018). Um ponto importante a ser analisado no processo de incorporação de nanopartículas ou outras substâncias bioativas, é como isso afeta as propriedades físicas da embalagem. As substâncias incorporadas não devem causar grandes alterações na matriz polimérica, para que seu uso não seja inviabilizado (MARTINEZ-ABAD; LAGARON; OCIO, 2012; ARFAT et al., 2017; OLIANI et al., 2017).

As autoridades reguladoras de produtos, como FDA (Food and Drug Administration) e a Direção Europeia da Saúde e Defesa do Consumidor, discutem e divulgam diversas diretrizes sobre o uso de nanopartículas e bioativos em embalagens de alimento, com o objetivo de prevenir os potenciais riscos a saúde humana causados por essas substâncias (BAJPAI et al., 2018). Essas diretrizes são importantes, uma vez que a toxicidade de vários compostos utilizados ainda não é totalmente esclarecida. A Direção Europeia da Saúde determina que o limite de migração de substâncias ativas presentes em materiais plásticos para o alimento é de 60mg (substância)/kg (alimento ou simulador de alimento) (EN1186-1, 2002, Regulation Nº 10/2011).

Além da preocupação com o desenvolvimento de embalagens ativas, muitas pesquisas têm buscado substituir o uso dos plásticos tradicionais por polímeros biodegradáveis. O uso massivo de plásticos e a poluição do meio ambiente causada pelos mesmos tem impulsionado a busca de um polímero biodegradável, que ao ser usado na fabricação de embalagens, mantenha as características físicas no devido padrão para ser utilizado comercialmente. Polímeros naturais como amido, celulose, lignina e outros podem ser utilizados na fabricação de embalagens. Apesar de serem uma ótima alternativa, devido ao seu baixo custo, abundância e causar menos impacto ambiental, suas propriedades físicas não são tão desejáveis em comparação com os polímeros sintéticos (MEDEIROS et al., 2019). Para suprir essa deficiência, estudos

utilizam esses polímeros naturais com outros polímeros biodegradáveis, como ácido polilático (PLA), poli (adipato-co-teriftalato de butilino) (PBAT), policaprolactona (PCL) e outros (MULLER; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; AMPARO CHIRALT, 2017). Essas combinações melhoram as propriedades físicas das embalagens e são boas opções para a produção de embalagens bioativas.

### 3.4 *Salmonella* sp

As bactérias do gênero *Salmonella* apresentam formato bacilar, são Gram-negativas, anaeróbias facultativas, geralmente flageladas e intracelular facultativa (WHITMAN, 2012). Esse gênero pertence à família Enterobacteriaceae, e atualmente consiste em apenas duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. *S. enterica* subdivide-se em seis subespécies ou grupos, e na subespécie I encontram-se a maioria das sorovariedades patogênicas para o homem, pois abrange as bactérias que infectam animais de sangue quente, enquanto as outras podem infectar somente animais de sangue frio (GARAI et al., 2012; POPOFF et al., 2004).

A detecção dos antígenos flagelares (H), somáticos (O) e capsulares (Vi) é utilizada para realizar a classificação sorológica de *Salmonella* (SHI et al., 2013). De acordo com o sistema de classificação Kauffman-White, atualmente há mais de 2500 sorovariedades de *S. enterica* (TANG et al., 2019). A febre tifoide, forma mais grave de salmonelose em humanos, é causada por bactérias dos sorovares Typhi e Paratyphi de *S. enterica*. Outros sorovares, como Typhimurium e Enteritidis, causam gastroenterites localizadas na mucosa intestinal até infecções sistêmicas graves, sendo que o grau de morbidade é determinado pelo estado nutricional e imunológico do paciente e da sorovariedade bacteriana (ANDREWS-POLYMENIS et al., 2010; GARAI et al., 2012).

A infecção por *S. enterica* normalmente ocorre por via oral, iniciando com a ingestão de água ou alimentos contaminados. A salmonelose ocorre após a ingestão de  $>5 \times 10^4$  bactérias em um produto contaminado. O processo infeccioso ocorre no intestino e se manifesta dentro de 12 -72 horas após a contaminação. Normalmente os sintomas são diarreia, vômito e dores abdominais (KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017; CDC, 2019).

*S. enterica* apresenta a capacidade de resistir ao pH ácido do estômago e aos sais biliares intestinais, propriedades indispensáveis para um patógeno que tem como rota de infecção a via oral e entram em contato com esses ambientes. O mecanismo de ácido-tolerância é o que possibilita a sobrevivência destas bactérias no estômago, para manter o pH intracelular em valores mais elevados do que o ambiente extracelular, ele induz uma função de regulação da homeostase do pH (GARCIA DEL PORTILLO et al., 1993; FABREGA; VILA, 2013). Para sobreviver aos sais biliares, quando a bactéria entra nesse ambiente ocorre a indução do sistema SOS, responsável por reparar os danos no DNA causados pelos sais (ÁLVAREZ-ORDÓÑES et al., 2011).

Como as bactérias do gênero *Salmonella* são microrganismos intracelulares facultativos, elas aderem e invadem as células da mucosa intestinal, principalmente as células M. A invasão das células M permite que as bactérias infectem células epiteliais adjacentes através de sua superfície basolateral. *S. enterica* expressa uma série de tipos diferentes de fímbrias e são essas estruturas que auxiliam na adesão inicial as células ou a matriz extracelular, mediando a colonização do trato intestinal e participando no processo de invasão tecidual (FIGUEROA-OCHOA; VERDUGO-RODRIGUEZ, 2005; WAGNER; HENSEL, 2011).

*S. enterica* tem a capacidade de causar intensa inflamação na mucosa intestinal, após passar pelo epitélio do intestino, os macrófagos da submucosa detectam e internalizam a bactéria para eliminá-la do hospedeiro (SANO et al., 2007). Mesmo com a ação do sistema imunológico parte das bactérias conseguem sobreviver ativando mecanismos de virulência que permitem a evasão da atividade microbicida das células fagocíticas e replicação no interior do vacúolo (ALPUCHE-ARANDA et al., 1994). Após se replicar no vacúolo, a bactéria ativa uma protease que induz a apoptose dos macrófagos infectados, possibilitando a infecção de novas células. As bactérias podem colonizar os órgãos e alcançar a circulação sanguínea através da circulação linfática.

*S. enterica* desenvolveu um mecanismo para escapar do sistema imune e utilizar produtos gerados no processo inflamatório para seu benefício. Essas bactérias utilizam o tetrionato, formado após a reação dos radicais reativos de oxigênio, gerados para eliminá-las, com o tiosulfato, como acceptor final de

elétrons na cadeia respiratória. Essa etapa é um fator essencial no processo infeccioso, pois garante a bactéria uma vantagem adaptativa frente à microbiota (WINTER et al., 2010; THIENNIMITR et al., 2012).

*Salmonella* é um dos patógenos de origem alimentar mais prevalentes, e infecções causadas por essa bactéria podem estar relacionadas a praticamente todos os tipos de alimentos, devido a capacidade de crescimento em temperaturas que variam de 7 a 45°C (MASTROENI; MASKELL, 2006). As fontes mais comuns de infecção são água e alimentos contaminados, principalmente os derivados de aves domésticas, de carne suína ou bovina e plantas (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2011; RUBY et al., 2012;).

Algumas sorovariedades são melhores adaptadas a hospedeiros específicos, por exemplo, os principais agentes etiológicos responsáveis por septicemia em suínos e bovinos são, respectivamente, *S. enterica* Choleraesuis e *S. enterica* Dublin, mas mesmo assim também podem causar infecções e diarreia no homem (MASTROENI; MASKELL, 2006; ANDREWS-POLYMENIS et al., 2010). Os sorovares Enteritidis e Typhimurium não são adaptados a um hospedeiro específico e por isso são os dois sorotipos mais frequentes na transmissão de *Salmonella* entre animais e humanos na maioria dos países (WHO, 2018a).

A contaminação por *Salmonella* em granjas de porcos, bois e aves são caracterizadas por dois problemas: a presença de sorovares patogênicos adaptados ao animal, que provocam gastroenterites e septicemias e levam a uma alta perda econômica, e a presença de sorovares que não causam doença nos animais, mas são as principais fontes de contaminação do alimento e que podem infectar seres humanos.

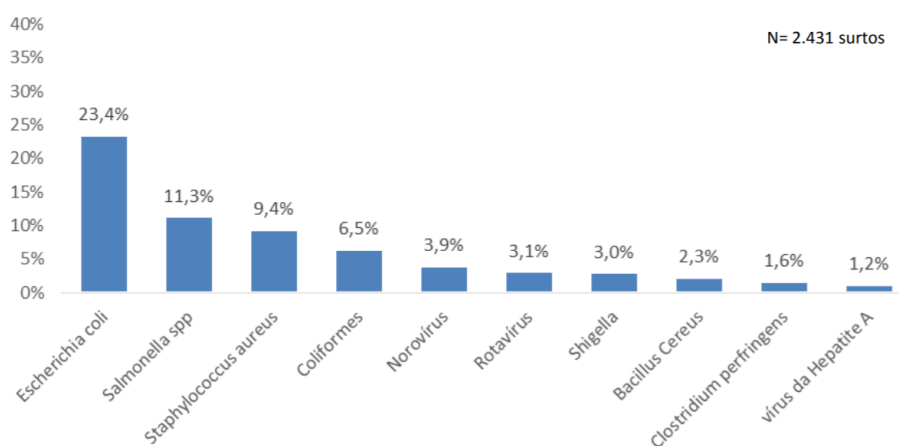
As sorovariedades Typhi e Paratyphi são restritos aos seres humanos e causam a febre tifóide, doença de grande preocupação para a saúde mundial, uma vez que é endêmica em regiões do mundo onde a qualidade da água potável e o tratamento de esgoto são precários (GUZMAN et al., 2006; RUBY et al., 2012).

A Organização Mundial de Saúde estima a ocorrência de 11 a 20 milhões de casos de febre tifóide no mundo, com 128 a 161 mil fatalidades anuais (WHO, 2018b). Além disso, sorovares não tifóides de *Salmonella* (NTS) são um dos quatro maiores causadores de doenças diarreicas causadas por

contaminação alimentar (WHO, 2018a). O CDC (2019) estima que *Salmonella* causa aproximadamente 1,2 milhão de infecções, 23 mil hospitalizações e 450 mortes nos Estados Unidos anualmente, além de causar elevados gastos médicos. No Brasil, de 2009 a 2018, ocorreram 2431 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), sendo que *Salmonella* esteve presente em 11,3% dos casos no qual o agente etiológico foi identificado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019) (Figura 4).

