

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Desenvolvimento de nanoestruturas de sílica  
contendo compostos antimicrobianos**

TESE DE DOUTORADO

**Luis Fernando Wentz Brum**

**Porto Alegre, RS**

**2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Desenvolvimento de nanoestruturas de sílica  
contendo compostos antimicrobianos**

**Luis Fernando Wentz Brum**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:**

**Profº. Drº. Adriano Brandelli**

**Porto Alegre, RS**

**2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Desenvolvimento de nanoestruturas de sílica contendo nisina* elaborada por Luis Fernando Wentz Brum, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Dalmoro – IFSul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Léliz Ticona Arenas – IQ/UFRGS

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Caciano Pelayo Zapata Noreña – ICTA/UFRGS

**“Temos aprendido a voar como os pássaros,  
a nadar como os peixes, mas ainda não aprendemos  
a sensível arte de viver como irmãos”.**

**(Marthin Luther King)**

## **Agradecimentos**

Á Deus, por dar o suporte e força para nunca desistir;  
Aos meus pais Antônio e Sirlei por acreditarem no meu sonho e me apoiarem  
em todos os momentos da minha vida;  
Ao Prof. Adriano Brandelli, pela orientação e amizade dedicados ao longo  
deste trabalho;  
Ao Prof. João Henrique Zimnoch dos Santos, pela amizade e por todas as suas  
contribuições e auxílio durante esta caminhada;  
Aos membros da banca Prof. Viviane Dalmoro, Prof. Léliz T. Arenas e Prof.  
Caciano P. Zapata Noreña pelo aceite ao convite e suas contribuições;  
Aos meus irmãos Gisele, Marcos, Fábio e Márcio pelo apoio, amizade e  
incentivo e meus sobrinhos Isabele, Murilo, Joaquim e Bibiana por todos os  
momentos de amor e alegria que me inspiram a ser uma pessoa melhor;  
A toda minha família que sempre foi minha incentivadora;  
Aos meus amigos, pelo apoio, um suporte inestimável;  
Aos amigos e colegas do Laboratório K-106 do IQ por todos os momentos de  
trabalho, lazer e diversão. Foi incrível ter dividido esta jornada: Bel, Eli, Arthur,  
Marceo, Giovani, Yolice, Cícero, Grazi, Nisar, Diego, Renan, Jaque, Willian,  
Ariane, Gislaine, Felipe, Leticia, Alexandra, Vivi, Sílvia, Matheus, Marcius,  
Jussania, Larissa, César, Juliano, Gabi, Daniel, Sabrine. Em especial, dedico  
meu agradecimento ao amigo William Leonardo por toda o auxílio prestado e  
paciência nas explicações de SAXS, revisões de textos e, acima de tudo, pela  
amizade. E, finalmente à amiga Cristiane, por tudo: auxílio, suporte, parceria e  
pela amizade em todos os momentos. Muito obrigado!  
Aos amigos e colegas do Laboratório 218 do ICTA pelos momentos de  
trabalho, troca de ideias e confraternização. Em especial a pessoas incríveis,  
que tornaram a rotina de análises e escrita mais leve e divertida: Nathalie,  
Priscila, Cristian, Maria e Carol, pela amizade, pelos ótimos momentos no Lab,  
congressos e almoços ou jantares. Obrigado!  
À CAPES, pelo apoio financeiro;  
A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

Como forma de minimizar o alto índice de desperdício de alimentos, este trabalho propôs um estudo de desenvolvimento de potencial conservante encapsulado em uma rede de sílica. Diante dos parâmetros envolvidos nas reações de catálise do processo sol-gel, estreptomicina foi utilizada para verificação da eficiência das rotas ácida e básica, sendo comprovada a mesma frente à inibição de microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos onde a rota ácida apresentou maior atividade. Ambas as rotas não apresentaram toxicidade contra células de mamíferos. Nisina foi encapsulada em sílica com 3 diferentes volumes de água (NA2 para 2 mL; NA4 para 4 mL e NA8 para 8 mL) deionizada utilizando rota ácida e os materiais caracterizados quanto à preservação da funcionalidade, estrutura molecular, textura, morfologia e estabilidade térmica. Foi verificado que os materiais desenvolvidos apresentaram atividade antibacteriana frente a todos os microrganismos testados, sendo que a amostra NA2 apresentou melhor desempenho de atividade. A amostra NA8 apresentou maior percentual de liberação, porém suas características de microporosidade e rugosidade podem ter contribuído para o seu menor desempenho. Foram, também, desenvolvidos filmes biodegradáveis produzidos com gelatina, poli (ácido láctico) e polihidroxialcanoato, sendo que os mesmos apresentaram atividade antibacteriana contra o patógeno *Staphylococcus aureus*.

*Palavras-chave:* encapsulamento, peptídeos antimicrobianos, embalagem ativa.

## Abstract

In order to minimize the high index of food waste, this work proposed a study of the development of potential preservative encapsulated in a silica network. In view of the in the catalysis reactions parameters involved of the sol-gel process, streptomycin was used to verify the efficiency of the acid and basic routes, and the same was proven against the inhibition of Gram-positive and Gram-negative microorganisms where the acidic route presented greater activity. Both routes showed no toxicity against mammalian cells. Nisin was encapsulated in silica with 3 different volumes of deionized water (NA2 to 2 mL, NA4 to 4 mL and NA8 to 8 mL) using acid route and the materials were characterized for the preservation of the functionality, molecular structure, texture, morphology and thermal stability. It was verified that the materials developed showed antibacterial activity against all the microorganisms tested, and NA2 sample presented better activity performance. NA8 sample presented higher percentage of release, but its microporosity and roughness characteristics may have contributed to its lower performance. Biodegradable films produced with gelatin, poly (lactic acid) and epichydroxyalkanoate were also developed, showing antibacterial activity against the pathogen *Staphylococcus aureus*.

*Keywords:* encapsulation, antimicrobial peptides, active packaging.

## Sumário

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
1.1 Peptídeos antimicrobianos: bacteriocinas .....	7
1.1.1 Nisina .....	12
1.2 Tecnologias para estruturação de compostos antimicrobianos.....	16
1.3 Processo sol-gel.....	19
1.3.1 Rotas de encapsulamento sol-gel .....	22
1.4 Embalagens antimicrobianas .....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral .....	26
2.2 Objetivos Específicos .....	26



---

<b>3. ARTIGOS DESENVOLVIDOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Antibacterial activity and structural characterization of silica xerogels encapsulating the aminoglycoside antibiotic streptomycin.....</b>	<b>27</b>
1. INTRODUCTION .....	29
2. MATERIALS AND METHODS.....	30
2.1 Chemicals.....	30
2.2 Synthesis of nanocapsules .....	31
2.3 Antibacterial activity.....	31
2.4 Characterization of the xerogels.....	32
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	33
3.1 Antimicrobial activity.....	33
3.2 Infrared spectroscopy.....	35
3.3 Physical characterization.....	37
3.4 Structural characterization.....	40
4. CONCLUSIONS .....	43
ACKNOWLEDGMENTS.....	43
REFERENCES.....	44
<b>3.2 Use of the sol-gel process for development of structured silica materials containing nisin.....</b>	<b>49</b>
1. INTRODUCTION .....	51
2. MATERIALS AND METHODS .....	52
2.1 Reagents and chemicals.....	52
2.2 Bacterial strains.....	53
2.3 Synthesis of nanocapsules.....	53
2.4 Antibacterial activity analysis.....	54
2.4.1 Minimum inhibitory concentration (MIC) .....	54
2.5 Characterization of the silica xerogels.....	54

---

2.5.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Attenuated total reflectance (ATR) .....	54
2.5.2 Nitrogen adsorption .....	55
2.5.3 Small-angle X-ray scattering (SAXS) .....	55
2.5.4 Zeta potential.....	55
2.5.5 X-ray diffraction (XRD) .....	56
2.5.6 Scanning electron microscopy (SEM) .....	56
2.5.7 Diffuse reflectance spectroscopy (DRS).....	56
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	57
3.1 Antimicrobial activity .....	57
3.2 Infrared spectroscopy .....	61
3.3 Structural characterization.....	64
3.4 Physical characterization.....	67
4. CONCLUSIONS .....	71
ACKNOWLEDGMENTS .....	71
REFERENCES.....	72
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>85</b>
A1 . Materiais .....	85
A2 Metodologia .....	86
A3 Resultados e Discussão.....	90
A4 Outros trabalhos desenvolvidos no Doutorado .....	96

## **Apresentação**

A presente Tese de Doutorado foi desenvolvida por Luis Fernando Wentz Brum, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFRGS), sob a orientação do Prof. Dr<sup>o</sup> Adriano Brandrelli.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (nisina) e lia (pediocina).....	11
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular da nisina .....	14
<b>Figura 3.</b> Número de estudos que relacionam a nisina como potencial conservante de alimentos através de uma aplicação direta .....	16
<b>Figura 4.</b> Número de publicações referente ao encapsulamento de peptídeos antimicrobiano .....	17
<b>Figura 5.</b> Dependência das taxas relativas das reações de hidrólise e condensação de $\text{Si}(\text{OR})_4$ em relação ao pH.....	21
<b>Figura 6.</b> a) Hidrólise catalisada por ácido; b) Hidrólise catalisada por base ..	23

## CAPÍTULO 3 – ARTIGOS DESENVOLVIDOS

### 3.1 ARTIGO 1: Antibacterial activity and structural characterization of silica xerogels encapsulating the aminoglycoside antibiotic streptomycin.

<b>Figure 1.</b> (A) FTIR spectra of SA and SB samples. (B) ATR spectra of SA and SB samples. (C) FTIR spectra of control samples (WA and WB).....	35
<b>Figure 2.</b> $\text{N}_2$ adsorption-desorption isotherms for the xerogels: (A) SA; (B) WA; (C) SB; (D) WB.. Inset: BJH pore-size distributions.....	39
<b>Figure 3.</b> SAXS curve for SA and SB samples .....	41
<b>Figure 4.</b> SEM images of (A) SA; (B) SB; (C) W; and (D) WB samples .....	42

**CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2****3.2 Use of the sol-gel process for development of structured silica materials containing nisin**

<b>Figure 1.</b> (A) Image of the plate test incubated with <i>Bacillus cereus</i> with NA2 and SI2 samples; (B) Image of the plate test incubated with <i>Listeria monocytogenes</i> with NA4 and SI4 samples; (C) Image of the plate test incubated with <i>Staphylococcus aureus</i> with NA8 and SI8 samples; (D) Image of the plate test incubated with <i>Salmonella enterica</i> with NA2 and NA4 samples; (E) Image of the plate test incubated with <i>Escherichia coli</i> with NA8, SI8 and SI2 samples.....	58
<b>Figure 2.</b> Infrared Spectrum of NA2, NA4 and NA8 samples.....	61
<b>Figure 3.</b> Attenuated total reflectance (ATR) spectra of the samples: (A) NA2; (B) NA4 and (C) NA8 .....	63
<b>Figure 4.</b> Infrared spectrum of free nisin (FN).....	63
<b>Figure 5.</b> SAXS curve of structured materials.....	65
<b>Figure 6.</b> SEM micrographs of samples a) NA2/SI2; b) NA4/SI4; c) NA8/SI8..	66
<b>Figure 7.</b> Release of nisin from structured materials .....	68
<b>Figure 8.</b> N <sub>2</sub> adsorption / desorption isotherms and pore distribution curves of the structured materials (a) NA2; (b) NA4; and (c) NA8 .....	69

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Principais grupos de bacteriocinas de bactérias ácido lácticas ..... 9

### Capítulo 3 – ARTIGOS DESENVOLVIDOS

#### **3.1 ARTIGO 1: Antibacterial activity and structural characterization of silica xerogels encapsulating the aminoglycoside antibiotic streptomycin**

**Table 1.** Antibacterial activity observed with the acid-catalyzed (SA), base-catalyzed (SB) structures and control samples ..... 34

**Table 2.** Peaks values of FTIR and ATR spectra of xerogels ..... 36

**Table 3.** Results of zeta potential (ZP), surface area ( $S_{BET}$ ), pore diameter ( $D_p$ ) and pore volume ( $V_p$ ) of the encapsulated systems and control samples..... 37

**Table 4.** Results obtained from the unified set of SAXS curves for xerogels samples ..... 41

#### **3.2 ARTIGO 2: Use of the sol-gel process for development of structured silica materials containing nisin**

**Table 1.** Antibacterial activity of nisin encapsulated samples and their respective controls..... 57

**Table 2.** Antibacterial activity of silica materials containing nisin at different concentrations ..... 60

**Table 3.** Band assignments of the FTIR and ATR spectras of the structured materials containing nisin ..... 62

**Table 4.** Results of spinning radius, particle radius and angular coefficients of the Law of Powers of structured materials ..... 65

**Table 5.** Results of specific areas ( $S_{BET}$ ), pore diameters ( $D_p$ ) and pore volumes ( $V_p$ ) of structured materials ..... 67

## INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana de alimentos tem se apresentado como um grande problema de saúde pública em todo o mundo e continua a ser uma importante fonte de doenças de origem alimentar, provocando graves prejuízos econômicos para a indústria alimentícia (ZHANG *et al.*, 2014).

A tendência atual de consumo de produtos mais saudáveis para uma melhor qualidade de vida, através de produtos minimamente processados, produtos seguros, incluindo a procura de alimentos sem aditivos ou o uso de compostos naturais para a conservação de alimentos, gera uma maior atenção para conceito de embalagem ativa antimicrobiana, sendo que esta tecnologia pode desempenhar um importante papel no prolongamento da vida de prateleira de alimentos e reduzir os riscos de contaminação patogênica (MEIRA *et al.*, 2014).

Com a emergência dos microrganismos psicrófilos em alimentos, o desenvolvimento de novas tecnologias e a procura dos consumidores por alimentos naturais, as bacteriocinas e/ou seus micro-organismos produtores têm sido reconhecidos como uma fonte potencial de bioconservantes para alimentos (FIB, 2010).

A nisina é um peptídeo natural usado como conservante em uma variedade de produtos alimentares, nos quais inibe principalmente o crescimento de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos multirresistentes. No entanto, o alcance de aplicação depende da produção e purificação de baixo custo desta molécula (JOZALA *et al.*, 2015).

O objetivo de preservar as características naturais, atender às normas e à legislação, assim como a busca por um processo prático e viável de tratamento dos compostos naturais induzem ao desenvolvimento de novas tecnologias para aplicação na conservação de alimentos. A imobilização de compostos antimicrobianos em matrizes de sílica representa uma forma eficiente de encapsulamento, pois os xerogeis resultantes devem combinar características estruturais e texturais adequadas de forma a permitir a liberação controlada destes compostos (LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004).

O processo sol-gel possibilita agregar características específicas e desejáveis aos compostos antimicrobianos através do desenvolvimento de materiais híbridos orgânico-inorgânicos com características específicas desejáveis aos mesmos buscando o melhor desempenho em seus diferentes processos de aplicação (SAKKA, 2005).

O presente trabalho é apresentado em quatro seções. Na primeira seção está descrito o capítulo de revisão bibliográfica, onde pode ser verificada a importância do estudo dos compostos naturais como conservantes de alimentos e a utilização destes no desenvolvimento de materiais híbridos orgânico-inorgânicos a base de silício. Na segunda seção estão descritos os objetivos geral e específicos, respectivamente, que apresentam a temática e o objetivo central deste trabalho. A terceira seção apresenta os artigos submetidos oriundos deste trabalho de doutorado, sendo que nestes estão descritos a metodologia experimental utilizada para o desenvolvimento dos trabalhos, bem como os materiais empregados, a análise dos resultados, juntamente com a sua discussão. Por conseguinte, a quarta seção apresenta as conclusões finais deste estudo seguida pelas referências bibliográficas. Por fim é apresentado o apêndice, contendo a metodologia e resultados da aplicação dos materiais desenvolvidos em filmes e materiais de revestimento para alimentos na subseção A1 e os demais trabalhos oriundos desta tese de doutorado na subseção A2.



## Capítulo 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo estão definidos os conceitos e pesquisas que nortearam o presente trabalho. Assim, será apresentada uma revisão que abrange os peptídeos antimicrobianos, em especial a nisina, o processo sol-gel, como a tecnologia utilizada na nanoestruturação e a potencial aplicação destas nanoestruturas em embalagens biodegradáveis para conservação de alimentos.

#### 1.1 Peptídeos antimicrobianos: bacteriocinas

Os peptídeos antimicrobianos são considerados atualmente uma boa alternativa na conservação dos alimentos e podem ser adicionados aos mesmos e/ou as suas embalagens com o propósito de manter suas características intrínsecas e extrínsecas, aumentando a sua vida de prateleira (BRANDELLI, 2012). A Portaria N. 540 da Anvisa (1997) define como aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento.

Os principais atrativos para utilização destas moléculas são: a sua ocorrência natural, a ampla faixa do espectro de atividade antimicrobiana e a sua natureza proteica, o que implica em uma degradação putativa no trato gastrointestinal de homens e de animais. São compostos catiônicos e anfifílicos contendo menos de 100 resíduos de aminoácidos em arranjos simples ou linear, devido à presença de uma grande quantidade de aminoácidos carregados positivamente, ou ainda, em alguns casos, pela amidação de sua região carboxi-terminal (WOLSTENHOLME, 1953; SANT'ANNA *et al.*, 2013).

As bacteriocinas são proteínas complexas ou peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente e secretados por várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e possuem como principais vantagens a sua estabilidade física e não toxicidade. Numerosos estudos relatam que bacteriocinas foram recuperadas para evidenciar o seu potencial como conservantes de alimentos ou como agentes terapêuticos ou biocontroladores (AHMAD *et al.*, 2017).

Estas substâncias antimicrobianas diferem dos antibióticos tradicionais por mecanismos de síntese, pelo modo de ação, espectro antimicrobiano, toxicidade e mecanismo de resistência, sendo que a maioria delas possui baixa massa molecular (3 a 10 kDa), alto ponto isoelétrico e contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (FIB, 2010; MALHEIROS *et al.*, 2012). Baseadas na sua estrutura primária, massa molecular, estabilidade ao calor e organização estrutural, FIB (2010) afirma que as bacteriocinas de bactérias ácido lácticas podem ser subdivididas em quatro grupos, sendo as classes I e II as mais estudadas para aplicação em alimentos, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais grupos de bacteriocinas de bactérias ácido lácticas

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Subcategorias</b>	<b>Exemplos</b>
Classe I - lantibióticas	Caracterizadas pela presença de lantionina e $\beta$ -metil	Tipo A (moléculas lineares) e Tipo B (moléculas globulares)	<b>Nisina</b> , subtilina, epidermina
Classe II	Pequenas (<30 kDa) e relativamente estáveis ao calor	Classe IIa: Peptídeos com sequência N-terminal definida e ativos contra <i>L. monocytogenes</i> ; Classe IIb: Complexos, que requerem dois diferentes peptídeos para que tenham atividade; Classe IIc: peptídeos com tiol ativado, que requerem resíduos de cisteína reduzidos para que sejam ativos	IIa: pediocina, enterocina, sakacina; IIb: plantaricina, lactacina F; IIc: lactococcina
Classe III	Grandes (>30 kDa), proteínas termolábeis	-	Helvecitina J, millericina B
Classe IV	Bacteriocinas complexas	As que contêm porções lipídicas e/ou de carboidratos além da porção protéica.	-

Fonte: Adaptado de NASCIMENTO; MORENO; KUAYE (2008).

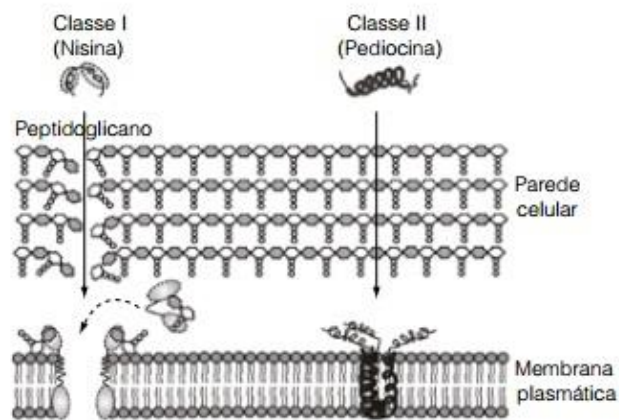
COTTER; HILL; ROSS (2005) afirmam que a Classe IV foi uma classificação reservada para as bacteriocinas que requerem porções não proteicas para a atividade, mas nenhum membro desta classe tem sido convincentemente demonstrado ainda e, por isso, esta classe pode ser desprezada e incluída em ramificações da Classe II.

