

**FILMES POLIMÉRICOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA FORNECEM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS**Sabrina da Costa Brito^{1,2,*}, Joana D. Bresolin², Kátia Sivieri¹, Marcos David Ferreira^{1,2}¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rodovia Araraquara Jaú, Km 01, Araraquara, SP, 14800-903, Brasil² Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, Caixa Postal 741, São Carlos, SP, 13560-970, Brasil

* Autor correspondente, e-mail: scbrito@yahoo.com.br

Resumo: As inovações tecnológicas nas embalagens visam otimizar a prevenção das contaminações microbiológicas, garantindo assim uma melhor conservação e segurança alimentar, neste contexto este trabalho avaliou o efeito antimicrobiano de filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporados com nanopartículas de prata (NPsAg) em diferentes concentrações, sendo elas 1,50, 15,00 e 75,00 µg/mL. A análise da eficácia antimicrobiana dos filmes foi realizada utilizando o Teste de Atividade Antimicrobiana de Contato e Teste de Agitação em Frasco nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. De acordo com os resultados, a adição de NPsAg ao PEBD promove propriedades antimicrobianas contra os microrganismos estudados, sendo a inibição microbiana maior em bactérias Gram-negativas do que nas bactérias Gram-positivas, e observou-se que os filmes nanoestruturados inibiram o crescimento e a reprodução de células bacterianas durante os estágios iniciais. Esses resultados sugerem que os filmes de PEBD aditivado com NPsAg podem contribuir significativamente para a qualidade e segurança dos alimentos.

Palavras-chave: Polietileno, Nanopartículas de Prata, Antimicrobiano, Embalagem Alimentícia.

**POLYMERIC FILMS OF SILVER NANOPARTICLES PROVIDE ANTIMICROBIAL
ACTIVITY IN FOOD PACKAGING**

Abstract: Technological innovations in packaging aim to optimize the prevention of microbiological contamination, thus being able to guarantee a better conservation and food safety, in this case this work has evaluated the antimicrobial effect of low-density polyethylene (LDPE) films incorporated with silver nanoparticles (AgNPs) at different concentrations, namely 1.50, 15.00 and 75.00 µg/mL. The antimicrobial efficacy analysis of the films was performed using the Contact Antimicrobial Activity Test and Flask Shaking Test on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. According to the results, the addition of AgNPs to LDPE promotes antimicrobial properties against the studied microorganisms, and the microbial inhibition was higher in Gram-negative than Gram-positive bacteria, and it was observed that nanostructured films inhibited growth and reproduction of bacterial cells during the early stages. These results suggest that NPsAg additive LDPE films can contribute significantly to food quality and safety.

Keywords: Polyethylene, Silver Nanoparticles, Antimicrobial, Food Packaging.

1. Introdução

As embalagens têm como principal propósito proteger os alimentos contra qualquer ação de deterioração, sendo está podendo ser proporcionada por contaminações químicas, físicas ou biológicas, desde seu acondicionamento até o consumo final, visando a prolongação da *shelf life* do produto alimentício (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; PIRINGER; BANER, 2000).

Dentre as ações que contribuem para uma melhora da qualidade dos alimentos ofertados ao consumidor estão investimentos em infraestrutura de transportes, melhorias nos

sistemas de refrigeração, boas práticas de fabricação durante o processamento e inovações tecnológicas em embalagens (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; PEIXOTO; PINTO, 2016).

