



REDUÇÃO DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* E *SALMONELLA TYPHIMURIUM* INOCULADAS EM CORTES DE FRANGO APÓS EXPOSIÇÃO À SOLUÇÃO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA, SOB REFRIGERAÇÃO

Wanderson Alexandre Valente^a; Augusto Aloísio Benevenuto Júnior^a; Maurílio Lopes Martins^a;
Wellington Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto^a.

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, campus Rio Pomba. Brasil.

RESUMO

O Brasil teve aumento expressivo no consumo da carne de aves e o setor precisa garantir a qualidade sanitária dos produtos, principalmente em relação a *Salmonella* spp. Considerando que nanopartículas de prata podem mitigar o risco de contaminação por patógenos em alimentos, objetivou-se com este trabalho, avaliar a redução da contagem de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium inoculadas em cortes de frango após exposição à solução contendo nanopartícula de prata em condições de refrigeração. Foi usada uma solução teste de 5 mg/L de prata, contendo nanopartículas. As estirpes de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) foram padronizadas a concentração de 10⁸ UFC/mL. Os cortes utilizados foram o filé de peito e o coração e os parâmetros de resfriamento foram aqueles praticados em um abatedouro de frangos de corte. *Salmonellas* foram quantificadas em Petrifilm (3M). Com os resultados de três repetições realizadas foram determinados os valores médios. A redução de *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, quando expostas a solução de prata foi, aproximadamente, de 2 log UFC/g para o filé de peito e 3 log UFC/g para o coração. Conclui-se que as estirpes de *Salmonella* spp. avaliadas, foram consideravelmente sensíveis a solução coloidal contendo nanopartículas de prata nas condições utilizadas.

Palavras-Chaves: *Salmonella*; Nanopartícula de prata; Patógenos; Carne de frango.



1. INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se entre os 10 maiores produtores de alimentos do mundo, com aumento expressivo na produção e consumo de carne. Em 2019, o volume produzido foi de 25,9 milhões de toneladas e o comércio internacional destacou-se por exportar produtos como a carne bovina e de frango, que juntas, totalizaram 6,8 milhões de toneladas, um aumento em volume de aproximadamente 8 % em relação a 2018 (EMBRAPA, 2019). Em 2020, a produção de carne de aves superou 3,8 % e sua exportação 0,4 % em milhões de toneladas, em relação a 2019 (ABPA, 2021).

Para sua continuidade, o setor precisa garantir a confiança e a qualidade sanitária dos produtos com normas sanitárias e controle legal da produção, considerando todos os riscos do processo, principalmente em relação ao patógeno *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é uma bactéria entérica presente em aves, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de endósporo. Essa bactéria é responsável por graves doenças de origem alimentar associada ao consumo de carnes de frango e ovos contaminados (DANTAS, 2018).

Com relação às salmonelas causadoras de doenças em humanos e animais, a espécie entérica é a que mais se destaca podendo ser classificada em restritas, que causam doenças em um indivíduo de espécie específica; adaptadas, que infectam uma espécie e ocasionalmente outras e, por fim, as não adaptadas que infecta tanto animal de sangue quente quanto frio. Exemplos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, que causam gastroenterites em humanos (BRASIL, 2018).



Para contê-las, entretanto, medidas preventivas e as boas práticas de manejo e industrialização da carne devem ser seguidas com controle e rigor, inclusive nas etapas de processamento no abatedouro, naquelas consideradas críticas como é o caso do pré-resfriamento e resfriamento em *chiller*.

Afim de assegurar a qualidade sanitária dos produtos avícolas, Ferreira et al. (2014) consideraram para uso, produtos de exclusão competitiva, ácidos orgânicos, probióticos, desinfetantes, vacinas, e glucanos e/ou mananoligossacarídeos como imunoestimulantes.

Nanopartículas de prata apresentaram efeito bactericida e bacteriostático contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos em aplicações com alimentos de origem animal. Arfat et al. (2017) aplicaram nanopartículas de prata em embalagens ativas e constataram efeito favorável contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium.

Ao final de 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Instrução Normativa nº 60 que estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. Nessa instrução, com intuito de monitorar patógenos causadores de enfermidades, foi inserido o padrão de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium na categoria de produtos carne de aves (BRASIL, 2019).

Neste trabalho foi avaliada a redução da contagem de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium inoculadas em cortes de frango após exposição à solução contendo nanopartícula de prata em condições de refrigeração.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Solução padrão e solução teste

A solução padrão utilizada continha nanopartículas com tamanhos variando entre 1 e 100 nm, na concentração de 20 ± 2 mg/L de prata e foi fornecida por um dos parceiros do projeto.