Os lantibióticos são pequenos peptídeos (19 a 38 resíduos de aminoácidos) termoestáveis que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina, resultante da associação de duas alaninas ligadas por uma ligação tioéter, ou ligação  $\beta$ -metilantionina, resultante de um ácido aminobutírico ligado a uma alanina por uma ligação tioéter que atuam aderindo-se na membrana plasmática dos micro-organismos criando poros e impedindo que os mesmos realizem o seu metabolismo, tendo como seu principal representante a nisina (DO NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

As bacteriocinas geralmente são sintetizadas como pré-peptídeos inativos que possuem uma seqüência guia N-terminal. Este precursor é transportado à superfície celular durante a fase de crescimento exponencial e hidrolisado à forma ativa. O transportador contém uma porção proteolítica N-terminal, responsável pela clivagem do peptídeo guia, além de uma porção C-terminal responsável pela hidrólise do ATP e fornecimento de energia. Estes compostos agem de forma diferenciada em espécies diferentes de micro-organismos de acordo com a composição fosfolipídica e pH das células envolvidas e podem perder sua atividade antimicrobiana em muitos produtos alimentares devido a vários fatores como a interação físico-química com os produtos, temperatura e pH do meio ou os processos industriais aos quais são submetidos (DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005; DO NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

A Figura 1 demonstra o mecanismo de ação celular de bacteriocinas das classes I e II.

**Figura 1.** Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (nisina) e II (pediocina)



Fonte: DO NASCIMENTO; MORENO; KUAYE (2008)

A eficiência da atividade das bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de bactérias ácido lácticas não é uniforme e constante, pois é dependente da composição química e das condições físicas dos alimentos. Interações e reações cruzadas do antimicrobiano com vários constituintes alimentares tais como proteínas e gorduras são difíceis de superar e muitas vezes exigem adição de grandes quantidades de antimicrobiano, a fim de obter reduções significativas na carga de patógenos em um produto (DO NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

VAN DEN HOOVEN e colaboradores (1996) descrevem que o potencial de aplicação de uma determinada bacteriocina pode ser predito por suas propriedades, como estabilidade à temperatura, pH e espectro de ação. Assim, a fim de obter bacteriocinas comercialmente úteis, muitos laboratórios têm feito pesquisas detalhadas com cepas isoladas de vários alimentos. A atividade das bacteriocinas no alimento pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo:

- a) Mudança na solubilidade e na carga eletrostática das bacteriocinas;
- b) Ligação das bacteriocinas aos componentes do alimento;
- c) Inativação das bacteriocinas por proteases;
- d) Mudanças na parede ou na membrana celular dos micro-organismos alvo como resposta a fatores ambientais.

MELO e colaboradores (2013) relatam que a eficácia antimicrobiana da bacteriocina também pode ser reduzida por causa de fatores como:

- a) Alterações físicas e químicas durante as operações de processamento e armazenamento do alimento;
- b) Interações indesejáveis com outros componentes alimentares que requerem a adição de grandes quantidades de peptídeos.

Além disso, os autores afirmam também que para superar essas limitações, o encapsulamento de bacteriocinas pode oferecer potenciais vantagens, como reduzir ou prevenir a interação da bacteriocina com componentes dos alimentos, evitar a interferência com microorganismos fermentadores durante a fermentação, agir como conservante de longo prazo em alimentos armazenados por longos períodos de tempo e proteger o antimicrobiano de inibidores ou condições desfavoráveis que, naturalmente, possam ocorrer na matriz alimentar.

### 1.1.1 Nisina

A nisina ( $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ) é uma bacteriocina catiônica e anfifílica produzida por *Lactococcus lactis*, que mostra um espectro amplo de atividade contra bactérias Gram-positivas e tem sido amplamente utilizada como um conservante seguro e natural na indústria de alimentos (CÉ *et al.*, 2012).

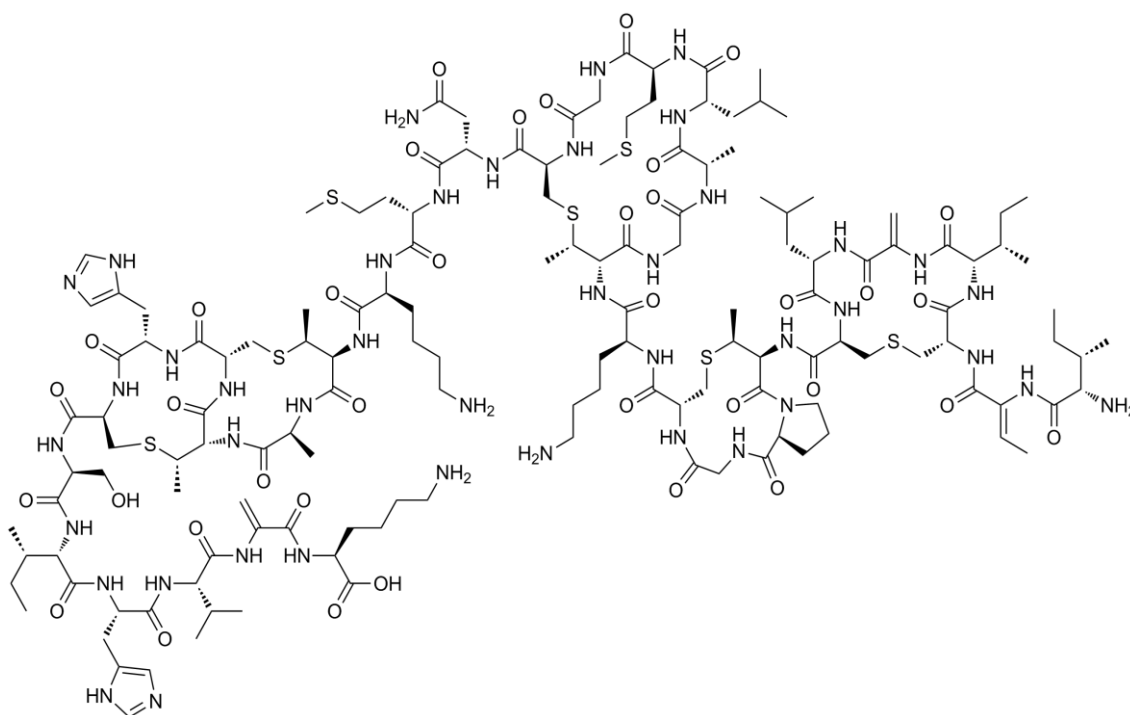
Os lantibióticos são sintetizados nos ribossomos como pré-peptídeos e, após, os aminoácidos incomuns são introduzidos, via modificações pós-translacionais. A desidroalanina e a dehidrobutrina são formadas por desidratação dos resíduos de serina e treonina, respectivamente. Subsequentemente, grupos tiol de cisteína sofrem uma reação de adição com estes resíduos insaturados, resultando, respectivamente, em lantionina e 3-metilantionina. A parte da lantionina ou da 3-metilantionina que é derivada da serina ou treonina está sempre na configuração D, enquanto que a outra metade, que se origina a partir de um resíduo de cisteína, mantém a sua configuração L (VAN DEN HOOVEN *et al.*, 1996).

A estrutura da nisina possui propriedades anfipáticas. No entanto, algumas propriedades estruturais a fazem ser bastante especial. A nisina é modificada pontualmente no modo pós-translacional de forma que resíduos de serina e treonina são desidratados para se tornar desidroalanina e desidrobutrina. Subsequentemente, os resíduos desidratados são acoplados a cisteínas a montante formando as ligações tioéter que produzem a característica de anéis de lantionina ocorrendo dois tipos de nisina variantes mais comuns (havendo outros tipos mais raros) que têm atividades semelhantes, chamados de Nisina A e Nisina Z. A Nisina A e a nisina Z diferem em um único resíduo de aminoácido na posição 27, sendo uma histidina na nisina A e uma asparagina na nisina Z, porém não há relatos de diferença nas atividades entre os dois peptídeos (BREUKINK; KRUIJ, 1999).

Esta bacteriocina é composta por 34 resíduos de aminoácidos tendo a isoleucina e a lisina como aminoácidos N- e C-terminais, respectivamente, e contém extensa modificação pós-translacional na forma de cinco anéis lantionina. O modo de ação proposto para a nisina sugere que a molécula adere à parede celular por interações eletrostáticas, passa pela parede da célula por difusão passiva e, inicialmente, se liga a membrana celular também por interações eletrostáticas. O efeito antimicrobiano é exercido pela formação de poros na membrana da célula alvo, que leva à morte celular (DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005; CHOLLET *et al.*, 2008; JOZALA *et al.*, 2015).

A nisina é formada por oito alaninas, quatro ácidos aminobutíricos, três glicinas, três isoleucinas, três lisinas, duas leucinas, duas histidinas, duas metioninas, uma serina, uma valina, uma prolina, uma asparagina e aminoácidos incomuns (duas desidroalanina e desidrobutrina) (DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005), e sua estrutura molecular está apresentada na Figura 2

Figura 2. Estrutura molecular da nisina



Fonte: GUIDECHEM (2017).

O ponto isoelétrico ou ponto de carga zero da nisina está acima de 8,5, sendo um peptídeo de 3354 Da que possui atividade contra bactérias Gram-positivas sensíveis através de um processo que desestabiliza o fosfolípido da bicamada da célula e cria poros transientes. A atividade antimicrobiana da nisina é fortemente influenciada pelo pH do meio, sendo que a maior atividade é observada em pH ácido (2 a 3), seguido por perda drástica de atividade em pH mais elevado. Somente em conjunto com modificações químicas externas a sua estrutura faz com que a nisina também seja capaz de inibir bactérias Gram-negativas, tais como espécies de *Escherichia coli* e *Salmonella*. Assim, o pH, juntamente com a concentração de nisina e sua característica estrutural, devem ser otimizados a fim de se obter uma formulação antimicrobiana capaz de inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas (BREUKINK; KRUIJ, 1999; TAI; McGUIRE; NEFF, 2008; KHAN *et al.*, 2015).



A nisina possui inúmeras aplicações como conservante de alimentos naturais, incluindo produtos lácteos, alimentos enlatados e queijo processado (MALHEIROS *et al.*, 2010). A nisina foi considerada segura para ser utilizada em alimentos pela *Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee* como conservante/aditivo para alimentos em 1969. Em 1983 esta bacteriocina foi adicionada à lista de aditivos regulamentados para alimentos na Europa com o código E234 e, em 1988, foi aprovada pela *US Food and Drug Agency* (FDA) para uso em queijos processados, sendo assim, pode ser utilizada como um conservante em muitos países (COTTER; HILL; ROSS, 2005; SILVA *et al.*, 2014).

No Brasil, o uso da nisina é permitido em queijos, requeijão, queijo fundido, queijos pasteurizados e queijo em pó na concentração de 12,5 mg.kg<sup>-1</sup> de produto final. A indústria de laticínios consome aproximadamente 800 kg de nisina por ano e paga aproximadamente US\$ 900 kg<sup>-1</sup> (DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005).

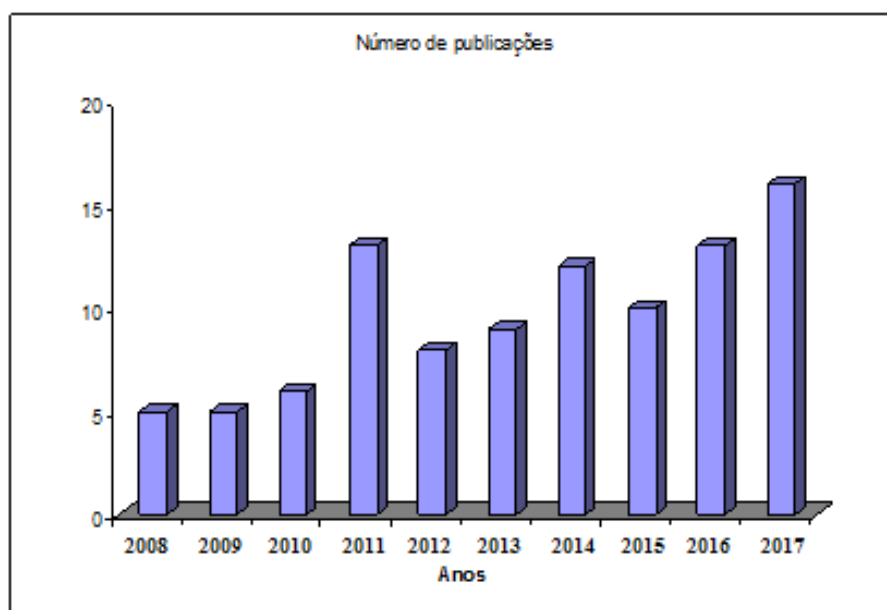
A nisina tem recebido grande atenção devido ao seu amplo espectro de inibição contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, bem como a inibição eficaz de esporos de *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*. Quando combinada com quelantes, a nisina também pode inibir o crescimento de algumas bactérias Gram-negativas (DAWSONA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2014; CHEN; DAVIDSON; ZHONG, 2014).

MEIRA e colaboradores (2014) destacam como características positivas deste peptídeo antimicrobiano ser não-tóxico, estável ao calor, sensível à proteases digestivas e de não contribuir para o *flavor* do alimento. A nisina é uma alternativa interessante aos aditivos sintéticos em materiais de embalagem ativa.

Estudos de toxicidade aguda, sub-crônica, crônica, de resistência cruzada e sensibilidade alérgica indicaram que a nisina é segura para o consumo humano com uma dose diária aceitável (IDA) de 2,9 mg/pessoa/dia. Outro estudo mostrou o efeito das enzimas gástricas sobre a nisina, onde o peptídeo antimicrobiano é inativado pela tripsina e a partir disto concluiu-se que a ingestão da nisina não interfere sobre a microbiota gastrointestinal (VAN DEN HOOVEN *et al.*, 1996).

Vários estudos relacionam o uso da nisina na conservação de alimentos, principalmente de derivados lácteos. A Figura 3 apresenta o crescimento do número de estudos nos últimos anos.

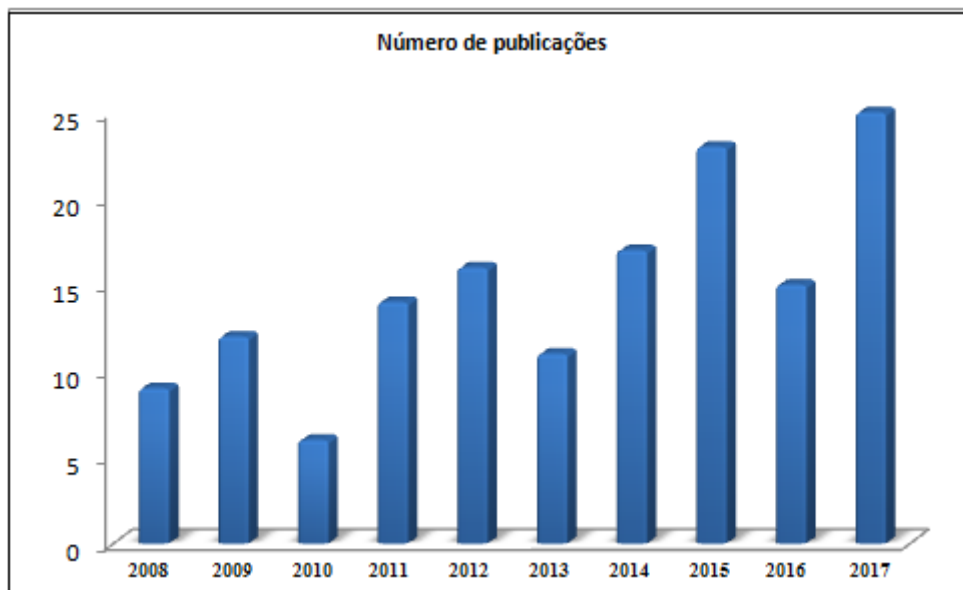
**Figura 3.** Número de estudos que relacionam a nisina como potencial conservante de alimentos através de uma aplicação direta



Fonte: SCOPUS (2018). Database: *nisin, food, shelflife*.

## 1.2 Tecnologias para estruturação de compostos antimicrobianos

Nos últimos anos pôde-se observar um aumento de estudos direcionados à aplicação de peptídeos antimicrobianos encapsulados, em especial a nisina, conforme a Figura 4.

**Figura 4.** Número de publicações referente ao encapsulamento de peptídeos antimicrobianos

Fonte: SCOPUS (2017). Database: antimicrobial peptides, encapsulation, nisin.

PINILLA; BRANDELLI (2016) co-encapsularam nisina e extrato de alho em nanolipossomas de fosfatidilcolina, sendo que as mesmas demonstraram controlar o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ao longo do tempo em leite integral a 37°C. KRIVOROTOVA e colaboradores (2016) desenvolveram nanopartículas de pectina carregadas de nisina, sendo que as mesmas exibiram atividade antimicrobiana dependente sobre o tipo de biopolímero e tamanho das partículas, tendo o ácido péctico carregado de nisina exibido a maior atividade e sendo identificado como o melhor potencial para utilização na indústria de alimentos como um sistema antimicrobiano. CUI e colaboradores (2016) desenvolveram e avaliaram as características de lipossomas com nisina-sílica e os efeitos contra o crescimento de *Listeria monocytogenes* de um lipossoma com nisina-sílica revestido de quitosana em queijo Cheddar. A eficiência de encapsulamento de nisina em um lipossoma aumentou acentuadamente após adsorvida em uma superfície de partículas de sílica e os mesmos exibiram efeitos antibacterianos contra *L. monocytogenes*, sem afetar as propriedades sensoriais do queijo Cheddar.

KHAN; OH (2016) relatam problemas consideráveis em relação ao uso de nisina no setor de alimentos, incluindo suas interações descontroladas com os componentes alimentares como degradação e repulsão eletrostática, sendo que esses problemas limitam potencialmente seu uso. Estratégias alternativas, incluindo uma variedade de nanopartículas, tais como as nanopartículas poliméricas e combinações de nisina com outras tecnologias, são empregados para aumentar a utilidade da nisina na indústria alimentícia.

Em geral, o encapsulamento de agentes ativos deve constituir-se dos seguintes requisitos: (BRANDELLI; BRUM; DOS SANTOS, 2016):

- a) Estabilizar o material através da formação constituída de um “envelope”;
- b) Transformar a estrutura do material encapsulado de forma a promover a correta lixiviação/liberação adequada e para evitar a inserção/migração de componentes indesejáveis, dentro do dispositivo de encapsulamento.

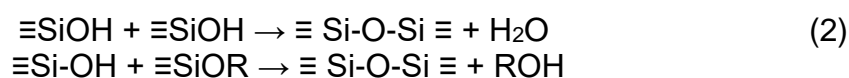
As técnicas de encapsulamento incluem diferentes tipos de micro ou nanopartículas (cápsulas e esferas) que são produzidas a partir de uma grande gama de materiais (mono e/ou poliméricos) e por diferentes processos incluindo *spray drying*, *spray cooling/chilling*, extrusão, *fluidized bed coating*, coacervação, lipossomas, centrifugação, cristalização, nanoemulsões, suspensão, *freeze-drying*, polimerização interfacial, inclusão molecular, processo sol-gel, entre outros (BRANDELLI; BRUM; DOS SANTOS, 2016).

Outros compostos antimicrobianos também são utilizados em processos de encapsulamento como forma de potencializar suas vantagens de aplicação. A estreptomicina, que pertence a classe dos aminoglicosídeos é utilizada como um antibiótico purificado da bactéria *Streptomyces griseus* e tem sido cada vez mais aplicada para tratar doenças infecciosas. Porém, a aplicação incorreta e descontrolada da estreptomicina pode resultar na presença de resíduos deste medicamento em alimentos, causando sérios efeitos colaterais em seres humanos, incluindo nefrotoxicidade e ototoxicidade (DAVIES, 2006; BECKER; COOPER, 2013; SMITTIPAT *et al.*, 2016; KHOSRAVI *et al.*, 2017).

### 1.3 Processo sol-gel

A descrição do processo sol-gel foi feita primeiramente por CARMAN (1940), como sendo a polimerização realizada por monômeros, como o  $\text{Si(OH)}_4$ , para formar partículas discretas, de dimensões coloidais compreendidas entre 1 a 1000 nm, os quais se agregam em cadeias, para então, formar a rede de gel. Em outras palavras, no crescimento dessas partículas primárias é produzida uma fase sol, o qual, após sofrer agregação pela formação de ligações covalentes, produz um gel, em um processo denominado transição sol-gel.

As principais reações que resultam na gelificação são: (1) hidrólise e (2) condensação, que estão representadas nas Equações 1 e 2, respectivamente, para precursores do tipo alcóxido.