A salmonelose ainda apresenta alta incidência e devido a sua gravidade é um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial, tornando-se alvo de campanhas mundiais para que os alimentos sejam cultivados, transportados e manipulados de forma com que o risco de contaminação seja menor. O tratamento dessas infecções foi dificultado devido à emergência de isolados multirresistentes a drogas (MDR) (MONACK, 2012; KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017). Estudos associaram a multirresistência com a presença de uma ilha genômica denominada SGI 1 (“*Salmonella Genomic Island*”), que apresenta os genes que conferem a bactéria resistência a antibióticos de primeira geração, mas algumas variantes carregam genes que codificam resistência a importantes antibióticos clínicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração (MULVEY et al., 2006; KISS et al., 2012; CUMMINS et al., 2019).

Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA<sup>2</sup>  
Brasil, 2009 a 2018\*.



<sup>2</sup> Surtos de DTA encerrados por critério laboratorial

**Figura 4** – Porcentagem da presença dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA que ocorrem no Brasil entre 2009 e 2018.

\* Dados preliminares, sujeitos à alteração.

Fonte: Sinan/SVS/Ministério da Saúde

A preocupação com as doenças causadas por contaminação alimentar e a necessidade de diminuição do uso de plásticos na indústria alimentícia impulsionou as pesquisas em busca de uma embalagem ativa biodegradável. Portanto, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma embalagem biodegradável incorporada com nanopartículas de prata biogênicas, com uma efetiva ação antimicrobiana.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília: MDCI; Campinas: UNICAMP. 2010.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). 2018. Disponível em: <https://www.abdi.com.br/postagem/nano-um-mercado-de-macrooportunidades>. Acesso em: 18 Ago 2019.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

ALI, M. *et al.* Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract--A comprehensive study. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 58, p. 359–65, 2016.

ALPUCHE-ARANDA, C. M. *et al.* Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 2, p. 601–608, 1994.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. **Microbiology**, v. 157, p. 3268-81, 2011.

ANDREWS-POLYMENIS, H. L. *et al.* Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 2356-69, 2010.

ANSARI, M. A. *et al.* Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 101–9, 2015.

ARFAT, Y. A. *et al.* Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 191–202, 2017.

BAJPAL, V. K. *et al.* Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n.4, p. 1201-1214, 2018.

BAKRY, A. M. *et al.* Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016.

BANU, A.; RATHOD, V.; RANGANATH, E. Silver nanoparticle production by *Rhizopus stolonifer* and its antibacterial activity against extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing (ESBL) strains of Enterobacteriaceae. **Materials Research Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1417–1423, 2011.

BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 160–4, 2006.

BOCATE, K. P. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 79–86, 2019.

BONDARENKO, O. *et al.* Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

CARDOZO, V. F. *et al.* Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Salmonella. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>. Acesso em: 30 Jul. 2019.

CHOI, J. I. *et al.* Potential silver nanoparticles migration from commercially available polymeric baby products into food simulants. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 35, n. 5, p. 996–1005, 2018.

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, n. 4, p. 587–590, 2007.

CUMMINS, M. L. *et al.* Salmonella Genomic Island 1B Variant Found in a Sequence Type 117 Avian Pathogenic Escherichia coli Isolate. **mSphere**, v. 4, n. 3, 2019.

DASGUPTA, N. *et al.* Nanotechnology in agro-food: From field to plate. **Food Research International**. 2015.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609-1624, 2011.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, 2005.

DURÁN, N. *et al.* Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2016.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 16–22, 2013.

EN-1186-1. Materials and Articles in Contact with Foodstuffs. Plastics. In: Part 1 Guide to the Selection of Conditions and Test Methods for Overall Migration. 2002.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 308–41, 2013.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32–53, 2012.

FIGUEROA OCHOA, I. M.; VERDUGO RODRIGUEZ, A. Molecular mechanism for pathogenicity of *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 47, p. 25–42, 2005.

FINNIGAN B. Barrier polymers. The wiley encyclopedia of packaging technology. New York: John Wiley and Sons Inc, 2009.

GARAI, P; GNANADHAS, D. P.; CHAKRAVORTTY, D. *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. **Virulence**, 2012.

GARCIA-DEL PORTILLO, F. *et al.* *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 22, p. 10544–8, 1993.

GUJRATI, M. *et al.* Multifunctional cationic lipid-based nanoparticles facilitate endosomal escape and reduction-triggered cytosolic siRNA release. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, p. 2734–2744, 2014.

GUZMAN, C. A. *et al.* Vaccines against typhoid fever. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3804–11, 2006.

HE, X.; HWANG, H. M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.24 n. 4, p. 671-681, 2016.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 946–57, 2014.

KANNAN, N.; SUBBALAXMI, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Bacillus subtilis* IA751 and its Antimicrobial Activity. **Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 1, n. 2, p. 87–94, 1 fev. 2011.

KANNAN, R. R. R. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga *Chaetomorpha linum*. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 3, n. 3, p. 229–233, 2013.

KASYANENKO, N. *et al.* DNA Modified with Metal Nanoparticles: Preparation and Characterization of Ordered Metal-DNA Nanostructures in a Solution and on a Substrate. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.

KHAN, IBRAHIM; SAEED, K.; KHAN, IDREES. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**. 2017.

KIM, J. S. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KISS, J.; NAGY, B.; OLASZ, F. Stability, entrapment and variant formation of salmonella genomic island 1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

KUMAR, C. M. K.; YUGANDHAR, P.; SAVITHRAMMA, N. Biological synthesis of silver nanoparticles from *Adansonia digitata* L. fruit pulp extract, characterization, and its antimicrobial properties. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 79–85, 2016.

KURTZ, J. R.; GOGGINS, J. A.; MCLACHLAN, J. B. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology Letters**, v. 190, p. 42–50, 2017.

LARA, H. H. *et al.* Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 8, 2010.

LOK, C. N. *et al.* Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527–534, 2007.

LONGHI, C. *et al.* Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 428–432, 2016.

LOO, Y. Y. *et al.* In Vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

MALLIKARJUNA, K. *et al.* Phytochemical fabrication and characterization of silver nanoparticles by using Pepper leaf broth. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1099–1103, 2014.

MANSOOR, S. *et al.* Polymer-Based Nanoparticle Strategies for Insulin Delivery. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1380, 2019.

MARTÍNEZ-ABAD, A.; LAGARON, J. M.; OCIO, M. J. Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5350–9, 2012.

MASHAGHI, S. *et al.* **Lipid nanotechnology**. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n.2, p. 4242-4282, 2013.

Mastroeni, P; Maskell, D. *Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**, 2006.

MEDEIROS, J. A. S. *et al.* Incorporation of Oregano Essential Oil Microcapsules in Starch-Poly (Butylene Adipate Co-Terephthalate) (PBAT) Films. **Macromolecular Symposia**, v. 383, n. 1, 2019.

MERIN, D. D.; PRAKASH, S.; BHIMBA, B. V. Antibacterial screening of silver nanoparticles synthesized by marine micro algae. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 10, p. 797–799, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS NO BRASIL – Informe 2018. 2019. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf). Acesso em 21 Ago 2019.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. V. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONACK, D. M. Salmonella persistence and transmission strategies. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 1, p. 100–7, 2012.

MULLER, J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Combination Of Poly(lactic) acid and starch for biodegradable food packaging, **Materials**, 2017.

MULVEY, M. R. *et al.* The genetics of Salmonella genomic island 1. **Microbes and infection**, v. 8, n. 7, p. 1915–22, 2006.

MURIEL-GALET, V. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 9–16, 2015.

NAKAZATO, G. *et al.* Use of nanoparticles as a potential antimicrobial for food packaging (ISBN 9780128043035). **Food Preservation**. 1ed. Amsterdã: ELSERVIER. v. 2, p. 413-447, 2016.

NITHYAJA, B.; MISHA, H.; P. N. NAMPOORI, V. Synthesis of Silver Nanoparticles in DNA Template and Its Influence on Nonlinear Optical Properties. **Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 4, p. 99–103, 2012.

OLIANI, W. L. *et al.* Fabrication of polypropylene/silver nanocomposites for biocidal applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, n. March, p. 845–853, 2017.

OTARI, S. V *et al.* Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 136 Pt B, p. 1175–80, 2015.

OZAKI, A. *et al.* Contents of Ag and other metals in food-contact plastics with nanosilver or Ag ion and their migration into food simulants. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 9, p. 1490–1498, 2016.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, v. 155, p. 568-70, 2004.

PUGAZHENDHI, A. *et al.* Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 41–45, 2018.

QING, Y. *et al.* Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3311–3327, 2018.

RAD, M. *et al.* Biological synthesis of gold and silver nanoparticles by *Nitraria schoberi* fruits. **American Journal of Advanced Drug Delivery**, 2013.

RESCH, S.; FARINA, M. C. Mapa do conhecimento em nanotecnologia no setor agroalimentar. **RAM. Revista de Administração Mackenzie**, v. 16, n. 3, p. 51–75, jun. 2015.

ROBERTSON, G. L. Food packaging: principles and practice. 2 edição. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2006.

RUBY, T. *et al.* Salmonella's long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 600-615, 2012.

SANO, G. I. *et al.* Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8224–8232, 2007.

SCANDORIEIRO, S. *et al.* Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

Shaik, M. R; Korsapati, M; Panati, D. Polymers in Controlled Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharma Sciences*, v 2, n. 4, p. 112-116, 2012.

SHI, C. *et al.* Molecular methods for serovar determination of Salmonella. **Critical Reviews in Microbiology**, 2015.

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v.16, n.1, 2018.

SILVA, P. T. DA *et al.* Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, 2014.

SINSINWAR, S. *et al.* Use of agricultural waste (coconut shell) for the synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial activity against selected human pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 30–37, 2018.

TANG, S. *et al.* Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for Salmonella. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

THIENNIMITR, P.; WINTER, S. E.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella*, the host and its microbiota. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 1, p. 108–14, 2012.

THOMAS, S. *et al.* Ceramic Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 42, p. 6165–6188, 2015.

UNIÃO EUROPEIA. Definition of nanomaterial. 2011. Disponível em: [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm). Acesso em: 20 Ago. 2019.

VISHNUPRIYA, S. *et al.* Single-cell investigations of silver nanoparticle-bacteria interactions. **Particle and Particle Systems Characterization**, v. 30, n. 12, p. 1056–1062, 2013.

WAGNER, C.; HENSEL, M. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 715, p. 17–34, 2011.

WHITMAN, W. B. (Editor) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. New York: John Wiley and Sons Inc, 2012.

WINTER, S. E. *et al.* Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426–429, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018a. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 21 Ago. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018b. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/typhoid-fever/en/>. Acesso em: 21 Ago. 2019.

