
PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO COLORIMÉTRICO DE ENSAIO ANTIMICROBIANO DE NANOESTRUTURAS DE ALUMINA

Daniel B. Ortega^{1,2}, Magali A. Rodrigues^{1,3}, Ailla O. Motta⁴, Beatriz S. Magalhães⁴, Marcelo P. Bemquerer¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372, Brasília-DF.

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF.

³ Centro Universitário Planalto do Distrito Federal, Av. Pau Brasil, lote 02 S/N - Águas Claras, Brasília-DF.

⁴ Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B Avenida W5, Brasília-DF.

ortegadnl@gmail.com, magarodrig@gmail.com, ailla.motta@gmail.com, magalhaes.bs@gmail.com, marcelo.bemquerer@embrapa.br

Projeto Componente: PC3 Plano de Ação: PA4

Resumo

Nanoestruturas metálicas como a alumina são insolúveis em meios aquosos, portanto os ensaios de atividade antimicrobiana baseados em medidas de turbidimetria não distinguem a absorbância oriunda da proliferação de micro-organismos do espalhamento de luz causado pelas nanopartículas. Ensaio colorimétrico que monitorem a formação de espécies reduzidas devido ao metabolismo celular podem ser alternativas eficazes. Este trabalho padronizou o ensaio colorimétrico descrito por MOSMANN (1983) e mostrou que suspensões de alumina modificada com APTES, a 2 mg.mL⁻¹, foram capazes de suprimir a viabilidade celular de *Escherichia coli* enquanto suspensões de alumina não modificada se mostraram inativas.

Palavras-chave: nanoestruturas de alumina, ensaio de atividade antimicrobiana, formazan, peptídeo antimicrobiano, método colorimétrico.

Introdução

A síntese de materiais híbridos constituídos de uma matriz inorgânica como sílica ou alumina modificada com uma molécula orgânica antimicrobiana pode ter aplicações variadas em agricultura, tais como no combate de fungos fitopatogênicos e na incorporação em embalagens de alimentos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

A preparação de nanoestruturas de alumina e a derivatização de sua superfície com (3-aminopropil)triethoxissilano tem permitido a obtenção de materiais aminados que podem ser modificados com peptídeos antimicrobianos ou com outras moléculas carboxiladas. Ainda que os materiais obtidos sejam nanoestruturados, as condições de ensaio de atividade antimicrobiana podem levar à formação de agregados e a problemas de turbidez. Metodologias clássicas de verificação de crescimento microbiano como os ensaios de turbidimetria e a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após a exposição a nanopartículas têm sido relatadas (DHAS *et al.*, 2013). Entretanto, métodos colorimétricos

baseados em atividade metabólica celular podem ser mais sensíveis para o ensaio de atuação antimicrobiana de partículas nanométricas (MOSMANN, 1983). O fundamento deste método é a redução por hidrogenação de um metabólito exógeno que causa a variação no perfil de absorbância. Partículas nanoestruturadas de alumina, de alumina derivatizada com (3-aminopropil)triethoxissilano e desta alumina aminada ligada covalentemente ao peptídeo sintético H-GILEAIKAIKAAG-NH₂ foram ensaiadas quanto à atividade inibitória do crescimento da bactéria *Escherichia coli*.

Materiais e métodos

A alumina nanoestruturada foi preparada a partir de Al(NO₃)₃ e NaCO₃ de acordo com a metodologia de POTDAR *et al.* (2007). As partículas obtidas foram derivatizadas com (3-aminopropil) triethoxissilano para a obtenção da alumina aminada. O peptídeo H-GILEAIKAIKAAG-NH₂ foi sintetizado pelo método da fase sólida e purificado por

cromatografia líquida de fase reversa. O peptídeo foi ligado covalentemente à alumina aminada por meio de ativação com diisopropilcarbodiimida. A atividade antimicrobiana das nanoestruturas foi determinada por adaptação do método colorimétrico que se baseia em redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium, MTT) para o respectivo formazan (MOSMANN, 1983). A leitura de absorbância foi conduzida a 600 nm após 12-24h de incubação em meio de cultura Mueller-Hinton. As células bacterianas e as nanoestruturas foram removidas por centrifugação antes da leitura de absorbância.

Micrografias eletrônicas de transmissão das nanoestruturas de alumina foram obtidas em um equipamento modelo 10-11 da JEOL (Tokyo, Japão) após a deposição das partículas sobre um filme de Formvar colocado sobre a tela de cobre.

Resultados e discussão

A síntese das nanoestruturas de alumina, a derivatização com (3-aminopropil)triethoxissilano e a modificação com o peptídeo antimicrobiano H-GILEAIKAIKAAG-NH₂ já foram descritas (BEMQUERER *et al.*, 2008). A micrografia eletrônica das nanopartículas de alumina mostra a obtenção de partículas em escala nanométrica, mas com um grau elevado de agregação, possivelmente por serem partículas eletricamente neutras (Fig.1). Imagens das partículas aminadas e de partículas modificadas covalentemente com o peptídeo antimicrobiano serão obtidas para a verificação do estado de agregação após a introdução de grupos catiônicos na superfície da alumina.