Muitos tipos de precursores podem ser utilizados para preparar xerogéis de sílica pelo método sol-gel. Os precursores mais comuns são soluções aquosas de silicatos de sódio (“*waterglass*”) e alcóxidos de silício  $\text{Si(OR)}_4$  (SCHUBERT; HUSING, 2012)

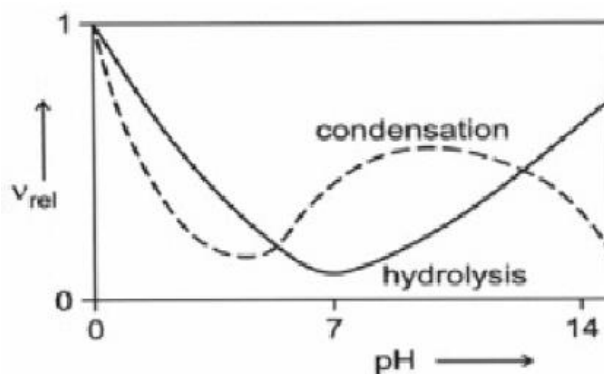
Além disso, as reações de gelificação de alcóxidos de silício bastante lentas, comumente são adicionados catalisadores que geralmente são classificados em dois tipos: ácidos e básicos. A reação de hidrólise é promovida mais facilmente por catalisadores ácidos, enquanto a reação de condensação por catalisadores básicos. A velocidade da reação é mais influenciada pela força e concentração de ácidos e bases, enquanto parâmetros como temperatura e natureza do solvente desempenham um papel secundário (WILLEY, 1985).

A velocidade das reações de condensação é dependente do valor de pH do meio. A reação é mais lenta em pH próximo a 2, o ponto isoelétrico da sílica após um considerável grau de condensação (grupos silanóis protonados) e mais rápida em pHs entre 3 e 5 (grupos silanóis desprotonados). O solvente é importante para homogeneizar a mistura reacional, especialmente no início da reação. A polaridade, o momento dipolar, a viscosidade, o comportamento prótico ou não prótico do solvente influenciam a taxa de reação e assim a estrutura do material sol-gel final (MOROW, 1990; SCHUBERT; HUSING, 2012).

O processo sol-gel é relativamente simples pelo número de etapas, mas complexo pelo envolvimento de diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, e concentração de reagentes. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

SCHUBERT; HUSING (2012) afirmam ainda que as velocidades de reação para hidrólise e condensação têm uma dependência diferente do pH, como mostrado na Figura 5. A taxa de reação mínima para hidrólise está a pH = 7 e para condensação em torno de pH 4,5. Para a reação de condensação, o pH mínimo corresponde ao IEP da sílica, onde as partículas de sol podem aproximar-se sem uma grande barreira eletrostática. O valor de pH é o parâmetro decisivo para os usos relativos de hidrólise e condensação de tetraalcoxissilanos. Sob condições ácidas (pH <5) a hidrólise é favorecida e a condensação é o passo determinante da taxa. São formados simultaneamente um grande número de monômeros ou pequenos oligômeros com grupos Si-OH reativos. Em contraste, a hidrólise é o passo determinante da taxa a pH >5 e as espécies hidrolisadas são imediatamente consumidas devido à condensação mais rápida.

**Figura 5.** Dependência das taxas relativas das reações de hidrólise e condensação de  $\text{Si}(\text{OR})_4$  em relação ao pH



(Fonte: SCHUBERT; HUSING, 2012).

Os solventes polares e particularmente próticos ( $\text{H}_2\text{O}$  e álcoois) estabilizam espécies silíceas polares por ligações de hidrogênio. Os solventes não polares são normalmente utilizados para os alquilossilanos organotriais ou sistemas incompletamente hidrolisados (SCHUBERT; HUSING, 2012).

A sílica é considerada um dos óxidos mais simples porque em sua superfície, pelo menos para temperaturas moderadas, há formação principalmente de grupos hidroxila isolados e, em menor extensão, vicinais e geminais, assim como ligações de siloxano não reativas. Ela forma uma das classes de substâncias inorgânicas mais utilizadas como suporte de uma variedade de sistemas com diferentes ramos de aplicação. A principal propriedade estudada na sílica está relacionada à sua superfície, a qual possui um considerável interesse quanto aos estudos das suas propriedades de adsorção de moléculas ou íons (MOROW, 1990; NASSAR, 2002).

Materiais à base de silício preparados pelo método sol-gel também têm sido descritos na literatura para o encapsulamento de peptídeos. Vários parâmetros experimentais durante a síntese de sol-gel podem afetar as propriedades estruturais e a morfologia do material resultante como por exemplo a natureza e concentração dos reagentes, condições ambientais, taxa de velocidade da reação e tipo de catálise (MORAIS *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Rotas de encapsulamento sol-gel

Segundo o método de preparação e, por consequência, suas propriedades, existem diversas classes de sílicas amorfas. A sílica-gel pertence ao grupo dos xerogéis e pode ser obtida através de diversas rotas, sendo que são utilizadas mais comumente as rotas ácida e básica (HABER, 1980; WILLEY, 1985).

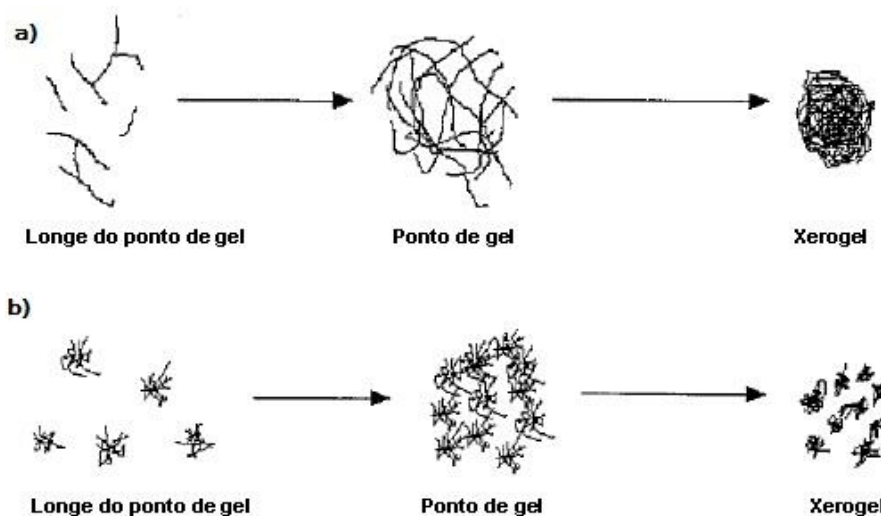
Na gelificação em meio ácido ocorre o ataque do composto ácido ao oxigênio ligado ao silício, Si – OH ou Si – OR, causando a sua protonação e propiciando sua saída. Desta forma, o posterior ataque nucleofílico ao silício é facilitado por moléculas de H<sub>2</sub>O no caso de hidrólise ou Si – OH para condensação (MOROW, 1990).

O grupo alcóxido da sílica é rapidamente protonado e a densidade eletrônica sobre o átomo de silício é retirada, tornando-o mais eletrofílico e, dessa forma, mais suscetível ao ataque pela molécula de água, fazendo com que o átomo de oxigênio da água se ligue ao átomo de silício, reduzindo a carga positiva do alcóxido protonado e tornando o álcool um bom grupo abandonador. Se a reação de gelificação for realizada em meio básico, o nucleófilo é o próprio íon hidróxido que se caracteriza inicialmente pelo ataque nucleofílico ao Si, pelo ânion hidroxila (HO<sup>-</sup>) para hidrólise ou pelo ânion Si–O<sup>-</sup> no caso de condensação, o ataque dar-se-á no Si mais ácido que é o mais reticulado. Nesse caso, o gel tende a crescer de forma mais reticulada, formando partículas primárias esféricas (MOROW, 1990).

Em condições ácidas, a sílica tende a formar moléculas lineares que ocasionalmente reticulam, porém, em condições básicas (hidrólise básica) formam-se *clusters* mais ramificados que não são interpenetráveis após a secagem e, então, comportam-se como espécies distintas, conforme demonstrado na Figura 6.



**Figura 6.** a) Hidrólise catalisada por ácido; b) Hidrólise catalisada por base



Fonte: Adaptado de BLUCKEY; GREENBLAT (1994).

Como os processos de hidrólise e condensação aumentam o número de substituintes OH e OSi na estrutura do encapsulado. Isto significa que, em meios ácidos, a monômero hidrolisa mais rapidamente do que as espécies parcialmente hidrolisadas ou oligoméricas e vice-versa no meio básico (SCHUBERT; HUSING, 2012).

#### 1.4 Embalagens antimicrobianas

Materiais de embalagem antimicrobiana podem ser classificados em dois tipos: aqueles contendo agentes antimicrobianos que migram para a superfície do material da embalagem e, portanto, podem migrar para o alimento, e aqueles que são eficazes contra o crescimento microbológico sem migração do agente ativo para o alimento (BRODY; STRUPINSKY; KLINE, 2001).

EMAMIFAR (2011) descreve que a nanotecnologia introduzida na indústria de embalagem de alimentos tem potencial para fornecer soluções para os desafios do setor através dos materiais para contato com alimentos (FCMs), incluindo ativos, inteligentes, biodegradáveis e de incorporação de nanomateriais para melhorar as propriedades da embalagem (de barreira a gases, temperatura / estabilidade de umidade e flexibilidade).

Os filmes biodegradáveis de fontes renováveis foram otimizados devido ao seu potencial uso em indústrias de embalagens, uma vez que eles podem ser biodegradados pela ação enzimática de microorganismos e convertidos em biomassa, sendo esta uma das alternativas consideradas pela tecnologia para minimizar os impactos negativos no meio ambiente (LUCHESE *et al.* 2017).

Entre as aplicações de embalagem ativa, a incorporação de agentes antimicrobianos está recebendo considerável atenção como um meio de prolongar a fase bacteriana lag, diminuindo a taxa de crescimento de microorganismos e mantendo a segurança dos alimentos (EMAMIFAR, 2011).

Através das técnicas de encapsulamento, compostos bioativos, tais como os peptídeos antimicrobianos, podem ser protegidos contra as condições severas de processamento na fabricação de embalagens e podem ter uma melhoria no comportamento de liberação controlada durante o armazenamento (BRANDELLI; BRUM; DOS SANTOS, 2016).

As bacteriocinas, como a nisina que é aceita por autoridades regulamentares de alguns países para uso alimentar, podem, teoricamente, ser ligadas à superfície de contato do alimento através de filmes (BRODY; STRUPINSKY; KLINE, 2001).

A aplicação direta de nisina para superfícies alimentares resultaria em alguma perda de atividade devido à interação com componentes alimentares. As embalagens de filmes antimicrobianos podem fornecer um cenário de liberação controlada, geralmente, preparado por uma mistura ou revestimento de agentes antimicrobianos imobilizados quimicamente no material de embalagem. Numerosos sistemas de liberação foram avaliados usando nisina, incluindo diálise em revestimentos em contato direto, com carnes refrigeradas (DAWSON *et al.*, 2005).

CORRADINI e colaboradores (2013) desenvolveram uma embalagem ativa antimicrobiana à base de poli (tereftalato de etileno) (PET) preparado por via sol-gel, incorporando como agente antimicrobiano a lisozima com o objetivo de obter filmes de embalagem com propriedades de liberação controlada. DIVSALAR e colaboradores (2018) desenvolveram um novo filme de bicamada antimicrobiana utilizando quitosana, celulose e nisina que inativou completamente a contagem inicial de *L. monocytogenes* na superfície de queijo branco.

## Capítulo 2

### OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a viabilidade de estruturação de compostos antimicrobianos como a nisina e a estreptomicina em matrizes de sílica através do processo sol-gel para potencial aplicação como agentes conservantes em embalagens.

#### 2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar o encapsulamento de estreptomicina pelo método sol-gel e sua atividade antibacteriana para comprovação da eficácia das rotas de estruturação ácida e básica.
- b. Otimizar encapsulamento de nisina em materiais de sílica pelo método sol-gel.
- c. Investigar o efeito do processo sol-gel nos materiais produzidos quanto a sua estrutura, morfologia e textura.
- d. Avaliar a atividade antibacteriana dos materiais estruturados frente a espectros Gram-positivos e Gram-negativos.
- e. Avaliar a eficiência de encapsulamento das rotas aplicadas.
- f. Desenvolver e avaliar a eficácia de filmes/polímeros antimicrobianos biodegradáveis contendo os materiais de sílica com nisina.

## Capítulo 3

### ARTIGOS DESENVOLVIDOS

#### 3.1. *Artigo 1:*

**Antibacterial activity and structural characterization of silica xerogels encapsulating the aminoglycoside antibiotic streptomycin.**

---

## **Antibacterial activity and structural characterization of silica xerogels encapsulating the aminoglycoside antibiotic streptomycin**

### **Abstract**

Streptomycin was encapsulated by sol-gel through acid-catalyzed gelation (SA) or basic-catalyzed gelation (SB) processes and the samples were evaluated for their antimicrobial activity against a spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The xerogels were characterized using a set of techniques including SEM, XRD, FTIR and SAXS to demonstrate their structure, texture and morphology. The zeta potential and the surface roughness were identified as the relevant factors for SA sample be more effective system than SB sample on inhibiting all bacterial strains tested. The best antimicrobial activity was observed with the encapsulated streptomycin prepared via the acid-catalyzed gelation route, showing largest inhibitory zones against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** sol-gel; antimicrobial; nanocapsules; drug encapsulation

## 1. INTRODUCTION

Streptomycin (chemical formula  $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ ), the first discovered drug of a class called aminoglycosides, is an antibiotic produced by *Streptomyces griseus* [1,2]. This antibacterial substance has been widely used in human and veterinary medicine as a very important component of combination therapies to treat infectious diseases, such as multidrug-resistant tuberculosis [3,4]. Inadequate penetration into the cells (due to its hydrophilicity) and rapid elimination from the bloodstream are the major disadvantages of streptomycin as antimicrobial drug [5].

Streptomycin is also used in husbandry and, when it is overcommitted, its residue can be found in food products such as meat, milk and honey, which can be hazard for the health [6,7]. Streptomycin has been detected in food of animal and/or vegetal origin and therefore the European Commission established the maximum residue limits (MRLs) of 200 mg kg<sup>-1</sup> for milk, 1000 mg kg<sup>-1</sup> for porcine kidney and 500 mg kg<sup>-1</sup> for porcine muscle [8]. Incorrect and uncontrolled application of streptomycin could causes serious effects on human health, including allergic reactions, nephrotoxicity and ototoxicity [1].

Nanotechnology has emerged as a rapidly growing field with numerous applications based on synthesis of new materials [9]. Nanostructures can serve as attractive delivery systems for antimicrobial drugs, selecting specific parts of the organism to release their content. Due to their small size, nanostructures can enable effective penetration through the small pores, allowing slow and constant release of the active substance and the use of reduced doses [10]. Despite streptomycin has been widely studied, only recent reports listed potential applications of nanostructured formulations of this antibiotic [4].

A pre-synthesized  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  was first coated with silica using Stöber method and then silver nanoparticles were deposited onto the surface of silica shell, which was impregnated with streptomycin antibiotic, becoming an excellent antibacterial agent [11]. In another study, streptomycin-loaded apoferritin nanoparticles showing high potential for therapeutic use in bacterial resistant infections were developed [5].

There is a growing demand for the development of novel harmless and eco-friendly nanomaterials. The sol-gel technology has been recently considered as an advantageous and promising inorganic system for controlled drug delivery, due to its good biocompatibility and the mild processing conditions [12]. Silica xerogels have the advantage of being an inert material due to be an amorphous and highly porous silica ( $\text{SiO}_2$ ). In this regard, the antimicrobial potential of nanostructured mesoporous silica functionalized with essential oils and antibiotics has been reported [13,14]. However, detailed structural, morphological and textural characterization is not described for these novel materials using sol-gel method for encapsulation. In this work, the encapsulation of streptomycin in silica xerogels was investigated through acid-catalyzed and base-catalyzed gelation processes as potential material with antibacterial activity. The structural and morphological characteristics of the resulting materials were investigated in detail.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Chemicals*

Agar agar (Kasvi), brain heart infusion (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK); hydrochloric acid ( $\text{HCl} > 99\%$ ; Dinâmica, São Paulo, Brazil), sodium chloride ( $\text{NaCl} > 99\%$ ; Merck), sodium hydroxide ( $\text{NaOH} > 99\%$ ; Qualitec); tetraethylorthosilicate (TEOS), ( $\geq 98\%$ ),



(Si(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), (ACROS) were used as received.

## 2.2. Synthesis of nanocapsules

Nanocapsules were synthesized by the sol-gel process by two adapted routes: acid route (SA) and basic route (SB) as described previously [15]. Silica gels were prepared from monomeric forms of the hydrolysis of TEOS (tetraethylorthosilicate) using 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl as a catalyst for acid-catalyzed route and 0.5 mol L<sup>-1</sup> NaOH as a catalyst for base-catalyzed route. The volumes used for each reagent followed stoichiometric ratio (1:10:0.5) between TEOS, H<sub>2</sub>O and HCl or NaOH. A schematic representation of the routes is presented in supplementary Figure S1.

The encapsulation reaction in the silica matrix was initiated with the addition of TEOS and subsequent addition of catalyst (0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl to acid route SA or 0.5 mol L<sup>-1</sup> NaOH to basic route SB) under magnetic stirring at 200 rpm. The reaction was continued at room temperature until the addition of 2 mL streptomycin solution (1 x 10<sup>-5</sup> mg mL<sup>-1</sup>). Control samples (WA to acid route and WB to basic route) were prepared by adding 2 mL water instead the streptomycin solution. The reaction time to gelification was 24 h for acid-catalyzed route and 72 h for base-catalyzed route. The samples were dried at 50°C for 24 h and ground in a porcelain mortar until obtaining a fine and homogeneous powder. The xerogel formed was dried for 7 days under natural laboratory environment.

## 2.3. Antibacterial activity

The SA and SB encapsulated streptomycin and control samples were tested against Gram-negative and Gram-positive bacterial strains by the agar-well diffusion method at 37°C for 24 h [16]. The bacterial strains used in this evaluation were *Escherichia coli*, *Bacillus*

*cereus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and (ATCC 8739, 13076, 7644, 1901 and 9634), respectively.

#### 2.4. Characterization of the xerogels

Scanning electron microscopy (SEM) experiments were carried on a JEOL (Tokyo, Japan) JSM/6060 microscope to evaluate the morphological properties of the samples. Samples were fixed on a carbon tape and then coated with gold by conventional sputtering techniques.

The specific surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation ( $PPo^{-1} = 0.05 - 0.35$ ), and the nitrogen adsorption isotherm was measured at  $-196^{\circ}\text{C}$  in a Gemini 2375 device (Micromeritics, Norcross, GA, USA). Samples were degassed ( $10^{-2}$  mbar) for 8 h at  $110^{\circ}\text{C}$ .

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses were performed using a Shimadzu FTIR spectrophotometer model 8300 to evaluate the functional groups present in the samples. Then, the samples were prepared as KBr pellets of approximately 2-mm thick and 5-mm in diameter. The spectra were obtained over the range of  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  with 32 acquisitions and a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ . The sample surfaces were analyzed in attenuated total reflectance (ATR) mode. The measurements were performed via deposition of the sample (powder) on a KBr crystal ATR ZnSe crystal with 24 acquisitions and a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Powder X-ray diffraction (XRD) data was obtained on a Bruker D500 advanced X-ray diffractometer using  $\text{Cu/K}\alpha$  radiation at a scan of  $\lambda = 1,54\text{ \AA}$ . Further analyses were performed at the small angle X-ray scattering (SAXS) line D11A at the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil) using the wavelength  $1488\text{ nm}$ , the routine evaluation Irenaimplemented in Igor Pro software (WaveMetrics, Portland,

USA) [17,18]. The X-ray beam was selected by silicon monochromator and dispersion collimated using the geometry of the system with a pin-hole type. In this method, the supplied to each structural level is the sum of a Guinier exponentially and structurally limited power law tail [19]. The values of  $R_g$ , the radius of gyration, and  $P$ , the exponential decay from those values define the size, shape and fractal distribution of the particles.

The zeta potential of the hybrid materials were measured using a dynamic light scattering technique on a Zeta Sizer Nano (Malvern Instruments, UK). The dispersions were diluted with deionized water (approximately 50 mg to ensure that the light scattering intensity was within the instrument's sensitivity range) and introduced into a closed capillary cell (DTS 1060).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Antimicrobial activity

The antibacterial activity of streptomycin encapsulated by the acid-catalyzed (SA) and base-catalyzed (SB) routes was evaluated. The inhibitory activity displayed by these structures is summarized in Table 1. Best antibacterial activity was observed for the SA sample for all tested bacteria, including Gram-positive and Gram-negative strains, especially against *L. monocytogenes* and *S.aureus*. The control silica xerogels prepared without streptomycin caused no inhibition against the tested bacteria (supplementary Figure S2).

**Table 1.** Antibacterial activity observed with the acid-catalyzed (SA), base-catalyzed (SB) structures and control samples.

