

ISABELLA CAROLINA DA ROCHA PIRES

**USO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO
NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS CONTAMINANTES NA INDÚSTRIA
CERVEJEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P667u
2021

Pires, Isabella Carolina da Rocha, 1995-

Uso de nanopartículas de ouro e pontos quânticos de carbono no controle de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira / Isabella Carolina da Rocha Pires. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (59 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 48-56.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.081>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cerveja - Microbiologia. 2. Nanocompósitos (Materiais). 3. Nanopartículas. 4. Ouro. 5. Sólidos quânticos. 6. Carbono. 7. Cerveja - Indústria. I. Tótola, Marcos Rogério, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 663.42

ISABELLA CAROLINA DA ROCHA PIRES

**USO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO
NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS CONTAMINANTES NA INDÚSTRIA
CERVEJEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

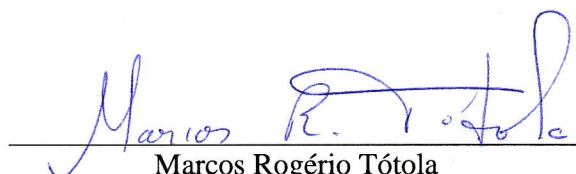
APROVADA: 07 de dezembro de 2021.

Assentimento:



Isabella Carolina da Rocha Pires

Autora



Marcos Rogério Tótola

Orientador

À minha mãe, Vania Georgina Pereira da Rocha, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar durante essa trajetória, dando-me saúde, coragem, fé, esperança e sabedoria para chegar até o fim.

À minha mãe, Vania, por ser a minha inspiração de força e coragem, por todo amor, apoio e dedicação aos meus sonhos. Ela é a razão de toda essa caminhada.

Ao meu afilhado Joaquim, por me fazer querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela estrutura e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, pelo apoio durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

À minha família, por estar sempre torcendo por mim. Em especial aos meus padrinhos Maria da Conceição, Teodorico, Vani, Thiago e Lidiane, por todo carinho, apoio e incentivo.

A todos os amigos do LBBMA, pelo companheirismo, por me ampararem nos momentos de dificuldade, por todos os conhecimentos compartilhados, pelo ambiente agradável de trabalho e pela amizade. Em especial a Beatriz, Karoline, Maria Theresa, Michelle e Tatiane.

À Professora Renata Pereira Lopes Moreira e ao técnico do laboratório LBBMA Alex Gazolla, por toda paciência, gentileza e carinho com os quais me ajudaram durante todo tempo. Gratidão por todo conhecimento compartilhado. Sem vocês esse trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos amigos do BIOTAN pelo acolhimento como profissional e amiga, por todo conhecimento compartilhado e por dividirem comigo os perrengues e alegrias. Vocês são sensacionais.

Aos meus amigos de Viçosa, Alexia, Rúzivia, Isabelle, Matheus, Rodrigo e Victor, por terem me acolhido, secado minhas lágrimas nos momentos de dificuldade, arrancado sorrisos e proporcionado momentos de alegria durante todo esse tempo. Gratidão por ter ganhado uma família.

Aos meus amigos distantes, Ana Paula, Thais, Larissa, Renata, Pollianna, Camila e Eduardo, por cada palavra de carinho, por sempre me receberem com amor durante as voltas para casa, por acreditarem em mim e por me incentivarem. Essa caminhada se tornou muito mais leve por saber que eles sempre estavam comigo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

PIRES, Isabella Carolina da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2021. **Uso de nanopartículas de ouro e pontos quânticos de carbono no controle de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira.** Orientador: Marcos Rogério Tótoia.

A presença de microrganismos contaminantes na cerveja, propicia a produção de compostos indesejados, o que pode levar à perda total do produto final. Algumas estratégias podem ser empregadas para se tentar evitar o problema, incluindo a pasteurização. No entanto, para alguns estilos de cerveja e, especialmente, para o chope, a técnica é evitada, uma vez que pode reduzir a expressão de aromas e sabores da cerveja, por acelerar algumas reações de oxidação. Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma estratégia alternativa de controle de microrganismos contaminantes da cerveja, utilizando nanomateriais associados a um peptídeo antimicrobiano. Nanopartículas de ouro (NPsAu) e pontos quânticos de carbono (PQC) foram produzidos e caracterizados. Os nanomateriais foram funcionalizados com o peptídeo nisina em diferentes concentrações, e o efeito dos mesmos foi avaliado em ensaios de atividade antimicrobiana contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com índices elevados de contaminação bacteriana. O efeito do peptídeo individual também foi avaliado contra algumas linhagens de leveduras cervejeiras comerciais selecionadas. A partir de espectros UV-visível, foi confirmada a formação de nanopartículas de ouro a partir dos três protocolos utilizados e a obtenção de pontos quânticos de carbono. A maioria dos isolados bacterianos avaliados foi susceptível à nisina livre, com concentrações inibitórias $\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os isolados *Acetobacter* sp. CTUG05, *Bacillus* sp. CJFP05, *Bacillus* sp. CTUG06, *Lactobacillus* sp. CJFC03, *Lactobacillus* sp. CTUG04 e *Sphingomonas* sp. CTUG09 não foram completamente inibidos pela nisina livre. Para esses isolados, as nanopartículas de ouro, na ausência (NPs Au-DT) ou na presença do peptídeo (NPsAu- DT/ Nisina), apresentaram maior eficiência de inibição do crescimento. A inibição do crescimento dos isolados bacterianos pelos pontos quânticos de carbono na ausência (PQC) ou na presença do peptídeo (PQC-Nisina) não diferiu. O crescimento das leveduras comerciais selecionadas não foi afetado pela nisina livre nas concentrações avaliadas ($\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Conclui-se que a utilização da nisina livre ou de nanomateriais com atividade antibacteriana são uma alternativa potencialmente aplicável ao controle de bactérias contaminantes de cervejas.

Palavras-chave: Dissertação. Tese. Pós-graduação. Nanopartículas de ouro. Pontos quânticos de carbono. Indústria cervejeira. Controle de microrganismos contaminantes.

ABSTRACT

PIRES, Isabella Carolina da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2021. **Use of gold nanoparticles and carbon nanodots in the control of contaminant microorganisms in the beer industry.** Adviser: Marcos Rogério Tótola.

The presence of contaminating microorganisms in beer favors the production of unwanted compounds, which can lead to the total loss of the final product. Some strategies can be employed to try to avoid the problem, including pasteurization. However, for some styles of beer, and especially for draft beer, the technique is avoided, as it can reduce the expression of beer aromas and flavors, by accelerating some oxidation reactions. This work aimed to develop an alternative strategy to control beer contaminating microorganisms, using nanomaterials associated with an antimicrobial peptide. Gold nanoparticles (NPsAu) and carbon quantum dots (PQC) were produced and characterized. The nanomaterials were functionalized with the peptide nisin at different concentrations, and their effect was evaluated in antimicrobial activity assays against bacterial isolates obtained from beer samples with high levels of bacterial contamination. The effect of the individual peptide was also evaluated against selected commercial brewer's yeast strains. From UV-visible spectra, the formation of gold nanoparticles was confirmed from the three protocols used and the obtaining of carbon quantum dots. Most bacterial isolates evaluated were susceptible to free nisin, with inhibitory concentrations $\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$. *Acetobacter* sp. CTUG05, *Bacillus* sp. CJFP05, *Bacillus* sp. CTUG06, *Lactobacillus* sp. CJFC03, *Lactobacillus* sp. CTUG04 and *Sphingomonas* sp. CTUG09 were not completely inhibited by free nisin. For these isolates, the gold nanoparticles, in the absence (NPsAu-DT) or in the presence of the peptide (NPsAu-DT/Nisin), showed higher growth inhibition efficiency. The growth inhibition of bacterial isolates by the carbon quantum dots in the absence (PQC) or in the presence of the peptide (PQC-Nisin) did not differ. The growth of selected commercial yeasts was not affected by free nisin at the concentrations evaluated ($\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$). It is concluded that the use of free nisin or nanomaterials with antibacterial activity are a potentially applicable alternative to the control of contaminating bacteria in beer.