A solução de teste foi preparada a concentração de 5 mg/L de prata, após diluir a solução padrão no solvente caldo Luria Bertani (LB), marca Sigma-Aldrich.

2.2 Preparo da amostra biológica

No preparo da amostra biológica foram utilizadas as estirpes de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) mantidas sob refrigeração de -18 °C.

Em seguida, esses microrganismos foram reativados em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), marca Sigma-Aldrich, e incubadas por 24 h a 35 °C. Posteriormente, cada estirpe foi repicada dos tubos com caldo BHI para o Ágar Müeller-Hinton, marca Sigma-Aldrich e incubadas a 35 °C por 24 h, para verificação de sua pureza. Por último, 3 a 5 colônias foram transferidas para o caldo Luria Bertani (LB), marca Sigma-Aldrich, seguindo da incubação por 24 h a 35 °C, para obtenção de uma cultura em crescimento ativo (BATTISTI, 2016).

As estirpes foram padronizadas a concentração de 10^8 UFC/mL em escala McFarland (0,5) por comparação visual e confirmação espectrofotométrica através da



leitora de microplacas de absorvância modelo iMark Biorad ($\lambda=595$ nm) (DUFFY et al., 2018; NEFELOBAC, 2019).

2.3 Preparo da amostra de carne e exposição à refrigeração

Foram escolhidos dois produtos fornecidos pelo abatedouro parceiro desse projeto para representar a matéria orgânica. Os parâmetros utilizados de resfriamento foram aqueles praticados em um abatedouro de frangos de corte (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros de resfriamento

Porção	Parâmetros	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Filé de peito	4	50
Coração	4	20

Fonte: BRASIL (1998)

Cada produto foi pesado individualmente, em frascos contendo 100 g cada e, autoclavados a 121 °C por 30 minutos para garantia da esterilidade.

As amostras foram divididas e preparadas da seguinte forma:

Amostra teste – A amostra biológica padronizada a 10^8 UFC/mL foi ajustada para 10^7 UFC/mL após diluição em caldo Luria Bertani, marca Sigma-Aldrich. De cada porção de produto estéril foi pesado 25 g e, em seguida, contaminada com 0,25 mL do inóculo (*Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, separadamente) a 10^7 UFC/mL. Por fim, cada amostra recebeu 225 mL do diluente (água peptonada 1 %, marca Difco) contendo a solução teste a 5 mg/L de prata;



Amostra positiva – Foi preparada igual à amostra teste. Entretanto, cada amostra recebeu 225 mL do diluente (água peptonada 1 %, marca Difco) sem solução teste a 5 mg/L de prata;

Branco – Foi pesado 25 g de cada amostra estéril e, em seguida, adicionado 225 mL do diluente (água peptonada 1 %, marca Difco) contendo a solução teste a 5 mg/L de prata.

Após o preparo das amostras, todas foram homogeneizadas por 1 minuto, em homogeneizador *Stomacher* marca Marconi, modelo MA 440/GF e então encaminhadas para a geladeira, com controle de temperatura e tempo conforme parâmetros da Tabela 1.

2.4 Quantificação de *Salmonella* spp.

Após o período de exposição à refrigeração, as amostras foram analisadas em Petrifilm (3M) de Enterobactérias para quantificação da *Salmonella* spp. presente (AOAC 2003.01).

2.5 Análise estatística dos dados

Com os resultados de três repetições realizadas foram determinados os valores médios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição das amostras de frango contaminadas com *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em solução contendo nanopartículas de prata



resultou em uma redução de, aproximadamente, 2 log UFC/g do número de microrganismos presentes na amostra teste de filé de peito, em relação a sua amostra positiva e, aproximadamente, 3 log UFC/g do número de microrganismos presentes na amostra teste de coração, em relação a sua amostra positiva (Tabela 2).

A contagem inicial das amostras positivas foi de aproximadamente 10.000 UFC/g.

Tabela 2 – Redução microbiana da solução de prata a 5 mg/L contendo nanopartículas.

Estirpes <i>Salmonella</i>	Branco (UFC/g)	Amostra positiva (UFC/g)	Filé de peito		Coração	
			Contagem (UFC/g)*	% redução	Contagem (UFC/g)*	% redução
Typhimurium	0	10.000	329	96,71	58	99,42
Enteritidis	0	10.000	147	98,53	27	99,73

Fonte: Dados da pesquisa

*Média de três repetições.

