

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS METÁLICOS

(Fernanda Elisa Arab^{1,2}; Elaine Cristina Paris²; Clóvis Wesley Oliveira de Souza¹; Marcos David Ferreira^{1,2})

¹PPG Biotecnologia – UFSCar, São Carlos, SP. fee.arab@gmail.com

²Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP.

Classificação: processamento de filmes nanoestruturados para embalagens de alimentos

Resumo

Muitas doenças são transmitidas através de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, podendo repercutir grande impacto, como exemplo, os surtos alimentares que afetam a população. Os avanços atuais no campo da nanobiotecnologia, particularmente a capacidade de desenvolver nanomateriais de óxido metálico de tamanho e forma específicos, provavelmente levarão ao desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. As atividades funcionais das nanopartículas são influenciadas em grande parte pelo tamanho das partículas. Desta forma, o objetivo principal desse trabalho foi sintetizar, pelo método de precipitação, nanopartículas de óxido de zinco e óxido de cobre e testar a atividade antimicrobiana dessas nanopartículas inorgânicas contra bactérias presentes em alimentos, como a *Staphylococcus aureus* e a *Salmonella*. Para ambas as nanopartículas foram observadas as formações dos halos de inibição para a bactéria *S. aureus* (Gram – positiva), porém a inibição não ocorreu para a *Salmonella* (Gram – negativa). Tal fato pode estar relacionado a diferença da parede celular dos dois grupos de bactérias.

Palavras-chave: Alimentos; Bactérias; Embalagens; Inibição; Nanomateriais.

Evaluation of the antimicrobial effect of metal oxides

Abstract

Many diseases are transmitted through contaminated food with pathogenic microorganisms, which can have a great impact, such as, food outbreaks affecting the population. Current advances in the field of nanobiotechnology, particularly the ability to develop metal oxide nanomaterials of specific size and shape, will likely lead to the development of new antibacterial agents. The functional activities of the nanoparticles are influenced to a great extent by the size of the particles. Therefore, the main objective of the work was to synthesize by the precipitation method nanoparticles of zinc oxide and copper oxide and to test the antimicrobial activity of these inorganic nanoparticles against bacteria present in foods, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. For both nanoparticles, the formation of the inhibition halo was observed for the bacteria *S. aureus* (Gram - positive), but inhibition didn't happen for *Salmonella* (Gram - negative). This fact can be related to the difference in the cell wall of the two groups of bacteria.

Keywords: Foods; Bacteria; Packaging; Inhibition; Nanomaterials

1 INTRODUÇÃO

Anteriormente, para a conservação de alimentos observava-se mais a aparência, tamanho e integridade das embalagens, todavia, atualmente ocorre um maior enfoque em promover a qualidade e a segurança alimentar. Para isso, o uso de antimicrobianos em embalagens de alimentos vem ganhando destaque devido ao grande interesse pelas indústrias (CHA; CHINNAN, 2004). O uso de antimicrobianos em embalagens são eficazes para inibir ou retardar o crescimento de microrganismos, assim como estender o prazo de validade dos alimentos (ASSIS, 2012; LACOSTE et al., 2005). A utilização da nanotecnologia como alternativa na melhoria da vida útil dos alimentos é muito promissora, como no caso da fabricação de embalagens ativas (PUTI, et al., 2015).

Durante o transporte e armazenamento os alimentos são expostos a condições que podem alterar sua qualidade. A causa mais comum de sua deterioração é o crescimento de microrganismos na

superfície dos alimentos (ORTS et al., 2005). O crescimento microbiano pode ser controlado por meio da incorporação de agentes antimicrobianos nas embalagens, como exemplo, a incorporação de nanopartículas em filmes.

O efeito bactericida das nanopartículas metálicas tem sido relacionada ao seu pequeno tamanho e elevada relação superfície/volume, permitindo interagir com as membranas microbianas. Estudos com nanopartículas de óxido de cobre mostraram-se favoráveis como agentes bactericidas (RUPARELIA, et al., 2008). Vale ressaltar, no entanto no risco de exposição dos consumidores à migração dessas nanopartículas para os alimentos (BECARO, et al., 2015). Primeiros estudos com o óxido de zinco (ZnO) como agente antimicrobiano começou na década de 1950, sendo atualmente um dos cinco compostos de zinco listados como reconhecidamente seguro pela *U.S. Food and Drug Administration*. O óxido de zinco é um antimicrobiano promissor devido à sua atividade contra uma vasta gama de microrganismos (ESPITIA, et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de sintetizar essas nanopartículas (ZnO e CuO) e avaliar o efeito antimicrobiano de cada uma delas contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, com o propósito de investir em processos que retardam/inibem o crescimento de microrganismos, como o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas. Dentre as principais contribuições desse desenvolvimento estão as estratégias nanotecnológicas para melhorar a conservação de frutas e hortaliças, aumentando sua vida útil; assegurar a qualidade do produto; minimizar perdas de alimentos; melhorar a aparência; aumentar a comercialização devido um consumidor mais satisfeito, proporcionando ganhos para a cadeia produtiva e de consumo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Ambas as sínteses foram realizadas pelo método de precipitação com base em alguns trabalhos na literatura (BURDA, et al., 2005; KOUTSOPOULOS, 2002; ZHU, et al., 2004).