Keywords: Dissertation. Thesis. Gold nanoparticles. Carbon nanodots Brewery industry. Control of contaminating microorganisms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Indústria cervejeira	10
2.2. Nisina	15
2.3. Nanopartículas	18
2.3.1. Nanopartículas de ouro	18
2.3.2. Pontos quânticos de carbono	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Composto antimicrobiano	23
4.2. Microrganismos	23
4.3. Produção de nanopartículas de ouro	24
4.3.1. Protocolo 1	25
4.3.2. Protocolo 2	26
4.3.4. Protocolo 3	27
4.4. Pontos quânticos de carbono	28
4.5. Caracterização dos nanomateriais	29
4.6. Ensaio de atividade antimicrobiana para as bactérias	29
4.7. Ensaio de atividade antimicrobiana para as leveduras	30
4.8. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Caracterização das nanopartículas	30
5.1.1. Caracterização das nanopartículas de ouro	30
5.1.2. Caracterização dos pontos quânticos de carbono (PQC)	35
5.2. Ensaio de atividade antibacteriana	36
5.2.1. Ensaio de atividade antibacteriana com as NPs Au-DT/ Nisina	36
5.2.2. Ensaio de atividade antibacteriana dos PQC	44
5.3. Ensaio de inibição das leveduras	46
6. CONCLUSÕES	47
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. APÊNDICE	57

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a terceira bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para o café e para o chá. Considerando tal relevância, a indústria cervejeira está entre as mais importantes atividades produtivas do século XXI (Capece et al., 2018; Piacentini et al., 2018). Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), o número de cervejarias registradas cresceu 36,4% nos últimos 5 anos (dados obtidos em 2019) e, caso as projeções para os próximos anos sejam alcançadas, em 2025 o Brasil ultrapassará os Estados Unidos em relação ao número de cervejarias.

Essa bebida é o resultado da fermentação de açúcares disponíveis, gerados por meio do processo de malteação de grãos, em etanol e CO₂. A fermentação é principalmente realizada por leveduras do gênero *Saccharomyces*, sendo as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* as principais responsáveis pela produção de cervejas do tipo Ale e Lager, respectivamente (Bamforth, 2017; Boronat et al., 2020). Além da levedura, a água, o lúpulo, os cereais e grãos maltados são ingredientes essenciais para a produção da cerveja (Humia et al., 2019).

Apesar da cerveja ser uma bebida de alta estabilidade microbiana, o que dificulta o crescimento da maioria dos microrganismos, alguns conseguem resistir às suas propriedades e se desenvolver, podendo afetar negativamente a qualidade do produto final (Schneiderbanger et al., 2018; Dysvik et al., 2020). Tais microrganismos podem estar presentes no ambiente, como bactérias e leveduras selvagens, ou advir das matérias primas utilizadas no processo produtivo (Bokulich & Bamforth, 2017).

Em decorrência de tal situação, análises microbiológicas em diferentes etapas e pontos da linha de produção devem ser realizadas, no intuito de se garantir a qualidade do produto e corrigir possíveis problemas (Schneiderbanger et al., 2018). Além disso, a higienização da cervejaria deve ser feita rotineiramente, visando reduzir-se os riscos de contaminação. No entanto, não há como se garantir ausência total de microrganismos indesejáveis, uma vez que o processo de produção da cerveja não é asséptico (Vaughan et al., 2005).

A maior preferência dos consumidores por alimentos naturais e seguros está em crescimento, o que torna necessário o desenvolvimento de estratégias de controle microbiológico menos dependentes de compostos químicos sintéticos por parte da indústria alimentícia (Salanta et al., 2020). Diante disso, o uso de compostos de origem natural tem ganhado destaque como uma alternativa para se controlar microrganismos indesejáveis (Pisoschi et al., 2018). Peptídeos microbianos que possuem status GRAS - Generally Recognized as Safe - têm sido utilizados, visto que não são tóxicos e não alteram as

propriedades do produto, sendo considerados seguros para o consumo humano (Muller-Auffermann et al., 2015).

Além dos compostos naturais, o uso de materiais, estruturas e partículas em escala nanométrica (nm) também vem recebendo grande destaque como estratégia de controle de contaminação e maior garantia de segurança alimentar durante toda a cadeia de produção (Khan & Oh, 2016; De Souza et al., 2019). A associação entre biomoléculas e nanopartículas tende a apresentar maior atividade antimicrobiana quando comparadas com a aplicação de tais moléculas de forma isolada (Tao, 2018).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma estratégia baseada na associação de um composto antimicrobiano de origem natural e nanotecnologia para o controle de microrganismos indesejáveis na indústria cervejeira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Indústria cervejeira

O consumo da cerveja se dá desde os primórdios da humanidade e, ainda que seja difícil precisar o início e a origem, há registros de produção dessa bebida no antigo Egito e na Mesopotâmia desde 5.500 a.C. (Cabras & Higgins, 2016, Callejo et al., 2017). A descoberta do processo de produção da cerveja é considerada um dos mais importantes marcos históricos em relação ao desenvolvimento de processos biotecnológicos (Cabras & Higgins, 2016). Naquela época, não se tinha conhecimento sobre a participação dos microrganismos no processo de fermentação. Somente nas décadas de 1860 e 1870 foi que o pesquisador Louis Pasteur demonstrou a importância do metabolismo microbiano na fermentação (Callejo et al., 2017; Karabín et al., 2017). A partir dessa descoberta, houve um avanço significativo no processo de produção de cerveja com a utilização de culturas puras, técnica iniciada por Emil Christian Hansen em 1883 (Petruzzi et al., 2016).

Além da utilização de culturas puras, a introdução de tecnologias - como a refrigeração e a pasteurização - no processo produtivo permitiram o armazenamento e a comercialização de um produto de melhor qualidade, o que promoveu um aumento em sua produção e consumo (Cabras & Higgins, 2016). Assim, atualmente a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, e a terceira mais consumida entre as bebidas em geral (Humia et al., 2019). Dessa forma, a indústria cervejeira está entre as atividades produtivas mais importantes do século XXI (Piacentini et al., 2018).

Segundo dados publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), o número de cervejarias registradas no Brasil cresceu 36,4% nos últimos 5 anos, alcançando um total de 1.209 unidades em 2019. São Paulo é o estado que lidera a lista do maior número de cervejarias, possuindo 241 empresas, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 236, e Minas Gerais, com 163. Ainda de acordo com os dados fornecidos pelo MAPA, se as projeções para os próximos anos forem atingidas conforme o último balanço realizado, em 2025 o Brasil ultrapassará os Estados Unidos em relação ao número de cervejarias.

A cerveja é resultado de um processo fermentativo, em que os açúcares fermentáveis são convertidos em etanol e dióxido de carbono (Humia et al., 2019). Na fabricação da cerveja, os principais microrganismos utilizados são leveduras do gênero *Saccharomyces*, em decorrência de sua capacidade de tolerar altas concentrações de álcool, da elevada eficiência na conversão de açúcar em etanol e da produção de *flavors* característicos no produto final (Stewart et al., 2016).

