

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM FILMES POLIMÉRICOS

*Sabrina da Costa Brito¹, Katia Sivieri¹
Marcos David Ferreira²

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo. ²Embrapa Instrumentação, São Carlos, São Paulo.

*scbrito@yahoo.com.br

Classificação: *Processamento de filmes nanoestruturados para embalagens e conservação de alimentos.*

Resumo:

É estimado que cerca de 54% do desperdício de alimentos no mundo ocorra na produção, manipulação pós colheita e durante o armazenamento dos produtos e os 46% restantes é por meio do processamento e durante a distribuição, além disso, microrganismos deteriorantes e patogênicos também contribuem para incrementar as perdas de produtos alimentícios. Dentre as ações que podem ser desenvolvidas para reduzir o desperdício de alimentos está a inovação tecnológica em embalagens eficientes, com o propósito de prevenir contaminações físicas, químicas e biológicas, como a incorporação de nanopartículas de prata (NPsAg) em filmes poliméricos. Este trabalho teve como objetivo investigar a eficácia antimicrobiana dos filmes polietileno de baixa densidade (PEBD) contendo NPsAg com carregador de sílica (SiO₂), em diferentes concentrações (ppm) por filme em determinados patógenos. A análise microbiológica foi realizada por meio do teste de atividade microbiana por contato nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos mostram que os filmes nanoestruturados apresentam ação biocida contra os microrganismos estudados, sendo que a ação antimicrobiana foi maior em Gram negativas do que as Gram positivas.

Palavras – chave: Nanotecnologia; Nanopartículas de prata; Antimicrobianas; Embalagens ativas.

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS IN POLYMERIC FILMS

Abstract:

It is estimated that about 54% of the world's food waste occurs in the production, post-harvest handling and produce storage and the remaining 46% is through the processing and distribution; deteriorating and pathogenic microorganisms also contribute to increase waste losses. Among the actions that can be developed to reduce food waste would be the technological innovations in efficient packaging with the purpose of preventing physical, chemical and biological contaminations, such as the incorporation of silver nanoparticles (NPsAg) in polymer films. This work aimed to investigate the antimicrobial efficacy of low density polyethylene (LDPE) films containing NPsAg with silica loader (SiO₂) in different concentrations (ppm) per film in certain pathogens. The microbiological analysis was carried out by means of the test of microbial activity by contact in the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results show that the nanostructured films present biocidal action against the microorganisms studied and the antimicrobial action was higher in Gram negative than Gram positive.

Keywords: Nanotechnology; Silver nanoparticles; Antimicrobials; Packaging.

1. INTRODUÇÃO

Baseando-se no relatório da Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013), estima-se que anualmente cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são desperdiçados no mundo, sendo que em países em desenvolvimento como o Brasil as causas do desperdício de alimentos estão associadas a limitações financeiras, deficiências de gestão e de técnicas na produção da colheita de

produtos, nas dificuldades de armazenamento, embalagens ineficientes e nas deficientes estruturas de comercialização, além destes fatores o desperdício de alimentos também está associado com contaminações microbiológicas. Os microrganismos, deteriorantes ou patogênicos, promovem alterações da qualidade dos alimentos, incluindo características nutricionais e sensoriais (oxidação, sabor e odor desagradável e alterações indesejáveis na textura e cor) (ESPITIA; BATISTA, 2016; PEIXOTO; PINTO, 2016). A aplicação de embalagens eficientes podem prevenir contaminações físicas, químicas e biológicas. A inclusão da nanotecnologia em embalagens para alimentos oferece soluções que até então eram consideradas obstáculos, como o curto tempo de prateleira, e devido a isso uma nova geração de embalagens para produtos alimentícios vem sendo apresentada, como as embalagens com NPSAg, que visa a diminuição microbiana em alimentos (PEIXOTO; PINTO, 2016; JOKAR *et al.*, 2012; IMRAN *et al.*, 2010). Este trabalho objetivou avaliar a ação antimicrobiana de filmes PEBD com NPsAg em diferentes concentrações por ppm em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados filmes PEBD com NPsAg e carregador de SiO₂ e filmes PEBD sem adição de nanopartículas, sendo este o controle. Para o preparo dos filmes PEBD+NPsAg, nas concentrações 15,00 e 75,00 ppm, foi inicialmente preparado uma mistura de prata (Ag) e SiO₂, para serem posteriormente incorporadas em masterbatches. Na preparação dos filmes os masterbatches foram homogeneizados com pelletes de PEBD puro, para depois serem processados em extrusora de filme balão.

Na análise microbiológica as bactérias foram inoculadas em caldo de soja triplicaseína (TSB) e incubados, 37°C por 24 horas, após este período cada microrganismo foi centrifugado, e o sobrenadante foi descartado para em seguida as células serem ressuspensas em solução salina (0,9%). Para o ensaio, cada inóculo de microrganismo foi ajustado em solução salina na concentração 10⁵. Os filmes com NPsAg e o filme controle foram cortados em quadrados de dimensões de (4 cm x 4 cm) 16 cm² e acomodados na parede interna de tubos eppendorf, para seguidamente serem adicionados 500µL de suspensão microbiana e incubados em agitação suave na incubadora rotativa por 24 horas a temperatura ambiente (±25°C). Posteriormente em cada tubo foi retirado uma alíquota da suspensão microbiana, para em seguida obter diluições seriadas em solução salina, sendo cada diluição vigorosamente misturada. De cada diluição 10 µL da solução microbiana foram semeadas no meio ágar tripton de soja (TSA) estas foram incubadas a 37°C por 24h (PAGNO *et al.*, 2015).