Relacionado as inovações tecnológicas, a aplicação da nanotecnologia em embalagens destinadas à indústria de alimentos tem contribuído para buscar soluções anteriormente consideradas um obstáculo, como o curto tempo de prateleira (CHAUDHRY et al., 2008), estas embalagens visam aprimorar a prevenção de contaminações, em especial aquelas proporcionadas por microrganismos, e assim melhorando a conservação e segurança dos alimentos (BRODY et al., 2008; MARSH; BUGUSU, 2007; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Devido a isso, vem sendo apresentada uma nova geração de embalagens ativas para alimentos, como as embalagens nanoestruturadas à base de nanopartículas metálicas (Greiner, 2009), estas apresentam um ótimo desempenho em suas atividades antimicrobianas e isso se dá devido a sua elevada proporção de área superficial e volume (DAMM; NEUMANN; MÜNSTEDT, 2005). Dentre as nanopartículas metálicas estão as nanopartículas de prata (NPsAg), que além de apresentarem intensa ação antimicrobiana (KIM et al., 2007; RUPARELIA et al., 2008; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004), é uma das substâncias mais utilizadas em conjunto com materiais poliméricos (BECARO et al., 2015; DEHNAVI et al., 2012; JOKAR et al., 2012)

Desta forma, este projeto teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de embalagens poliméricas aditivadas com NPsAg em relação a propriedades antimicrobianas por meio de análises *in vitro*, visando melhorar a qualidade físico-química e microbiológica dos alimentos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Foi utilizado masterbatch de base de PEBD, contendo em sua formulação NPsAg dispersas no carregador de sílica (SiO_2) nas concentrações de 1.50, 15.00 e 75.00 $\mu\text{g/mL}$ e como controle foi utilizado o filme de PEBD sem a adição de NPsAg. Os masterbatches foram obtidos de uma empresa de nanotecnologia e os filmes foram produzidos em uma fábrica de embalagens plásticas. Ambas as empresas estão sediadas em São Carlos / SP.

2.2. Atividade Antimicrobiana por Contato

Para o teste de atividade antimicrobiana por contato, as colônias das bactérias foram inoculadas caldo de soja trip-caseína (TSB) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as bactérias foram centrifugadas (Hettich zentrifugen Rotina-390) e o sobrenadante foi descartado para em seguida estas células serem ressuspensas em solução salina (0.9%). O inóculo de microrganismo foi ajustado na concentração de UFC/mL de 10^5 (PAGNO et al., 2015).

Os filmes com NPsAg e controle foram cortados em quadrados pequenos e desinfetados por imersão em álcool etílico 70% por 15 minutos, para posteriormente serem acomodados na parede interna dos tubos Eppendorf (PAGNO et al., 2015).

Nos tubos foram adicionados 500 μL de suspensão microbiana e incubados em agitação suave na incubadora rotativa por 24 horas a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) (PAGNO et al., 2015).

Posteriormente, foi retirada uma alíquota da suspensão microbiana para se obter diluições seriadas, e de cada diluição 10 μL da solução microbiana foi semeada no meio ágar triptona de soja (TSA); para em seguida serem incubadas a 37°C em 24 h (PAGNO et al., 2015).

As células viáveis em cada uma das placas, inoculadas com microrganismos, foram contadas para quantificação da formação de colônias. (PAGNO et al., 2015).

2.3. Teste de Agitação em Frasco

No teste de agitação em frasco, os filmes com NPsAg e controle foram cortados em quadrados pequenos, desinfetados por imersão em álcool etílico 70% por 15 minutos, e posteriormente imersos em 100 mL de TSB (JOKAR et al., 2012).

Em um erlenmeyer contendo TSB com os corpos de prova e 0.4 g de tween 80 foi inoculado 1 mL de cada bactéria, ajustados na concentração de 10^5 UFC/mL. Na sequência foram incubados sob agitação a 37°C , sendo que a cada duas horas uma alíquota de amostra era retirada para acompanhamento do crescimento microbiano por meio da leitura de absorbância a 600 nm pelo espectrômetro de Ultravioleta – Visível (UV-Vis) (JOKAR et al., 2012).

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade Microbiana por Contato

Os resultados obtidos pela atividade microbiana por contato mostraram que os filmes nanoestruturados exibiram ações antimicrobianas contra os microrganismos estudados (Tabela 1).

