



Síntese de nanopartícula antimicrobiana acoplada com bacteriocina

Antimicrobial nanoparticle synthesis coupled with bacteriocin

Mariane de Souza Consolin¹, Luana de Carvalho², Luciana Furlaneto Maia³

RESUMO

A biossíntese baseia-se no princípio da biorredução de um sal utilizando compostos biológicos como agentes redutores e estabilizantes. O objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de zinco a partir de enterocinas e avaliar seu potencial antimicrobiano na presença de agentes patogênicos. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em placas de Petri com meio ágar BHI e apontaram halos de inibição para bactérias patogênicas como *E. coli*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*. A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada com resazurina, e obteve-se o resultado de 1:128 para *L. innocua*; 1:4 para *E. coli* e 1:2048 para *L. monocytogenes*. As partículas apresentaram tamanhos médios de 1523,20, 82602 e 7239 nm, respectivamente. Para as amostras 1 e 2, o potencial zeta apresentou valores ideais para nanopartículas, porém, para a amostra 3 obteve-se um valor disperso, mostrando um potencial em se aglomerar. Concluímos que a enterocina pode ser precursora na síntese de nanopartículas de zinco, mostrando-se viável para a aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: enterocina; síntese verde; zinco.

ABSTRACT

Biosynthesis is based on the principle of bioreduction of a salt using biological compounds as reducing and stabilizing agents. The objective of this work was to synthesize zinc nanoparticles from enterocins and evaluate their antimicrobial potential in the presence of pathogenic agents. Antimicrobial activity tests were carried out in Petri dishes with BHI agar medium and showed inhibition halos for pathogenic bacteria such as *E. coli*, *L. monocytogenes* and *L. innocua*. The determination of the minimum inhibitory concentration was carried out with resazurin, and the result was 1:128 for *L. innocua*; 1:4 for *E. coli* and 1:2048 for *L. monocytogenes*. The particles had average sizes of 1523.20, 82602 and 7239 nm, respectively. For samples 1 and 2, the zeta potential presented ideal values for nanoparticles, however, for sample 3 a dispersed value was obtained, showing a potential for agglomeration. We conclude that enterocin can be a precursor in the synthesis of zinc nanoparticles, proving to be viable for application.

KEYWORDS: enterocin; green synthesis; zinc.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o campo da nanotecnologia proporcionou um enorme desenvolvimento com as aplicações e síntese de nanopartículas de diversos materiais. Na escala nanométrica, essas partículas apresentam propriedades físicas, químicas, ópticas e biológicas características que são fortemente influenciadas pelo seu tamanho, morfologia e composição. Essas propriedades se diferem quando comparadas a partículas maiores provenientes do mesmo material na qual as nanopartículas foram formadas, e por conta disso despertam imenso interesse de pesquisadores em áreas multidisciplinares (MUSHTAQ et al., 2022).

Ainda não há consenso entre os autores que defina exatamente o tamanho de uma nanopartícula, sendo assim, essa ampla classe de materiais inclui substâncias particuladas

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: marianeconsolin@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5170921199201227.

² Mestre em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: luanamedvet23@gmail.com. ID Lattes: 4351545706913104.

³ Docente no Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: lucianamaia@utfpr.edu.br. ID Lattes: 6007117281861512.



que variam entre dimensões de 1 a 100 nm, e de 10 até 1000 nm dependendo de suas aplicações (MEDEIROS, 2021; FREITAS, 2019).

Devido a seu pequeno tamanho e elevada relação superfície-volume, as NPs metálicas apresentam propriedades antimicrobianas a partir da liberação de íons e a formação de radicais livres. Essa interação das NPs afetam a integridade das células bacterianas, e da mesma forma que as propriedades físico-químicas, os mecanismos de ação antimicrobiana das NPs são influenciados pelas suas características morfológicas e das espécies bacterianas (ARAB, 2018).