A produção de álcool pelas células de levedura ocorre para que as mesmas consigam gerar energia e manter o equilíbrio redox ao consumir açúcar em condições anaeróbicas. O equilíbrio redox é alcançado pela regeneração do NAD^+ na reação final da fermentação. Supõe-se que isso acontece para que *S. cerevisiae* consiga manter seu equilíbrio intracelular de elétrons. Em condições anaeróbicas, ou mesmo na presença de oxigênio e de concentrações elevadas de açúcar (efeito Crabtree), *Saccharomyces* converte o ácido pirúvico em etanol via acetaldeído, com a regeneração do NAD^+ para possibilitar a continuação da glicólise e a produção de ATP (Walker e Walker, 2018). Durante a fermentação por *S. cerevisiae* são formados alguns metabólitos secundários, os quais incluem álcoois superiores, polióis, ésteres, ácidos orgânicos, dicetonas vicinais e aldeídos. Embora tais metabólitos sejam produzidos em baixas concentrações em comparação com o etanol e o dióxido de carbono, eles são capazes de influenciar o sabor em bebidas fermentadas (Walker e Stewart, 2016). A eficiência da fermentação pelas células de levedura está diretamente relacionada ao seu metabolismo e taxa de reprodução, os quais são, direta ou indiretamente, influenciados por diversos fatores. Tais fatores incluem temperatura, composição do meio de cultivo, pH, presença de produtos químicos, fatores genéticos, entre outros (Cruz et al., 2018; Walker e Walker, 2018).

Embora o uso de culturas puras proporcione um melhor controle do processo e facilite a reprodutibilidade do produto, contribuindo assim para a sua qualidade, tal prática tende a limitar os diversos *flavors* que poderiam ser gerados por meio da inoculação de diferentes linhagens e espécies de leveduras na produção de cerveja (Gutiérrez et al., 2018). Ainda que seja possível obter bebidas com diferentes perfis sensoriais por meio da variação de lúpulos e maltes, a maior parte dos compostos aromáticos são produzidos pela levedura selecionada para realizar a fermentação (Callejo et al., 2019). Nesse sentido, leveduras não-pertencentes ao gênero *Saccharomyces* têm sido estudadas no intuito de se desenvolverem cervejas com diferentes teores alcoólicos e sabores diversificados (Methner et al., 2019). Apesar do uso desses microrganismos ser comedido em decorrência da possível produção de compostos que conferem sabores estranhos para a bebida e da limitação do desempenho de fermentação, eles são capazes de metabolizar diversos precursores não voláteis em compostos produtores de aromas, além de produzir compostos secundários que irão influenciar positivamente as propriedades organolépticas do produto (Callejo et al., 2019; Larroque et al., 2021).

Além da levedura, água, lúpulo, cereais e grãos maltados são também ingredientes essenciais para a produção da cerveja (Humia et al., 2019). A cevada e o trigo são os principais grãos utilizados na fabricação; entretanto, outros grãos, como o arroz, a aveia e o milho também são utilizados como coadjuvantes ou na produção de bebidas com perfis sensoriais específicos

(Dysvik et al., 2020; Humia et al., 2019). Cabe ressaltar ainda que a adição de grãos como coadjuvantes pode ser feita no intuito de se reduzir o custo de produção do produto, sendo justificada, ainda, pela maior disponibilidade dos mesmos nos mercados locais (Piacentini et al., 2018).

Humulus lupulus, comumente conhecido como lúpulo, é uma planta rica em compostos fenólicos, como flavonóides, humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos) (Almeida et al., 2020). Nas flores femininas, especialmente na lupulina, encontram-se α -ácidos, β -ácidos e óleos essenciais, os quais contribuem para o aroma e amargor típicos da cerveja (Rodolfi et al., 2018). O lúpulo é um componente importante na cerveja, pois, além de conferir o amargor e aromas característicos da bebida, atua como um agente protetor contra deterioração, em razão de sua ação antibacteriana (Steenackers et al., 2015; Rodolfi et al., 2018). Os ácidos amargos do lúpulo são reportados na literatura como altamente eficazes contra bactérias Gram-positivas, enquanto que as Gram-negativas são resistentes ou necessitam de uma concentração maior para serem afetadas (Kramer et al., 2015). As frações antimicrobianas do lúpulo atuam alterando a permeabilidade da membrana celular das bactérias Gram-positivas. Tais compostos são capazes de se difundir através da membrana celular para o interior da célula, causando dissipação do gradiente de prótons e, dessa forma, levando à redução do pH intracelular e interrompendo a capacidade da célula de captar nutrientes (Bergsveinson et al., 2015; Pielech- Przybylska et al., 2017).

Atualmente, a produção de cerveja está dividida por estilo de fermentação em dois grupos, sendo eles Ale e Lager (Boronat et al., 2020). Algumas características, tais como o tempo e temperatura utilizados no processo fermentativo, o tipo e as propriedades específicas da cepa selecionada, entre outros, são fatores importantes que diferenciam os dois grupos (Saerens et al., 2010; Gerhards et al., 2020). As cervejas do tipo Lager são produzidas em temperaturas entre 6 e 15 ° C, enquanto que a fermentação das bebidas do grupo Ale ocorre entre 16 e 24 ° C (Da Costa Jardim et al., 2018). As leveduras cervejeiras mais comumente utilizadas na produção dos estilos Ale e Lager são *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, respectivamente, sendo classificadas ainda com base nas suas propriedades de floculação (Saerens et al., 2010). O estilo Lager é classificado como cerveja de baixa fermentação, em decorrência da deposição da levedura no fundo do fermentador (Monerawela & Bond, 2017). Em contrapartida, o estilo Ale é classificado como cerveja de fermentação superior, pois a levedura se mantém na superfície do mosto no final da fermentação (Gerhards et al., 2020).

A caracteriza-se, dentre outros fatores, pela presença de etanol, pH ácido e altos níveis de dióxido de carbono, os quais contribuem para que esse produto tenha uma alta estabilidade microbiana (Dysvik et al., 2020). Apesar de todas essas características que dificultam o crescimento de microrganismos contaminantes, existem alguns que são resistentes a essas condições, produzindo compostos indesejáveis e, conseqüentemente, gerando *off-flavors*, além de poder causar turbidez, acidificação, sedimentação e até a produção de limo no produto final (Shimotsu et al., 2015; Schneiderbanger et al., 2018). A presença desses microrganismos pode se dar em diversas etapas do processo produtivo, como durante o armazenamento do mosto, durante a fermentação, maturação, envase, dentre outros (Muller-Auffermann et al., 2015). Cabe ressaltar ainda que, para a maioria das cervejas, a presença de qualquer microrganismo que não tenha sido inoculado de forma intencional é considerada um contaminante (Bokulich et al., 2012).

Em decorrência dos efeitos indesejáveis de microrganismos contaminantes na cerveja, análises microbiológicas de diversos pontos do processo de produção de cerveja são importantes, uma vez que auxiliam na detecção e rápida correção de possíveis problemas, além de evitar que lotes contaminados sejam consumidos, garantindo-se com isso a qualidade do produto (Schneiderbanger et al., 2018).

Dentre os microrganismos responsáveis pela deterioração da cerveja, incluem-se bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras selvagens e fungos multicelulares (Esmaeili et al., 2015). O maior número de microrganismos contaminantes dessa bebida tem origem nos equipamentos utilizados na cervejaria e nas matérias primas, como o malte, o lúpulo e a água (Obi, 2017).