Pode ser observado que *S.aureus* e *E.coli* apresentaram uma redução de UFC/mL a partir da concentração NPsAg 1.50 $\mu\text{g/mL}$, porém ao contrário da bactéria Gram negativa a *S. aureus* começou a apresentar diferenças significativas ($p \leq 0.05$) com o controle negativo a partir da concentração 7.50 $\mu\text{g/mL}$ sugerindo que a inibição das bactérias Gram negativas foi significativamente maior que das bactérias Gram positivas, além disso, foi verificado que quanto maior a concentração de NPsAg nos corpos de prova há um aumento na inibição, sugerindo uma maior eficácia de agente antimicrobiano dos filmes PEBD com o acréscimo de NPsAg; similares aos resultados observados por Ruparelia et al.(2008) em um estudo de efeito bactericida de NPsAg em *E.coli* e *S.aureus*.

Tabela 1. Distribuição dos valores relativos à média e \pm desvio padrão de contagens (UFC/ml) de *S. aureus*, e *E.coli* em relação ao controle negativo e aos corpos de prova nanoestruturados ($\mu\text{g/mL}$).

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	<i>S.aureus</i> (UFC/ml)	<i>E.coli</i> (UFC/ml)
Controle Negativo	162.2 \pm 68.3 ^a	157.6 \pm 21.0 ^a
1.50	108.3 \pm 43.0 ^{ab}	117.9 \pm 4.2 ^b
15.00	65.8 \pm 3.6 ^b	38.7 \pm 8.2 ^d
75.00	48.1 \pm 2.5 ^c	1.9 \pm 1.1 ^f

*Médias seguidas da mesma letra, entre as linhas, não são significativamente diferentes pelo teste de Games-Howell ($p > 0.05$).

**Análises realizadas em triplicada.

Os resultados encontrados sugerem que o efeito antimicrobiano das NPsAg pode estar associado com as características de certas espécies de bactérias. As bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças na estrutura da membrana, sendo a mais distinta a espessura da camada de peptidoglicano, que tem como função essencial proteger a bactéria contra agentes antibacterianos. As Gram positivas por apresentarem uma espessura de peptidoglicano superior as Gram negativas, podem se proteger com maior eficácia da formação de rupturas na sua membrana celular, corroborando com os valores de inibição apresentados nesta pesquisa (KIM et al., 2007; KIM; LEE; RYU, 2011; RUPARELIA et al., 2008).

3.2. Teste de Agitação em Frasco

Os resultados obtidos, por meio do teste de agitação em frasco, mostram que os filmes nanoestruturados influenciaram na cinética de crescimento da *S.aureus* e *E.coli*, como pode ser observado nas figura 1.

Desta forma, ocorre um claro indicativo que os filmes nanoestruturados promoveram inibição no crescimento e na reprodução de células bacterianas logo nos primeiros estágios. Corroborando ao que foi observado na pesquisa de Sadeghnejad et al. (2014), onde ao testar a ação antimicrobiana de filmes de polietileno com NPsAg contra *S.aureus* e *E.coli* no teste de agitação em frasco, verificou que a NPsAg influenciou nas fases lag e log de ambas bactérias. Também pode ser verificado que quanto maior a concentração (ppm) de NPsAg nos filmes de PEBD maior é a sua influência na cinética de crescimento das bactérias estudadas.