A crescente aplicação de NPs em escala industrial tem levado à liberação destes nanomateriais no meio ambiente, e ainda requer a compreensão acerca da mobilidade, reatividade, toxicidade ecológica e persistência desses materiais no ecossistema (MUSHTAQ et al., 2022). Dessa forma, rotas químicas alternativas para a síntese de NPs a partir de sais metálicos têm sido propostas, a fim de implementar técnicas que não utilizem solventes orgânicos tóxicos e que não formem subprodutos indesejáveis, de modo que ainda possuam um ótimo custo-benefício e não agridam o meio ambiente.

A síntese verde a partir de organismos e extratos biológicos é uma das opções existentes e baseia-se no princípio da biorredução de um sal em meio aquoso no qual esses compostos são empregados como agentes redutores e estabilizantes para a síntese de NPs (MEDEIROS, 2021). Sendo assim, uma das alternativas para a biossíntese é a utilização de compostos antimicrobianos como as bacteriocinas.

As bacteriocinas, denominadas enterocinas quando produzidas por bactérias do gênero *Enterococcus*, são peptídeos sintetizados por ribossomos que agem como mecanismo de defesa de algumas bactérias ácido-láticas, inibindo o crescimento de vários agentes patogênicos (RAMALHO et al., 2023). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar NPs de nitrato de zinco a partir de enterocinas e avaliar o potencial antimicrobiano na presença de agentes patogênicos.

METODOLOGIA

ISOLADOS BACTERIANOS

Para a produção da enterocina, foi utilizado o isolado de *E. durans* MF5. Para os testes de atividade antimicrobiana, foram utilizadas as bactérias indicadoras *L. monocytogenes* 2048, *L. innocua*, *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli* 43888. Os isolados encontravam-se estocados em freezer e foram reativados em 5 mL de meio de cultura, sendo caldo MRS (ManRogosa Sharpe) para *E. durans* MF5 e caldo BHI (Brain Heart Infusion) para as demais bactérias. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas.

OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS (CFS)

Isolado de *E. durans* MF5 foi cultivado por 18 horas sob agitação de 180 rpm a 37 °C em caldo MRS. Após este período, foi inoculado 1% (v/v) do cultivo em meio MRS caldo e incubado a 37 °C por 24 horas sob agitação de 180 rpm. O cultivo foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm para a sedimentação das células e obtenção do sobrenadante livre de células (CFS). O sobrenadante foi esterilizado em membrana filtrante e armazenado em frasco estéril.



OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO

Para a síntese de nanopartículas de zinco (ZnNPs), foram dissolvidas 560 mg de nitrato de zinco em 5 mL de água deionizada estéril, obtendo-se uma concentração de 0,5M. Foram adicionadas à solução 2,5 mL de CFS na proporção de 0,5:1. A mistura obtida foi transferida para um tubo Falcon coberto com papel alumínio, e colocada sob agitação a 110 rpm à temperatura ambiente por cerca de 5 horas. A identificação da formação de nanopartículas de zinco se dá através da mudança de cor da solução de marrom-claro para amarelo-claro. Também foi possível observar a formação de precipitados na solução.

Posteriormente, foram coletadas amostras de 1,5 mL da solução suspensa, e transferidas para microtubos de Eppendorf para serem centrifugadas a 6500 rpm por 30 minutos para a remoção do CFS. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de ZnNPs foi lavado com 500 μ L de água deionizada estéril, e assim levado para a centrifugação a 6500 rpm por cerca de 10 minutos. Esse processo de lavagem foi repetido duas vezes, e posteriormente o pellet foi seco em estufa a 60 °C por 24h. Para as análises, o pellet foi suspenso novamente em água destilada e esterilizada.

TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise da atividade antimicrobiana foi realizada observando a formação de halos de inibição de crescimento microbiano através da difusão da solução de ZnNPs no meio de cultura. As suspensões bacterianas utilizadas para inoculação foram padronizadas até atingir a turvação igual à suspensão da escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em tubos de ensaio contendo água esterilizada, obtendo-se uma suspensão de 1×10^7 UFC/mL.