WYRWA, J.; BARSKA, A. Innovations in the food packaging market: active packaging. **European Food Research and Technology**, 2017.

XU, HENGYI *et al.* Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7. **BioMetals**, v. 25, n. 1, p. 45–53, 2012.

YUAN, Z. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. **Chemosphere**, v. 90, n. 4, p. 1404–1411, 2013.

ZHANG, X. F. *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados e discussões foram apresentados na forma de artigo. O artigo foi submetido e segue as normas da revista “Journal of Nanobiotechnology”, e tem como título: **Activity of biodegradable films with bio-AgNP and silver migration to chicken meat.**

## Activity of biodegradable films with bio-AgNP and silver migration to chicken meat

### Abstract

Nanotechnology has been contributed to development of many products used in various fields including food packaging. The new technologies are used to improve the biological synthesis of nanoparticles, searching for a cheapest and ecofriendly method. Concern with sustainability and renewable resources increase the use of non-toxic materials, and nanotechnology assist the development of products that less affects the environment. Food industry explored the association of polymers with nanoparticles in the packaging production. Active products are important to increase the shelf life of food and avoid the contamination. In our study was developed a starch-poly (adipate co-terephthalate butyl) (PBAT) films with silver nanoparticle (AgNP) produced by *Fusarium oxysporum* (bio-AgNP), with the aim of eliminate the food pathogens. The results showed a great action of bio-AgNP against different *Salmonella* serotypes, with minimum inhibitory concentration ranged from 4.24 to 16.98 µg/mL, including multidrug-resistant *Salmonella* Saint Paul and *Salmonella* Enteritidis. Biodegradable films with bio-AgNP were capable to inhibited  $10^5$  to  $10^6$  CFU growing of food pathogens. Silver migration from the films to chicken was analyzed using electrothermal atomic absorption spectrophotometry and the results showed a tendency of migration but the values obtained are lower than the allowed limits. Our work showed a high potential use of bio-AgNP in biodegradables films to avoid food contamination, mainly for keeping the migration of silver within the parameters stipulated by food regulations.

Keywords: nanotechnology, biological synthesis, pathogens, biodegradable films and silver migration.

## Background

Nanotechnology has been used as a tool in development of many products and in human health make a great contribution in new antimicrobials research. Combine new technologies with active components already used is an interesting way to advance in the search for new products [1]. Silver nanoparticles have been explored for several applications and demonstrated significant action as antimicrobial agent, so increase the use of this compound in food and health care industry [2, 3, 4].

Concern about the environment and the increase of silver nanoparticles demand influenced the development of various synthesis methods. Green synthesis is used and is a better alternative than the physical and chemical methods, that are expensive and environment toxic. Plants extract and fungus proteins are efficient and explored in a green synthesis of silver nanoparticle, and the compound showed a great efficacy against microorganism [5, 6].

Food contamination can cause big losses to food industry, so a development of active packaging is explored and products are marketed [7]. The active packaging with antimicrobial properties also contributed to food extension of shelf life, reducing the microorganisms growth responsible for food deterioration [8].

Massive use of plastic and the environment pollution, increase the search for an alternative material to replace conventional polymers [9, 10]. Some natural polymers do not present good physical properties and to improve these characteristics they are combined with others biodegradable polymers [11, 12]. Studies have shown that biodegradable films with AgNP incorporated have the potential to prevent food contamination [13, 14].

Foodborne diseases are an important public health problem, causing million illnesses and thousand deaths per year [15]. This problem do not impact just the developing countries, CDC [16] estimates that *Salmonella* causes about 1.2 million illnesses and 23,000 hospitalizations every year in the United States, with a large cost of medical care. *Salmonella* are a major cause of diarrheal diseases in the worldwide, and present over than 2,500 different serotypes. This bacteria cause a human infection through contaminated food and water and can survive several weeks in dry conditions [16, 17]. The uncontrolled antibiotics

use in food production contributed with the emergence of multidrug resistant *Salmonella* strains [18, 19].

The use of biodegradable films with AgNP is a great alternative to avoid the food contamination using an ecofriendly plastic, but studies showed some cell damages caused by silver, so it is important to analyzed the migration of this compound from packaging to food [14, 20, 21, 22]. More data about the impact of silver nanoparticle presence and the interaction between the nanomaterials and the consumer are needed to evaluate the security of the products.

Therefore, the aim of our study was evaluated the action of bio-AgNP against an important food pathogen, *Salmonella* sp., and develop an antibacterial biodegradable film that present a silver migration within the stipulated limits.

## Results

### Characterization of bio-AgNP

The mean diameter of bio-AgNP size and its mean potential zeta value was 81.25 nm (figure 1) and - 36.4 mV (figure 2) respectively. Spherical nanoparticles were observed in micrograph made by transmission electron microscopy (figure 3).

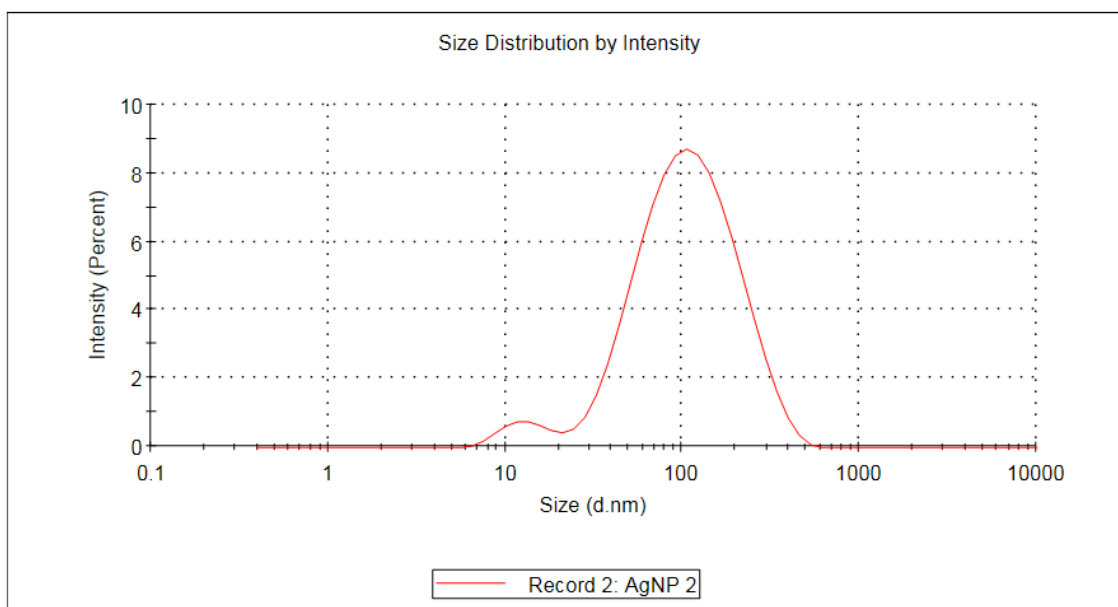


Figure 1. Size distribution by intensity (%) of bio-AgNP produced by *Fusarium oxysporum*.

The average diameter of bio-AgNP was 81.25 nm.

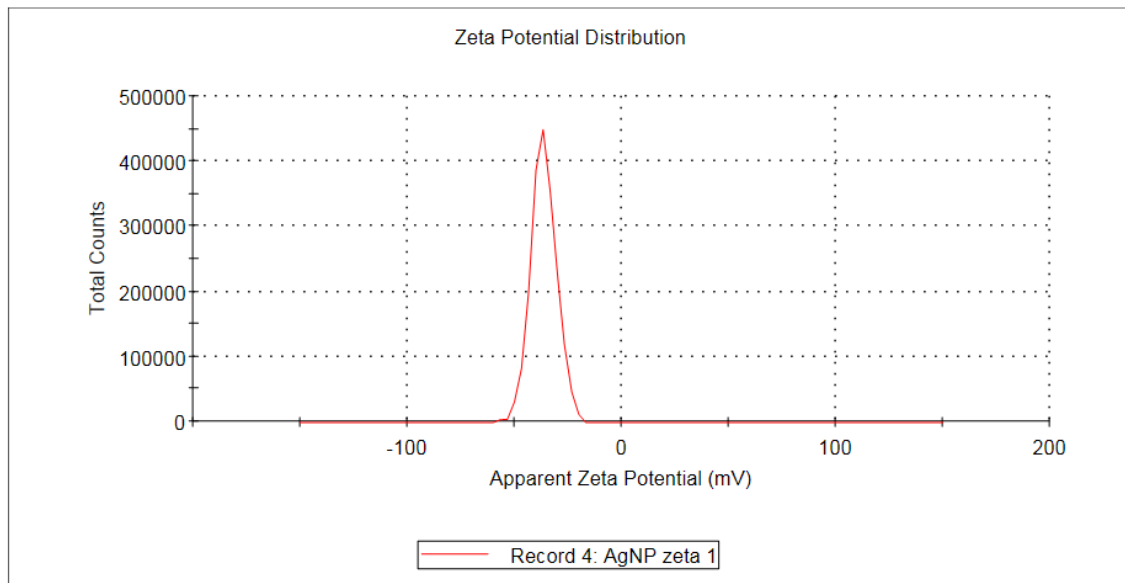


Figure 2. The average zeta potential of bio-AgNP was -36.4 mV.

