

ASSOCIAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE ORIGEM ALIMENTAR

Any Caroliny Santos de Arcantes (PIBIC/CNPq/FA/UEM),
Jane Martha Graton Mikcha (Orientador). E-mail: ra123850@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Microbiologia (2.12.00.00-9) / Microbiologia aplicada (2.12.02.00-1)

Palavras-chave: Associação de antimicrobianos, nanopartículas biogênicas de prata, compostos naturais.

RESUMO

Para evitar contaminações com microrganismos patogênicos, é comum na indústria o uso de conservantes e antimicrobianos sintéticos, todavia, tornou-se crescente a busca do consumidor por produtos mais naturais e menos processados. Visto isso, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de dois compostos naturais - cinamaldeído e carvacrol - em associação com nanopartículas biogênicas de prata (BioAgNP) contra cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da BioAgNP, do cinamaldeído e do carvacrol contra essas bactérias. A avaliação da associação dos compostos com nanopartículas foi realizada pelo método de *Checkerboard*. Como resultado, ambas associações dos compostos com as BioAgNP foram sinérgicas, demonstrando ser uma possível alternativa para a substituição aos antimicrobianos sintéticos.

INTRODUÇÃO

As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) representam um problema de saúde pública. As DTHA são causadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados e existem mais de 250 tipos no mundo, podendo ser causadas por bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas intestinais ou substâncias químicas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 600 milhões de pessoas adoecem e 420.000 morrem todos os anos devido a essas doenças (BRASIL, 2022). Com objetivo de diminuir o impacto negativo causado por essas bactérias, métodos de conservação foram desenvolvidos para garantir segurança microbiológica dos alimentos, como exemplo os conservantes químicos sintéticos. Entretanto, há um interesse crescente por produtos naturais como alternativas para os conservantes químicos, tais como os antimicrobianos derivados de plantas, animais, bactérias, algas e fungos. Mas para a disseminação do uso desses compostos naturais como conservantes, há alguns obstáculos, uma vez que para inibir a deterioração ou

eliminar bactérias patogênicas, são necessárias altas concentrações dessas substâncias podendo afetar nas características sensoriais do alimento (BRUNO e MACHADO, 2022).

Visto isso, o presente trabalho encontrou como possível alternativa para contornar essas alterações organolépticas a associação dos compostos naturais com as nanopartículas de prata (AgNP). A nanotecnologia desempenha um papel crucial no setor alimentício, contribuindo para o aumento da qualidade e segurança dos alimentos, uma vez que as nanopartículas de metais nobres – como a AgNP – possuem alta atividade contra microrganismos (DUNCAN, 2011). E dessa forma, poder encontrar uma nova possibilidade de conservante ao invés dos antimicrobianos sintéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo das Bactérias

Nesta pesquisa foram estudadas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 estocadas em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) suplementado com 20% de glicerol a -20 °C.

Agente antimicrobianos

As substâncias naturais utilizadas no presente estudo foram adquiridas comercialmente. Os compostos naturais usados foram carvacrol e cinamaldeído (pureza $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich). As nanopartículas biogênicas de prata (BioAgNP-GRAL) fornecidas pela Prof^a Dr^a Renata K. T. Kobayashi, do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina

Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da BioAgNP e dos compostos naturais foram determinadas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), utilizando o método de microdiluição em caldo. As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo Mueller Hinton (MHB) e padronizadas de acordo com a escala de Mc Farland 0,5. As nanopartículas foram diluídas seriadamente em MHB nas concentrações de 0,97 a 500 μM e os compostos naturais nas concentrações de 7,8 a 5.000 $\mu\text{g/mL}$. Após incubação a 35 °C por 24 h, a CIM foi determinada visualmente identificando-se a concentração mais baixa na qual não foi observado o crescimento bacteriano. Após a determinação da CIM, alíquotas de 20 μL foram removidas dos poços onde não for possível observar crescimento bacteriano e foram inoculados em Ágar Tripton de Soja (TSA). As placas foram incubadas em estufa de 35 °C por 24 h. A CBM foi determinada como a menor concentração onde não for observado crescimento bacteriano