As células viáveis em cada uma das placas inoculadas com microrganismos foram contadas quantificando a formação de colônias (UFC/ml) (PAGNO *et al.*, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela atividade microbiana por contato mostraram que os filmes nanoestruturados exibiram ações antimicrobianas contra os microrganismos estudados, , como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos valores relativos à média e ±desvio padrão de contagens (UFC/ml) de *S. aureus* e *E.coli*, em relação aos corpos de prova controle e nanoestruturados (ppm), Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP, 2017.

Concentrações (ppm)	<i>S.aureus</i> (UFC/ml)	<i>E.coli</i> (UFC/ml)
Controle	162,2±68,3	157,6±21,0
15,00	65,8±3,6	38,7±8,2
75,00	48,1±2,5	1,9±1,1

O que pode ser verificado neste estudo é que com o aumento da concentração (ppm) de NPsAg menor é a formação UFC/ml, sugerindo que concentrações maiores de NPsAg são mais eficazes na ação antimicrobiana, além disso, foi observado uma inibição maior na *E. coli*.

A inibição microbiana pelo acréscimo de NPsAg está relacionada a uma maior formação de rupturas na parede celular dos microrganismos, e portanto aumentando a permeabilidade da membrana, resultando na morte celular, além disso, sugerem que o efeito antimicrobiano das NPsAg pode estar associado com as características de certas espécies de bactérias; já que Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças na estrutura da membrana (KIM; LEE; RYU, 2011; MIRZAJANI *et al.*, 2011; RUPARELIA *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2007).

Na Tabela 2 foi realizada uma comparação entre o limite de tolerância de microrganismos em frutas e hortaliças de acordo com a RDC nº212 do Brasil, com a inibição dos corpos de prova nanoestruturados com o microrganismo estabelecido na legislação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; 2001).

Pode ser verificado de acordo com a Tabela 6, que para todos os alimentos selecionados, os filmes ao serem comparados com a tolerância bacteriana da legislação apresentaram \log_{10} UFC/ml menor, ou seja, em todas as concentrações estudadas nesta pesquisa houve uma inibição para *E.coli* tolerável para o consumo destes alimentos.

Tabela 2. Distribuição dos dados de limite máximo aceitável de microrganismo por alimento (\log_{10} UFC/ml), de acordo com RDC nº12, e inibição em \log_{10} UFC/ml dos corpos de prova nanoestruturados (ppm) com os respectivos microrganismos, Embrapa instrumentação, São Carlos/SP, 2017.

Alimentos	Microrganismo e sua Tolerância para Amostra Representativa (\log_{10} UFC/ml)		Microrganismos e concentrações (ppm) (\log_{10} UFC/ml)	
Frutas frescas “in natura”, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.	<i>E.coli/g</i>	3,30	15,00	<i>E.coli</i> 0,81
			75,00	0,04
Hortaliças e legumes “in natura” preparados (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.	<i>E.coli/g</i>	2,30	15,00	<i>E.coli</i> 0,56
			75,00	0,03

4.CONCLUSSÃO

Os filmes nanoestruturados apresentaram ação antimicrobiana promissora com os microrganismos estudados, e, portanto filmes poliméricos antimicrobianos tem potencial para uso em embalagens alimentícias, auxiliando na diminuição de desperdício de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Capes pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC no12, de 02 de Janeiro de 2001. v.53, n.9, p.1689–99, 2001.

ESPITIA, P.J.P.; BATISTA, R.A. Non-thermal food preservation: control of food borne pathogens through active food packaging nanotechnology. In: RAVISHANKAR, K.V. *Advances in Food Biotechnology*. Chichester: Wiley blackwell, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food wastage footprint: Impacts on natural resources [Internet]. 2013 [Acesso em: 20 de julho de 2017]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3347e/i3347e.pdf>.

IMRAN, M.; REVOL-JUNELLES, A.M.; MARTYN, A.; TEHRANY, E.A.; JACQUOT, M.; LINDER, M.; DESOBRY, S. Active food packaging evolution: transformation from micro- to nanotechnology. *Food Sci Nutr.*; v. 50, n. 9, p. 799-821, 2010.

JOKAR, M.; RAHMAN, R.A.; IBRAHIM, N.A.; ABDULLAH, L.C.; TAN, C.P. Melt production and antimicrobial efficiency of low- density polyethylene (ldpe)-silver nanocomposite film. *Food Bioproc Tech.*, v. 5, p. 719-728, 2012.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 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 JMicrobiol.*,v.39, n.1, p.77–85, 2011.

MIRZAJANI, F.; GHASSEMPOUR, A.; ALIAHMADI, A.; ESMAEILI, M.A. Antibacterialeffect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol.*, v.162, n.5, p.542–9, 2011

PAGNO, C.H.; COSTA, T.M.H.; MENEZES, E.W.; BENVENUTRI, E.V.; HERTZ, P.F.; MATTE, C.R.; TOSATI, J.V.; MONTEIRO, A.R.; RIOS, A.O.; FLÔRES, .S.H. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chem.* v.173, p.755- 762, 2015

PEIXOTO, M.; PINTO H.S. Desperdício de alimentos: Questões socioambientais, econômicas e regulatórias [Internet]. Boletim Legislativo nº41. 2016 [acesso em: Acesso em: 20 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/publicacoes/estudoslegislativos/tipos-de-estudos/boletins-legislativos/bol41>.

RUPARELIA, J.P.; CHATTERJEE, A.K.; DUTTAGUPTA, S.P.; MUKHERJI, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.*,v.4, n.3, p.707–16, 2008.