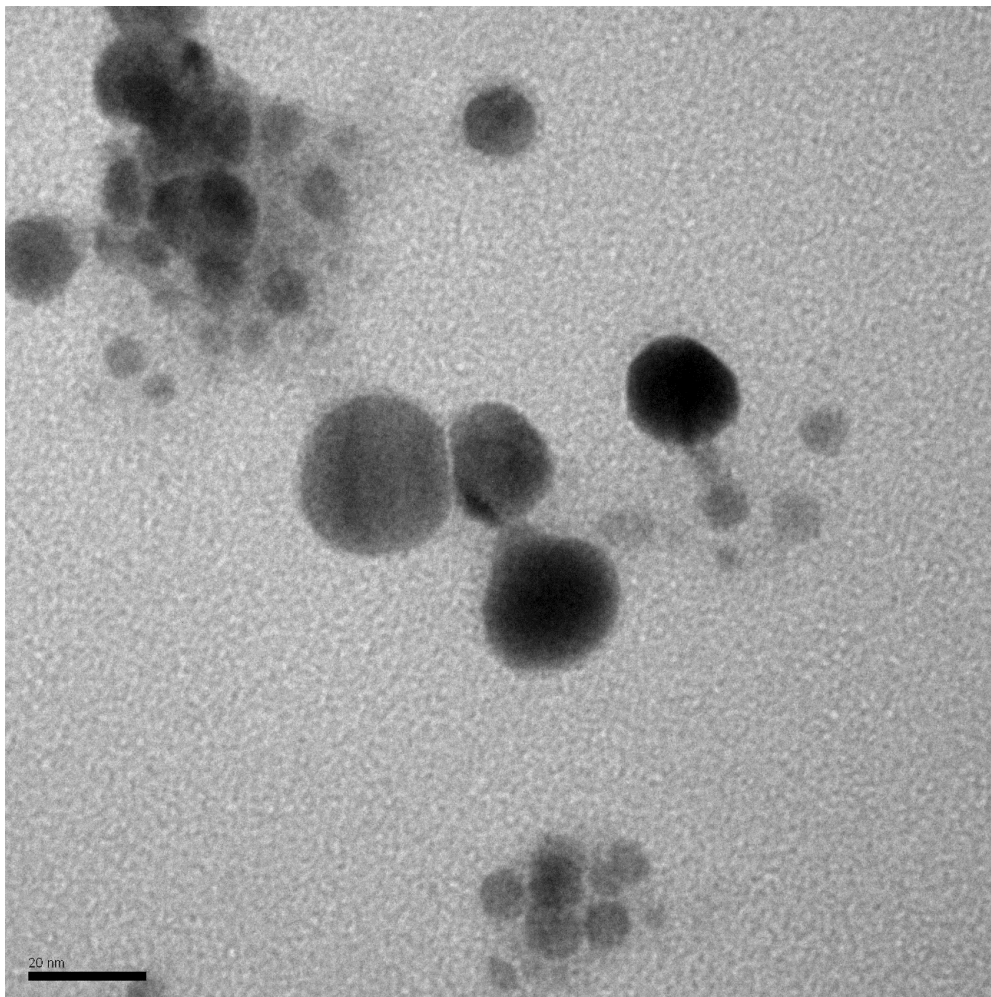


Figure 3. Transmission electron micrograph of bio-AgNP produced by *Fusarium oxysporum*.

Spherical nanoparticles were observed in this micrograph (500,000 x).

### Antibacterial Activity bio-AgNP

All tested bacterial strains had their growth inhibited by bio-AgNP action. MIC for bio-AgNP ranged from 4.24 to 16.98  $\mu\text{g/mL}$ , and MBC ranged from 4.24 to 16.98  $\mu\text{g/mL}$  (Table 1).

Table 1. Values of minimal inhibitory and bactericidal concentrations of bio-AgNP, MIC and MBC respectively.

<b>Bacteria</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>MBC (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4.24	4.24
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16.98	16.98
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	8.49	8.49
<i>S. Typhimurium</i> ATCC UK1	8.49	8.49
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	4.24	8.49
<i>S. Saint Paul</i> 08	8.49	8.49
<i>S. Saint Paul</i> 09	8.49	8.49
<i>S. Saint Paul</i> 10	8.49	8.49
<i>S. Saint Paul</i> 11	8.49	16.98
<i>S. Saint Paul</i> 12	16.98	16.98
<i>S. Saint Paul</i> 13	8.49	8.49
<i>S. Enteritidis</i> 92	8.49	8.49
<i>S. Enteritidis</i> 02	8.49	8.49
<i>S. Enteritidis</i> 06	8.49	8.49
<i>S. Seftenberg</i> 14	16.98	16.98
<i>S. Seftenberg</i> 15	16.98	16.98
<i>S. Seftenberg</i> 16	8.49	16.98
<i>S. Seftenberg</i> 17	8.49	8.49
<i>S. Seftenberg</i> 18	8.49	8.49
<i>S. Seftenberg</i> 19	8.49	16.98
<i>S. Kentucky</i> 20	16.98	16.98
<i>S. Kentucky</i> 21	8.49	8.49
<i>S. Kentucky</i> 22	16.98	16.98
<i>S. Kentucky</i> 25	16.98	16.98

### Time-Kill Assay

For all three strains tested (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* UK1 and *S. Typhimurium* ATCC 13311) the bio-AgNP showed the bactericidal endpoint in 1 h of incubation ( $p < 0.05$ ; Figure 4).

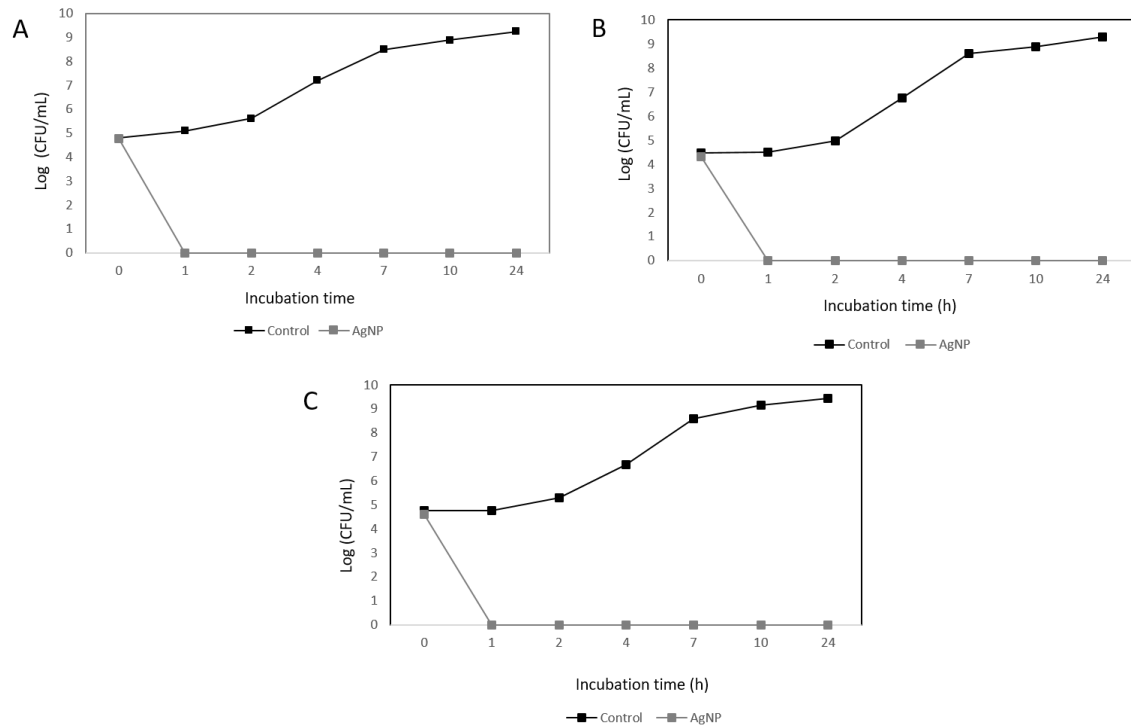


Figure 4. Time kill curves of bacterial exposed to bio-AgNP.

*S. Enteritidis* ATCC 13076 (A), *S. Typhimurium* UK1 (B) and *S. Typhimurium* ATCC 13311 (C)

### Antimicrobial tests using biodegradable films with bio-AgNP

#### Agar diffusion assay

The result of A.D. assay showed bacteria growth inhibition in the area that were in contact with bio-AgNP films. This inhibition was not observed in control samples. A small clear zone around the square films can be observed in the photos (Figure 5).

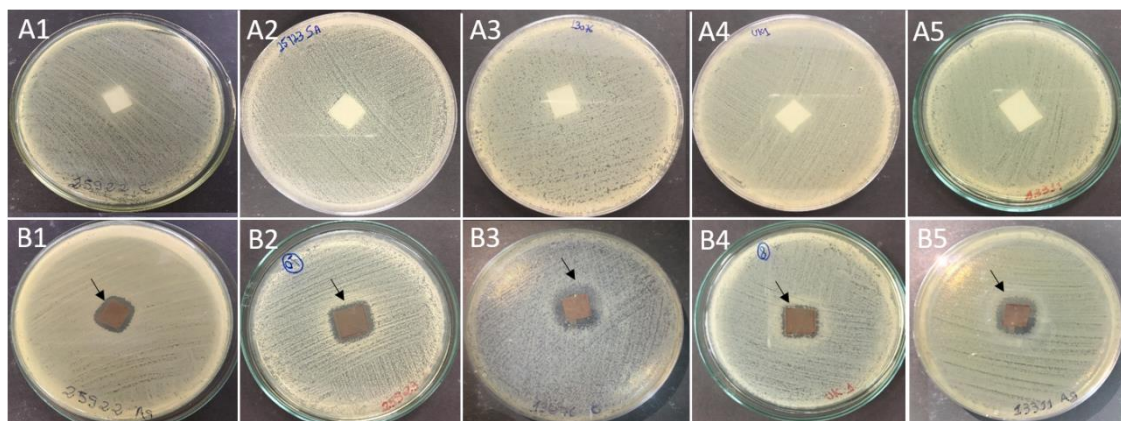


Figure 5. Antimicrobial activity of bio-AgNP films against bacteria.

The bacteria growth was inhibited in the contact area with bio-AgNP films and inhibition halo were observed (arrowheads). A: Control and B: Treatment; 1: *E. coli* ATCC 25922; 2: *S. aureus* ATCC 25923; 3: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; 4: *Salmonella* Typhimurium UK; 5: *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Films without bio-AgNP were used as control.

#### Enumeration of bacteria inhibited by bio-AgNP films

After contact with the bacteria strains serial dilutions, bio-AgNP films showed an inhibitory effect even in the high cellular density. Films were capable to inhibit growth of *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* ATCC 13311 from  $10^0$  to  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>. Growth *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* UK1 were inhibited from  $10^0$  to  $10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> (table 2 and figure 6).

Table 2. The concentration of bacteria (CFU/cm<sup>2</sup>) inhibited by bio-AgNP films.

Bacteria	Concentration inhibited (CFU/cm <sup>2</sup> )
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$10^5$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$10^5$
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	$10^6$
<i>S. Typhimurium</i> UK1	$10^5$
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	$10^6$

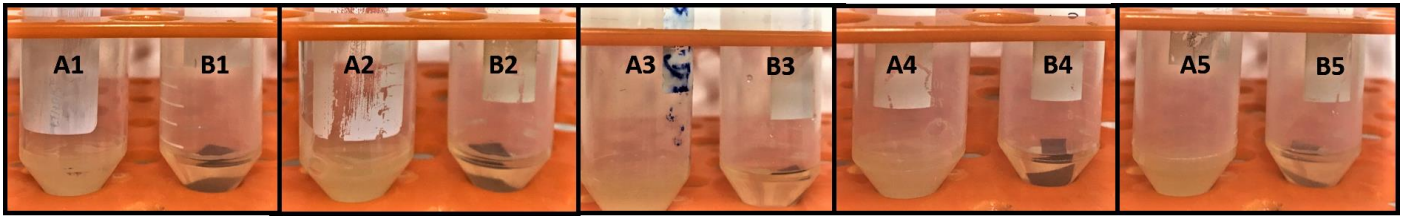


Figure 6. Inhibited growth bacteria after contact with bio-AgNP films.