As etapas de pré-resfriamento e resfriamento das carcaças de frangos de corte são extremamente importantes para o processo de abate. Nelas ocorrem a redução da temperatura das carcaças e com isso a velocidade de multiplicação da microbiota existente. Essas reduções podem ser reforçadas pela adição de cloro ou outros compostos com ação antimicrobiana. O resfriamento é a etapa onde a temperatura de saída da carcaça do *chiller* deve estar entre 0 e 7 °C e a temperatura da água não deve ser superior a 4 °C (BRASIL, 1998).

Nessas condições, Zobot (2016), comparando compostos clorados e ácidos orgânicos na redução da contaminação da carne de frango contaminada artificialmente



(coxa de frango) com *Salmonella* spp., submetida à refrigeração, comprovou que o ácido láctico teve maior efetividade, reduzindo o crescimento em 4,82 log UFC/g (100 %), seguido do hipoclorito de sódio (5,0 mg/L) e dicloro (60 mg/L) que reduziram o número desse microrganismo em 1,06 (22 %) e 0,97 log (20 %) UFC/g, respectivamente. Por fim, o hipoclorito de sódio (0,5 mg/L), reduziu apenas 0,56 log UFC/g (11,62 %) de *Salmonella* spp., sendo pouco expressiva em relação aos demais compostos testados.

Nicolau (2016), comparando a eficácia de diferentes concentrações do ácido láctico na eliminação da bactéria *Salmonella* Enteritidis, encontrou resultados satisfatórios quando empregou 0,2 e 5 % após o resfriamento, observando maior eficácia na concentração mais alta, que foi de 5 %. Esse mesmo autor encontrou uma eficiência de 96,3 % do hipoclorito de sódio (5 mg/L) na eliminação de *Salmonella* spp. No entanto, estudos demonstraram que somente concentrações próximas a 1.200 mg/L de cloro ativo na água do *chiller* seriam capazes de eliminar 99,9 % dos microrganismos da carcaça, não sendo permitido por legislação e ainda sendo risco na formação de tri-halometanos (GOMIDE & RAMOS & FONTES, 2014).

O resultado obtido neste trabalho com a solução contendo nanopartícula de prata foi superior aos resultados apresentados por esses autores com compostos clorados, que é atualmente a solução mais utilizada em *chiller* dentro de abatedouros. Ao menos 2 log UFC/g foram reduzidos do microrganismo *Salmonella*, mostrando boa eficiência.

A propriedades físico-químicas das nanopartículas, aliadas à área superficial, a pequena diferença de tamanho entre as nanopartículas (10^{-9} m) e bactérias (10^{-6} m)



e reatividade química facilitam a entrada nos microrganismos provocando a sua morte ou reduzindo seu crescimento com efeitos menos tóxicos para o tecido circundante. Podem atuar como catalisadores para formar as espécies reativas de oxigênio (ROS) que geram estresse oxidativo as células microbianas (KAILASA et al., 2019).

Mathew et al. (2019) testaram a eficiência de nanocompósitos contendo prata na redução da carga microbiana em amostras de salsicha de frango e conseguiram uma boa ação antimicrobiana contra *Salmonella* Typhimurium quando empregaram em filme biodegradável contendo a mistura, o qual também se mostrou barreira contra a luz e resistividade à água, o que seria fator de aumento da *shelf life* do produto.

Zarpon et al. (2016) estudaram a eficiência bactericida de películas finas compostas por nanopartícula de prata no tratamento de água residuária industrial e chegaram a uma eficiência de 93 % para o grupo coliformes presentes inicialmente. Kumar & Bhattacharya & Das (2020) aplicaram nanopartículas de prata na água potável de granjas a uma concentração de 50 mg/L e também obtiveram resultados satisfatórios de redução para o grupo coliformes.

Uma das preocupações do uso de nanopartículas de prata seria o efeito sobre os microrganismos presentes no trato intestinal e sobre as células humanas. Em testes para avaliação desse efeito, Yu et al. (2019) verificaram a liberação de íons de prata e obtiveram resultados antimicrobianos contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, sem comprometer, portanto, as células do cólon e por isso verificaram como alternativa de aplicação em embalagem de alimentos ativos.

Cueva et al. (2019) utilizaram de um simulador dinâmico do trato gastrointestinal humano e descartaram quaisquer alterações na distribuição de fluido



intestinal e também mudanças significativas na composição e atividade metabólica (proteolítica) da microbiota intestinal quando um suporto humano se alimentou com nanopartículas de prata estabilizadas com glutathione líquida.

Esses resultados corroboram com o trabalho por confirmarem a eficiência da nanopartícula de prata contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo estirpes de *Salmonella* spp.