Para a síntese de ZnO foram utilizados o nitrato de zinco como precursor e o hidróxido de potássio como agente redutor, sendo uma quantidade suficiente para produzir 1g de ZnO. Para isso, foi preparado em um béquer de 250ml, uma solução de 50ml de água Mili-Q e 3,68g de Zn (NO₃)₂, mantidos sob agitação. Em seguida, 10ml de solução de KOH 6M foi vertida aos poucos no béquer até atingir o pH 14, e assim foi mantido sob agitação por 1h. Após transcorrido o tempo, transferiu-se a solução para tubos Falcon de 50ml. Para que os tubos tivessem o mesmo peso acrescentou-se água Mili-Q. Os tubos foram centrifugados a 7 °C, a 11000 rpm por 15 minutos. Após centrifugar, descartou-se o sobrenadante e o precipitado branco ficou no fundo dos tubos. Novamente acrescentou-se água Mili-Q até aproximadamente 40ml e realizou-se o mesmo procedimento de pesagem dos tubos e centrifugou-se. Esse processo foi repetido até a solução atingir o pH 7. Quando isso ocorre, centrifuga-se mais uma vez nas mesmas condições. No caso foi realizado 3 centrifugações até atingir o pH desejado. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sólido branco foi disperso com etanol. A suspensão de etanol e ZnO foi transferida para uma placa de petri coberta com papel alumínio com alguns furos e colocada na estufa a 60°C *overnight*. No dia seguinte, a placa de petri foi retirada da estufa e o pó formado (coloração branca) foi macerado para desaglomerar. A amostra foi guardada em um tubo Eppendorf.

O procedimento para a síntese de CuO foi praticamente o mesmo, apenas alterando os agentes, que foram o hidróxido de sódio e o nitrato de cobre. Os parâmetros utilizados foram iguais ao da síntese de ZnO até a etapa de retirar o pó da estufa. Após isso, a amostra foi colocada na mufla a 300°C por 2 horas a uma velocidade de 10°C/min. Quando o processo terminou, a amostra, agora com coloração escura, foi retirada da mufla e macerada no almofariz e então guardada em um tubo Eppendorf.

Para o teste de difusão, este trabalho teve como base a metodologia de Bauer et al. (1996). O teste foi realizado com bactérias Gram-positiva, a *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa, a *Salmonella*. Inicialmente, foram preparados os meios de cultura: 1) Müller-Hinton Agar para as placas de petri; 2) Müller-Hinton Broth depositado em tubos Falcon para o posterior crescimento das bactérias. Ambos os meios foram autoclavados. Posteriormente, foram inoculadas as bactérias no meio Müller-Hinton Broth que foram preparados em tubos Falcon e incubados *overnight* na estufa a 35 °C. No dia seguinte, com base na escala McFarland 0,5, a concentração de células bacterianas de cada tubo foi ajustada por diluições sequenciais até uma concentração final de 10⁻⁶ UFC/mL. Na sequência,

100 μ L das amostras diluídas foram colocadas na placa de petri e espalhadas com o auxílio da alça de drigalski, e depois as nanopartículas foram depositadas nas placas. Todas as placas foram feitas em triplicata. As placas controle foram realizadas para ambas as bactérias. As placas foram deixadas na estufa em temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por um período de aproximadamente 24 horas. Após esse período os resultados da formação dos halos foram visualizados. Os halos de inibição foram medidos em relação ao seu diâmetro com o auxílio de um paquímetro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a formação do halo de inibição foram positivos para a bactéria *S.aureus* para as duas nanopartículas testadas. Porém, não houve visualização do halo para a *Salmonella* em nenhum dos casos, como podemos observar na Figura 1. Os diâmetros medidos podem ser visualizados na Tabela 1.

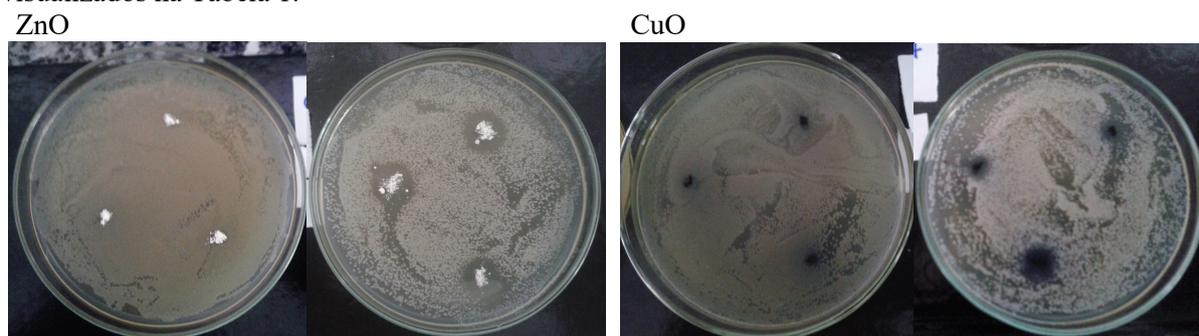


Figura 1. Resultado do teste de difusão. Ambas as imagens à esquerda se referem a *Salmonella* e à direita se referem a *S.aureus*