Indicator bacteria	Inhibitory diameter (mm)				
	SA	WA	SB	WB	FS
<i>Bacillus cereus</i>	24.2 ± 0.3	0.0	17.8 ± 0.1	0.0	36.2 ± 0.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	34.2 ± 0.2	0.0	16.3 ± 0.2	0.0	54.3 ± 0.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	33.3 ± 0.1	0.0	16.3 ± 0.2	0.0	55.3 ± 0.2
<i>Escherichia coli</i>	26.8 ± 0.2	0.0	17.5 ± 0.5	0.0	32.5 ± 0.1
<i>Salmonella enterica</i>	18.2 ± 0.4	0.0	12.0 ± 0.2	0.0	30.3 ± 0.3

Values are the means ± standard deviations of three independent experiments.

WA and WB correspond to samples without addition of streptomycin prepared by acid and basic routes, respectively.

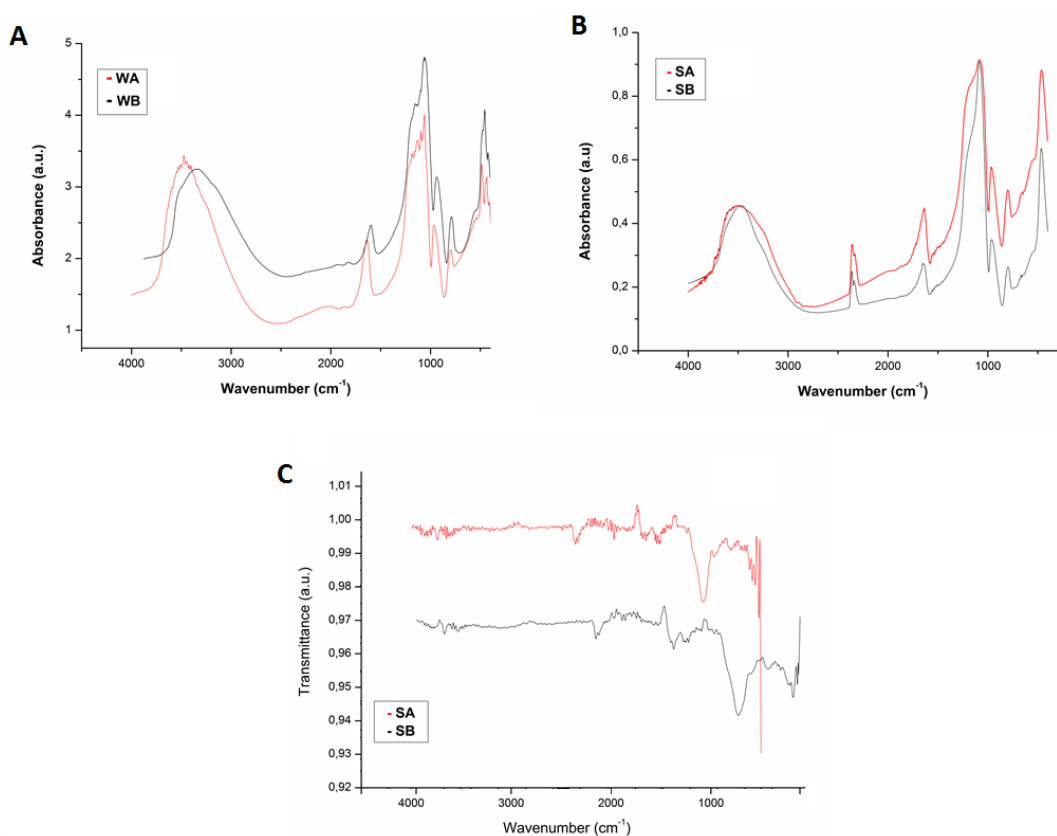
FS corresponds to the sample of free streptomycin in 0.1M HCl solution in the same concentration added to the tested routes.

Aminoglycosides are broad-spectrum antimicrobials active against different spectrum of microorganisms and several multidrug-resistant strains of bacteria [20]. The highest efficacy of streptomycin on Gram-positive bacteria is due, probably, to the low intrinsic resistance to antimicrobial agents because these bacteria do not have specific membrane receptors and/or permeases to control the entrance of a substance into the cell [13]. Although few studies with streptomycin nanostructured with inorganic materials, composites often have less inhibitory effects on the growth of Gram-negative bacteria but the difference between antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria is not too significant [11].

### 3.2. Infrared spectroscopy

Samples were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in both transmission and ATR modes to observe any significant changes in the obtained spectra of the samples after the encapsulation of the drug in the acid-catalyzed and base-catalyzed xerogels. FTIR spectra of the encapsulated and control samples are presented in supplementary Figure 1.

**Figure 1.** (A) FTIR spectra of SA and SB samples. (B) FTIR spectra of control samples (WA and WB). (C) ATR spectra of SA and SB samples.



The relevant peaks of transmission and ATR FTIR spectra are detailed in Table 2. The peaks obtained in these spectra indicate the characteristic assignments of silica in 3400  $\text{cm}^{-1}$ , 1641  $\text{cm}^{-1}$ , 1087  $\text{cm}^{-1}$ , 964  $\text{cm}^{-1}$ , 797  $\text{cm}^{-1}$  and 464  $\text{cm}^{-1}$ . Typical peaks of streptomycin in the superficial area and in the bulk (2352  $\text{cm}^{-1}$  to SA and 2364  $\text{cm}^{-1}$  to SB due to C-O and C=C stretching) and (1969  $\text{cm}^{-1}$  to SB due to -OH stretching) are similar peaks found in pure sample (2400  $\text{cm}^{-1}$  and 1900  $\text{cm}^{-1}$ , respectively) according to the literature [21,22]. Characteristic peaks of streptomycin were observed at around 2350  $\text{cm}^{-1}$  and 1640  $\text{cm}^{-1}$  [23,24]. The results of infrared analysis indicate that assignments of organic groups of streptomycin, mainly -C=O, -OH and -NH groups are present in the silica-structured aminoglycoside.

**Table 2.** Peaks values of FTIR and ATR spectra of xerogels

Vibration type	FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ )			ATR ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	SA	SB	WA/WB	SA	SB	WA/WB
$\nu$ C=C; $\nu$ O-H	3523	3489	3400	3720	3743	3400
$\nu$ C-O	2352	2364	-	2352	2364	-
$\nu$ C=C	1633	1645	1641	1656	1656	1647
$\delta$ C-H	-	-	-	1505	1510	-
$\nu_{\text{as}}$ Si-O-C	1076	1076	1076	1076	1053	1076
$\nu_{\text{as}}$ Si-O	964	961	964	-	-	-
$\nu_{\text{as}}$ Si-O	798	798	797	-	-	-
$\delta$ O-H				508	554	-
$\delta$ Si-O-Si	464	464	464	-	-	-

$\nu$  stretching;  $\nu_{\text{as}}$  asymmetric stretching;  $\delta$  in-plane bending

### 3.3. Physical characterization

Further characterization of streptomycin encapsulated by SA and SB routes was performed by determination of zeta potential ( $\zeta$ ) values of the resulting particles (Table 3). Values were positive for SA and negative for SB, which could be expected, since the presence of the antibacterial compound caused no change in the electrostatic properties of the surface matrix and own values similar to the control measured around +0.33 and -1.84 mV for WA and WB, respectively. The zeta potential has been identified as a factor that can affect the stability of particles and then, the efficiency of encapsulated materials.

In general, highly negative or positive ZP values indicate that the suspensions were more stable because their surface charge did not allow particle agglomeration [25]. SA showed a positive value for zeta potential, which could have stronger interactions with the cell membrane [13]. Zeta potential values significantly changed after the streptomycin encapsulation process with apoferritin, becoming less negative for all the molar ratio of tested complexes, from -20 to -37 mV [5].

**Table 3.** Results of zeta potential (ZP), surface area ( $S_{BET}$ ), pore diameter ( $D_p$ ) and pore volume ( $V_p$ ) of the encapsulated systems and control samples.

Samples	ZP (mV)	$S_{BET}$ ( $m^2/g$ )	$D_p$ ( $\text{\AA}$ )	$V_p$ ( $cm^3/g$ )
SA	2.59	2.92	13.65	0.0116
WA	0.33	3.31	9.45	0.0033
SB	-7.54	1.65	8.32	0.0024
WB	-1.84	2.47	8.99	0.0001

Table 3 also shows the results of sorption isotherms of xerogels. The samples were

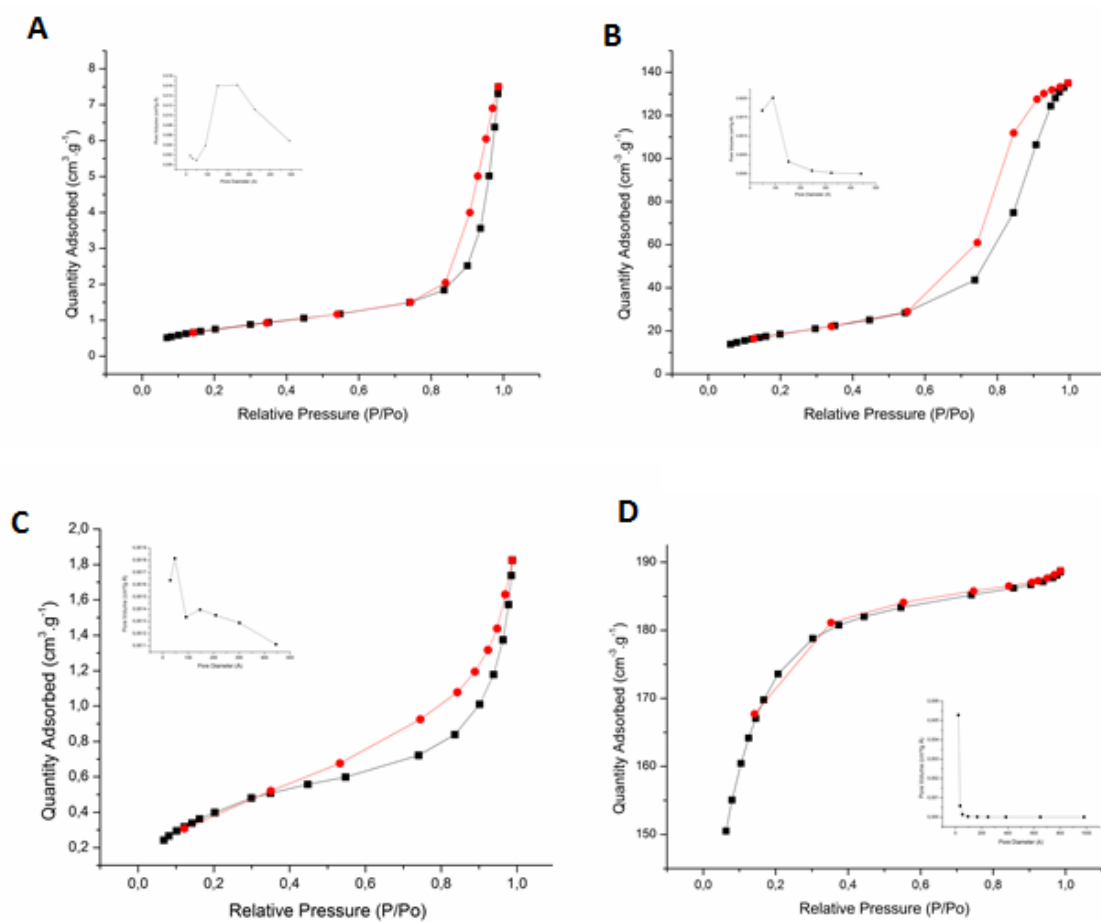
analyzed using nitrogen adsorption and the resulting surface areas ( $S_{\text{BET}}$ ) were  $2.92 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $1.65 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  to SA and SB, respectively and similar values ( $3.31 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $2.47 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) to WA and WB, respectively. The xerogel obtained using the acid-catalyzed route exhibited the highest  $S_{\text{BET}}$  value and larger pore diameter ( $D_p$ ) and pore volume ( $V_p$ ), which suggests that both the pore diameter, pore volume and surface area could also be controlled by tuning the molar ratio of HCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  to TEOS.

SA and SB presented type IV isotherms, with H3 hysteresis curves indicating a mesoporous texture as shown in Figure 2. The type IV isotherms are associated with mesoporous adsorbents according to the classification of Brunauer, Deming, Deming, and Teller (BDDT). The adsorption behavior in mesopores is determined by the adsorbent-adsorptive interactions and by the interactions between the molecules in the condensed state. In the case of a type IV isotherm, capillary condensation is accompanied by hysteresis. Although the adsorption hysteresis is not fully understood due to the effect of various factors, such as the association of the hysteresis shape loops with the specific pore structures. WB presented type I isotherms with The hysteresis is displayed in a range of  $P/P_0$  between 0.2 and 0.3, often associated with porous materials consisting of well-defined cylindrical channels or compact uniform ball agglomerates separated by slits [26].

Silica pores exist separated or connected forming a network of channels of different lengths. Pore size can be designed in widths exceeding 50 nm for macroporous silica, between 2 and 50 nm for mesoporous silica or even smaller than 2 nm for microporous materials [27]. The aging time and pH are also influencing the properties of the resulting silica material, in terms of texture, morphology and mesopores structuring. Mesoporous materials are characterized to own high surface areas and pore volumes, as observed for silica xerogels obtained in this work by both SA and SB routes.

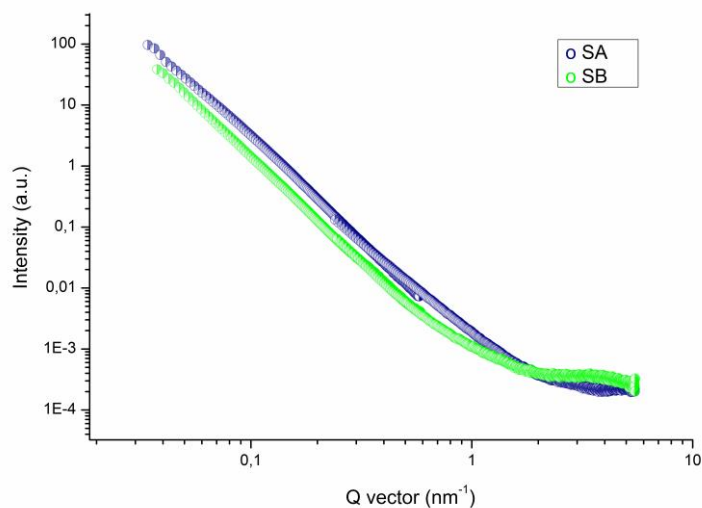


**Figure 2.** N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms of silica xerogels. Data was obtained for xerogels prepared by acid-catalyzed route with (A) or without streptomycin (B) and base-catalyzed route with (C) or without streptomycin. Inset: BJH pore-size distributions



### 3.4. Structural characterization

SAXS analysis provides structural information about the xerogels. The organization of these materials as well as their particle radius ( $R_p$ ), shape, fractal structure ( $\alpha$ ) and topography were investigated through the unified approach in the Guinier and Power-law regions and the SAXS curves for both samples revealed the presence of one organizational level (supplementary Figure S4). When the exponent of the power law is between 1.0 and 3.0, the particles have a mass fractal structure. When  $\alpha$  is between 3.0 and 4.0, the particles have a fractal surface. When  $P$  is equal to 4.0, the particles have a dense core and more uniform, spherical and smooth shape [28]. The results obtained from the unified set of SAXS curves for the encapsulated samples are provided in Table 4. By analyzing Level 1 the radius of gyration ( $R_g$ ) of the primary particles is located in a  $q$  region greater than  $4 \text{ nm}^{-1}$ . The highest value of  $R_g$  was observed for SB, and the lowest value was observed for SA to the primary particles, measured as 0.22 and 0.15 nm, respectively. In terms of  $\alpha$ , values between 3.29 and 3.72 were observed to SA and SB samples, respectively, affecting the organization of particles, because the characteristics of a fractal surface was observed in  $\alpha$  values were between 3.0 and 4.0.

**Figure 3.** SAXS curve for SA and SB samples**Table 4.** Results obtained from the unified set of SAXS curves for xerogels samples

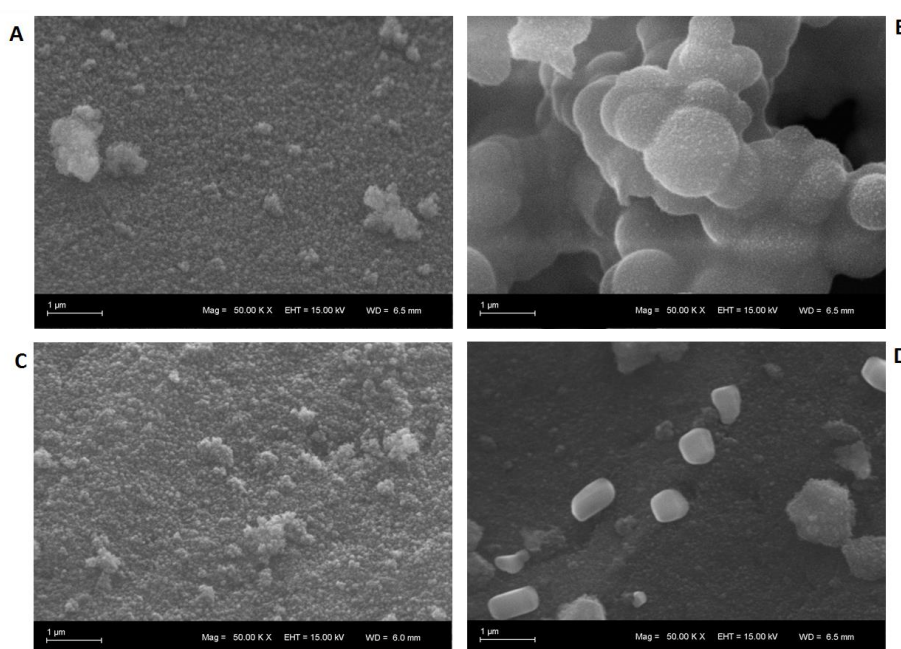
Samples	Level 1			Level 2		
	<i>Rg</i> 1 (nm)	<i>Rp</i> 1 (nm)	<i>p</i>	<i>Rg</i> 2 (nm)	<i>Rp</i> 2 (nm)	$\alpha$
SA	0.15	0.19	-	-	-	3.29
WA	0.66	0.74	4	2,12	2.74	3.07
SB	0.22	0.28	-	-	-	3.72
WB	0.78	0.87	4	2,54	3.28	3.67

Control of silica without streptomycin showed secondary particles in the Level 2 and *Rg* of the secondary particles is located in a *q* region between 1 and 4 nm<sup>-1</sup>. The presence of streptomycin may have influenced the formation of larger particles agglomerated at only one level. Analysis of other silica-based structures by SAXS showed that a similar value around 0.6 nm was observed for gentamicin structured in

silica sample in a fractal surface structure that showed two levels was reported previously [29].

SEM images of SA and SB samples are helpful to identify their successful synthesis by observing their morphologies and both materials showed irregular agglomerates (Figure 4). SA demonstrated a rough surface and SB showed a smooth surface with grooves. Control WA and WB samples showed similar features to that observed for SA and SB samples, respectively, indicating that the addition of streptomycin did not modify the morphology of the silica xerogels. The analysis of XRD using Cu/K $\alpha$  radiation at a scan of  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  showed a broad peak at  $2\Theta = 23^\circ$  theta (supplementary Figure S5), which is characteristic for amorphous silica [30]. The SEM images and XRD analysis reinforced the results provided by SAXS, in which these samples were characterized as fractal surfaces, whose structures are organized tending to spherical, but with a certain roughness.

**Figure 4.** SEM images of (A) SA; (B) SB; (C) WA; and (D) WB samples



The antibacterial activity results for the SA sample suggested that, for these systems, the rough surface of these materials may have contributed to a greater interaction of the aminoglycoside studied with the tested microorganisms.

#### **4 CONCLUSIONS**

In this work, the aminoglycoside antibiotic streptomycin was successfully encapsulated into silica xerogels produced by either acid (SA) or basic (SB) routes. Sol-gel process affects the structural, morphological and textural characteristics of the xerogel obtained, which is a relevant factor in the antimicrobial effect. The best result is shown by the SA against *S. aureus* and *L. monocytogenes* and the results indicate that route involving acid-catalyzed material produced the most active system for all microorganisms. It was hypothesized that the more inhibition of all tested bacteria for acid-catalyzed route sample is due to rough surface and positive electrostatic charge on surface of these material generated from the applied synthesis. In particular, the produced xerogels are promising for practical use in pharmaceuticals as effective controlled release antibiotics, which are prepared from the aminoglycoside in silica matrices.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The Center for Electronic Microscopy (CME, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) and the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil) are acknowledged for their contribution in SEM and SAXS (Project D11A-SAXS1 - 15911) analyses, respectively.

### Conflicts of interest

Authors declare no conflicts of interest regarding this manuscript.