A microbiota natural da matéria prima utilizada pode ser responsável por eventos de contaminação e resultar na perda completa do produto final (Vaughan et al., 2005; Obi, 2017). As micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, podem também estar presentes nos cereais usados para a fabricação da cerveja, e tal contaminação pode ocorrer tanto no armazenamento dos mesmos após a colheita, como durante a maltagem (Bertuzzi et al., 2018). Em decorrência de condições climáticas favoráveis, a ocorrência desse tipo de contaminação no Brasil é maior quando comparada a outros países (Piacentini et al., 2018). Dada a resistência dessas moléculas a altas temperaturas e pH extremos, a temperatura máxima utilizada durante o processo de produção de cerveja não é capaz de destruir esses compostos, sendo a sua presença capaz de alterar parâmetros físicos, químicos e biológicos da bebida, além de causar prejuízos à saúde do consumidor (Pascari et al., 2018). O gênero *Fusarium* é o mais comumente associado a essas contaminações, sendo as fumosinas, tricotecenos e zearalenona

as principais micotoxinas encontradas na cerveja (Piacentini et al., 2017; Piacentini et al., 2018).

A presença de leveduras selvagens é também indesejável na produção de cerveja, uma vez que elas competem com a levedura cervejeira e reduzem o desempenho da fermentação. Além disso, podem produzir *off- flavors* que comprometem a qualidade final do produto (Spedding & Aiken, 2015). As contaminações por levedura na cerveja se dão principalmente por espécies do gênero *Saccharomyces*, seguido por *Dekkera/Brettanomyces* (Suzuki, 2020). Leveduras selvagens dos gêneros *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, entre outros, já foram detectadas na superfície dos equipamentos de produção (Hernández et al., 2018). Tais microrganismos são capazes de formar biofilmes, fator que facilita o aumento da transferência horizontal de genes e conseqüentemente o número de linhagens resistentes aos compostos antimicrobianos encontrados na cerveja (Bergsveinson et al., 2015).

As bactérias Gram-positivas são consideradas o principal grupo de microrganismos contaminantes da cerveja, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* os principais representantes (Suzuki, 2020). Espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* também são capazes de crescer nessa bebida (Ashtavinayak et al., 2016). As bactérias do ácido lático são responsáveis por até 90% das contaminações na indústria de cerveja e são resistentes aos compostos antimicrobianos do lúpulo, o que lhes confere uma vantagem para o desenvolvimento no produto (Obi, 2017). Supõe-se que tal resistência tenha sido adquirida com o tempo, em decorrência do frequente e prolongado contato com o lúpulo durante os processos de fermentação (Sakamoto & Konings, 2003). Dentro do gênero *Lactobacillus*, *L. lindneri* foi detectada com uma frequência entre 15 e 25 % dos casos de contaminações em cervejarias (Liu et al., 2017). A presença dessa espécie promove a formação de *off-flavors*, em decorrência da produção de compostos como ácido lático, ácido acético e diacetil, além de causar turbidez no produto final. Essa espécie é termotolerante, ou seja, consegue sobreviver à fervura do mosto e, dado o seu tamanho reduzido, consegue passar pelos sistemas de filtração durante o processo de clarificação da bebida (Liu et al., 2017; Suzuki, 2020).

Em relação ao grupo das bactérias Gram-negativas, a presença das bactérias do ácido acético é considerada indesejável na cerveja e em outras bebidas, sendo os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* os mais frequentemente associados à contaminação e a perdas significativas em cervejarias (Ashtavinayak et al., 2016; De Roos & De Vuyst, 2018). São microrganismos difíceis de se detectar, uma vez que suas células estão em um estado viável mas não cultivável na maior parte do tempo, e seu cultivo requer a utilização de meios de cultura específicos (De

Roos & De Vuyst, 2018). Essas espécies são capazes de sobreviver em biofilmes e produzir diversos compostos, como ácido acético e sulfeto de hidrogênio, que causam *off-flavors* e conseqüentemente a deterioração da bebida (Ashtavinayak et al., 2016). Além desses, os gêneros *Megasphaera* e *Pectinatus* também são comumente encontrados, sendo esses microrganismos deteriorantes estritamente anaeróbicos (Schneiderbanger et al., 2018). A detecção de bactérias da família Enterobacteriaceae indica negligência com a higiene. Além disso, elas são capazes de crescer no início do processo de fermentação e produzir compostos indesejáveis que irão impactar no produto final, reduzindo a sua qualidade (Ashtavinayak et al., 2016; Obi, 2017).

Os compostos químicos comumente utilizados na indústria de alimentos têm gerado cada vez mais linhagens resistentes a compostos antimicrobianos, e a preferência do consumidor por alimentos mais seguros e naturais vem aumentando (Vaughan et al., 2005; Bahrami et al., 2019). Na busca por compostos capazes de reduzir os impactos negativos causados por microrganismos contaminantes em alimentos, novas estratégias de controle envolvendo compostos naturais têm ganhado cada vez mais destaque (Pisoschi et al., 2018).

2.2. Nisina

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos via ribossomal por bactérias e arqueias, podendo essas moléculas apresentar mecanismos de ação bactericidas ou bacteriostáticos sobre diversos microrganismos sem, contudo, afetar o microrganismo produtor (Kaskoniene et al., 2017; Santos et al., 2018). Dentre os grupos de bacteriocinas existentes, destacam-se os lantibióticos, os quais exercem atividade antimicrobiana em baixas concentrações. Sua classificação se dá em decorrência da presença de anéis de lantionina na estrutura química, sendo esses, variáveis em relação ao número e posição na molécula (Hassan et al., 2015; Gharsallaoui et al., 2016). A nisina é considerada o lantibiótico mais antigo de que se tem conhecimento, e também o mais estudado (Kaskoniene et al., 2017).

A nisina é pertencente ao grupo dos lantibióticos de classe I, e é produzida por *Lactococcus lactis* (Ozel et al., 2018). A estrutura desse peptídeo consiste de 34 aminoácidos, incluindo quatro aminoácidos incomuns, cinco pontes internas de dissulfeto e cinco anéis de lantionina, os quais são separados por uma região flexível que é chamada de dobradiça (Gharsallaoui et al., 2016; Muller-Auffermann et al., 2015; Khosa et al., 2016). Acredita-se que as estruturas cíclicas sejam responsáveis por manter a rigidez do peptídeo e por conferir proteção ao mesmo da degradação térmica e por proteases (Khan & Oh, 2016). Sabe-se ainda

que sua estabilidade térmica aumenta conforme o pH diminui, dada a presença de ligações tioéter na sua estrutura (Gharsallaoui et al., 2016).

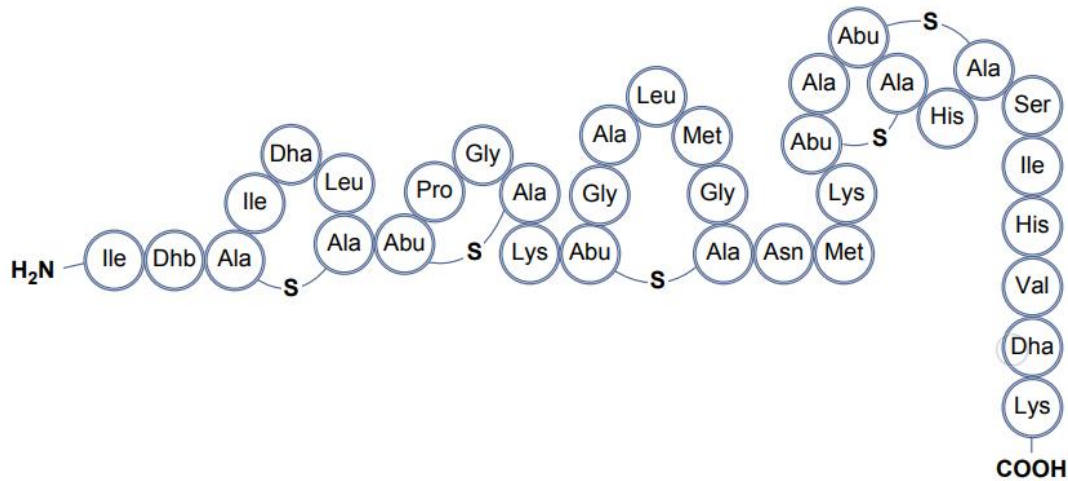


Figura 1: Estrutura do peptídeo nisina. (Aminoácidos não usuais: ácido aminobutírico (ABA); dehidroalanina (DHA); dehidrobutirina (DHB)). Fonte: Jayant & Halami, 2020.