A: Control and B: Treatment; 1: *E. coli* ATCC 25922; 2: *S. aureus* ATCC 25923; 3: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; 4: *Salmonella* Typhimurium UK; 5: *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Films without bio-AgNP were used as control. The bio-AgNP inhibited  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> of *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* ATCC 13311, and  $10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* UK1.

#### Growth curve with bio-AgNP films

Films containing bio-AgNP controlled the growth of all bacteria compared with control (film without bio-AgNP) as curves shown in the figure 7.

*E. coli* ATCC 25922 curve (figure 7A) showed a difference of 2.38 log ( $p < 0.05$ ) between control and treatment at 2 h, and this difference increased to 4.45 log ( $p < 0.05$ ) in 12 h. The bio-AgNP reduced the growth of *S. aureus* ATCC 25923 in 1.35 log ( $p < 0.05$ ) at 6h and 2.81 log ( $p < 0.05$ ) at 12 h, when compared with control.

The action of bio-AgNP in *S. Enteritidis* ATCC 13076 was visualized at 0 h when the difference between control and treatment was 1.15 log ( $p < 0.05$ ), this antibacterial effect lasted until 12 h in which 0.97 log ( $p < 0.05$ ) difference is shown; but the largest effect occurred at 6 h, time point in which there was 3.56 log ( $p < 0.05$ ) difference between control and bio-AgNP films.

The bio-AgNP treatment of *S. Typhimurium* UK1 showed 1.51 log ( $p < 0.05$ ) reduction of growth compared to control at 6h, and the difference increased to 1.86 log ( $p < 0.05$ ) after 12h. The growth of *S. Typhimurium* ATCC 13311 was so affect by bio-AgNP films, there was no detected viable cells at 2h of test, but at 10 h it was possible to count viable cells, even so bio-AgNP films caused 5.74

log ( $p < 0.05$ ) reduction and at 12 h the difference between control and treatment was 4.32 log ( $p < 0.05$ ).

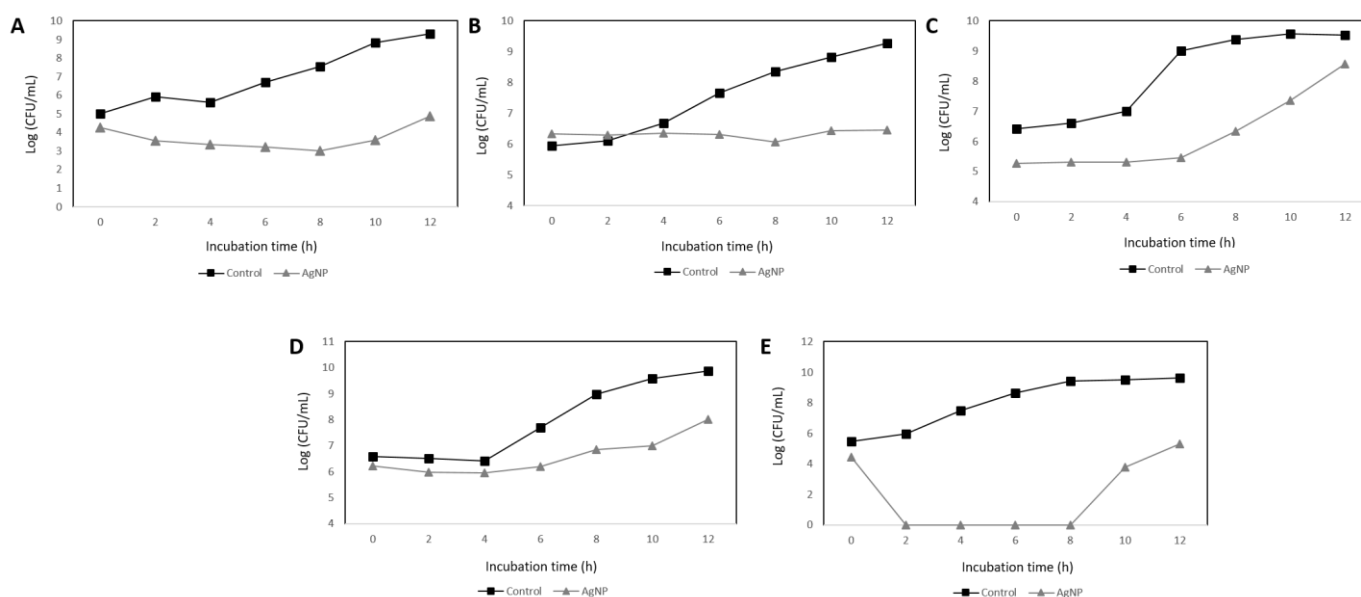


Figure 7. Growth curve of bacterial after contact with biodegradable films. *E. coli* ATCC 25922 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B), *S. Enteritidis* ATCC 13076 (C), *S. Typhimurium* UK1 (D) and *S. Typhimurium* ATCC 13311 (E) after 24 h of contact with biodegradable films with (treatment) and without bio-AgNP (control).

### The efficacy of bio-AgNP films after UV light exposure or autoclaving

Bio-AgNP films still showed antibacterial activity after UV light exposure, but films previously exposed to autoclaving process lost the ability of controlling bacterial growth (*S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* UK1). The bacterial growth was confirmed by plating the samples in agar medium.

### **Analysis of silver migration from bio-AgNP films to chicken meat**

Results showed that silver migration from films to chicken meat occurs when they were stored in refrigerator and freezer. Chicken placed in refrigerator showed the silver highest concentration (12.94  $\mu\text{g/g}$ ) after 10 days of storing. Samples stored in freezer showed the highest silver concentration (5.43  $\mu\text{g/g}$ )

after 3 days, but after 5 days of storing silver concentration was very similar, 5.39  $\mu\text{g/g}$ . Silver migration was higher in the chicken stored in refrigerator ( $p < 0.05$ ) after 3, 5 and 7 days when compare with meat stored in freezer at same time of storing.

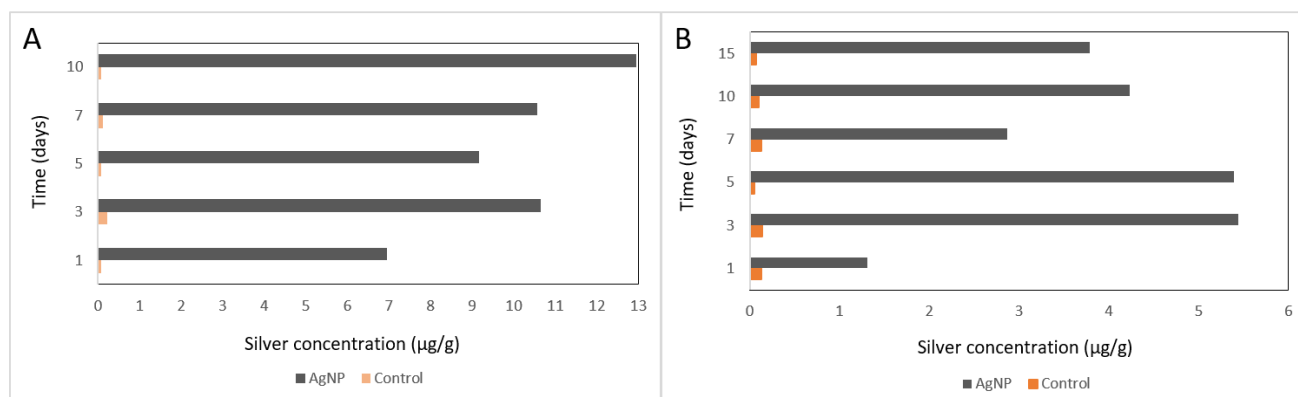


Figure 8. Quantification of silver migration from bio-AgNP films to chicken meat stored in refrigerator (A) and freezer (B).

## Discussion

The bactericidal activity of silver nanoparticles is explored in many recent studies, mainly nanoparticles that were obtained by green synthesis as described in previous researches [1, 23, 24, 25, 26].

Our study showed that bio-AgNP has activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Loo, et al. (2018) [26] reported AgNP MIC values of 3.9  $\mu\text{g/mL}$  to *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* and MIC of 7.8  $\mu\text{g/mL}$  to *E. coli*. In the research of Sinsinwar et al. (2018) [27] AgNP exhibited MIC values of 26  $\mu\text{g/ml}$  to *S. aureus*, 53  $\mu\text{g/ml}$  to *E. coli* and 106  $\mu\text{g/ml}$  to *S. Typhimurium*. Bio-AgNP MIC showed in our study ranged from 4.24  $\mu\text{g/ml}$  to 16.98  $\mu\text{g/ml}$ , which were similar to the literature results. AgNP MBC values found by Loo, et al. (2018) [26] were 3.9  $\mu\text{g/mL}$  to *S. Enteritidis* and 7.8  $\mu\text{g/mL}$  to *S. Typhimurium* and *E. coli*. Results found in our study were 4.24  $\mu\text{g/ml}$  to *E. coli*, 8.49  $\mu\text{g/ml}$  to *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, and ranged from 8.49  $\mu\text{g/ml}$  and 16.98  $\mu\text{g/ml}$  to *S. aureus* and others *Salmonella* serovars.

Chemical and physical characteristics of silver nanoparticles influence their antibacterial activity; many studies reported that AgNP with different sizes

showed a great efficacy against microorganism, but the antimicrobial activity increases when the size decreases [3, 28, 29] because the antimicrobial area of contact with the cell is bigger in small particles. The AgNP also presents variation in morphology and stabilizing agent, and all these properties impact in silver nanoparticle concentration needed to eliminate the bacteria, and are the reason of large variation in MIC values among different studies. Furthermore, in order to test alternative antimicrobials, sometimes it is necessary make adaptations on standard method of evaluation, and researchers have applied different methods to study non-conventional antimicrobial compounds, making it difficult to compare results [23, 30].

Silver nanoparticles biocidal effect has been explored in the last decades, once the potential of silver to act as antimicrobial has been known since 18th century [31]. The study described in this manuscript showed that bio-AgNP act against different species of bacteria, but the versatility of this nanocompound can be seen in others researches that reported the action against fungus [32] and virus [33].