### References

- [1] J.E. Davies, Aminoglycosides: Ancient and modern, *J. Antibiot.*, 59 (2006) 529-532. doi: 10.1038/ja.2006.73
- [2] B. Becker and M.A. Cooper, Aminoglycoside antibiotics in the 21st century, *ACS Chem. Biol.*, 8 (2013) 105-115. doi: 10.1021/cb3005116
- [3] N. Smittipat, T. Juthayothin, P. Billamas, S. Jaitrong, K. Rukseree, K. Dokladda, B. Chaiyasirinroje, A. Disratthakit, A. Chaiprasert, S. Mahasirimongkol, H. Yanai, N. Yamada, K. Tokunaga and P. Palittapongarnpim, Mutations in *rrs*, *rpsL* and *gidB* in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Thailand, *J. Global Antimicrob. Resist.*, 4 (2016) 5-10, doi: [10.1016/j.jgar.2015.11.009](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.11.009)
- [4] A.D. Khosravi, N. Etemad, M. Hashemzadeh, S.K. Dezfuli and H. Goodarzi, Frequency of *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iranian patients, *J. Global Antimicrob. Resist.*, 9 (2107) 51-56, doi: [10.1016/j.jgar.2017.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.005)
- [5] B. Ruozi, P. Veratti, M.A. Vandelli, A. Tombesi, M. Tonelli, F. Forni, F. Pederzoli, D. Belletti and G. Tosi, Apoferritin nanocage as streptomycin drug reservoir: Technological optimization of a new drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, 518 (2017) 281-288, doi: [10.1016/j.ijpharm.2016.12.038](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.038)
- [6] M. Lan, W. Liu, J. Ge, J. Wu, J. Sun, W. Zhang and P. Wang, A selective fluorescent and colorimetric dual-responses chemosensor for streptomycin based on

- 
- polythiophene derivative, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 136 (2015) 871-874, doi: [10.1016/j.jchromb.2016.09.037](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.037)
- [7] Y. Li, X. Su, Q. Peng, Y. Qiao and B. Shi, Method for determination of streptomycin and streptidine as markers for streptomycin industrial dregs monitoring in pig and poultry compound feeds, *J. Chromatogr. B*, 1035 (2016) 84-90, doi:[10.1016/j.jchromb.2016.09.037](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.037)
- [8] European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, *Committee for Veterinary Medicinal Products: Streptomycin*, Document EMEA/MRL/809/01 February 2002, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500015975.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015975.pdf) (accessed Mar 2018).
- [9] G.M. Whitesides, Nanoscience, nanotechnology, and chemistry, *Small*, 2 (2005) 172-179, doi: 10.1002/sml.200400130
- [10] A. Brandelli, Nanobiotechnology strategies for delivery of antimicrobials in agriculture and food, in M. Rai, C. Ribeiro, L. Mattoso and N. Duran (Eds.), *Nanotechnologies in Food and Agriculture*, Springer, Cham, 2015, Chapter 6, pp. 119-139.
- [11] M. Kooti, S. Gharineh, M. Mehrkhah, A. Shaker and H. Motamedi, Preparation and antibacterial activity of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/Ag composite impregnated with streptomycin, *Chem. Eng. J.*, 259 (2015) 34-42, doi: [10.1016/j.cej.2014.07.139](https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.07.139)
- [12] G.J. Owens, R.K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C. Min, C. Mahapatra, H.W. Kim and J.C. Knowles, Sol-gel based materials for biomedical applications, *Progr. Mat. Sci.*, 77 (2016) 1-79, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001> 0079-6425.

- [13] G.G. Corrêa, E.C. Morais, R. Brambilla, A.A. Bernardes, C. Radtke, D. Dezen, A.V. Júnior, N. Fronza and J.H.Z. Santos, Effects of the sol-gel route on the structural characteristics and antibacterial activity of silica-encapsulated gentamicin, *Colloids Surfaces B*, 116 (2014) 510-517, doi: [10.1016/j.colsurfb.2014.01.043](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.043)
- [14] G. Voicu, I. Dogaru, D. Meliță, R. Meștercă, V. Spirescu, E. Stan, E. Tote, L. Mogoantă, G.D. Mogoșanu, A.M. Grumezescu, R. Trușcă, E. Vasile, F. Iordache, M.C. Chifiriuc and A.M. Holban, Nanostructured mesoporous silica: new perspectives for fighting antimicrobial resistance, *J. Nanoparticle Res.*, 17 (2015) 201, doi: 10.1007/s11051-015-3004-7
- [15] U. Schubert and N. Hüsing, *Synthesis of Inorganic Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [16] M. Balouiri, M. Sadiki and S.K. Ibnsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.*, 6 (2016) 71-79, doi: [10.1016/j.jpha.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005)
- [17] J. Ilavsky and P.R. Jemian, Irena: tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering, *J. Appl. Crystallogr.*, 42 (2009) 347-353.
- [18] S.R. Kline, Reduction and analysis of SANS and USANS data using IGOR Pro, *J. Appl. Crystallogr.*, 39 (2006) 895-900.
- [19] A.F. Craievich, Synchrotron SAXS studies of nanostructured materials and colloidal solutions. A review, *Mat. Res.*, 5 (2002) 1-11, doi: 10.1590/S1516-14392002000100002
- [20] M.J. Martínez-Mejía and S. Rath, Use of experimental design to optimize a triple-potential waveform to develop a method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in pharmaceutical veterinary dosage forms by HPLC-PAD, *J.*



- Pharm. Biomed. Anal.*, 104 (2015) 81-89, doi: [10.1016/j.jpba.2014.11.026](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.026)
- [21] S. Hussein-Al-Ali, M.E.E. Zowalaty, M.Z. Hussein, M. Ismail and T.J. Webster, Synthesis, characterization, controlled release, and antibacterial studies of a novel streptomycin chitosan magnetic nanoantibiotic, *Int. J. Nanomed.*, 9 (2014) 549-557.
- [22] Chemistry Libretexts, *Spectroscopy parameters*, [https://chem.libretexts.org/Reference/Reference\\_Tables/Spectroscopic\\_Parameters/Infrared\\_Spectroscopy\\_Absorption\\_Table](https://chem.libretexts.org/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table) (accessed Mar 2018).
- [23] B. Torger and M. Müller, In situ-ATR–FTIR analysis on the uptake and release of streptomycin from polyelectrolyte complex layers, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 104 (2013) 546-553, doi: [10.1016/j.saa.2012.11.080](https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.11.080)
- [24] M. Kumar, M. Kakkar, A.K. Mishra, K. Chuttani and I.P. Kaur, Intranasal delivery of streptomycin sulfate (STRS) loaded solid lipid nanoparticles to brain and blood, *Int. J. Pharm.*, 461 (2014) 223-233, doi: [10.1016/j.ijpharm.2013.11.038](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.038)
- [25] V.J. Mohanraj and Y. Chen, Nanoparticles - A Review, *Trop. J. Pharm. Res.*, 5 (2006) 561-573.
- [26] C. Santos, A. Vargas, N. Fronza and J.H.Z. Santos, Structural, textural and morphological characteristics of tannins from *Acacia mearnsii* encapsulated using sol-gel methods: Applications as antimicrobial agents, *Colloids Surfaces B*, 151 (2016) 26-33, doi: [10.1016/j.colsurfb.2016.11.041](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.041)
- [27] Z.A. Al Othman, A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials, *Materials*, 5 (2012) 2874-2902, doi: 10.3390/ma5122874
- [28] G. Beaucage, Small-angle scattering from polymeric mass fractals of arbitrary mass fractal dimension, *J. Appl. Crystallogr.*, 29 (1996) 134-146.

- [29] E.C. Morais, G.G. Corrêa, R. Brambilla, P.R. Livotto, J.H.Z. Santos and M.B. Cardoso, Silica imprinted materials containing pharmaceuticals as a template textural aspects, *Sol-Gel Sci. Technol.*, 64 (2012) 324-334, doi: 10.1007/s10971-012-2861-0
- [30] S. Musić, N. Filipović-Vinceković and L. Sekovanić, Precipitation of amorphous SiO<sub>2</sub> particles and their properties, *Braz. J. Chem. Eng.*, 28 (2011) 89-94.
- [31] G. Repetto, A. Del Peso, JL. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity., *Nat. Protoc.*, 3 (2008) 1125-1131.
- [32] JC. Rocha, FF. Busatto, LK. de Souza, J. Saffi, Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity. *DNA Repair (Amst)*., 42 (2016) 33-43.
- [32] PG Krishna, PP. Ananthaswamy, T. Yadavalli, NB. Mutta, A. Sannaiah, Y. Shivanna,. ZnO nanopellets have selective anticancer activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 62 (2016) 919-926.

3.2. *Artigo 2:*

**Use of the sol-gel process for development of structured silica materials containing nisin.**

## Use of the sol-gel process for development of structured silica materials containing nisin

**Abstract:** Nisin was encapsulated in silica using different acid route through sol-gel process. The antibacterial activity of the structured materials was evaluated against microorganisms from Gram-positive (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella enterica*) microorganisms. The structured systems were analyzed using a set of techniques, namely Nitrogen adsorption, Small-angle X-ray scattering (SAXS), Zeta potential, X-ray diffraction (XRD), Scanning electron microscopy (SEM), Diffuse reflectance spectroscopy (DRS), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Results showed that the diameters of the particles in a second level of aggregation varied from 4.78 to 5.86 nm, Zeta Potential was -7.75 to -10.60 mV, surface area was 204.7 to 425.9 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> and pore diameter was 25.7 to 27.6 Å, which indicated the formation of mesoporous nanostructures. The encapsulated nisin in silica materials demonstrated the preservation of nisin after synthesis and strong activity against the microorganisms tested. Better antibacterial activity performances were obtained in the the system with greater amount of nisin bound to the silica (4.58 mg.g<sup>-1</sup>), that produced greatest release of nisin in the first six hours tested.

**Keywords:** Silica nanocapsules; natural antimicrobial; growth inhibition; bacteria.

## 1. INTRODUCTION

Antimicrobial peptides are considered a good alternative in food preservation and may be added to food systems with the purpose of maintaining intrinsic and extrinsic characteristics, and increasing shelf life (Brandelli, 2012). Nisin ( $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ) is a cationic and amphiphilic bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* and owns antimicrobial activity binding to the cell membrane by electrostatic interaction, and has been used as a safe and natural preservative in the food industry (De Melo 2005; Chollet et al., 2008; Cé et al., 2012; Jozala et al., 2015).

Nisin has received great attention due to the broad spectrum of inhibition against Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Zimet et al. (2018) studied nisin-loaded nanoparticles prepared by alginate ionic gelation and further complexation with chitosan and suggested that the application of nisin-loaded nanoparticles would enable the use of lower concentrations of nisin to obtain an antilisterial effect in beef. Therefore, there is a potential application of nisin-loaded nanoparticles in the food industry as a biopreservative agent.

When combined with chelators, nisin may also inhibit the growth of some Gram-negative bacteria (Dawson et al., 2005; Silva et al., 2014; Chen et al., 2014). Nisin has numerous applications as a natural food preservative, including dairy products, processed cheese and canned foods, thus, it can be used as a shelf life extender in many countries (Cotter et al., 2005; Malheiros et al. 2010; Silva et al., 2014). Additional positive characteristics of this antimicrobial peptide are the thermal stability, sensitivity to digestive proteases, the absence of toxicity and causing no change in food flavors (Meira et al., 2014).

Bioactive compounds, including antimicrobial peptides, can be protected against severe processing and can have an improvement in release behavior during storage by using encapsulation techniques (Brandelli et al., 2016). Silica-based materials prepared by the sol-gel method can be used for the encapsulation of peptides. Several experimental parameters during the sol-gel synthesis can affect properties and morphology of the resulting materials (Morais et al., 2012).

Sol-gel process can be described by the growth of primary particles produced by a sol phase, which after being aggregated by formation of covalent bonds, produces a gel, in a process called the sol-gel transition. The main reactions that result in gelation are hydrolysis and condensation and, after these, there may be formation of colloidal particles or linear polymer chains. This is due to the formation of solid materials by gelation due to the formation of an oxide network produced by progressive poly-condensation reactions of molecular precursors in a liquid medium. The reaction rate is more influenced by strength and concentration of acids and bases, while parameters such as temperature and nature of the solvents present a secondary role (Willey, 1985; Aegerter et al., 1989; Schubert and Hüsing, 2005).

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of nisin encapsulated by sol-gel processes through acid-catalyzed route.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1 Reagents and chemicals*

Agar agar (Kasvi), brain heart infusion (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK); hydrochloric acid (HCl > 99%; Dinâmica, SP, Brazil), sodium chloride (NaCl > 99%; Merck), sodium hydroxide (NaOH >99%; Qualitec); tetraethylorthosilicate (TEOS),

(Si(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>) (>98%, ACROS) were used as received or diluted in deionized water to the expected concentration.

The nisin used came from the Nisaplin trademark of Danisco Brasil Ltda. For the Activated System (SA) containing 2.5 mg of nisin.mL<sup>-1</sup>, 1 g of compound antibacterial was dissolved in 10 mL of HCl 0.1 mol.L<sup>-1</sup> solution and then centrifuged at 70 g for 5 min so that the activated solution was separated from the sedimented material.

## 2.2 Bacterial strains

*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901 and *Bacillus cereus* ATCC 9634 were used as the indicator organisms for antimicrobial activity assays. Strain were maintained on BHI agar plates at 4 °C, and subcultured periodically.

## 2.3 Synthesis of nanocapsules

Xerogels were produced through sol-gel processes by acid route modified. Silica gels were prepared from monomeric forms of the hydrolysis of TEOS (tetraethylorthosilicate) using HCl (hydrochloric acid) as a catalyst and activated peptide in solution. The volumes used for each reagent followed stoichiometric ratio between TEOS and hydrochloric acid.

The encapsulation reaction in the silica matrix was initiated with the addition of 10 mL of TEOS and subsequent addition of 6.3 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl under stirring on a magnetic stirrer at 200 rpm. The reaction was continued at room temperature until the addition of 2 mL of nisin solution (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) in 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl. Deionized water

prepared by adding 2 mL deionized water instead of the nisin solution. After the samples were dried at 50°C for 24 h and ground in a porcelain mortar until obtaining a fine and homogeneous powder. The xerogel formed was naturally dried for 7 days under laboratory environment.

#### *2.4 Antibacterial activity analysis*

Encapsulated samples were tested against Gram-negative and Gram-positive bacterial strains by the well diffusion method in agar plates incubated at 37°C for 24 h (Balouiri et al., 2016). The diameter of the inhibition zones was measured in millimeters. The tests were performed in triplicate, and the results are presented as the mean  $\pm$  standard deviations.

##### *2.4.1 Minimum inhibitory concentration (MIC)*

The production of silica nanocapsules was performed according to route with 4 mL of deionized water using different concentrations of nisin. Concentrations of 1.25; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 and 12.5 mg of nisin per mL of 0.1 mol.L<sup>-1</sup>HCl were tested. All samples were tested against Gram-negative and Gram-positive bacterial strains by the agar-well diffusion method at 37°C for 24 h.

#### *2.5 Characterization of the silica xerogels*

##### *2.5.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)*

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses were performed using a Shimadzu FTIR spectrophotometer model 8300 to evaluate the functional groups present in the samples. To perform this analysis, all the samples were prepared as KBr pellets of



approximately 2 mm thick and 5-mm in diameter. The spectra were obtained over the range of 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  with 32 acquisitions and a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . The sample surfaces were analyzed in attenuated total reflectance (ATR) mode. The measurements were performed via deposition of the sample (powder) on ATR ZnSe crystal with 24 acquisitions and a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.5.2 Nitrogen adsorption

The specific surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation ( $PPo^{-1} = 0.05 - 0.35$ ), and the nitrogen adsorption desorption was measured in a Gemini 2375 device (Micromeritics, Norcross, GA, USA) at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Samples were degassed ( $10^{-2}$  mbar) for 8 h at  $90^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.3 Small-angle X-ray scattering (SAXS)

The X-ray beam was selected by silicon monochromator and collimated using the geometry of the system with a pin-hole type. In this method, the dispersion supplied to each structural level is the sum of a Guinier exponentially and structurally limited power law tail (Craievich, 2002). The values of  $R_g$ , the radius of gyration, and  $P$ , the exponential decay from those values define the size, shape and fractal distribution of the particles. The analyses were performed at the small angle X-ray scattering (SAXS) line D11A at the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil) using the wavelength 1488 nm, the routine evaluation Irena (Ilavsky and Jemian, 2009) implemented in Igor Pro (WaveMetrics, Portland, USA) software (Kline, 2006).

### 2.5.4 Zeta potential

The zeta potential of the hybrid materials were measured using a dynamic light scattering technique on a Zeta Sizer Nano (Malvern Instruments, UK). The dispersions were diluted with deionized water (approximately 50 mg to ensure that the light scattering intensity was within the instrument's sensitivity range) and introduced into a closed capillary cell (DTS 1060).

#### 2.5.5 X-ray diffraction (XRD)

Powder X-ray diffraction data was obtained on a Bruker D500 advanced X-ray diffractometer using Cu/K $\alpha$  radiation at a scan of  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ .

#### 2.5.6 Scanning electron microscopy (SEM)

Experiments were carried on a JEOL (Tokyo, Japan) JSM/6060 microscope to evaluate the morphological properties of the samples.

#### 2.5.7 Diffuse reflectance spectroscopy (DRS)

The materials were analyzed using diffuse reflectance UV-Vis in a Varian Cary 100 spectrophotometer operating over a wavelength range from 200 to 800 nm. All the standards presented UV-Vis spectra with an absorption maximum at  $257 \pm 0.2 \text{ nm}$  according Abts et al. (2011). The samples (powder) were directly analyzed in a 10-mm quartz cell set within the accessory Varian Lab sphere DRA-CA-30 with an average thickness of 5 mm. Samples were measured in triplicate. (Dos Santos; Dos Santos, 2016). The reflectance values were converted into Kubelka-Munk (1948) units using a function that converts reflectance units into absorbance units, as described by Eq. 1.

$$(K-M) = (1 - R_{\infty})^2 / (2R_{\infty}) \text{ (Eq. 1)}$$

where  $R_{\infty}$  is the diffuse reflectance of an infinitely thick sample.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Antimicrobial activity

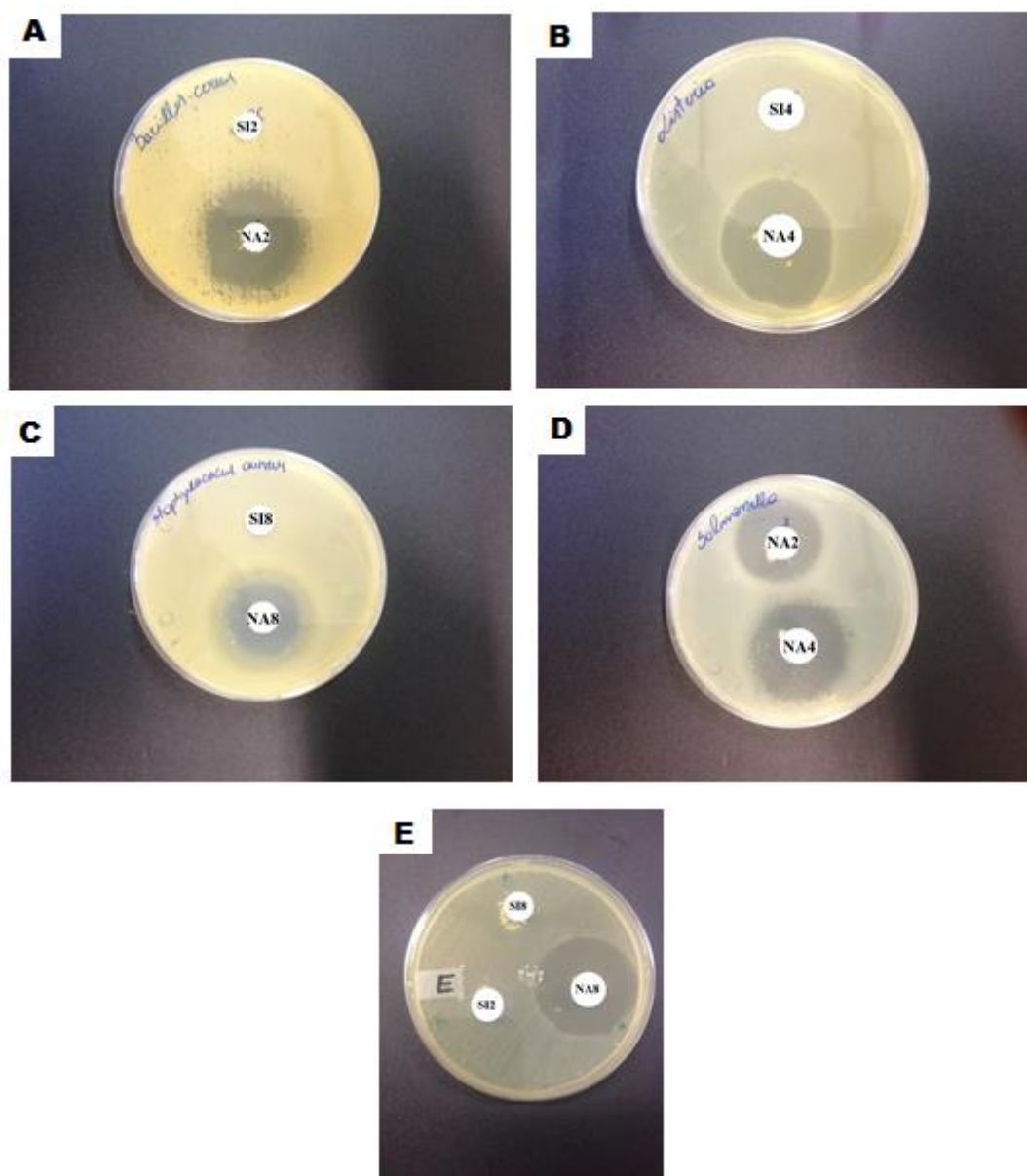
The antibacterial activity observed with NA2, NA4 and NA8 structures is summarized in Table 1. Figure 1 shows the images of inhibitory activities observed in agar plates.