Dois mecanismos de ação envolvem a atividade antimicrobiana da nisina, sendo eles a formação de poros na membrana e a inibição da síntese da parede celular (Li et al., 2018). Esse peptídeo atua por meio da ligação ao Lipídeo II, molécula essencial na síntese da parede celular, responsável pela síntese do peptideoglicano (Muller-Auffermann et al., 2015). Dada essa característica, a atividade antimicrobiana irá variar de acordo com o organismo, uma vez que existem diferenças na estrutura celular que podem ou não dificultar o acesso do composto ao seu alvo de ação (Dos Santos et al., 2018; Medeiros-Silva et al., 2018). Além disso, a nisina possui maior efetividade contra células que estão em fase exponencial de crescimento (Muller-Auffermann et al., 2015), além de possuir atividade esporostática. Em temperaturas mais elevadas, sua atividade antimicrobiana é potencializada (Khan & Oh, 2016).

A região N-terminal hidrofóbica da nisina é a que permite sua ligação ao grupamento pirofosfato (PPi) da membrana celular, permitindo sua penetração nessa estrutura celular (Gharsallaoui et al., 2016). A estrutura do Lipídeo II, composta pela ligação do pirofosfato a uma cadeia altamente hidrofóbica, faz com que essa molécula consiga se mover através da membrana citoplasmática, resultando no bloqueio da síntese da parede celular bacteriana (Chugunov et al., 2013). Além disso, a extremidade C-terminal do peptídeo é responsável pela formação de poros na membrana plasmática (Gharsallaoui et al., 2016). Assim, ocorre a associação entre oito moléculas de nisina e quatro moléculas de Lipídeo II, o que promove a desestruturação da membrana, gerando dissipação do potencial eletrostático e,

consequentemente, levando à morte celular (Prince et al., 2016; Chugunov et al., 2013). Tendo-se o grupamento PPI da membrana celular como alvo, nisina é vista como um potencial agente antimicrobiano, uma vez que esse grupamento é insubstituível (Medeiros-Silva et al., 2018).

A atividade antibacteriana da nisina contra bactérias Gram-positivas tem sido reportada em diversos estudos (Punyaappa-Path et al., 2015; Li et al., 2018). Entretanto, sua atividade contra bactérias Gram-negativas é reduzida, uma vez que a membrana externa desse grupo dificulta o acesso da nisina ao seu alvo específico (Ibarra-Sánchez et al., 2020). Além disso, a nisina não apresenta efeito inibitório contra leveduras, fungos filamentosos e vírus (Gharsallaoui et al., 2016). Dada a sua forma de produção, esse peptídeo possui um alto custo, o que dificulta seu uso em larga escala (Muller-Auffermann et al., 2015). Sabe-se ainda que a aplicação da nisina na sua forma livre, a depender das condições em que é empregada, pode não resultar na eficiência desejada, em razão da possível ocorrência de mecanismos de degradação enzimática (Khan & Oh, 2016).

Em decorrência de algumas limitações no uso da nisina como agente de controle microbiológico, estudos visando a estratégias alternativas baseadas no uso desse composto de forma combinada com outras tecnologias têm sido realizados (Khan & Oh, 2016; Chi & Holo, 2018). A aplicação de antimicrobianos associados a materiais em escala nanométrica é um sistema que apresenta potencial de aplicação na indústria alimentícia, uma vez que tal tecnologia pode ser empregada durante toda a cadeia de produção alimentar (Khan & Oh, 2016). Assim, nanopartículas recobertas por nisina têm sido utilizadas no intuito de se aumentar o controle de possíveis microrganismos contaminantes de alimentos (Bahrami et al., 2019).

Embora a atividade da nisina seja limitada, esse peptídeo é amplamente utilizado na indústria alimentícia e possui status conhecido como seguro (GRAS), apresentando, portanto, baixo risco à saúde humana, além de não alterar as propriedades organolépticas dos alimentos (Camargo et al., 2018; Ibarra-Sánchez et al., 2020). Seu uso em alimentos foi aprovado em mais de 50 países e tem sido aplicado como conservante de alimentos desde 1950 (Ibarra-Sánchez et al., 2020; Khan & Oh, 2016). De acordo com Muller-Auffermann et al (2015), essa molécula é digerida de forma rápida pelo organismo humano, não gerando nenhum efeito negativo conhecido sobre a microbiota intestinal.

No que se refere à produção da cerveja, a nisina é uma molécula que possui relevância, uma vez que não altera suas propriedades sensoriais nem afeta a levedura cervejeira, além de ser estável em diversas temperaturas, alta concentração de CO₂ e baixo pH (Muller-Auffermann et al., 2015). Portanto, sua aplicação pode ser eficaz em alimentos que sejam submetidos a altas

temperaturas e baixa acidez, podendo ser aplicada inclusive durante a fervura do mosto sem que sua atividade seja afetada (Khan & Oh, 2016).

2.3. Nanopartículas

Ainda que tecnologias baseadas em nanomateriais já sejam aplicadas por muitas civilizações, apenas recentemente a natureza dos materiais em nanoescala foi descoberta a partir de análises e técnicas microscópicas (Sk et al., 2012). A nanotecnologia envolve o estudo de materiais, estruturas e partículas em escala nanométrica (nm) (De Souza et al., 2019). Para tal, metais nobres como a prata, platina, paládio e ouro, dentre outros, são constantemente estudados. Além desses, as propriedades dos óxidos inorgânicos não metálicos, como os óxidos de titânio e de zinco, também são exploradas (Menon et al., 2017).

As nanopartículas são consideradas uma tecnologia com alto potencial de aplicação, possuindo relevância em diversos campos, tais como a engenharia, medicina e ciência (Varghese et al., 2013). No que diz respeito a alimentos, o sistema de nanopartículas é considerado uma tecnologia de grande importância, aplicável em toda a cadeia alimentar, podendo auxiliar no aumento da vida útil dos alimentos, da segurança alimentar e na redução da deterioração dos mesmos (Khan & Oh, 2016). Segundo Chung e colaboradores (2017), estudos envolvendo o uso de nanotecnologia enfatizam o alto potencial dessa tecnologia em substituição ao uso de substâncias agrotóxicas em alimentos.

Envolvendo as aplicações alimentares, as nanopartículas também auxiliam no controle de biofilmes, facilitando a entrada dos agentes antimicrobianos no interior dessas estruturas microbianas (Bahrami & Delshadi, 2020). Além disso, podem ser empregadas como biossensores, a fim de se detectar a presença de microrganismos patogênicos (Shi et al., 2019). Nanopartículas podem ser empregadas ainda na entrega de compostos bioativos com maior biodisponibilidade, sem alterar as propriedades organolépticas dos alimentos. O uso de nanotecnologia já é empregado na produção de embalagens para alimentos, a fim de se prevenir a contaminação microbiana (Kaphle et al., 2018). Portanto, embora mais estudos ainda sejam necessários, a aplicação de nanotecnologia na produção de alimentos tende a inovar e aprimorar toda a cadeia de produção alimentar (Chung et al., 2017).