Studies that used the same bio-AgNP tested in this work present results that corroborate ours [24, 32, 34, 35]. Searching explore the use of silver nanoparticle, our study developed an active packing using biodegradable polymer and bio-AgNP. This proposal was made to work around an important public health problem, the presence of pathogens in food [36, 37, 38]. *Salmonella* is an important foodborne pathogen, with a large number of infection per year, resulting in an expressive medical care costs [39]. The contamination caused for this bacterium can occur in different steps of food production [17], and the active packing is a good strategy to avoid consumer contamination. In our study the bio-AgNP showed action against multidrug-resistant *Salmonella* sp., and the MIC and MBC values were similar to the sensitive strains.

Results observed in time-kill assays showed the great efficacy of bio-AgNP against *Salmonella* sp., reducing about 5 log ( $p < 0.05$ ) of bacterial growth after 1 h treatment. Many food pathogens have rapid reproduction time, one important cause of bacteria infectivity [40], and the fast reduction in the quantity of bacteria can avoid an infection, once the salmonellosis occur after ingestion of  $>5 \times 10^4$  bacteria in contaminated product [41]. The action of silver nanoparticle

is also important to avoid the cross contamination and the spread of bacteria during the food manipulation. The concentration of bio-AgNP that eliminated all bacteria were 16.98 µg/ml to *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* UK1, and 8.49 µg/ml to *S. Typhimurium* ATCC 13311. Loo, et al. (2018) [26] reported that after 1 h treatment, AgNP at 15.6 µg/mL kill *S. Typhimurium*, and 31.2 µg/mL was the bactericidal concentration to *S. Enteritidis* in the same time, similar results to those reported in this study.

Analyzing the studies of AgNP activity is possible to observe that the concentration capable to eliminate bacteria varies even in species of the same genus. The microorganism present metabolic and structural differences and it is important to study which are the parameters that influence in concentration to understand the better application of the compound. Silver nanoparticles can be used in combination with alternative or commercial antibiotics to prevent the selection of AgNP resistant strain and to decrease the concentration needed to kill the microorganism. The efficacy of these combinations already were related [24, 34, 35] and can be more explored, especially against multidrug resistant strains.

Several silver-based products were developed, especially materials containing silver nanoparticles [4, 42, 43]. Active packaging is a concept explored to increase the shelf-life food and decrease the risk of contamination [44]. The environmental problems about massive use of plastics in industry showed the necessity to expand the biodegradable polymers studies. Several studies aim to develop a biodegradable plastic with active compound that do not change physical-chemical properties of polymer and maintain the action of implanted substance [11, 45, 46].

According different methodologies, such as qualitative method as disk diffusion agar or broth quantitative assays, the biodegradable film containing bio-AgNP developed in our study showed antibacterial activity for all bacteria tested. Results of agar diffusion assay showed that inhibition of bacteria occurred in area of contact with AgNP films and small clear zone was observed. Abreu et al (2015) [47] reported the inhibition of bacteria in contact area with AgNP films, but no inhibition halo was observed. Small or absent inhibition halo were also noted in tests with silver nanoparticles in suspension [26, 48], showing that the film polymer do not influence the presence or size of inhibition halo. The silver

nanoparticles showed a difficult to migrate in agar plates and caused a variation of the results reported in literature [30]. Quantitative tests, as used in this work, are a great alternative to analyze films, they give more information to discuss and understand how this product act and can be used.

The release of AgNP present in polymer matrix is important to compound act against microorganism, mainly in liquid environment, once the contact with the cell membrane is an essential step to kill bacteria. Enumeration of bacteria inhibited by bio-AgNP films was performed in nutrient broth and showed 5 log inhibition growth for *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and *Salmonella* Typhimurium UK1, and 6 log for *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Results suggest that the bio-AgNP film can avoid an infection caused by *Salmonella* sp, because it eliminated more bacteria ( $10^5$  and  $10^6$ ) than needed to cause an infection ( $>5 \times 10^4$ ).

The fisical alteration of plastic with AgNP can influence antimicrobial action of nanometal compound; this was observed in our study when autoclaving process made the bio-AgNP film lose the capacity to stop bacteria growth. Visually the process altered the film structure; its size reduced and became drier. These alterations maybe decrease bio-AgNP concentration in the film and the amount of antimicrobial in plastic after the process was not enough to inhibit the bacteria. Probably, autoclaving do not alter action of AgNP, once this process can be used in synthesis of silver nanoparticles [49] and the liquid AgNP after autoclaving maintain the bactericidal effect (data not shown). The maintenance of silver nanoparticle activity after decontamination process is important, once this compound is used in many active products that can pass to different physical process during fabrication.

Results of bacterial growth curve with bio-AgNP films showed significant ( $p < 0.05$ ) log reduction compared to control even in high bacterial concentration. Analyzing the curve, it is possible to observe reduction mainly in the Log phase of growth. More studies about bacterial kinetics associated with the films antibacterial activity are needed, as well as the establishment of standard techniques for product tests.

Silver nanoparticle mechanism of action is still studied because the exact antibacterial activity is unknown. Researchers showed that the silver nanoparticles present many targets in bacteria. Nanoparticles interact to cell by

different ways, Bondarenko et al. (2013) [50] showed the importance of cell-NP contact to AgNP action, but DNA interaction [51], free radical generation [52], ROS formation [53] and interaction with sulfur-containing proteins and enzymes [50, 54, 55], also have important role in AgNP mechanism of action. These multiples targets can explain the fact of the highest activity of silver nanoparticle was observed in a Log phase of growth, phase of high metabolic activity.

The Ag<sup>+</sup> ions release of silver nanoparticle is an important step to this compound antimicrobial action [56], but it is also a concern when the AgNP is applied in materials that make contact with human body or food. The migration of silver from silver-based materials has been studied, our research showed presence of 12.94 µg silver/g chicken meat stored for 10 days in refrigerator, and 5.43 µg/g in chicken meat stored for 3 days in freezer. Abreu et al. (2015) [47] reported migration of 0.70 mg/g (Ag/meat) and 0.40 mg/g of Ag from silver nanoparticles/starch nanocomposite to food simulant. Echegoyen and Nerin (2013) [57] reported silver migration values ranging from 1.66 to 31.46 ng/cm from commercial plastic bags to food simulants, showing a tendency of silver migration. Gallocchio et al. (2016) [58] reported no migration of silver from commercial plastic bag to chicken meatball but had no effect against the bacteria tested, these results suggest that migration is important to antimicrobial action. Our results showed silver tendency to migration under high temperature that corroborate with other studies [20, 57]. Migration values obtained in our study are in the limit determinate by European directives on food packaging (EN1186-1, 2002, Regulation N° 10/2011) [59], which is 60 mg (substances)/kg (foodstuff or food simulant) of migration from plastic materials.

Evaluate silver nanoparticles migration is necessary, once the cytotoxicity of AgNP is still unclear. Through an *in silico* screen of literature data analyzing cytotoxic effects of AgNP in HEPG2 cells, Sooklert et al. (2019) [22] indicated that most genes affected by AgNP are located in the nucleus and was involved in transcriptional control. They found that genes responsible for oxidative stress, inflammation, and cell death were also affected by AgNP exposure. Some researchers suggest that silver nanoparticles induce morphological alterations in hepatic and lung cells, using *in vitro* cells models [22, 60]. Filon et al. (2015) [61] observed that the skin penetration of nanoparticle is size-dependent; NPs ≤4 nm can penetrate the intact skin while nanoparticles larger than 45 nm

cannot penetrate nor permeate through the skin. Wang et al. (2017) [60] also reported that damages in cells were dose-dependent, so in any product development is important analyze the size and concentration of AgNP used.

## **Conclusion**

The biogenic and ecofriendly silver nanoparticles produced in this study showed a great action against an important foodborne pathogen, *Salmonella* sp., including multidrug resistant strains. This work showed a quantitative test of bio-AgNP films and how it affects the bacterial kinetics, this is an important information to analyze the application of the product. The obtained results indicate a high potential of using bio-AgNP in biodegradable films to avoid food contamination, mainly for keeping the migration of silver within the parameters stipulated by food regulation.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial Strains**

The antimicrobial assays were performed using reference strains from American Type Culture Collection (ATCC) provided by the Laboratory of Basic and Applied Bacteriology of Londrina State University (Londrina, Paraná, Brazil), and poultry farms strains provided by Laboratory of Genomics and Bacterial Molecular Biology of The University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil) (Table 3). The standard bacterial strains used were as follows: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK1 ATCC 68169 (provided by Dr. Roy Curtiss III, Arizona State University, Tempe, AZ). The bacterial strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in Brain-Heart Infusion Broth (BHI, Acumedia, USA) with 25% glycerol (Merck, USA).

Table 3. Antibiotics resistance of *Salmonella* sp. isolates from poultry farms provided by The University of Campinas.

<b>Bacteria</b>	<b>Resistance</b>
S. Saint Paul 08	AMP, PEN, ERY, OXA
S. Saint Paul 09	AMP, PEN, ERY, OXA, AMX, CEF, CET, CRO, CFZ, CTX
S. Saint Paul 10	AMP, PEN, ERY, OXA, NAL, AMX, CEF, CFZ, FOX
S. Saint Paul 11	NAL, PEN, ERY, OXA
S. Saint Paul 12	AMP, PEN, ERY, OXA, AMX, CEF, CET, CRO, CFZ, CTX
S. Saint Paul 13	ERY, OXA
S. Enteritidis 92	NAL, CHL
S. Enteritidis 02	NAL, ERY, OXA
S. Enteritidis 06	AMP, PEN, NAL, ERY, OXA
S. Seftenberg 14	NAL, ERY, OXA
S. Seftenberg 15	NAL, ERY, OXA, AMX, CET, CRO, CFZ, CTX
S. Seftenberg 16	NAL, ERY, OXA
S. Seftenberg 17	NAL, ERY, OXA
S. Seftenberg 18	NAL, ERY, OXA
S. Seftenberg 19	PEN, NAL, ERY, OXA
S. Kentucky 20	AMP, PEN, NAL, ERY, OXA
S. Kentucky 21	PEN, NAL, ERY, OXA
S. Kentucky 22	PEN, NAL, ERY, OXA
S. Kentucky 25	PEN, NAL, ERY, OXA

AMP- ampicillin; AMX – amoxicillin; CEF – cephalothin; CET – ceftiofur; CFZ – cefazolin; CHL- chloramphenicol; CRO- ceftriaxone; CTX – cefotaxime; ERY – erythromycin; FOX – cefoxitin; NAL - nalidixic acid; OXA – oxacillin; PEN – penicillin.