**Table 1.** Antibacterial activity of nisin encapsulated samples and their respective controls.

Indicator bacteria	Inhibitory diameter (mm)					
	NA2	SI2	NA4	SI4	NA8	SI8
<i>B. cereus</i>	39.67±0.17	-	35.00±0.45	-	30.67±0.17	-
<i>L. monocytogenes</i>	33.00±0.45	-	32.34±0.17	-	30.34±0.17	-
<i>S. aureus</i>	35.34±0.17	-	31.67±0.24	-	25.34±0.17	-
<i>E. coli</i>	40.67±0.11	-	32.34±0.17	-	31.00±0.45	-
<i>Salmonella enterica</i>	32.67±0.11	-	35.34±0.17	-	29.00±0.45	-

(-) degree of inhibition not observed.

**Figure 1.** (A) Image of the plate test incubated with *Bacillus cereus* with NA2 and SI2 samples; (B) Image of the plate test incubated with *Listeria monocytogenes* with NA4 and SI4 samples; (C) Image of the plate test incubated with *Staphylococcus aureus* with NA8 and SI8 samples; (D) Image of the plate test incubated with *Salmonella enterica* with NA2 and na4 samples; (E) Image of the plate test incubated with *Escherichia coli* with NA8, SI8 and SI2 samples



All samples showed a strong inhibition against the bacteria tested. When the antibacterial action is compared among the samples for the same microorganism, NA2 formulation presented higher antibacterial activity, excepting for NA4 sample in the inhibition of *S. enterica*. NA2 sample showed the highest inhibitory zones against *E. coli* growth and NA8 sample presented the lowest inhibition of *S. aureus* growth. The amount of water in the routes did not influence the results of the antibacterial activity, once all the samples showed positive results. NA2 sample, however, showed the best results against in a general comparison.

The nisin concentration of the samples was calculated by adding 2.5 mg of nisin per mL of 0.1 mol.L<sup>-1</sup> HCl, resulting in 5 mg of nisin added in each sample tested. Antimicrobial analyzes for the determination of the minimal inhibitory concentration demonstrated that the minimum amount of nisin in the formulation required for the biological activity should be 5 mg.

Dawson et al. (2005) evaluated the antimicrobial activity of nisin adsorbed on commercial silica and found that it caused a reduction in a population of *L. monocytogenes* for values lower than 10 CFU mL<sup>-1</sup>. In another study, different formulations containing nisin (20-200 µg/mL) and ethylene-dianene tetra acetic acid (EDTA) (3-36 mM) resulted in inhibition halos between 7.5 and 18 mm against the bacteria *L. monocytogenes*, *E. coli* and *Salmonella* sp. (Khan et al., 2015).

The antibacterial action against Gram-negative bacteria seems to be directly related to the differences in the contact surface of the hybrid materials, to the stability in their surface charge and to the gradual release of the antimicrobial peptide. Dos Santos et al. (2017) reported that the surface phenomenon between the antimicrobial agent and the microbial cell is crucial for an inhibitory effect, and the charges present in all

systems tested should be considered. However, despite any tendency for repulsion, surface area can propiciate contact between the hybrid materials and the cellmembrane, favoring cellular inhibition among agents that should repel.

The minimum inhibitory concentration of encapsulated nisin of bacterial growth was tested by means of 5 different concentrations of the peptide by the agar-well diffusion method in order to test their antimicrobial activity, being 1.25; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 and 12.5 mg were tested. Table 2 shows the results of the antibacterial assays of the samples tested at different concentrations against the microorganism spectrum. The concentration of water was fixed in 2 mL (NA2 route), since the increase of water addition did not have a positive influence on the results of antibacterial activities, which already presented previously.

**Table 2.** Antibacterial activity of silica materials containing nisin at different concentrations.

<b>Concentration (mg)</b>	<b>1.25</b>	<b>2.50</b>	<b>5.00</b>	<b>7.50</b>	<b>10.00</b>	<b>12.50</b>
<b>Indicator bacteria</b>	<b>Inhibitory diameter (mm)</b>					
<i>B. cereus</i>	-	10.05	39.75	39.25	35.00	31.67
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	35.50	33.00	32.33	37.00
<i>S. aureus</i>	-	9.75	34.50	36.15	33.33	35.44
<i>E. coli</i>	-	-	39.95	37.75	32.33	32.67
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	31.95	33.25	35.33	36.67

(-) degree of inhibition not observed;

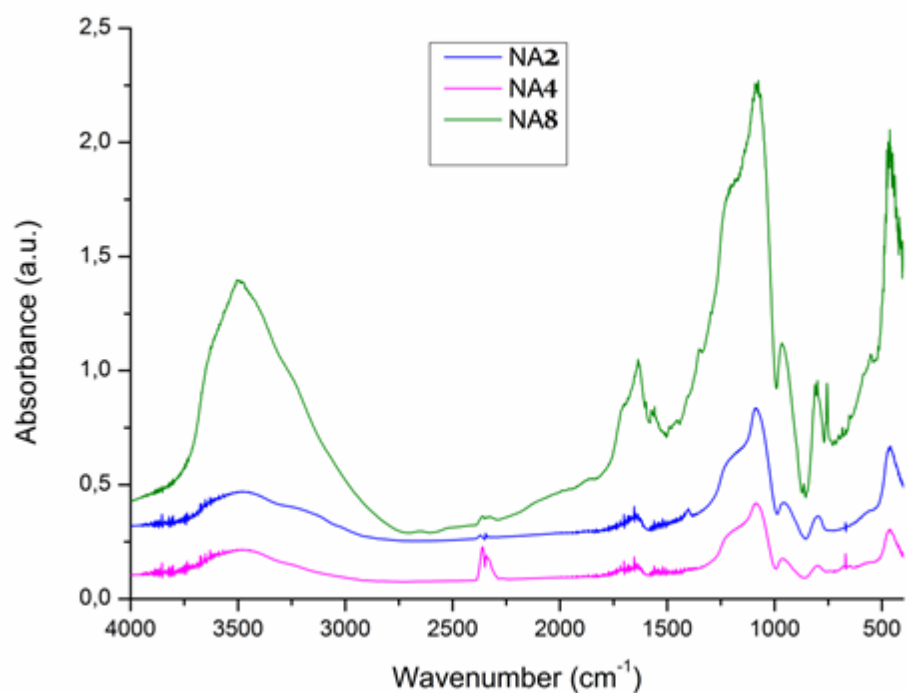
All samples with concentrations above 2.5 mg of nisin showed antibacterial activity against all tested microorganisms. The concentration of 1.25 mg of nisin did not present antibacterial activity against all tested microorganisms. Thus, according to the presented results, it can be indicated that the minimum inhibitory concentration of nisin encapsulated in silica is 5.0 mg, for the routes developed in this study.

The optimum pH of nisin activity is 3.5, therefore, conditions of acid catalysis reaction should favor the antibacterial activity of this compound. Furthermore, structural, textural and morphologic characterization was performed as further described to investigate the technical parameters that influenced the nisin activity.

### 3.2. Infrared spectroscopy

The characteristic organic groups of free nisin were not identified by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis, as shown in Figure 2. Only the characteristic bands of silica were observed in the bulk structural composition of the samples (Fidalgo and Ilharco, 2004).

**Figure 2.** Infrared Spectrum of NA2, NA4 and NA8 samples



Structural analyzes of infrared spectroscopy in attenuated reflectance mode (ATR) were performed to detect functional groups of nisin in the hybrid materials on the surface of the matrices as shown in Figure 3. The displacements of free nisin (FN) bands are observed in the structured samples and can be seen in Figure 4. Table 3 shows the interactions of the CH groups of the C=N groups with silica are most strongly visualized in the NA8 sample, but all samples showed displacements greater than  $4\text{ cm}^{-1}$ . Regarding the groups analyzed on the surface of the materials by ATR considering the valid displacements. The other bands identified in the infrared spectrum of nisin are not observed or do not undergo considerable displacement demonstrating that interactions occur between the hydroxyl groups present in their structure and the oxygen atoms of the group (-O-Si-O-) and the hydroxyl of the silane groups (-Si-OH) of the silica network formed after synthesis of the structured material.

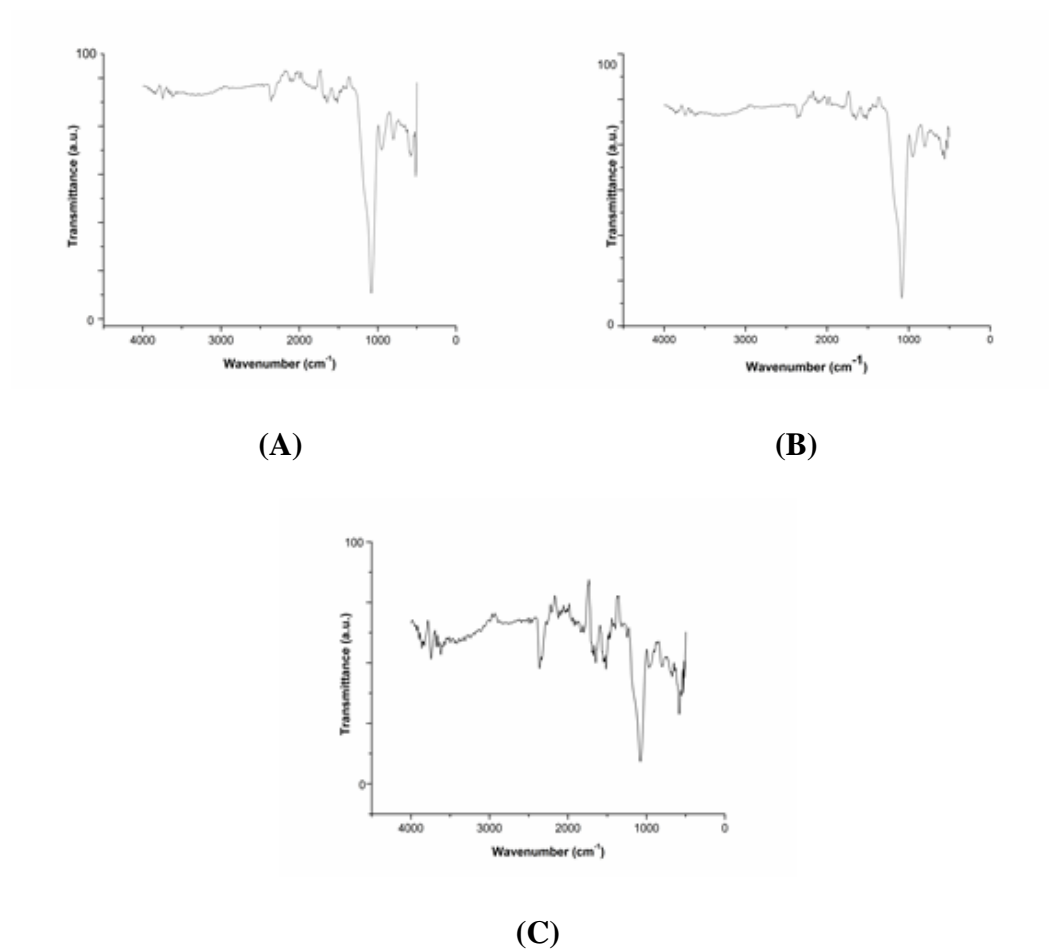
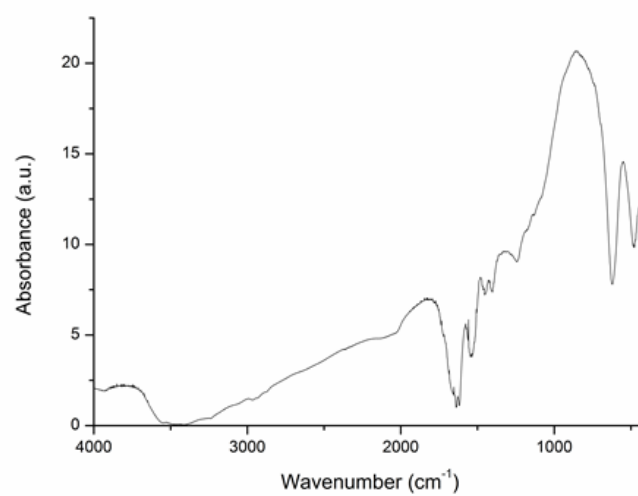
**Table 3.** Band assignments of the FTIR and ATR spectras of the structured materials containing nisin.

Band assignments	FTIR			ATR			
	FN <sup>a</sup>	NA2	NA4	NA8	NA2	NA4	NA8
$\nu$ OH (H <sub>2</sub> O + SiOH)	-	3464	3483	3502	3319	3327	3616
$\delta$ -d bond	-2356				2356	2343	2355
$\delta$ -axial (C=N)	2066				2089	2098	2118
$\delta$ H-OH (H <sub>2</sub> O)	-	1649	1647	1633	1658	1656	1639
F (C-H)	1532				1513	1517	1514
$\delta$ -(C=C-C)	1440				-	-	-
$\nu_{\text{as}}$ (Si-O-Si)	-	1092	1093	1089	-	-	-
$\nu$ (-OH)	570				567	576	584
$\nu_{\text{as}}$ (Si-O-Si)	-	1085	1085	1087	1076	1089	1071
$\nu_{\text{as}}$ (Si-OH)	-	958	962	966	936	950	955
$\nu_{\text{s}}$ (Si-O-Si)	-	798	798	800	802	793	793
$\nu_{\text{as}}$ (Si-O)	-	462	460	460	-	-	-



**Figure 3.** Attenuated total reflectance (ATR) spectra of the samples: (A) NA2; (B) NA4 and (C)

NA8

**Figure 4.** Infrared spectrum of free nisin (FN)

Angular deformation, which is attributed to the interactions of the C-H groups, and other angular deformation associated to the C=N group were observed on the surface of the hybrid materials, with more intensity in the NA8 sample. This mechanism can be viewed in the contributions of the -OH bonds with different organic groups, which may be related to differences in the electrolytic loads on the surfaces of the materials and as nisin has its activity from this surface. The X-ray diffraction (XRD) technique confirmed the typically amorphous character of the silica structures containing nisin and the presence of intense lamellar structures was not observed.

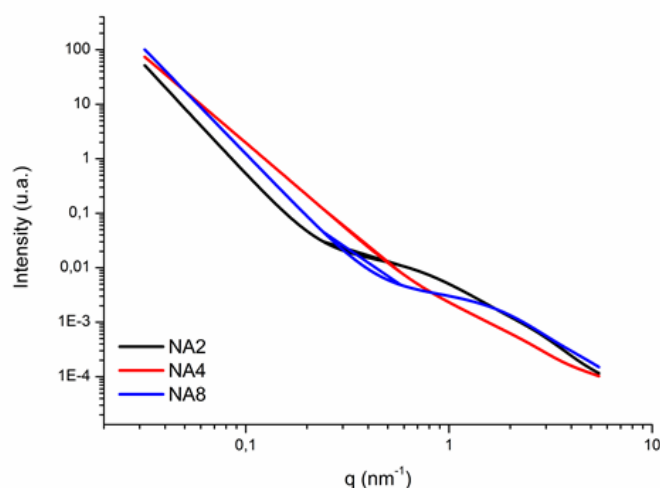
### *3.3. Structural characterization*

The morphological characterization of materials was evaluated by the small-angle X-ray scattering technique (SAXS), which allows the visualization of a multi-scale particle structure with a size between 1 and 100 nm. The SAXS curve of the materials presents a structure formed by levels of organization constituted by a region of Guinier and by a law of power (Law of Porot). Figure 5 shows the SAXS curves of the encapsulated samples. The Guinier region allows an estimate of the radius of rotation ( $R_g$ ), ie, the size of the primary particles, while the power law region provides details about the organization of the system. The size of the particles in the materials is a parameter performance of the route applied. Materials made from surface fractals have smaller surface areas when compared to materials with structures constituting fractals of mass (Salgado and González, 2003). Table 4 presents the coefficients  $\alpha$  (angular coefficients of the Law of Powers) and the values of radius of rotation and particle.

**Table 4.** Results of spinning radius, particle radius and angular coefficients of the Law of Powers of structured materials.

Sample	Level 1		Level 2		$\alpha$
	Rg 1(nm)	Rp1 (nm)	Rg 2 (nm)	Rp2 (nm)	
NA2	0.60	0.78	1.95	2.52	3.95
NA4	0.74	0.96	2.27	2.93	4
NA8	0.66	0.86	1.85	2.39	3.16

**Figure 5.** SAXS curve of structured materials

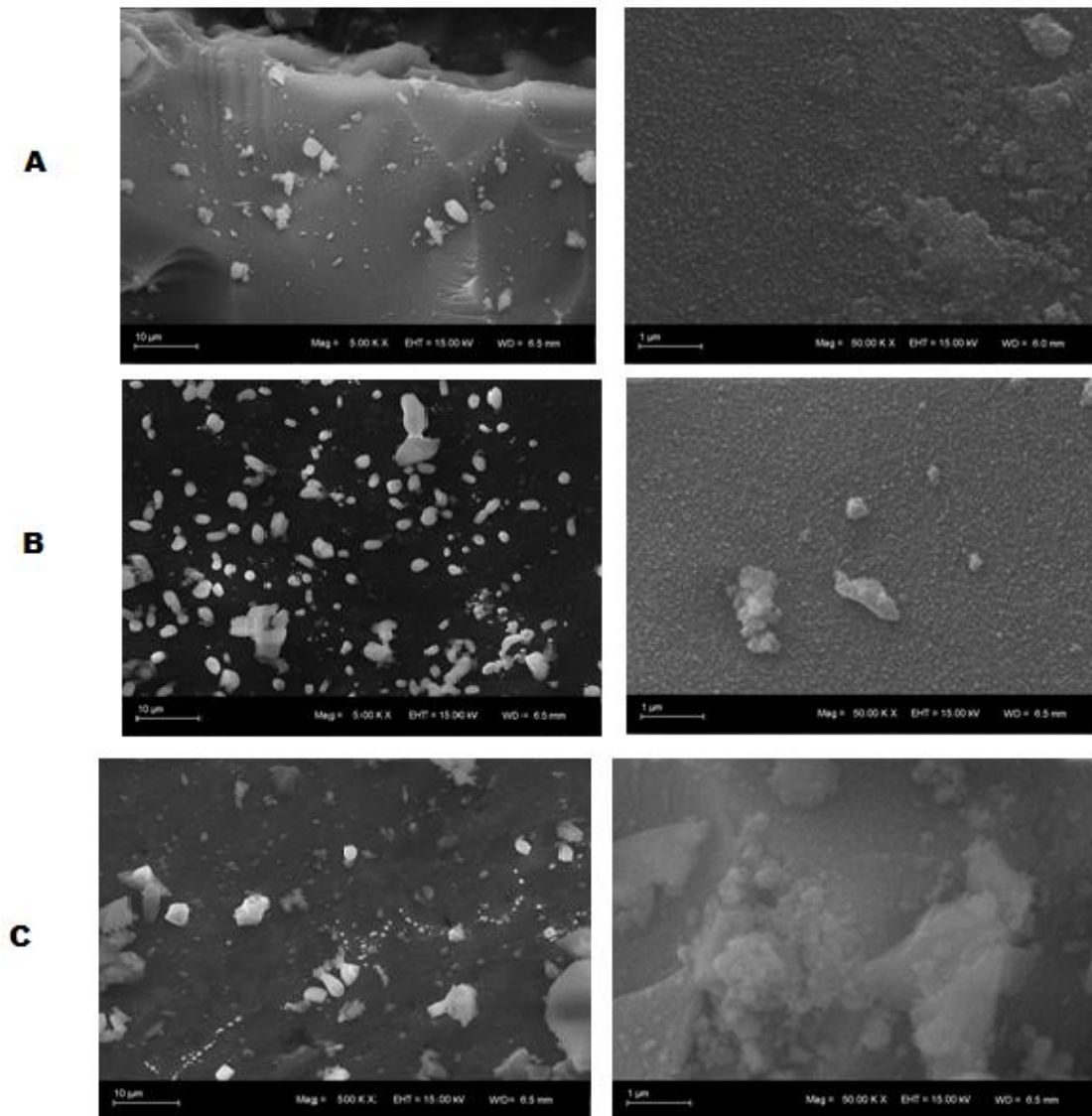


According to Table 4, all samples have two levels, being a Guinier region, located at high values of  $q$ , and a region that can be analyzed by the power law, at lower values of  $q$ . The samples presented values of  $\alpha$  varying between 3.16 and 4.0, which indicates the degree of roughness of the surface of the nanocapsules. According to Beaucage (1996), surface fractures have exponents ranging from 3, when this is totally rough, to 4 when a smooth surface. The formation of pores in silica-based materials is related to the aggregation mechanism of the primary particles. In sol-gel reactions, the primary particles have a nanometric size and act as nuclei for gel formation. The diameters of the particles in thesecond level varied from 4.78 to 5.86 nm, indicating no

significant variation in their size, independent of the route applied.