2.3.1. Nanopartículas de ouro

Dentre os materiais disponíveis para a fabricação e utilização como nanopartículas, o ouro vem ganhando cada vez mais destaque para diversas finalidades (Elahi et al., 2018). Dentre suas propriedades, destacam-se a estabilidade das nanopartículas, a facilidade para se controlar

sua forma e tamanho (geralmente possuem entre 1 e 100 nm), uma alta relação superfície-volume, a capacidade de imobilizar diversos grupos funcionais, a facilidade de detecção através de métodos colorimétricos e fluorimétricos, resistência térmica e a alta compatibilidade com biomoléculas (Chen et al., 2018; Paidari & Ibrahim, 2021).

O ouro é um metal quimicamente inerte e não reativo, sendo, portanto, considerado atóxico (Jia et al., 2017). Dessa forma, as nanopartículas de ouro também são consideradas relativamente não citotóxicas (Lopez-Chaves et al., 2018). Entretanto, a toxicidade das nanopartículas é uma questão que diverge na opinião dos pesquisadores, embora já seja conhecido que fatores como a forma, tamanho, carga de superfície, revestimento, concentração, dentre outros, são capazes de influenciar a toxicidade celular (Fratoddi et al., 2015; Schaeublin et al., 2011).

Dentre a diversas gamas de aplicações, as nanopartículas de ouro também têm sido utilizadas como estratégia para o controle de diversas bactérias e fungos, sendo de grande importância para o controle de bactérias resistentes (Bahrami & Delshadi, 2020; Paidari & Ibrahim, 2021). Os efeitos antimicrobianos das nanopartículas são variáveis de acordo com algumas características, tais como o tamanho, os agentes utilizados para o revestimento de superfície, a concentração e os métodos de purificação (Zhang et al., 2015).

De acordo com Tao (2018), as nanopartículas de ouro, quando combinadas com outras biomoléculas, detêm maior atividade antimicrobiana quando comparadas com a aplicação de tais moléculas de forma isolada. Os mecanismos pelos quais isso acontece são diversos, os quais incluem lise celular, interrupção da atividade próton motora, interrupção de funções celulares, interação com o material genético, aumento da permeabilidade celular, dentre outros (Tao., 2018; Zhang et al., 2015). Ainda que as possibilidades sejam diversas, o mecanismo de efeito sinérgico é difícil de elucidar, uma vez que cada molécula tem seu próprio mecanismo exclusivo de ação (Zhang et al., 2015).

Resultados obtidos por Shah et al. (2014) demonstraram que o uso do antibiótico ceftriaxona conjugado com nanopartículas de ouro aumentou a atividade antibacteriana em seis vezes quando comparado ao uso da molécula pura. Em outro estudo, Payne et al. (2016) testaram a atividade antibacteriana da canamicina e da molécula associada a nanopartículas de ouro contra uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus epidermidis*) e uma Gram negativa (*Enterobacter aerogenes*), e observaram que a concentração inibitória mínima da associação entre a nanopartícula e a canamicina era significativamente menor do que quando foi aplicada a molécula livre. Resultados semelhantes foram encontrados por Rattanata et al. (2016), os quais avaliaram a atividade antibacteriana do ácido gálico puro ou conjugado com

nanopartículas de ouro contra patógenos de origem alimentar, tais como *Plesiomonas shigelloides* e *Shigella flexneri*. De acordo com os pesquisadores, a conjugação com a nanopartícula potencializou a atividade do ácido gálico, e a concentração inibitória mínima foi significativamente reduzida em comparação com a da molécula pura.

2.3.2. Pontos quânticos de carbono

O carbono é um elemento encontrado em abundância na natureza, considerado não tóxico, e vem sendo alvo de grande interesse para aplicações em escala nanométrica (Varghese et al., 2013; Wu et al., 2021). Os pontos quânticos de carbono são consideradas pequenas moléculas baseadas em carbono, em escala nanométrica, com eficaz funcionalização de superfície, obtidos a partir de materiais orgânicos ou biológicos (Al Awak et al., 2017). A funcionalização da superfície da nanopartícula é de grande importância, dado que afeta propriedades tais como a interação celular, o tráfego intracelular, a citotoxicidade e características físicas e ópticas (Rabe et al., 2019).

Os pontos quânticos de carbono podem ser sintetizados a partir de uma fonte de carbono natural ou sintética, por diversos métodos (Wu et al., 2021). De acordo com a literatura, os pontos quânticos de carbono são benignos e considerados não tóxicos *in vitro* e *in vivo*, além de serem facilmente sintetizáveis, de baixo custo e ambientalmente favoráveis (Dong et al., 2017; Dong et al., 2020; Rabe et al., 2019). Tais partículas têm ganhado destaque em decorrência da sua facilidade de detecção, boa biocompatibilidade e propriedades fluorescentes (Shi et al., 2019). Dessa forma, são estudadas para diversas aplicações, tais como na obtenção de biossensores, combate ao câncer, bioimagem e controle de microrganismos (Wu et al., 2021).

O principal mecanismo antimicrobiano descrito para os pontos quânticos de carbono consiste na produção de espécies reativas de oxigênio. A adesão das nanopartículas à superfície celular bacteriana desencadeia o rompimento da parede celular e conseqüentemente induz o estresse oxidativo intracelular (Dong et al., 2020). Em razão do seu modo de ação, é necessário que as nanopartículas estejam interagindo próximas às células bacterianas para que sejam eficazes (Rabe et al., 2019). O resultado da atividade antibacteriana é variável, uma vez que diversos parâmetros devem ser levados em consideração, tais como o estado de fotoexcitação, as propriedades ópticas e a funcionalização da superfície das nanopartículas (Dong et al., 2020).

O uso dos pontos quânticos de carbono tem sido considerado para aplicações clínicas e na agricultura, uma vez que possuem um menor risco de gerar resistência antimicrobiana, em relação aos antibióticos convencionais (Wu et al., 2021). Além disso, são utilizados em grande escala na produção de embalagens para alimentos, e comumente migram para os mesmos

(Thiruvengadam et al., 2018). No estudo realizado por Sk e colaboradores (2012), foram encontradas amostras de pontos quânticos de carbono em alimentos de consumo regular como pão, açúcar mascavo, flocos de milho e biscoito. Dadas as suas características tais como biocompatibilidade e baixa ou nenhuma toxicidade, os pontos quânticos de carbono são uma tecnologia com alto potencial de aplicação voltado para a segurança alimentar (Shi et al., 2019).

A nisina é o peptídeo antimicrobiano mais comumente utilizado na indústria alimentícia (Bahrami et al., 2019). A atividade antimicrobiana da conjugação de nanopartículas de diversos materiais com a nisina tem se mostrado bastante promissora (Arakha et al., 2016; Bhat et al., 2017; Pandit et al., 2017; Vucomanovik et al., 2017; Pandit., 2021). No estudo realizado por Thirumurugan e colaboradores (2013), foi demonstrado o efeito positivo da associação de nisina com nanopartículas de ouro contra patógenos alimentares em relação ao uso do peptídeo na sua forma livre. Em outro estudo, foi relatado que pontos quânticos de carbono associados à nisina demonstraram alta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Qi et al., 2011).