### **Biogenic Silver Nanoparticles**

Biogenic silver nanoparticles preparation (bio-AgNP) was according to a previously established method [62] that has been patented (Patent, 2006, PI

0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). The principle of this method is the production of bio-AgNP after silver nitrate reduction by *Fusarium oxysporum* enzymes (strain 551), from Molecular Genetics Laboratory of ESALQ-USP culture collection (Piracicaba, São Paulo, Brazil). *F. oxysporum* was cultivated on Malt agar 2 % (Difco®, USA) containing 0,5 % (w/v) yeast extract (BD, USA) for 7 days at 30 °C. After growth, fungal biomass was scraped off the plate using a sterile loop and added to distilled water at 0.1 g/mL and incubated with agitation (150 rpm) at 30°C for 72 h. Afterwards, the solution components were separated by vacuum filtration. Silver nitrate (Sigma Aldrich®, USA) at 1 mM was added to solution, and the system was incubated for 15 days at 30 °C in the dark. After bio-AgNP preparation, diameter and zeta potential were determined using ZetaSizer NanoZS (Malvern, UK) and the shape was observed using Transmission electron micrograph (model JEM-1400, Jeol, Japan).

### **Antibacterial Activity bio-AgNP**

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in triplicate by broth dilution method in 96-well plates (KASVI, Brazil), according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [63]. The tested concentrations of bio-AgNP ranged from 1.06 to 67.92 µg/mL. Mueller-Hinton broth (MHB, Difco®, USA) alone was used as negative control, and the strains used for test were growth in MHB without bio-AgNP as positive control. The bacteria tested were primarily cultivated in Mueller-Hinton agar (MHA, Difco®, USA), and incubated at 37 °C for 24 h. Each bacterial strain was suspended in sterile saline and adjusted to  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml using McFarland scale. After the bio-AgNP plus MHB were added to microplate, the bacterial suspensions were previously diluted in MHB (1:100) and inoculated into the plate at final density of  $5.0 \times 10^5$  CFU/ml. The plates were incubated at 37 °C and after 24 h, the lowest concentration of bio-AgNP that inhibited visible growth was defined as MIC. To determine the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), 10 µL from the broth dilution MIC were plated in MH agar and the lowest concentration that kills  $\geq 99.9\%$  of bacteria after the treatment was defined as MBC [64].

## **Time-Kill Assay**

Kinetics of bio-AgNP-treated bacterial populations were studied by viable cells count method with final construction of time-response growth curve [64]. Bacteria sample was prepared as described in antibacterial activity assay previously. Each culture was inoculated at a final cell density of  $10^5$  CFU/ml in two tubes containing MHB, one that includes bio-AgNP and other with MHB alone used as growth control. These cultures were incubated at 37°C and aliquots of 10 µL were collected at 7 different times of incubation (0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, and 24 h), serially diluted and plated on MHA. The CFU/mL was determined after growth at 37 °C for 18 h. Three bacterial strains were used in this assay (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 13311 and *S. Typhimurium* UK1), and the strains were treated with bio-AgNP at 16.98 µg, 8.49 µg and 16.98 µg, respectively.

## **Preparation of biodegradable films with bio-AgNP**

To incorporate bio-AgNP in biodegradable films, the suspension of nanoparticles was transformed in powder by frozen and lyophilization. For the lyophilization process a lyophilizer (Model LP3, JOUAN, USA) was used for 48 h at -30 °C. To produce the biodegradable films, a formulation was prepared using 30% (w/w) of poly (adipate co-terephthalate butyl) (PBAT) (Ecoflex®, BASF, Germany) and 51.10% (w/w) of starch. As control was used 18.90% (w/w) of glycerol, without nanoparticle, and in bio-AgNP films was added 17.40% (w/w) of glycerol and 1.50% (w/w) of lyophilized bio-AgNP. The ingredients of formulations were manually mixed and extruded in a pilot single-screw extruder (BGM, EL-25 model, Brazil) to produce the pellets. The extruder had a screw diameter (D) of 25 mm, screw length (L) of 750 mm (L/D ratio of 30), five heating zones and a matrix with six 2mm-holes, and the barrel temperature profile was set at 90/120/120/120 °C with a screw speed of 35 rpm. Pellets were extruded in the same extruder to produce three-layer films by blow extrusion, operating same operating conditions but with a different matrix specific for balloon formation.

## **Antimicrobial test using biodegradable films with bio-AgNP**

### Agar diffusion assay

This assay was performed based on disk diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) [65], with modifications. Bacterial strains were grown in MHA at 37 °C for 24 h. After this incubation time, each bacterial strain was suspended in sterile saline and concentration was adjusted to  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml, using the McFarland scale. Bacterial suspension was spread in MH agar plates and a square (1cm) of the films, control and with bio-AgNP, were put in contact with the bacteria. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and the growth was observed.

### Enumeration of bacteria inhibited by bio-AgNP films

Bacterial strains, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 13311 and *S. Typhimurium* UK1, were inoculated in Nutrient Broth and incubated at 37 °C for 24 h. Cultures reached a concentration of  $10^9$  CFU/ml. After the growth, the bacterial strains were serially diluted in saline ten-fold solution up to  $10^{-7}$  and dilution was plated in Nutrient agar to confirm the total CFUs. A volume of 10  $\mu$ L of each dilution were placed on the films square with and without bio-AgNP and stored in a sterile Petri dish at room temperature for 24 h. The initial cellular density in contact with films ranged from  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> to  $10^0$  CFU/cm<sup>2</sup>. After contact with bacteria, film samples were inoculated in Nutrient Broth and placed at 37 °C for 24 h. Bacterial growth was confirmed by samples plating in agar medium, *E. coli* in MacConkey Agar (Acumedia, USA), *S. aureus* in Mannitol Salt Agar (Difco®, USA) and *Salmonella* sp in SS Agar (Difco®, USA).

### Growth curve with bio-AgNP films

This assay was performed to observe bacterial population kinetic when they were in contact in the film with bio-AgNP. 10  $\mu$ L volume of the bacterial strain

( $10^9$  CFU ml<sup>-1</sup>) was placed on the films square with and without bio-AgNP and stored in a sterile Petri dish at room temperature for 24 h. After 24 h of contact between film and bacteria, the films squares were inoculated in Nutrient Broth (1 % peptone, 1% meat extract, 0,1% glucose and 0,5 % sodium chloride) and incubated at 37 °C for 12 h, with constant stirring at 160 rpm. Aliquots of 10 µL were collected every two hours, serially diluted and plated on Nutrient agar with post incubation at 37 °C for 24. The CFU was determined and a curve of time x viable cells was constructed.

#### The efficacy of bio-AgNP films after UV light exposure or autoclaving

To observed if these physical decontamination methods used regularly in the laboratory routine can affect the effectiveness of bio-AgNP films, this assay was developed. A square (1 cm) of the film were exposed in UV light for 40 min, 20 min each side, or submitted to autoclaving for 15 min at 121 °C. After this process, a volume of 10 µL of the bacterial strain were placed on the films square (control that do not pass for any process, films exposed to UV light and autoclaving films) and stored in a sterile Petri dish at room temperature for 24 h. Bacterial concentration inoculated in the films square was determined by previous test quantification of bacteria inhibited by bio-AgNP films. After bacterial-films contact, film samples were inoculated in Nutrient Broth at 37 °C for 24 h. Bacterial growth was confirmed by plating the samples in agar medium, such as MacConkey agar, Mannitol salt agar and SS agar.

#### **Analysis of silver migration from bio-AgNP films to chicken meat**

Silver migration was analyzed after chicken meat contact with the bio-AgNP films. A commercial chicken was cut into pieces of approximately 1 g. The pieces were involved by rectangle of films with and without bio-AgNP (2,5 cm x 4 cm) and stored in refrigerator (4 – 8 °C) for 1, 3, 5, 7 and 10 days, or in the freezer (-20 °C) for 1, 3, 5, 7, 10 and 15 days. Each day had three samples of chicken in contact with films with and without bio-AgNP. After contact time with films, the chicken meat was dried at 60 °C for 48h. The acidic digestion of dried

chicken pieces was performed using an ultrapure nitric acid 5 N (Merck, USA) at 60 °C for 48 h, according to Alves and Wood (2006) [66]. Quantification of Ag in chicken meat was performed through electrothermal atomic absorption spectrophotometry (AAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

### **Statistical Method**

Analyses were performed using R Statistical Software, version 3.6.1, to time kill assay results, growth curve with bio-AgNP films and silver migration to chicken meat. Means were analyzed using Student's *t*-test, or ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### **List of Abreviation**

AgNP - silver nanoparticle

ATCC – American Type Culture Collection

BHI - Brain-Heart Infusion Broth

bio-AgNP – biogenic silver nanoparticle

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

MBC – Minimal Bactericidal Concentration

MHA - Mueller-Hinton agar

MHB - Mueller-Hinton broth

MIC – Minimum inhibitory concentration

NPs – Nanoparticles

PBAT - adipate co-terephthalate butyl

UV – Ultraviolet

### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable

**Consent for publication**

Not applicable

**Availability of data and materials**

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Competing interests**

The authors declare that the research have no competing interests.

**Funding**

This work was supported by 'Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná' with payment of student scholarship to MSN and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Finance Code 001.

**Authors' contributions**

MSN performed the experimental research, interpreted the data and wrote the manuscript. SS performed the statistical analysis and contributed to the manuscript writing. APD and FY participated in the biodegradable films production and in drafting of this assay. WER and CBRM designed and participated in the silver migration test. RKTK participated in drafting of antimicrobial test using bio-AgNP biodegradable films. GN coordinated the research and the manuscript.

**Acknowledgements**

The authors would like to thank Postgraduated Program in Microbiology of Londrina State University and the all laboratories of Microbiology Department for their cooperation.

## References

1. Sheikholeslami S, Mousavi SE, Ahmadi Ashtiani HR, Hosseini Doust SR, Rezayat SM. Antibacterial activity of silver nanoparticles and their combination with zataria multiflora essential oil and methanol extract. *Jundishapur J Microbiol.* 2016 Oct 1;9(10).
2. Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar VS, et al. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications - A Comprehensive Review. *Curr Pharm Des.* 2019.
3. Zhang X, Liu Z, Shen W, Gurunathan S. *Silver Nanoparticles : Synthesis, Characterization, Properties, Applications and Therapeutic Approaches.* 2016.
4. Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006;33(7):627–34.
5. Ahmed J, Arfat YA, Bher A, Mulla M, Jacob H, Auras R. Active Chicken Meat Packaging Based on Polylactide Films and Bimetallic Ag–Cu Nanoparticles and Essential Oil. *J Food Sci.* 2018;83(5):1299–310.
6. Khatoon N, Sharma Y, Sardar M, Manzoor N. Mode of action and anti-Candida activity of *Artemisia annua* mediated-synthesized silver nanoparticles. *J Mycol Med.* 2019.
7. Wyrwa J, Barska A. Innovations in the food packaging market: active packaging. Vol. 243, *European Food Research and Technology.* Springer Verlag; 2017. p. 1681–92.
8. Valdés A, Burgos N, Jiménez A, Garrigós M. Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. *Coatings.* 2015 Nov 16;5(4):865–86.
9. Roopan SM. An overview of natural renewable bio-polymer lignin towards nano and biotechnological applications. Vol. 103, *International Journal of Biological Macromolecules.* Elsevier B.V.; 2017. p. 508–14.
10. Gandini A, Lacerda TM, Carvalho AJF, Trovatti E. Progress of Polymers from Renewable Resources: Furans, Vegetable Oils, and Polysaccharides. *Chem Rev.* 2016;116(3):1637–69.