Para a padronização do método colorimétrico de ensaio antimicrobiano, o ensaio foi inicialmente conduzido com o peptídeo antimicrobiano H-GILEAIKAIKIAG-NH₂. Após otimizações metodológicas, verificou-se que a concentração inibitória mínima determinada coincide com aquela obtida por medida direta de absorbância a 600 nm, que é devida à turbidez causada pelas células antimicrobianas (Fig. 2).

A etapa seguinte foi a verificação de que a quantidade de 1.5×10^4 UFC.mL⁻¹ fornece uma concentração de formazan com absorbância da ordem de 1 A.U. após 5-6 h de crescimento.

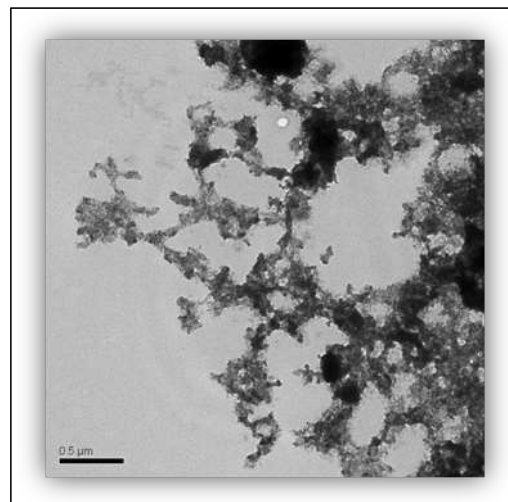


Fig 1. Micrografia eletrônica de transmissão das nanoestruturas de alumina obtidas a partir de Al(NO₃)₃ e NaCO₃.

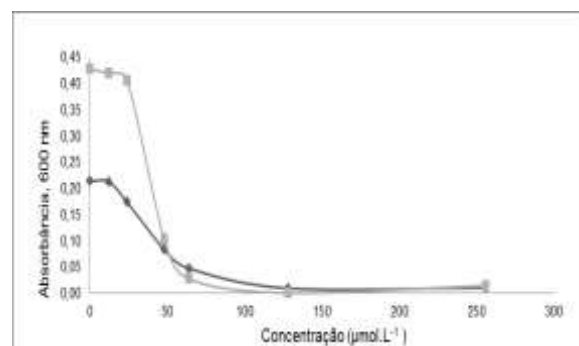


Fig 2. Determinação de concentração inibitória mínima do peptídeo H-GILEAIKAIKAAG-NH₂ sobre o crescimento de *E. coli*.

(■) ensaio colorimétrico; (◆) ensaio pelo método de turbidimetria.

Resultados preliminares mostraram que suspensões de alumina modificada com (3-aminopropil)triethoxissilano, a 2 mg.mL⁻¹, foram capazes de suprimir a viabilidade celular de *E. coli*, enquanto suspensões de alumina não modificada ainda se mostraram inativas (Fig. 3).

Após repetições experimentais para a verificação deste resultado, testaremos a hipótese de potencialização da atividade antimicrobiana com a incorporação do peptídeo.

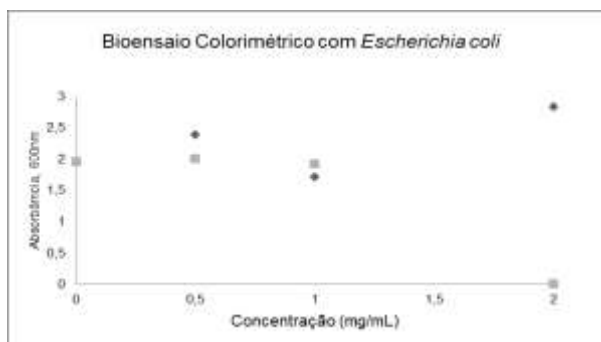


Fig 3 Bioensaio colorimétrico apresentando as variações referentes às leituras de absorbância em cultura de *E. coli* na presença de nanoestruturas de alumina livre (◆) e nanoestruturas de alumina modificadas com (3-aminopropil)triethoxissilano (■).

Conclusões

Após a padronização do ensaio colorimétrico baseado em metabolismo celular (MOSMANN, 1983), a análise de viabilidade celular bacteriana na presença de nanopartículas de alumina mostrou-se eficaz, possibilitando sua utilização em ensaios de atividade antimicrobiana de nanoestruturas insolúveis como a alumina. Além disso, a modificação de nanopartículas de alumina com APTES altera consideravelmente a ação antimicrobiana da nanoestrutura na proliferação de *Escherichia coli*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes, FAP-DF e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

Referências

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 113-126, 2002.

BEMQUERER, M. P.; RODRIGUES, M. A.; MAGALHÃES, M. T. Q.; SOUSA, M. H.; SILVA, L. P.; BLOCH JR, C. Alumina nanotubes derivatized with synthetic antimicrobial peptides. In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2008, Guarujá-SP. Anais do VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2008. p. H544.

DHAS, S. P.; SHINY, P. J.; KHAN, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N.

Toxic behavior of silver and zinc oxide nanoparticles on environmental microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, Chichester, in press, 2013.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, Palo Alto, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dezembro 1983

POTDAR, H. S.; JUN, K-W.; BAE, J. W.; KIM, S-M; LEE J. L. Synthesis of nano-sized porous γ -alumina powder via a precipitation/digestion route. *Applied Catalysis A: General*, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 109-116, 2007.