Com o crescente aumento da demanda por alimentos e bebidas mais seguros, atrelado ao aumento de bactérias patogênicas resistentes aos atuais antibióticos e métodos de controle utilizados, o sistema de nanopartículas é uma estratégia relevante para auxiliar no aumento da segurança alimentar (Khan & Oh, 2016; Bahrami & Delshadi, 2020). Neste trabalho, explorou-se o efeito da funcionalização de nanomateriais com nisina, com vistas ao controle de microrganismos comumente encontrados como contaminantes em cervejas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade de microrganismos contaminantes da indústria cervejeira e leveduras comerciais a nanopartículas de ouro e pontos quânticos de carbono funcionalizados com o peptídeo nisina.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir nanopartículas de ouro e pontos quânticos de carbono funcionalizados com nisina.
- Caracterizar os nanomateriais produzidos.
- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos nanomateriais conjugados com o peptídeo nisina contra microrganismos contaminantes da cerveja e leveduras cervejeiras.

4. METODOLOGIA

4.1. Composto antimicrobiano

O composto nisina foi selecionado para os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana contra os microrganismos contaminantes da cerveja em associação às nanopartículas de ouro e de carbono. A nisina foi adquirida da empresa Fermentech (nome comercial Nisaplin), e as nanopartículas foram produzidas no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2. Microrganismos

O trabalho foi conduzido com isolados microbianos obtidos de cervejas com histórico de contaminação microbiológica. A atividade antimicrobiana do peptídeo foi avaliada contra um conjunto de bactérias previamente isoladas (Tabela 1) e armazenadas a -80°C, no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) (Siqueira, 2019).

Linhagens de leveduras comerciais comumente utilizadas na indústria cervejeira foram selecionadas para avaliar se a nisina exerce algum efeito inibitório sobre as mesmas. Para tal, foram utilizadas neste trabalho as espécies *Saccharomyces cerevisiae safale S-04*, *Trappist Ale SY065*, *California Ale Yeast WLP001*, *Saison Ale SY064*, *Belgian Ale 04 YLB3003*, *American Ale SY025* e *Brettanomyces lambicus YLB900*.

Tabela 1. Isolados bacterianos obtidos de cerveja com elevados índices de contaminação bacterianos utilizados neste trabalho

Isolado	Identificação
CTUG05	<i>Acetobacter malorum</i> HWW3
CTUG08	<i>Acetobacter cerevisiae</i> SCMA40
CJFP05	<i>Bacillus sp.</i> T56
CJFP10	<i>Bacillus subtilis</i> 30L2-1
CTUG06	<i>Bacillus megaterium</i> N9
CVIC02	<i>Bacillus sp.</i> YSS/2001-3
CVIC03	<i>Bacillus sp.</i> PVL04
CJFP01	<i>Lactobacillus brevis</i> M4-1
CJFP04	<i>Lactobacillus brevis</i> YJ11B
CJFP11	<i>Lactobacillus brevis</i> NWAUFU1535
CJFP12	<i>Lactobacillus brevis</i> SC13
CJFP13	<i>Lactobacillus brevis</i> HBUAS53105
CJFC03	<i>Lactobacillus brevis</i> YJ11B
CJFC05	<i>Lactobacillus brevis</i> CE7.3
CTUG04	<i>Lactobacillus brevis</i> YJ11B
CVIC01	<i>Micrococcus yunnanensis</i> SML_M164
CTUG09	<i>Sphingomonas zeae</i> P5-D10
CJFP03	<i>Paenibacillus sp.</i> JULS-5
CJFP09	<i>Paenibacillus chibensis</i> BGRI EBC SK18-T28

4.3. Produção de nanopartículas de ouro

As nanopartículas empregadas no estudo foram sintetizadas empregando-se três protocolos diferentes. Todas as vidrarias utilizadas para a execução dos protocolos foram cuidadosamente limpas com detergente, água corrente e água ultrapura por 5 vezes cada uma e finalmente secas em estufa.

A concentração de 1 mM foi selecionada em todos os protocolos executados para os ensaios seguintes de atividade antimicrobiana.

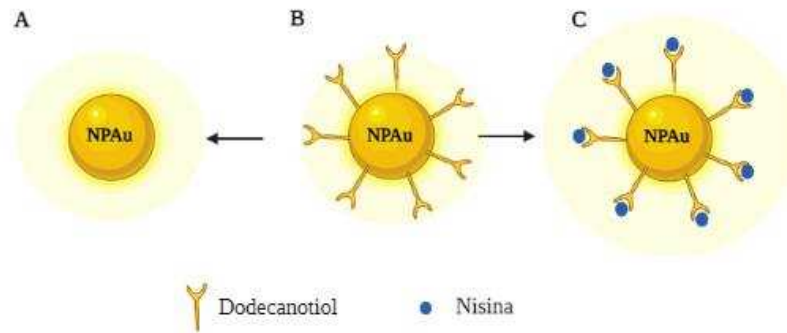


Figura 2: Ilustração esquemática das nanopartículas de ouro. As letras A, B e C representam respectivamente NPs Au (estoque das nanopartículas de ouro), o NPs Au – DT (controle das nanopartículas de ouro) e NPs Au – DT/Nisina (nanopartículas de ouro funcionalizadas com nisina).

4.3.1. Protocolo 1

Para a produção das NPs Au do primeiro protocolo, foram adicionados 0,5 mL de NaOH (1 mol L^{-1}) em 48 mL de água ultrapura. Posteriormente, 1,5 mL de cloreto de tetra(hidroximetil)fosfônio (THPC) 80% diluído em água ultrapura (1,5 mM) foi adicionado à solução, sob agitação constante por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (10 mM) diluído em HCl (50 mM) (concentração final de $1 \mu\text{M}$), sob agitação vigorosa e constante por cerca de 15 minutos. Ao fim desse processo, foram obtidas as nanopartículas.

Na sequência, as nanopartículas de ouro foram funcionalizadas com nisina (NPs Au-DT/Nisina). Para tal, em frasco tipo penicilina, foram adicionados 500 μL , 250 μL ou 125 μL da solução estoque de nisina a 20 mM, para um volume final de 10 mL, a fim de se obterem concentrações finais de 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM, respectivamente. Em seguida, adicionaram-se 4 mL de tampão de tetraborato de sódio (50 mM, pH 9,2) e 2,4 μL de dodecanotiol, sob agitação branda por 5 minutos. Por último, foram adicionados 5 mL da solução de nanopartículas previamente sintetizadas, mantendo-se a agitação por 5 minutos adicionais. Os frascos de penicilina foram recobertos com papel alumínio e armazenados no escuro por 48 horas, sob temperatura ambiente. Em seguida, as nanopartículas foram submetidas à caracterização e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana. Uma descrição dos tratamentos do protocolo 1 é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos tratamentos do protocolo 1 empregado na síntese das nanopartículas de ouro

Tratamento	Solução estoque nisina 20 mM	Tampão tetraborato 50 mM	NPs Au (concentração)	Dodecanotiol (concentração)
NPs Au– DT/ Nisina 1 Mm	500 µL	4,5 mL	5 mL (0,5 µM)	2,4 µL (1000 µM)
NPs Au– DT/ Nisina 0,5 mM	250 µL	4,750 mL	5 mL (0,5 µM)	2,4 µL (1000 µM)
NPs Au– DT/ Nisina 0,25 mM	125 µL	4, 875 mL	5 mL (0,5 µM)	2,4 µL (1000 µM)
NPs Au– DT	-	5 mL	5 mL (0,5 µM)	2,4 µL (1000 µM)

4.3.2. Protocolo 2

Para a síntese das NPs Au do segundo protocolo, inicialmente foram adicionados 50 µL de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) em HCl (50 mM) a 4,8 mL de água ultrapura. Em sequência, foram acrescentados 150 µL da solução de NaBH_4 (150 mM) em NaOH (50 mM), sob agitação vigorosa e constante por 1 minuto.