As bactérias-teste foram então inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar BHI. Após a secagem da suspensão no meio, foram abertos os poços com o auxílio de duas ponteiros, nos quais foram adicionados 10 μ L das soluções de ZnNPs, e 10 μ L de água estéril para controle. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).

Os orifícios da microplaca foram preenchidos com 100 μ L de caldo Mueller-Hinton (CMH) e 100 μ L da solução aquosa de ZnNP, na qual foi realizada a diluição seriada de 1:2. Posteriormente, foram distribuídos 10 μ L das suspensões padronizadas dos microrganismos em cada orifício das microplacas. Alguns orifícios foram destinados para o controle do meio de cultura, o controle de crescimento, o controle da ZnNP. A placa foi levada para estufa e incubada a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, foram realizadas as leituras com o revelador resazurina (100 μ g/mL) no qual 30 μ L foram adicionados em cada orifício da microplaca. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C por 2 horas.

A leitura foi realizada pela observação da alteração de cor do meio, no qual a presença de cor púrpura representa ausência de crescimento bacteriano, e a cor rosa, a presença de crescimento. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea), mostrando-se ter uma correlação direta com a quantidade de organismos vivos.

RESULTADOS

Através do teste de atividade antimicrobiana contendo ZnNPs, foi possível observar halos de inibição para *E. coli*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*, exceto nas amostras de menor tempo (3,5 h). Os resultados podem ser observados na Tabela 1. Destaque para as fotos, onde mostram a presença ou ausência de halo de inibição para as bactérias testadas.

Tabela 1 – Diâmetros de halo de inibição

Bactéria	Amostra 1 (3,5 h)	Amostra 2 (4,5 h)	Amostra 3 (5,5 h)	Halo de inibição em meio de cultura
<i>E. coli</i>	-	1,5 cm	> 1 cm	
<i>L. monocytogenes</i>	-	1 cm	1,2 cm	
<i>L. innocua</i>	-	-	1,2 cm	
<i>Salmonella</i>	-	-	-	

Fonte: Autoria própria (2023).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada para determinar a mínima concentração de ZnNPs que houve redução microbiana. A Figura 1 apresenta a CIM da ZnNP para a bactéria *L. innocua*, pela coloração a CIM foi de 1:128; para *L. monocytogenes* e *E. coli* a CIM foi 1:2048 e 1:4, respectivamente.

Figura 1 – Representação esquemática da Concentração Inibitória Mínima da ZnNPs para a bactéria *Listeria innocua*



Fonte: Autoria própria (2023).

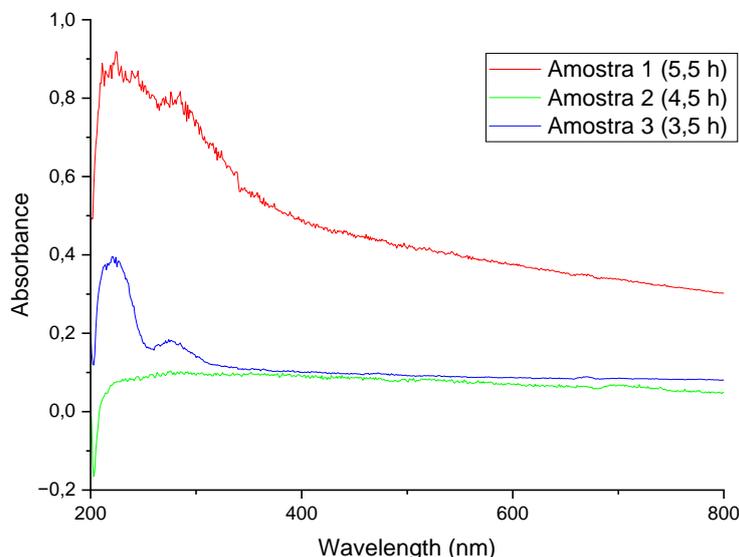


A caracterização das ZnNPs foi realizada por espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), distribuição do tamanho da partícula e pelo potencial zeta. A Figura 1 mostra as curvas de absorbância das amostras obtidas pelo UV-Vis, indicando picos característicos da ZnNPs nas 3 amostras avaliadas.