The micrographs obtained by SEM are presented for samples NA2, NA4 and NA8 and for control samples in Figure 6.

**Figure 6.** SEM micrographs of samples a) NA2 / SI2; b) NA4 / SI4; c) NA8 / SI8



The micrographs of the encapsulated materials showed a compact surface with some granular formations of irregular morphology with different sizes of grains and that

the agglomerates are deposited on smooth surfaces with irregularities that can be uneven or a certain roughness. These images reinforce the results obtained by SAXS in which these samples were characterized as surface fractals, that is, structures with an organization tending to spherical, but with a certain roughness.

### 3.4 Physical characterization

The textural characterization of these materials was carried out using the nitrogen porosimetry technique, through the nitrogen adsorption / desorption isotherms of the silica nanocapsules containing nisin, as well as the pore distribution curves of the same. The materials were analyzed by UV vis diffused reflectance to evaluate the content of nisin in the routes employed. Table 5 shows the content of nisin, release of nisin in controlled-release test, specific areas, pore diameters, pore volumes and the zeta potential results of the silica materials containing and not containing nisin.

**Table 5.** Results of specific areas ( $S_{BET}$ ), pore diameters ( $D_p$ ) and pore volumes ( $V_p$ ) of structured materials.

System	Content (mg)	Liberation (%)	$S_{BET}^a$ ( $m^2 \cdot g^{-1}$ )	$D_{pBJH}^b$ (Å)	$V_p^c$ ( $cm^3 \cdot g^{-1}$ )	$ZP^d$ (mV)
NA2	4.58	60	$216.6 \pm 2.92$	$27.6 \pm 1.97$	0.223	$-7.75 \pm 0.30$
NA4	4.32	58	$204.7 \pm 0.87$	$26.8 \pm 0.38$	0.132	$-10.60 \pm 0.69$
NA8	4.42	68	$425.9 \pm 2.68$	$25.7 \pm 2.68$	0.262	$-8.32 \pm 0,24$
SI2	-	-	$370.4 \pm 1.75$	$44.8 \pm 0.76$	0.624	$-1.40 \pm 0.12$
SI4	-	-	$311.8 \pm 1.43$	$52.4 \pm 0.63$	0.236	$-1.79 \pm 0.43$
SI8	-	-	$622.7 \pm 3.23$	$39.3 \pm 0.97$	0.342	$-2.14 \pm 0.41$

<sup>a</sup>  $S_{BET}$ : BET surface area at  $P/P_o - 0.20 \pm SD$  (n-8)

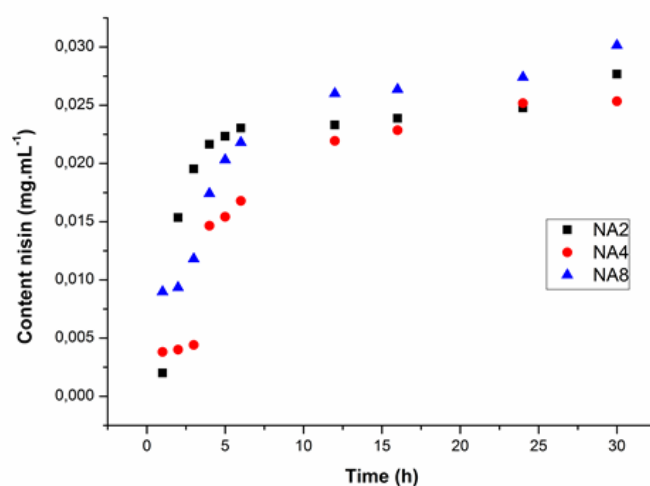
<sup>b</sup>  $V_p$ : pore volume estimated at  $P/P_o - 0.9$

<sup>c</sup>  $D_p$ : mean pore diameter calculated from the pore size distribution  $\pm SD$  (n-8)

<sup>d</sup> ZP: zeta potential.

According Table 5, the efficiency of encapsulation in each route was: NA2 = 91.5% [4.6 mg]; NA4 = 86.4% [4.3 mg] and NA8 = 88.4% [4.4 mg]. Therefore, the most efficient route in amount of nisin bound in the silica structure was NA2. According to the controlled release test, the NA8 sample presented higher release of nisin in 30 h, which may be related to higher surface area and smaller pore diameter of the sample, with less resistance to detachment. However, the NA2 sample presented higher release when considered the first 6 hours of the experiment as shown in Figure 7, which is directly connected to the exponential growth curve of the microorganisms, which, according Levinson (2014), has an exponential growth phase of up to 360 min in a plaque test and this factor may have contributed to the higher antibacterial activity presented by sample.

**Figure 7.**Release of nisin from structured materials

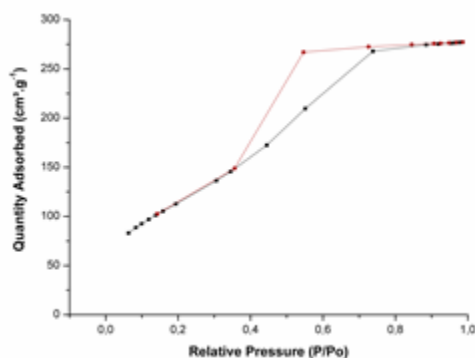


The zeta potential values obtained for the three samples were similar, being all negative and less than -30 mV, suggesting that the addition of nisin in the sol-gelencapsulation acidic route with addition of water affected the surface charge value of the particles, due to the cationic nature of nisin. In addition, Dos Santos et al.(2017)

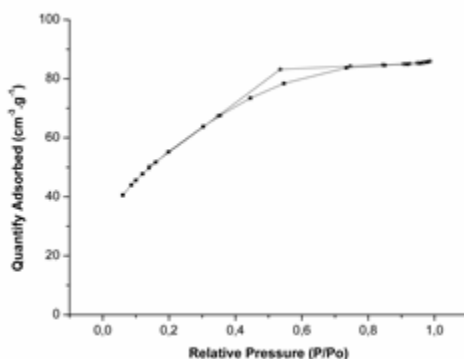
reported the adsorption of compounds on the surface of the hybrid materials can be understood by the knowledge of their electrostatic charge. The measured value gives an indication of the instability of the suspension. It has been suggested that particles with zeta potential values greater than +30 lower than -30 mV form stable suspensions. However, some nanomaterials with zeta potential values within the range -30 to + 30 mV showed good stability (Taylor et al. 2008).

Figure 8 shows the isotherms of structured samples, as well as the pore distribution curves.

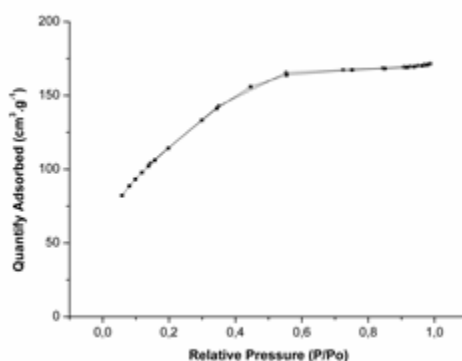
**Figure 8.** N<sub>2</sub> adsorption / desorption isotherms and pore distribution curves of the structured materials (A) NA2; (B) NA4; and (C) NA8



(A)



(B)



(C)

The adsorption/desorption isotherms demonstrated that hysteresis formation behavior of the samples is inversely proportional to the increase of the water amount used in the routes, since the NA2 sample, which has lower water addition, presented an isotherm with more evident hysteresis, which indicates the formation of mesopores on the surfaces, while the NA8 sample, which has the highest water addition, did not show hysteresis.

According to the International Union of Applied Chemistry (IUPAC) (1985), for the classification of adsorption isotherms, NA2 and NA4 samples presented Type IV isotherms, which unrestricted adsorption characteristic of multilayer monolayer in its initial part and hysteresis in its second part indicating a mesoporous texture. Type II isotherm is observed to NA8 sample to non-porous or microporous adsorbents. The shape of the isotherm is the result of high monolayer adsorption up to  $P/P_0$ . Point B is almost indistinguishable indicating a rapid coverage of the monolayer and the beginning of the adsorption in multilayers. Although, NA8 presents a specific area larger than NA2 and NA4 samples, the average pore size similar to the interaction with the adsorbent it was slower than others.



#### 4. CONCLUSION

Structured silica materials containing nisin with strong antibacterial activity can be obtained from sol-gel process. Due to the low pH, the acid synthesis promoted favorable conditions for the activation of nisin. The addition of deionized water in the modified acid route was a determinant factor to obtain an active system. However, in the comparison between samples with more and less water addition, the sample with less addition obtained greater presence of nisin bound to silica ( $4.58 \text{ mg.g}^{-1}$ ) and materials with high zeta potential value ( $-7.75 \text{ mV}$ ), high pore diameter ( $27.6 \text{ \AA}$ ) and surface fractals materials with nanometric second level particles diameter ( $5.04 \text{ nm}$ ). Such system was shown to be active against Gram-positive as well as Gram-negative bacterial growth.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The Center for Electronic Microscopy (CME, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) and the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil) are acknowledged for their contribution in SEM and SAXS (Project D11A-SAXS1 - 15911) analyses, respectively.

#### CONFLICTS OF INTEREST

Authors declare no conflicts of interest regarding this manuscript.

**REFERENCES**

- ABTS, A.; MAVARO, A.; STINDT, J.; BAKKES, P. J.; METZGER, S.; DRLESSEN, A. J. M.; SMITS, S. H. J.; SCHMITT, L. Easy and rapid purification of highly active nisin. **International Journal of Peptides**, v. 1, p. 1-9, 2011.
- AEGERTER, M. A.; JAFELICCI, M. Jr.; SOUZA, D. F.; ZANOTTO, E. D. Winter school on glasses and ceramics from gels. **Sol-gel Science and Technology**. World Scientific. Hong Kong, p. 323-345.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal Pharmaceutical Analysis**, v. 1, p. 1-9, 2016.
- BEAUCAGE, G. Small-angle scattering from polymeric mass fractals of arbitrary mass-fractal dimension. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 29, p. 134–146, 1996.
- BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 731-741, 2012.
- BRANDELLI, A.; BRUM, L. F. W.; SANTOS, J. H. Z. Nanobiotechnology methods to incorporate bioactive compounds in food packaging. In: Shivendu Ranjan; Nandita Dasgupta; Eric Lichtfouse. (Org.). **Nanoscience in Food and Agriculture**. 1ed. Cham: Springer International Publishing, v. 2, p. 27-58, 2016.
- CE, N.; NOREÑA, C. Z.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. **CyTA – Journal of Food**, v. 10, n. 1, p. 21–26, 2012.
- CHEN, H.; DAVIDSON, M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. **International Journal of Food Microbiology**, v.191, p. 75–81, 2014.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982–989, 2008.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

CRAIEVICH, A. F. Synchrotron SAXS studies of nanostructured materials and colloidal solutions: a review. **Mater. Res.**, v. 5, p. 1-11, 2002.

DAWSON, P. L.; HARMONC, L.; SOTTHIBANDHUB, A.; HANA, I. Y. Antimicrobial activity of nisin-adsorbed silica and corn starch powders. **Food Microbiology**, v. 22, p. 93–99, 2005.

DE MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52(303), p. 921-938, 2005.

DOS SANTOS, C.; VARGAS, A.; FRONZA, N.; DOS SANTOS, J. H. Z. Structural, textural and morphological characteristics of tannins from *Acacia mearnsii* encapsulated using sol-gel methods: Applications as antimicrobial agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 151, 26–33, 2017.+

FIDALGO, A.; ILHARCO, L. M. Chemical Tailoring of Porous Silica Xerogels: Local Structure by Vibrational Spectroscopy. **Chem. Eur. J.**, v. 10, p. 392- 398, 2004.

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry, Reporting physisorption data for gas/solid systems (Recommendations 1984). Printed in Great Britain. **Pure & Appl. Chem.**, n. 57, ,v. 4, p. 603–619, 1985.

JOZALA, F.; NOVAESA, L. C. L.; MAZZOLAB, P. G.; NASCIMENTO, L. O.; PENNA, T. C. V.; TEIXEIRA, J. A.; PASSARINHA, L. A.; QUEIROZ, J. A.; JÚNIOR

A. P. Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 9, n. 3, p. 115–121, 2015.

KHAN, A.; VU, K. D.; RIEDL, B.; LACROIX, M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 124-129, 2015.

KUBELKA, P. **J. Opt. Soc. Am.**, v. 38, p. 448–459, 1948.

LEVINSON, W. **Review of medical microbiology and immunology**. 13th edition. LLC, New York, 2014.

MEIRA, S. M. M. ; ZEHETMEYER, G. ; JARDIM, A. I. ; SCHEIBEL, J. M. ; OLIVEIRA, R. V. B. ; BRANDELLI, A.. Polypropylene/Montmorillonite Nanocomposites Containing Nisin as Antimicrobial Food Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 3349-3357, 2014.

MORAIS, E. C.; CORREA, G. G.; BRAMBILLA, R.; LIVOTTO, P. R.; SANTOS, J. H. Z.; CARDOSO, M. B. Silica imprinted materials containing pharmaceuticals as a template: textural aspects. **Journal Sol-Gel Science Technology**, v. 64, p. 324–334, 2012.

NCCLS, **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**, 27 (1, eighth edition, The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania, 2007, 168 p., NCCLS document M2-A8 and document M100-517, 2003.

SALGADO, J.C.R.; GONZALEZ, E.R. Correlação entre a atividade catalítica e o tamanho de partículas de Pt/C preparados por diferentes métodos. **Ecl. Quim.** São Paulo, 28 (2), 77-85, 2003.

SCHUBERT U.; HÜSING, N. **Synthesis of inorganic materials**. xvii, Weinheim ; New York : Wiley-VCH, 396 p., 2000.

SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. **Journal Nanoparticules Research**, v. 16, p. 24-79, 2014.

WILLEY, J. D. Kirk-Othmer-Concise. **Encyclopedia of Chemical Technology**. Wilwy& Sons: New York, p. 1054, 1985.

ZIMET, P.; MOMBRÚ, A W.; FACCIO, R.; BRUGNINI, G.; MIRABALLES, I.; RUFO, C.; PARDO, H. Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. **LWT - Food Science and Technology**, v.91, p. 107–116, 2018.

## Capítulo 4

### CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou ser viável a produção de nanoestruturas de sílica contendo nisina através do processo sol-gel utilizando a rota ácida. As nanocápsulas de sílica adicionadas de nisina foram desenvolvidas a partir de rotas otimizadas com adição de H<sub>2</sub>O e apresentaram grande atividade antibacteriana frente à espectros Gram-positivos e Gram-negativos. Os materiais apresentaram sílica amorfa, instabilidade eletrônica e morfologia de grãos não uniformes sobre superfícies rugosas e os aglomerados no segundo nível apresentaram tamanho variando entre 4.78 to 5.86 nm.

As características texturais e morfológicas também afetaram o desempenho dos materiais. Materiais encapsulados com áreas específicas menores e superfícies mais lisas, mas com certa rugosidade, além de diâmetros de poro maiores contribuíram para maior desempenho quanto à ação antimicrobiana.

Foi possível também desenvolver nanocápsulas de sílica adicionadas de estreptomicina via processo sol-gel a partir de rotas ácida e básica. A maior

atividade antibacteriana foi observada para as nanocápsulas que foram produzidas via rota ácida, sendo que ambos os sistemas não apresentaram toxicidade contra células de mamíferos.

Os filmes antimicrobianos biodegradáveis contendo as nanoestruturas de sílica com nisina e produzidos com gelatina, PLA e PHA apresentaram atividade antibacteriana contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, apresentando potencial para aplicação como embalagem conservante de alimentos de fontes renováveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIRY, M. A.; KARAAWI, M. A. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 1-11, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi.asp](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi.asp). Acesso em: 19-Jul-2015.

BERNARDES, A. A.; RADTKE, C.; ALVES, M. C.; BALBICH, I. M.; LUCCHESI, M.; SANTOS, J. H. Z. Synthesis and characterization of SiO<sub>2</sub>-CrO<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub>-MoO<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub>-WO<sub>3</sub> mixed oxides produced using the non-hydrolytic sol-gel process. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 69, p. 72-84, 2013.

BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 731-741, 2012.

BRANDELLI, A.; BRUM, L. F. W.; SANTOS, J. H. Z. Nanobiotechnology methods to incorporate bioactive compounds in food packaging. In: Shivendu Ranjan; Nandita Dasgupta; Eric Lichtfouse. (Org.). **Nanoscience in Food and Agriculture**. 1ed. Cham: Springer International Publishing, v. 2, p. 27-58, 2016.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 223-234, 1999.

BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The Sol-Gel Preparation of Silica Gels. **J. Chem. Educ.**, 71 (7), p. 599, July 1994.



CARMAN, P. C. Constitution of colloidal silica. **Trans. Faraday Soc.** v. 36, p. 963-974, 1940.

CE, N.; NOREÑA, C. Z.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. **CyTA – Journal of Food**, v. 10, n. 1, p. 21–26, 2012.

CHEN, H.; DAVIDSON, M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. **International Journal of Food Microbiology**, v.191, p. 75–81, 2014.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982–989, 2008.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute - Manual*. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), 2007. Acesso em: 12-Dez-2015.

COPELLO, G. J.; TEVES, E. S.; DEGROSSI, E. J.; D'AQUINO, E. M.; DESIMONE, M. F.; DIAZ, E. L. E. Antimicrobial activity on glass materials subject to disinfectant xerogel coating.. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 33, p. 343–348, 2006.

CORRADINI, C.; ALFIERI, I.; CAVAZZA, A.; LANTANO, C.; LORENZI, A.; ZUCHETTO, N.; MONTENERO, A. Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol–gel technique. *Journal of Food Engineering*, v. 119, P. 580–587, 2013.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

CUI, H. Y.; WU, J.; LI, C. Z.; LIN, L. Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. **Dairy Sci.** v. 99, p. 1–9, 2016.

DAWSONA, P. L.; HARMONC, L.; SOTTHIBANDHUB, A.; HANA, I. Y. Antimicrobial activity of nisin-adsorbed silica and corn starch powders. **Food Microbiology**, v. 22, p. 93–99, 2005.

DE MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52(303), p. 921-938, 2005.

DIVSALARA, E.; TAJIKA, H.; MORADIA, M.; FOROUGH, M.; LOTFIA, M.; KUSWANDIC, B. Characterization of cellulosic paper coated with chitosan-zinc oxidenanocomposite containing nisin and its application in packaging of UFcheese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1311–1318, 2018.

DO NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocins in food: a review. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

DOS SANTOS, C.; VARGAS, A.; FRONZA, N.; dos SANTOS, J. H. Z. Structural, textural and morphological characteristics of tannins from *Acacia mearnsii* encapsulated using sol-gel methods: Applications as antimicrobial agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 151, 26–33, 2017.

EMAMIFAR, A. Applications of Antimicrobial Polymer Nanocomposites in Food Packaging, **Advances in Nanocomposite Technology**, Dr. AbbassHashim (Ed.), ISBN: 978-953-307-347-7, InTech, DOI: 10.5772/18343, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/s8620e/S8620E06.htm> Acesso em 23-Jan-2015.

FIB. FOOD INGREDIENTS BRASIL **Revista Fib**. n. 15 – 2010.

GUIDECHEM. Guidechem Chemical Products. Disponível em: <http://www.guidechem.com/>. Acesso em: 13-Jan-2017.

HABER, J. **Catalisys: Science and Technology**. Anderson, J. R. Boudart, M. (Eds). Springer: Berlim, 2 ed., p. 13, 1980.

JOZALA, F.; NOVAESA, L. C. L.; MAZZOLAB, P. G.; NASCIMENTO, L. O.; PENNA, T. C. V.; TEIXEIRA, J. A.; PASSARINHA, L. A.; QUEIROZ, J. A.; JÚNIOR, A. P. Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 9, n. 3, p. 115–121, 2015.

KHAN, A.; VU, K. D.; RIEDL, B.; LACROIX, M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 124-129, 2015.