4. CONCLUSÃO

A solução coloidal contendo 5 mg/L de prata com partículas e tamanhos nanométricos foi eficiente contra *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis inoculadas em cortes de frango em condições de refrigeração, podendo ser aprimorada como alternativa para compostos clorados que são atualmente utilizados nos *chillers*.

Estudos posteriores ao longo de toda a cadeia produtiva do frango de corte são promissores, visto os bons resultados obtidos, inclusive considerando também a possibilidade de impregnar em recipientes e equipamentos que estarão em contato direto com a ave viva ou com seu produto, com foco em redução de *Salmonella* spp.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC INTERNATIONAL, Official Method of Analysis. 2003.01.(2006). *Enumeration of Enterobacteriaceae in Selected Foods*. Rockville, MD, USA.

ARFAT, Y. A.; EJAZ, M.; JACOB, H.; AHMED, J. (2017). Deciphering the potential of guar gum/Ag-Cu nanocomposite films as an active food packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 157, 65-71.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, ABPA (2021). Relatório Anual 2020. São Paulo: ABPA, 2020. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf.

BATTISTI, R. (2016). Desenvolvimento de folha celulósica com revestimento biodegradável e ações antimicrobiana e antioxidante para uso como embalagem ativa em carne bovina fresca. Orientadora: Mara Gabriela Novy Quadri. 2016. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRASIL. (1998). Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Dispõe sobre a inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.

BRASIL. (2018). Dispõe sobre a Salmonela em carne de frango. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango>.

BRASIL. (2019). Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a lista de padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>.

CUEVA, C.; GIL-SÁNCHEZ, I.; TAMARGO, A.; MIRALLES, B.; CRESPO, J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M.V. (2019). Gastrointestinal digestion of food-use silver nanoparticles in the dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract (simgi®). Impact on human gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology*, 132.

DANTAS, S. T. A. (2018). Caracterização molecular e da virulência de cepas de *Salmonella* spp. isoladas em uma planta de abate de aves. Orientadora: Vera Lúcia Mores Rall. 77p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada). UNESP, Botucatu.



DUFFY, L. L.; OSMOND-MCLEOD, M. J.; JUDY, J.; KING, T. (2018). Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Food Control*, 92, 293 – 300.

EMBRAPA (2019). Central de Inteligência de Aves e Suínos (Concórdia, SC). Mapas e Infográficos. Brasília: EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/mapas>.

FERREIRA, A. J. P.; REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C. S. A.; NUÑEZ, L. F. N.; PARRA, S. H. S.; ALLEGRETTI, L.; AZEVEDO, N. P.; CARRANZA, C. (2014). Controle de patógenos que comprometem a qualidade dos produtos avícolas: do frango ao abate. *Avicultura Industrial*, 2.

GOMIDE, L.A.M; RAMOS, E.M.; FONTES; P.R. (2014). Tecnologia de abate e tipificação de carcaças, 2. ed. rev. e ampl. Viçosa: UFV.

KAILASA, S.K.; PARK, T.; ROHIT, J. V.; KODURU, J. R. (2019). Antimicrobial activity of silver nanoparticles. In: GRUMEZESCU, A. M. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. Willian Andrew, p. 461- 484.

KUMAR, I.; BHATTACHARYA, J.; DAS, B.K. (2020). Dispersion, availability, and antimicrobial activity of silver nanoparticles during application to drinking water of the poultry. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 14.

MATHEW, S.; SNIGDHA, S.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. (2019). Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 155-156.

NEFELOBAC: escala nefelométrica (2019). São Paulo: Probac do Brasil (Bula de produto químico).

NICOLAU, J. P. (2016). Controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frango pelo uso de descontaminantes químicos durante o processo de abate e as consequências na qualidade da carne. Orientadora: Elisa Helena Giglio Ponsano. 74p. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal), UNESP, Araçatuba.

YU, Z.; WANG, W.; KONG, F.; LIN, M.; MUSTAPHA, A. (2019). Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 887 – 894.

ZABOT, S. (2016). Atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e compostos clorados sobre micro-organismos patogênicos em carne de frango. Orientadora:



Elisabete Hiromi Hashimoto. 97p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos).
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina.

ZARPELON, F.; GALIOTTO, D.; AGUZZOLI, C. CARLI, L. N.; FIGUEROA, C.A.;
BAUMVOL, I.J.R.; MACHADO, L.; CRESPO, J.S.; GIOVANELA, M. (2016). Removal of
coliform bacteria from industrial wastewaters using polyelectrolytes/silver
nanoparticles self-assembled thin films. *Journal of Environmental Chemical
Engineering*, 4, 1, 137 – 146.