Tabela 1. Valores dos diâmetros dos halos de inibição referentes a bactéria *S.aureus*

Nanopartículas	<i>S. aureus</i>	
	ZnO	CuO
Diâmetro	14,2mm \pm 0,05mm	6,2mm \pm 0,05mm
	14,5mm \pm 0,05mm	8,5mm \pm 0,05mm
	13,3mm \pm 0,05mm	11,6mm \pm 0,05mm

A atividade bactericida de tais nanopartículas depende, em parte, do tamanho, da estabilidade e da concentração no meio de crescimento, bem como da CFU de bactérias usadas nos experimentos. O crescimento da população bacteriana pode ser inibido por interações específicas de nanopartículas (RAGHUPATI; KOODALI; MANNA, 2011). Segundo estudos os mecanismos de ação inibitória das nanopartículas podem estar relacionados com a perda da capacidade de replicação do DNA da bactéria e a inativação das proteínas celulares. Acredita-se também na ação das nanopartículas na atividade da desidrogenase da cadeia respiratória das bactérias (GOMAA, 2016). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos naturais do metabolismo de organismos respiradores. Enquanto níveis pequenos podem ser controlados pelas defesas antioxidantes das células, um excesso da produção de ROS pode conduzir a um estresse oxidativo. A adição de radicais livres pode atacar lipídios da membrana e ocasionar uma quebra desta, prejudicando a função mitocondrial ou ocasionando danos ao DNA (GOMAA, 2016; NEL et al., 2006). Em estudos de Russell (2003), as bactérias Gram-negativas mostraram-se menos sensíveis às espécies reativas de oxigênio em relação as Gram-positivas. Um dos principais motivos apontado para a maior resistência seria a diferença estrutural na membrana bacteriana de ambos os grupos.

4 CONCLUSÃO

O ensaio realizado para avaliação do potencial antimicrobiano das nanopartículas foram satisfatórios, pois podemos confirmar o efeito inibitório das amostras sintetizadas contra uma das bactérias. Porém, os resultados foram baseados em uma análise qualitativa (ensaio prévio), ou seja, se houve ou não a inibição, apesar das medidas dos diâmetros. Observamos que de forma geral a bactéria *S. aureus* foi inibida por todas as nanopartículas, mas a *Salmonella* não foi inibida por nenhuma. Mas

é necessário a realização de uma avaliação quantitativa, como a curva de crescimento bacteriano para monitorar o tempo e a concentração inibitória das nanopartículas em relação a curva de crescimento padrão. O resultado foi positivo para a bactéria Gram – positiva, em decorrência, provavelmente, das diferenças na composição das paredes celulares entre os grupos.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Instrumentação por toda estrutura proporcionada para a realização do meu projeto e à CAPES pela bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, L. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- BAUER A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966 Apr;45(4):493-6.
- BECARO, A. A. et al. Postharvest quality of fresh-cut carrots packaged in plastic films containing silver nanoparticles. *Food Bioprocess Technol*. Volume 9, [Issue 4](#), pp 637–649, 2015.
- BURDA, C. et al. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.*, 2005. 105(4): p. 1025-1102.
- CHA, D. S.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Review Food Science and Nutrition*. United Kingdom, v 44, n 4, p 223-37, 2004.
- ESPITIA, P. J. P. et al. A. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Technol*. 5:1447-1464, 2012.
- GOMAA, E. Z. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol*. Mar, 17;63(1):36-43. 2017.
- KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002. 62(4): p. 600-612.
- LACOSTE, A. et al. Advancing controlled release packaging through smart blending. *Packaging Technology and Science*, Inglaterra, v. 18, n. 2, p. 77-87, 2005.
- NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622–627 (2006).
- ORTS, W. J. et al. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites. *Journal of Polymers and the Environment*, 13(4): 301,2005.
- PUTI, F. C. 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, 2148-2156, 2015.
- RAGHUPATI K.R.; KOODALI R.T.; MANNA A.C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2011; 27:4020–4028.
- RUPARELIA, J. P. et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater*. 4(3):707-16, 2008.
- RUSSELL, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 750–763.
- ZHU, J. et al. “Highly dispersed CuO nanoparticles prepared by a novel quick-precipitation method”. *Mater. Lett.*, 58 (26): 3324, 2004.