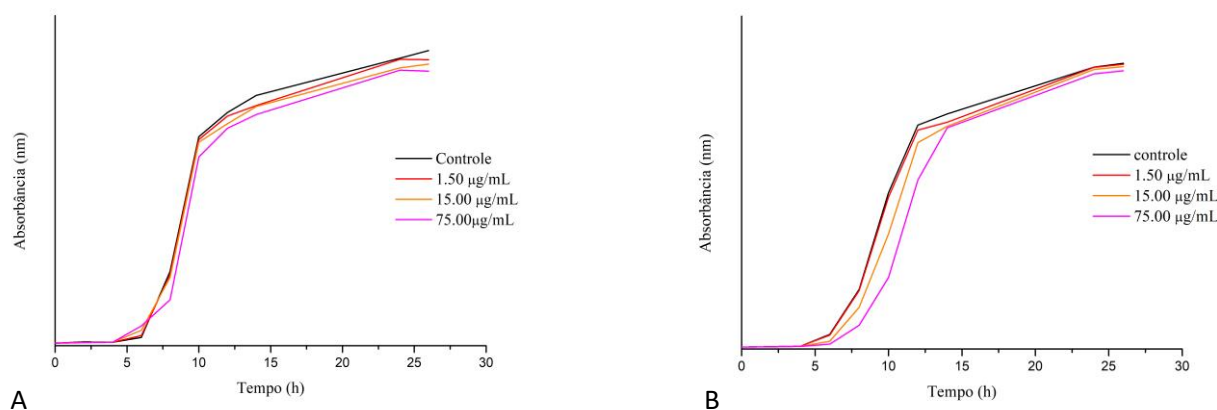


Figura 1. Curva de crescimento relativo aos corpos de prova controle e nanoestruturado em *S. aureus* (A) e *E. coli* (B)

4. Conclusões

Os filmes PEBD + NPsAg, foram eficazes na inibição dos microrganismos estudados, sendo que a NPsAg apresentou uma ação antimicrobiana maior em bactérias Gram negativas. Os resultados demonstraram o potencial na utilização do polietileno de baixa densidade aditivados com nanopartículas de prata na ação antimicrobiana em embalagens de alimentos, podendo auxiliar na manutenção da qualidade e redução de riscos de contaminação de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código Financeiro 1633026, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, projeto 13.16.04.041.00.00) para suporte técnico e financeiro.

Referências

- BECARO, A. A. et al. Polyethylene Films Containing Silver Nanoparticles for Applications in Food Packaging: Characterization of Physico-Chemical and Anti-Microbial Properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 2148–2156, 2015.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução - RDC N 275, de 21 de outubro de 2002. **Anvisa**, v. 2002, p. 1–23, 2002.
- BRODY, A. L. et al. Innovative food packaging solutions. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. 107–116, 2008.
- CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 25, n. 3, p. 241–258, 2008.
- DAMM, C.; NEUMANN, M.; MÜNSTEDT, H. Properties of nanosilver coatings on polymethyl methacrylate. **Soft Materials**, v. 3, n. 2–3, p. 71–88, 2005.
- DEHNAVI, A. et al. Preparation and characterization of polyethylene/silver nanocomposite films with antibacterial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 2, p. 1180–1190, 2012.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. Embalagens para alimentos. In: **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008. p. 512.
- GREINER, R. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. **Nutrire: journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 243–260, 2009.
- JOKAR, M. et al. Melt Production and Antimicrobial Efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 719–728, 2012.

- KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.
- KIM, S.; LEE, H.; RYU, D. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean J Microbiol ...**, v. 39, n. 1, p. 77–85, 2011.
- MARSH, K.; BUGUSU, B. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, p. 39–55, 2007.
- MIHINDUKULASURIYA, S.; LIM, L. Nanotechnology development in food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 149–167, 2014.
- PAGNO, C. H. et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 755–762, 2015.
- PEIXOTO, M.; PINTO, H. **Desperdício de alimentos: Questões socioambientais, econômicas e regulatórias**. Disponível em:
<<https://www12.senado.leg.br/publicacoes/estudoslegislativos/tipos-de-estudos/boletins-legislativos/bol41>>. Acesso em: 20 jul. 2016.
- PIRINGER, O. G.; BANER, A. L. **Plastic Packaging Materials for Food: Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance, and Legislation**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.
- RUPARELIA, J. P. et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 3, p. 707–716, 2008.
- SADEGHNEJAD, A. et al. Antibacterial nano silver coating on the surface of polyethylene films using corona discharge. **Surface and Coatings Technology**, v. 245, p. 1–8, 2014.
- SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.