Avaliação do Potencial Sinérgico

As interações entre a BioAgNP e os compostos naturais foram avaliadas pelo método de *checkerboard*. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços contendo de 100 µL de MHB, onde a BioAgNP apresentava concentração inicial de 500 µM, foi diluída seriadamente no eixo X e os compostos naturais, com concentração inicial de 5000 µg/mL, foram diluídos no eixo Y. A suspensão bacteriana padronizada foi inoculada em todos os poços e a microplaca foi incubada em estufa de 35 °C por 24 h. Após a incubação, o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$ICIF = CIF(\text{composto natural}) + CIF(\text{nanopartícula});$$

$$\text{onde, } CIF(\text{composto natural}) = \frac{CIM(\text{composto natural} + \text{nanopartícula})}{CIM(\text{composto natural})}$$

$$CIF(\text{nanopartícula}) = \frac{CIM(\text{nanopartícula} + \text{composto natural})}{CIM(\text{nanopartícula})}$$

Os resultados foram interpretados como efeito sinérgico ($ICIF \leq 0.5$); aditivo ($0.5 < ICIF \leq 1$); indiferente ($1 < ICIF \leq 2$); antagônico ($ICIF > 2$) (YADAV et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi determinada a CIM e o CBM das substâncias naturais e da nanopartícula biogênica de prata contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. Typhimurium* (Tabela 1). A CIM e a CBM do cinamaldeído contra todas as bactérias foi de 625 µg/mL. O carvacrol apresentou CIM e CBM de 625 µg/mL contra *E. coli*, contra *S. aureus* a CIM e CBM do carvacrol foram de 1.250 µg/mL e contra *S. Typhimurium* a CIM e CBM foram de 312,5 µg/mL.

A BioAgNP apresentou CIM de 62,5 µM e CBM de 125 µM contra *E. coli*. Contra *S. aureus*, a CIM e a CBM foram de 125 µM. Por fim, a CIM e CBM da BioAgNP contra *S. Typhimurium* foi de 62,5 µM/mL. Esses dados evidenciam a atividade antimicrobiana dos compostos naturais e das BioAgNPs contra as bactérias estudadas.

Tabela 1 - CIM e CBM dos compostos naturais e da Nanopartícula de Prata contra bactérias patogênicas de origem alimentar.

Bactéria	Carvacrol CIM e CBM (µg/mL)	Cinamaldeído CIM e CBM (µg/mL)	BioAgNP CIM e CBM (µM)
<i>E. coli</i>	625/625	625/625	62,5/125
<i>S. aureus</i>	1250/1250	625/625	125/125
<i>S. Typhimurium</i>	312,5/312,5	625/625	62,5/62,5

Por meio do método de *checkerboard*, realizou-se a avaliação do potencial sinérgico dos compostos naturais com BioAgNP contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. Typhimurium* (Tabela 2).

TABELA 2 – Potencial sinérgico entre BioAgNP e compostos naturais.

	Carvacrol + BioAgNP	ICIF	Cinamaldeído + BioAgNP	ICIF
<i>E. coli</i>	Sinérgico	0,4	Sinérgico	0,5

<i>S. aureus</i>	Sinérgico	0,3	Sinérgico	0,5
<i>S. Typhimurium</i>	Sinérgico	0,5	Sinérgico	0,5

CONCLUSÕES

Com o estudo, foi possível concluir que a BioAgNP atuou sinergicamente em associação com o carvacrol e cinamaldeído, portanto as concentrações necessárias das substâncias para inibir os microrganismos diminuíram quando utilizados juntos. Com isso, os compostos naturais e a BioAgNP tornam-se uma possível alternativa no combate de alguns microrganismos, visto a grande procura do mercado consumidor por alimentos com menor índice de conservantes químicos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a orientadora Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha, ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde de A a Z: Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. GOV.BR, [2022?]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BRUNO, L. M. MACHADO, T. F. **Potencial Uso de Antimicrobianos de Plantas na Conservação de Alimentos**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, ago. 2022.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 323, p. 1-24, Nov. 2011.

CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Document M07-A10 (10th ed.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.2018.

YADAV, M. K., PARK, S. W., CHAE, S. W., SONG, J. J., KIM, H. C. Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. **Apmis – Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**. E. 121, 1198-1206, 2013. Doi: 10.1111/apm.12067.