11. de Medeiros JAS, Blick AP, Galindo M V., Alvim ID, Yamashita F, Ueno CT, et al. Incorporation of Oregano Essential Oil Microcapsules in Starch-Poly (Butylene Adipate Co-Terephthalate) (PBAT) Films. *Macromol Symp.* 2019;383(1).
12. Muller J, González-Martínez C, Chiralt A. Combination Of Poly(lactic) acid and starch for biodegradable food packaging. *Materials.* MDPI AG; 2017;10.
13. Božanić DK, Djoković V, Dimitrijević-Branković S, Krsmanović R, McPherson M, Nair PS, et al. Inhibition of microbial growth by silver-starch nanocomposite thin films. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(17):2343–55.
14. Li W, Zhang C, Chi H, Li L, Lan T, Han P, et al. Development of antimicrobial packaging film made from poly(lactic acid) incorporating titanium dioxide and silver nanoparticles. *Molecules.* 2017 Jul 13;22(7).
15. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. 2015. [https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/ferg\\_report/en/](https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/ferg_report/en/). Accessed 31 Jul 2019.
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Salmonella. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>. Accessed 30 Jul 2019.
17. Tang S, Orsi RH, Luo H, Ge C, Zhang G, Baker RC, et al. Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for Salmonella. *Front Microbiol.* 2019 Jul 12;10.
18. Acar S, Bulut E, Stasiewicz MJ, Soyer Y. Genome analysis of antimicrobial resistance, virulence, and plasmid presence in Turkish Salmonella serovar Infantis isolates. *Int J Food Microbiol.* 2019 Oct;307:108275.
19. Odoch T, Wasteson Y, L'Abée-Lund T, Muwonge A, Kankya C, Nyakarahuka L, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and risk factors associated with non-typhoidal Salmonella on Ugandan layer hen farms. *BMC Vet Res.* 2017 Nov 29;13(1).

20. Artiaga G, Ramos K, Ramos L, Cámara C. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS. *FOOD Chem.* 2014.
21. Ozaki A, Kishi E, Ooshima T, Hase A, Kawamura Y. Contents of Ag and other metals in food-contact plastics with nanosilver or Ag ion and their migration into food simulants. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2016;33(9):1490–8.
22. Sooklert K, Wongjarupong A, Cherdchom S, Wongjarupong N, Jindatip D, Phungnoi Y, et al. Molecular and Morphological Evidence of Hepatotoxicity after Silver Nanoparticle Exposure: A Systematic Review, In Silico , and Ultrastructure Investigation. *Toxicol Res.* 2019 Jul 15;35(3):257–70.
23. Zarei M, Jamnejad A, Khajehali E. Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(1).
24. Scandorieiro S, de Camargo LC, Lancheros CAC, Yamada-Ogatta SF, Nakamura C V., de Oliveira AG, et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Front Microbiol.* 2016;7.
25. Mathew S, Raveendran A, Mathew J, Radhakrishnan EK. Antibacterial Effectiveness of Rice Water (Starch)-Capped Silver Nanoparticles Fabricated Rapidly in the Presence of Sunlight. *Photochem Photobiol.* 2019;95(2):627–34.
26. Loo YY, Rukayadi Y, Nor-Khaizura MAR, Kuan CH, Chieng BW, Nishibuchi M, et al. In Vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. *Front Microbiol.* 2018;9.
27. Sinsinwar S, Sarkar MK, Suriya KR, Nithyanand P, Vadivel V. Use of agricultural waste (coconut shell) for the synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial activity against selected human pathogens. *Microb Pathog.* 2018;124:30–7.
28. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 2014;4(8):3974–83.

29. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005 Oct 1;16(10):2346–53.
30. Durán N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Aug;100(15):6555–70.
31. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(4):587–90.
32. Bocate KP, Reis GF, de Souza PC, Oliveira Junior AG, Durán N, Nakazato G, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *Int J Food Microbiol*. 2019;291:79–86.
33. Lara HH, Ayala-Nuñez N V., Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology*. 2010;8.
34. Longhi C, Santos JP, Morey AT, Marcato PD, Duran N, Pinge-Filho P, et al. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2016;54(4):428–32.
35. Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MRE, Andrade CGTJ, Silveira WD, et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12(1).
36. Gozi KS, Froes JR, Deus Ajude LPT, da Silva CR, Baptista RS, Peiró JR, et al. Dissemination of Multidrug-Resistant Commensal *Escherichia coli* in Feedlot Lambs in Southeastern Brazil. *Front Microbiol*. 2019;10.
37. Koga VL, Scandorieiro S, Vespero EC, Oba A, De Brito BG, De Brito KCT, et al. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-Range Poultry. *Biomed Res Int*. 2015.

38. Rubin JE, Ekanayake S, Fernando C. Carbapenemase-producing organism in food, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1265.
39. Oh J-H, Park M-K. Recent Trends in Salmonella Outbreaks and Emerging Technology for Biocontrol of Salmonella Using Phages in Foods: A Review. *J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017 Dec 28;27(12):2075–88.
40. Lara HH, Ayala-Núñez N V., del Turrent LCI, Padilla CR. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26(4):615–21.
41. Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol Lett.* 2017;190:42–50.
42. Olmos D, Pontes-Quero G, Corral A, González-Gaitano G, González-Benito J. Preparation and Characterization of Antimicrobial Films Based on LDPE/Ag Nanoparticles with Potential Uses in Food and Health Industries. *Nanomaterials.* 2018;8(2):60.
43. Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:3311–27.
44. De Moura MR, Lorevice M V., Mattoso LHC, Zucolotto V. Highly Stable, Edible Cellulose Films Incorporating Chitosan Nanoparticles. *J Food Sci.* 2011;76(2):25–9.
45. Castro-Mayorga JL, Freitas F, Reis MAM, Prieto MA, Lagaron JM. Biosynthesis of silver nanoparticles and polyhydroxybutyrate nanocomposites of interest in antimicrobial applications. *Int J Biol Macromol.* 2018;108:426–35.
46. Malherbi NM, Schmitz AC, Grando RC, Bilck AP, Yamashita F, Tormen L, et al. Corn starch and gelatin-based films added with guabiroba pulp for application in food packaging. *Food Packag Shelf Life.* 2019;19:140–6.
47. Abreu AS, Oliveira M, De Sá A, Rodrigues RM, Cerqueira MA, Vicente AA, et al. Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. *Carbohydr Polym.* 2015;129:127–34.

48. Patra JK, Baek KH. Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its anticandidal and antioxidant effects. *Front Microbiol.* 2017;8(FEB):1–14.
49. Marchiore NG, Manso IJ, Kaufmann KC, Lemes GF, Pizolli AP de O, Droval AA, et al. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;76:203–8.
50. Bondarenko O, Ivask A, Käkinen A, Kurvet I, Kahru A. Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLoS One.* 2013;8(5).
51. Vishnupriya S, Chaudhari K, Jagannathan R, Pradeep T. Single-cell investigations of silver nanoparticle-bacteria interactions. *Part Part Syst Charact.* 2013;30(12):1056–62.
52. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2007;3(1):95–101.
53. Xu H, Qu F, Xu H, Lai W, Wang YA, Aguilar ZP, et al. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *BioMetals.* 2012;25(1):45–53.
54. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2016;12(3):789–99.
55. Yuan Z, Li J, Cui L, Xu B, Zhang H, Yu CP. Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. *Chemosphere.* 2013;90(4):1404–11.
56. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem.* 2007;12(4):527–34.
57. Echegoyen Y, Nerín C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food Chem Toxicol.* 2013;62:16–22.

58. Gallocchio F, Cibin V, Biancotto G, Roccato A, Muzzolon O, Carmen L, et al. Food Additives & Contaminants : Part A Testing nano-silver food packaging to evaluate silver migration and food spoilage bacteria on chicken meat. 2016;0049(May).
59. EN-1186-1. Materials and Articles in Contact with Foodstuffs. Plastics. In: Part 1 Guide to the Selection of Conditions and Test Methods for Overall Migration. 2002. <http://img.21food.cn/img/biaozhun/20090815/187/11183625.pdf>. Accessed 07 Jul 2019.
60. Wang J, Che B, Zhang LW, Dong G, Luo Q, Xin L. Comparative genotoxicity of silver nanoparticles in human liver HepG2 and lung epithelial A549 cells. *J Appl Toxicol*. 2017;37(4):495–501.
61. Larese Filon F, Mauro M, Adami G, Bovenzi M, Crosera M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015 Jul;72(2):310–22.
62. Durán N, Marcato PD, Alves OL, De Souza GIH, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnology*. 2005;3.
63. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA. 2015;35 No 2.
64. NCCLS. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. 1999. [http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/M26A\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M26A_sample.pdf). Accessed NOV 2016.
65. Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement,” CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne, Pa, USA, 2013.
66. Alves, L., Wood, C.M. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol*. 2006;78:217–232.

## 6. CONCLUSÕES

A nanopartícula de prata biogênica apresentou ação antibacteriana contra todas as cepas testadas, inclusive os isolados de *Salmonella* multirresistentes, e o tempo de ação contra cepas padrões foi de 1 hora.

Mesmo após a incorporação da nanopartícula de prata em uma matriz polimérica biodegradável sua ação antibacteriana foi observada e a embalagem foi capaz de eliminar uma quantidade maior de bactéria do que é necessária para causar uma infecção. Processos físicos podem alterar a capacidade da embalagem em eliminar os microrganismos, mas possivelmente isso ocorre por alteração na matriz polimérica e diminuição na concentração do ativo, e não por perda de ação da nanopartícula de prata. Apesar dos resultados mostrarem a migração de prata da embalagem para a carne de frango, a quantidade está dentro do padrão permitido pelos órgãos reguladores.

Dessa forma, os resultados sugerem que a embalagem biodegradável incorporada com nanopartículas de prata biogênica pode ser uma boa alternativa para evitar a contaminação de alimentos e causar menor poluição no meio ambiente.