Em relação ao tamanho das partículas, a amostra 1 apresentou tamanho médio de 1523,20 nm, valor menor em relação as amostras 2 e 3, que apresentaram tamanhos médios de 8260 e 7239 nm, respectivamente.

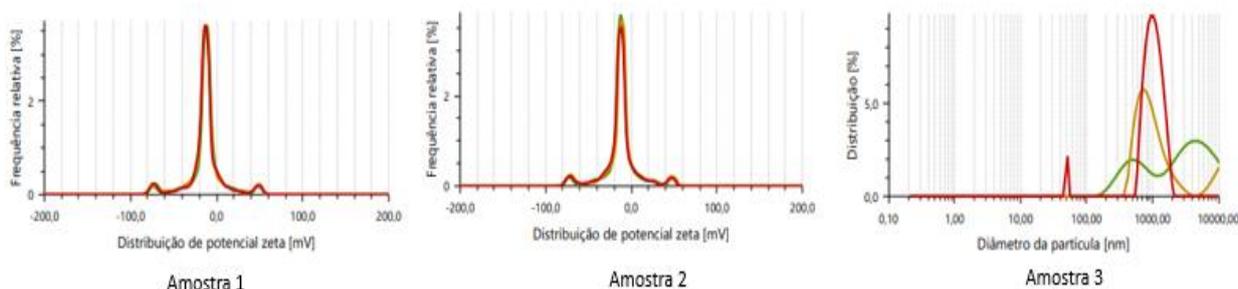
A avaliação do potencial zeta apresentou valores -30 a +30 nas amostras 1 e 2, sendo ideal para as nanopartículas. Já a amostra 3 apresentou o potencial zeta disperso, mostrando que a nanopartícula pode ainda sofrer aglomerações (Figura 2).

Figura 1 – Resultados obtidos pelo UV-Vis



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 2 – Potencial zeta das três amostras de nanopartículas de zinco



Fonte: Autoria própria (2023).



Os estudos da atividade antimicrobiana de NPs biossintetizadas contra bactérias, fungos e até vírus, tem expandido consideravelmente, contudo, ainda existe uma grande variabilidade tanto nas propriedades das NPs e defesas microbianas, dependendo dos diferentes layouts experimentais (MUSHTAQ et al., 2022).

As propriedades físico-químicas das NPs biossintetizadas, tais como material, tamanho, forma e funcionalização superficial, desempenham um papel crucial no seu efeito antimicrobiano, por isso é importante que os estudos incluam uma caracterização completa das NPs e conectem os aspectos microbiológicos e físicos-químicas (MUSHTAQ et al., 2022).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, concluímos que a enterocina pode ser precursora na síntese de nanopartículas de zinco, com atividade antimicrobiana contra patógenos de veiculação alimentar. Novos testes deverão ser conduzidos, porém as ZnNPs mostram-se viáveis para aplicação.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela concessão da bolsa; ao LabMULTI-LD; à UTFPR pelo incentivo à pesquisa (edital PROPPG 07/2022). Luana de Carvalho agradece à Capes pela concessão de bolsa do mestrado.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ARAB, F. E. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Exatas de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

RAMALHO, R. et al. Antibacterial efficacy of *Enterococcus* microencapsulated bacteriocin on *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovi*. **J Food Sci Technol**. v. 60, p.262–271, 2023.

MUSHTAQ et al. Green synthesis of ZnO nanoparticles from saffron corm extract and their bactericidal activity. **Materials Today: Proceedings**, v. 69, p.74–81, 2022.

MEDEIROS, C. G. et al. Síntese verde de nanopartículas antioxidantes feitas com prata e polissacarídeos sulfatados da alga *Crassiphycus birdiae*. **HOLOS**, v. 5, p. 1-19, 2021.