KHAN, I.; OH, D. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 376–384, 2016.

KRIVOROTOVA, T.; CIRKOVAS, A.; MACIULYTE, S.; STANEVICIENE, R.; BUDRIENE, S.; SERVIENE, E.; SEREIKAITĖ, J. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 49-56, 2016.

LÓPEZ-RUBIO, A.; ALMENAR, E.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; LAGARÓN, J. M.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Overview of active polymer-based packaging Technologies for food applications, **Food Review International**, v. 20(4) p. 357-387, 2004.

LUCHESE C. L.; BRUM, L. F. W.; PIOVESANA, A.; CAETANO, K.; FLÔRES, S. H. Bioactive compounds incorporation into the production of functional biodegradable films – a review. **Polymers from Renewable Resources**, v. 8, n. 4, p. 133-158, 2017.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; BRANDELLI, A. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. **Food Control**, v. 23, p. 42-47, 2012.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, v. 27, p. 175–178, 2010.

MEIRA, S. M. M. ; ZEHETMEYER, G. ; JARDIM, A. I. ; SCHEIBEL, J. M. ; OLIVEIRA, R. V. B. ; BRANDELLI, A.. Polypropylene/Montmorillonite Nanocomposites Containing Nisin as Antimicrobial Food Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 3349-3357, 2014.

MELLO, M. B.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; SILVEIRA, N. P.; JANTZEN, M. M.; MOTTA, A. S. Characterization and antilisterial effect of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide pediocin. **Probiotics&AntimicrobialProteins**, v. 5, p. 43–50, 2013.

MORAIS, E. C.; CORREA, G. G.; BRAMBILLA, R.; LIVOTTO, P. R.; SANTOS, J. H. Z.; CARDOSO, M. B. Silica imprinted materials containing pharmaceuticals as a template: textural aspects. **Journal Sol-Gel Science Technology**, v. 64, p. 324–334, 2012.

MOROW, B. A. **Study Surfaces Science**. Catal. 57<sup>a</sup>, A161, 1990.

NASSAR, E. J. Base and acid catalysis in the preparation of functionalized silica obtain by sol-gel method. **Quím. Nova** v.25 n.1, p. 27-31, 2002.

PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative. Food Science and Emerging Technologies*, v. 36, p. 287–293, 2016.

SAKKA, S. (Ed). **Handbook of Sol-Gel Science and Technology**. Processing Characterization and Application, Kluwer Acad. Publish., Boston/Dordrecht/London, 2005.

SALGADO, J.C.R.; GONZALEZ, E.R. Correlação entre a atividade catalítica e o tamanho de partículas de Pt/C preparados por diferentes métodos. **Ecl. Quim.** São Paulo, 28 (2), 77-85, 2003.

SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; OLIVERA, F. C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of Peptide P34 during thermal processing. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 73–79, 2013.

SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. **Journal Nanoparticules Research**, v. 16, p. 24-79, 2014.

STOBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, p. 62-69, 1968.

TAI, Y.; MCGUIRE, J.; NEFF, J. A. Nisin antimicrobial activity and structural characteristics at hydrophobic surfaces coated with the PEO–PPO–PEO triblock surfactant Pluronic® F108. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 104–111, 2008.

VAN DEN HOOVEN, H. W.; DOELAND, C. M.; VAN DE KAMP, M.; KONINGS, R. N. H.; HILBERS, C. W.; VAN DE WEN, F. J. M. Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. **Eur. J. Biochem.** v. 235, p. 382-393, 1996.

ZHANG, Z.; VRIESEKOOP, F.; YUAN, Q.; LIANG, H. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 150, p. 307–312, 2014.

WILLEY, J. D. Kirk-Othmer-Concise. **Encyclopedia of Chemical Technology**. Wiley & Sons: Nova Iorque, p. 1054, 1985.

WOLSTENHOLME, G. E. **The chemical structure of proteins**. Berlin, 1 ed. p. 141-146, 1953.

## Apêndice

Nesta seção serão apresentados a metodologia e os resultados da aplicação dos materiais estruturados em diversos tipos de filmes biodegradáveis com o objetivo de investigar o comportamento das mesmas frente aos diversos tipos de processos de obtenção de filmes e sua posterior funcionalidade antibacteriana.

### A1 Materiais

Os materiais utilizados para a elaboração dos filmes biodegradáveis estavam disponíveis no acervo do Laboratório de Catálise e Polímeros do Instituto de Química e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram os seguintes:

- 1) Celulose
- 2) Gelatina
- 3) Poli (ácido lático) (PLA);
- 4) Polihidroxialcanoatos (PHA)
- 5) Amido de milho
- 6) Ácido metacrílico (MAA).

Foram utilizados no preparo dos filmes as nanoestruturas de sílica contendo nisina proveniente da rota de encapsulamento NA2, que obteve os melhores resultados de atividade antibacteriana e melhor eficiência de encapsulamento, conforme apresentado anteriormente no Artigo 2.

## A2 Metodologia

### A 2.1 Preparo dos filmes biodegradáveis

As nanoestruturas de sílica contendo nisina foram submetidas a 7 diferentes preparações de filmes biodegradáveis:

#### 1) Filmes de gelatina

A solução pré-filme foi obtida pela técnica de *casting* hidratando-se 3 g de gelatina em 50 mL de água deionizada por 1 hora. Após esse período, a solução foi submetida à agitação de 100 rpm a 60°C, em banho termostático por 10 min. Após completa solubilização, foi adicionado glicerol (10% em relação a massa seca da gelatina) e 100 mg da amostra NA2, sob agitação magnética, até a homogeneização da amostra. O volume de cada porção da solução formadora do filme (20 ml), foi vertido sobre placas de Petri (14 cm x 14 cm) e secos à temperatura ambiente por aproximadamente 72 h. Foi realizado o mesmo procedimento sem a incorporação da amostra NA2 para obtenção de uma amostra controle.

#### 2) Filmes de PLA

A solução pré-filme foi obtida pela técnica de *casting* diluindo-se 2 g de PLA em 50 mL do agente plastificante 1-2 dicloroetano, incorporando também na mistura 100 mg da amostra NA2 sob agitação de 200 rpm por 6 h. O volume de cada porção da solução formadora do filme (20 ml), foi vertido sobre placas de Petri (14 cm x 14 cm) e secos à temperatura ambiente por aproximadamente 48 h. Foi realizado o mesmo procedimento sem a incorporação da amostra NA2 para se obter uma amostra controle.

#### 3) Filmes de (PLA + Celulose)

A solução pré-filme foi obtida pela técnica de *casting* diluindo-se 2 g de PLA e 200 mg de pasta de celulose em 50 mL do agente plastificante 1-2 dicloroetano, incorporando também na mistura 100 mg da amostra NA2 sob agitação de 200 rpm por 6 h. O volume de cada porção da solução formadora do filme (20 mL), foi vertido sobre placas de Petri (14 cm x 14 cm)



e secos à temperatura ambiente por aproximadamente 48 h. Foi realizado o mesmo procedimento sem a incorporação da amostra NA2 para se obter uma amostra controle.

#### 4) Filmes de polihidroxialcanoatos (PHA)

A solução pré-filme foi obtida pela técnica de *casting* hidratando-se 3 g de gelatina em 50 mL de água deionizada por 1 hora. Após esse período, a solução foi submetida à agitação de 100 rpm a 60°C, em banho termostático por 10 min. Após completa solubilização, foi adicionado glicerol (10% em relação a massa seca da gelatina), 400 mg de PHA (biopoliéster biodegradável produzido em laboratório) e 100 mg da amostra NA2, sob agitação magnética, até a homogeneização da amostra. O volume de cada porção da solução formadora do filme (20 ml), foi vertido sobre placas de Petri (14 cm x 14 cm) e secos à temperatura ambiente por aproximadamente 72 h. Foi realizado o mesmo procedimento sem a incorporação da amostra NA2 para obtenção de uma amostra controle.

#### 5) Hidrogel de amido

Para a obtenção do hidrogel de amido utilizou-se 10g de amido de milho e 180 mL de água deionizada que foram misturados em um béquer até completa homogeneização e, então, foram adicionados 100 mg da amostra NA2. Após, a mistura foi aquecida a uma temperatura de 300°C sob agitação magnética a 200 rpm até que atingisse 96°C internamente. Deixou-se o composto formado a temperatura ambiente por alguns minutos, e na sequência transferiu-se para um tubo Falcon e para congelamento por 24h seguido de descongelamento por 2h. Posteriormente os géis foram congelados novamente por 24 h e liofilizados. O liofilizador utilizado foi o da Marca Liotop, Modelo L101 a uma temperatura de -55°C. Foi realizado o mesmo procedimento sem a incorporação da amostra NA2 para obtenção de uma amostra controle.

#### 6) Polimerização com ácido metacrílico (MAA)

Em uma primeira etapa ocorre a pré-polimerização, onde ocorre uma interação entre o monômero funcional (ácido metacrílico, MAA) e a molécula molde – a nisina. Em um Becker são adicionados 2,370 milimol (0,2 mL) de MAA juntamente com 0,0647 milimol (35 mg) do indicador e 3,1360 (1 mL) do agente de reticulação trimetilolpropanotrimetacrilato (TMPTMA) em 35 mL de solvente, acetonitrila, que atua como agente porogênico. Os reagentes interagem por 24 horas à temperatura ambiente sob agitação magnética para assegurar a homogeneização do sistema.

Após o período de pré-polimerização, a solução é vertida em um copo de Teflon® (de 100 mL), que é inserido em uma autoclave de aço inoxidável. Junto à solução são acrescentadas 28 mg do iniciador radicalar 1,1'- azobis. O sistema é submetido, por 5 minutos, em fluxo de argônio para remoção do oxigênio presente. Vencido este procedimento, a autoclave é devidamente selada e anexada em uma estufa com rotação mecânica (MARCONI, SP, BR) mantendo sob agitação e temperatura constante de 90°C por 24 horas. O polímero final é obtido por decantação, onde passa por uma etapa de secagem à 50°C por 12 horas, e uma moagem até obter um pó fino e homogêneo, e por último, é acondicionado em frascos de vidro âmbar.

#### *A2.2 Análise termogravimétrica (TGA)*

Os materiais estruturados com nisina foram submetidos à análise termogravimétrica que foram realizadas em um analisador TGA Q50 V6.4 Build 193. Cerca de 5 mg de cada amostra foram aquecidas em um intervalo de 25 a 800°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

#### *A2.3 Análise da atividade antibacteriana*

Após finalizados, os filmes e polímeros ativos e controles foram submetidos à análise de atividade antibacteriana frente a uma espécie Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma espécie Gram-negativa (*Escherichia*

*coli*) através do método ágar disco adaptado para os filmes e ágar poço adaptado para os pós homogêneos. Então, os filmes ativos que apresentaram atividade antibacteriana foram caracterizados quanto a morfologia, estrutura e propriedades mecânicas.

#### *A2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O tamanho e a forma dos agregados nos filmes ativos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura num microscópio eletrônico de varredura de JEOL, modelo JSM 6060, operando em 10 kv. Cada amostra foi preparada colocando-se uma quantidade mínima suficiente para cobrir a fita de carbono fixada no suporte de alumínio (stub) formando uma fina camada e após metalização pela aplicação de uma fina camada de ouro.

#### *A2.5 Análise de propriedades mecânicas*

##### 1) Medida de espessura

A medida de espessura dos filmes foi realizada com um micrômetro milesimal 0-30 mm, marca Tesa e modelo Micromaster (precisão: 0,001 mm). Os resultados foram obtidos da média de cinco pontos de cada filme produzido.

##### 2) Ensaio de resistência à tração

Os filmes ativos e controles foram cortados em corpos de prova de 10 x 1,25 mm. O equipamento usado para estabelecer os parâmetros foi um Emic DL® modelo 2000. Ele foi equipado com uma célula de carga de 50N (Trd 18) e velocidade de 5 cm/min em temperatura em torno de 20°C sob 50% de umidade relativa. O ensaio de resistência à tração foi realizado em triplicata na posição axial baseado na norma ASTM D882-09 da *American Society for Testing Materials* (ASTM, 2009) em que foi avaliada a força máxima componente (em Newtons - N) versus deformação (mm) para determinação das propriedades mecânicas dos filmes produzidos. A força máxima é medida diretamente pelo instrumento e a resistência à tração ou tensão de ruptura ( $N \cdot mm^{-2}$  ou MPa) e a deformação na ruptura (%) são determinadas pelas Equações 1 e 2, respectivamente:

$$RT = FR.(LCP.ECP)^{-1} \text{ (Eq. 1)}$$

$$DR = (ET.DG^{-1}).100 \text{ (Eq. 2)}$$

Onde:

RT – Resistência à tração (N.mm<sup>-2</sup> ou MPa)

DR – Deformação na ruptura (%)

FR – Força de ruptura (N)

ET - Elongação total antes da ruptura do filme (mm)

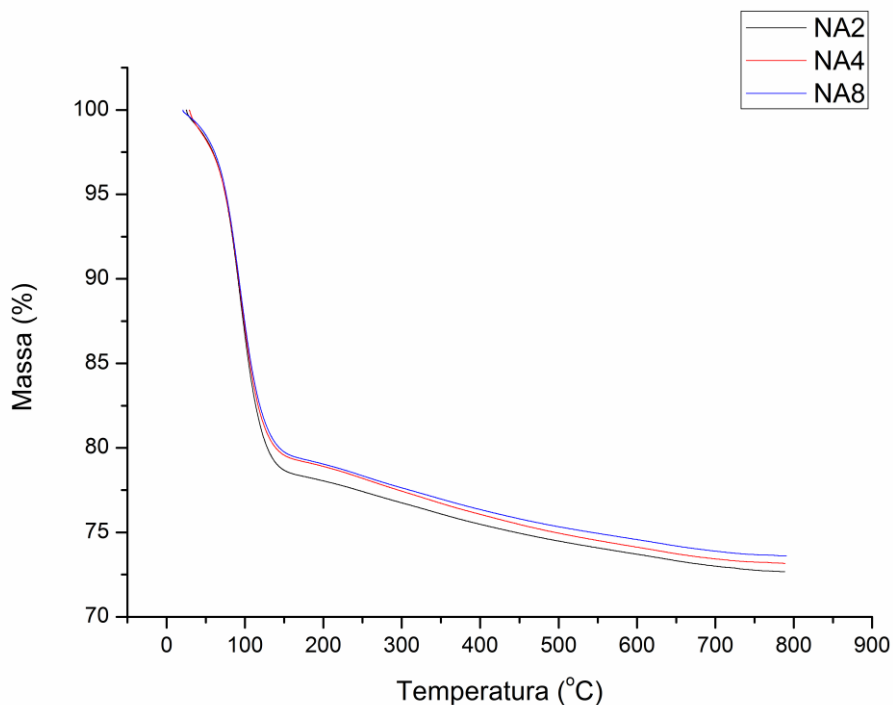
DG - Distância inicial entre as garras (mm)

LCP – Largura do corpo de prova (mm)

ECP - Espessura mediana do corpo de prova (mm)

### **A3 Resultados e Discussão**

As estruturas de sílica contendo nisina foram analisadas através de análise termogravimétrica (TGA), sendo possível avaliar a estabilidade térmica dos materiais.

**Figura A.1** Termograma das amostras NA2, NA4 e NA8.

O termograma apresentado na Figura A.1 apresenta comportamento similar para as três amostras, indicando uma rápida perda de massa entre 50 e 90°C (~5%) e uma intensa perda entre 90 e 140°C (~20%). A perda de massa continua menos atenuada a partir de 150°C até 800°C em uma variação de aproximadamente 10%.

Os filmes produzidos com as estruturas de sílica contendo nisina e os filmes controle sem nisina foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana frente a um espectro Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) e um espectro Gram-negativo (*Escherichia coli*). A Tabela A.1 apresenta o resultado das análises da atividade antibacteriana medida em halo de inibição (mm).

**Tabela A.1** Atividade antibacteriana de filmes/materiais biodegradáveis contendo nisina

Filme/material	Atividade antibacteriana em halo de inibição (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Celulose	-
Celulose controle	-	-
Gelatina	8,35 ± 0,15	-
Gelatina controle	-	-
PLA	11,75 ± 1,85	-
PLA controle	-	-
PLA + celulose	-	-
PLA + celulose controle	-	-
PHA	17,90 ± 0,30	-
PHA controle	-	-
Hidrogel de amido	-	-
Hidrogel amido controle	-	-
MAA	-	-
MAA controle	-	-

(-) Atividade antibacteriana não observada

De acordo com a Tabela A.1, apenas os filmes biodegradáveis produzidos com gelatina, PLA e PHA apresentaram atividade antibacteriana, sendo que o filme produzido com PHA apresentou maior valor de atividade. Porém, os materiais apresentaram apenas atividade antibacteriana frente ao espectro Gram-positivo *Staphylococcus aureus*, não tendo nenhum material apresentado atividade antibacteriana frente ao espectro Gram-negativo *Escherichia coli*.

Os filmes biodegradáveis que apresentaram atividade antibacteriana foram caracterizados morfolologicamente, bem como tiveram suas propriedades mecânicas avaliadas.

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas através dos parâmetros de espessura, resistência à tração e alongação e os valores estão apresentados na Tabela A.2.

**Tabela A.2** Propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis

<b>Filmes</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>	<b>Elongação (%)</b>
Gelatina	0,230	2,29 ± 0,22	89,71 ± 20,99
PLA	0,175	2,82 ± 0,19	2,03 ± 0,44
PHA	0,215	9,45 ± 4,32	4,32 ± 0,35

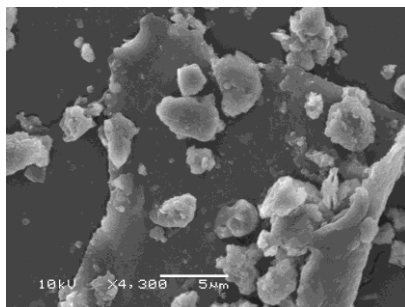
Os resultados das análises de resistência à tração indicam que o filme produzido com PHA obteve maior resistência à ruptura, ou seja, é necessário aplicar uma força aproximadamente quatro vezes maior para que ocorra a ruptura do que os demais filmes. Já o ensaio de alongação demonstrou que o filme produzido com gelatina possui característica de elasticidade extremamente superior às outras amostras, sendo este material mais maleável, enquanto os outros mais rígidos. As propriedades mecânicas de um filme biodegradável são importantes para manutenção da integridade estrutural de um produto bem como proteção física e controle de velocidade de liberação

A Figura A.2 apresenta as micrografias obtidas através de MEV para os três filmes que apresentaram atividade.

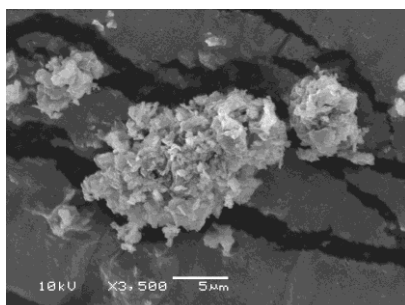
As imagens mostram que os filmes biodegradáveis produzidos possuem superfície com certa rugosidade, sendo que existem aglomerados não uniformes dispostos sobre esta superfície. A amostra de filme biodegradável produzido com PHA apresenta uma superfície mais lisa e com menos aglomerados do que as demais, indicando menor presença de material reticulado, ou uma melhor solubilização dos materiais de sílica no processo de *casting*.

**Figura A. 2** Micrografias dos filmes de 1) Gelatina; 2) PLA; 3) PHA.

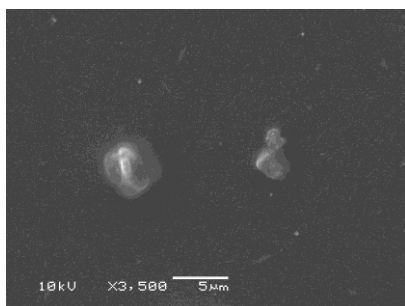
1) Gelatina



2) PLA



3) PHA





#### A 4 Trabalhos gerados da Tese de Doutorado

Os trabalhos associados a esta tese de doutorado foram:

- 1) BRANDELLI, A.; BRUM, L.F.W. ; SANTOS, J.H.Z. Nanobiotechnology methods to incorporate bioactive compounds in food packaging. In: Shivendu Ranjan; Nandita Dasgupta; Eric Lichtfouse. (Org.). **Nanoscience in Food and Agriculture**. 1ed.Cham: Springer International Publishing, 2016, v. 2, p. 27-58.
- 2) REVIEW Nanostructured bioactive compounds for ecological food packaging Adriano Brandelli; Luis Fernando Wentz Brum; João Henrique Zimnoch dos Santos. **Environ Chem Lett** (2017) 15:193–204 DOI 10.1007/s10311-017-0621-7
- 3) LF Brum, JH Dos Santos, A Brandelli. Antibacterial activity of encapsulated streptomycin in silica xerogels. Presentador/es de Poster en XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2016