Após a síntese, foi realizada a funcionalização das partículas com nisina (NPs Au-DT/Nisina) para concentrações finais de 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM (Tabela 2). Assim, volumes de 500 µL, 250 µL e 125 µL da solução estoque de nisina a 20 mM, para 10 mL de volume final completados com água ultrapura em frasco de penicilina, foram acrescentados de 4,8 µL de dodecanotiol sob agitação constante por 3 minutos. Posteriormente, 20 µL da solução de nanopartículas (0,5 mM) foram adicionados à solução sob agitação constante. Os frascos de penicilina foram cobertos com papel alumínio e mantidos no escuro por 48 horas, sob temperatura ambiente. Em seguida, as nanopartículas foram submetidas à caracterização e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana.

Tabela 3: Descrição dos tratamentos do protocolo 2 empregado na síntese das nanopartículas de ouro

Tratamentos	Solução estoque nisina 20 mM	Tampão tetraborato 20 mM	NPs Au (concentração)	Dodecanotiol (concentração)
NPs Au–DT/ Nisina 1 mM	500 µL	9,5 mL	20 µL (1 µM)	4,8 µL (2.000 µM)
NPs Au – DT/ Nisina 0,5 mM	250 µL	9,750 mL	20 µL (1µM)	4,8 µL (2.000 µM)
NPs Au– DT/ Nisina 0,25 mM	125 µL	9,875 mL	20 µL (1µM)	4,8 µL (2.000 µM)
NPs Au– DT	-	10 mL	20 µL (1µM)	4,8 µL (2.000 µM)

4.3.4. Protocolo 3

A síntese das NPs Au foi realizada de modo similar ao Protocolo 2, diferindo apenas no processo de funcionalização.

A etapa de funcionalização das nanopartículas de ouro com nisina foi feita em tubo de centrífuga de 15 mL. Foram adicionados 2 mL da solução de nanopartículas (0,5 mM) e 1,28 mL de acetona, seguindo-se agitação manual por alguns segundos. Em seguida, foram adicionados 1,53 mL de solução de hexano contendo 23,7 µL de dodecanotiol, seguindo-se nova agitação manual e vigorosa por 30 segundos. Após esse tempo, o frasco foi deixado em repouso para que fossem formadas duas fases (fase inferior aquosa e fase superior orgânica contendo as nanopartículas ligadas ao dodecanotiol e moléculas de dodecanotiol livres). Esse procedimento foi repetido sequencialmente por 5 vezes, sendo feita em todas elas a coleta da fase superior e a adição de novo volume de hexano puro à fase aquosa inferior.

Ao fim das lavagens com hexano, 100 µL da fase orgânica final (hexano) contendo as nanopartículas ligadas a dodecanotiol foram adicionados a frascos de penicilina e a solução foi mantida em cabine de exaustão para a evaporação do solvente. Na etapa seguinte, foram adicionados 500 µL, 250 µL e 125 µL da solução estoque de nisina a 20 mM, para um volume final de 20 mL em água ultrapura, a fim de se obterem concentrações finais de 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM, respectivamente (Tabela 3). Ao fim da funcionalização, os frascos foram recobertos com papel alumínio e mantidos no escuro por 48 horas, sob temperatura ambiente. Em seguida, as nanopartículas foram submetidas à caracterização e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana.

Tabela 4: Descrição dos tratamentos do protocolo 3 empregado na síntese das nanopartículas de ouro

Tratamentos	Solução estoque nisina 20Mm	Tampão tetraborato 20 mM	Au (concentração)	Dodecanotiol (concentração)
NPs Au–DT/ Nisina 1 mM	500 μ L	9,5 mL	(0,67 μ M)	(67 μ M)
NPs Au – DT/ Nisina 0,5 mM	250 μ L	9,750 mL	(0,67 μ M)	(67 μ M)
NPs Au–DT/ Nisina 0,25 mM	125 μ L	9,875 mL	(0,67 μ M)	(67 μ M)
NPs Au–DT	-	10 mL	(0,67 μ M)	(67 μ M)

4.4. Pontos quânticos de carbono

A síntese de pontos quânticos de carbono foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por Li et al. (2016), com modificações, a partir da pirólise do citrato de amônio. Para tal, citrato de amônio (2 g) foi submetido a tratamento térmico de 200°C por aproximadamente 2 horas em mufla. A massa escura obtida foi triturada em almofariz e 0,05 g foram adicionados a 2 béqueres contendo volumes específicos da solução estoque de nisina 10 mg mL⁻¹, previamente diluída em água ultrapura, a fim de se obterem amostras nas concentrações finais de 1 mg mL⁻¹ e 0,5 mg mL⁻¹ respectivamente. Assim, ao primeiro béquer foram adicionados 1mL da solução estoque e 1 mL de água ultrapura e, ao segundo, foram adicionados 0,5 mL da solução estoque e 1,5 mL de água ultrapura. Posteriormente, os béqueres foram submetidos à temperatura de 260°C por 2 horas em mufla. O precipitado preto foi ressuspendido em 10 mL de água ultrapura. A solução obtida foi mantida em sonicador por 1 hora a 40 °C e posteriormente centrifugada a 35.000 g por 1 hora. O sobrenadante foi retirado, e as amostras foram armazenadas em frasco de penicilina, a -20°C. Seguindo-se os mesmos procedimentos, foi preparado um controle sem a adição da nisina. As soluções foram armazenadas em frasco de penicilina e mantidas em geladeira até seu uso.

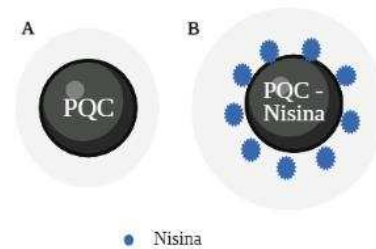


Figura 3: Ilustração esquemática dos pontos quânticos de carbono. As letras A e B representam, respectivamente, o PQC (controle) e os PQC–Nisina (pontos quânticos de carbono funcionalizados com nisina).

4.5. Caracterização dos nanomateriais

Após a funcionalização, as nanopartículas de ouro e os pontos quânticos de carbono foram caracterizados por meio da avaliação do espectro de emissão de fluorescência (Cary Eclipse Fluorescence - Agilent Technologies) e de espectrofotometria UV-visível (Genesys 10S UV-vis).

Devido a cor escura obtida ao final da síntese dos pontos quânticos de carbono, foi necessário proceder com a diluição das amostras na proporção 1:50, em água ultrapura, para realizar as caracterizações.

4.6. Ensaio de atividade antimicrobiana para as bactérias

A atividade antibacteriana da nisina na sua forma livre ou conjugada a nanomateriais foi avaliada contra o conjunto de microrganismos selecionados previamente (item 4.2), empregando-se o método de microdiluição em placas de 96 poços. Os microrganismos foram previamente incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. A nisina, em sua forma livre ou conjugada a nanomateriais foi diluída nos respectivos meios de cultura, a fim de se obterem concentrações finais de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nisina. Para isso, alíquotas de 50 μL das diluições das diferentes soluções de nisina foram adicionadas a poços contendo 50 μL das culturas celulares em fase de crescimento exponencial (10^6 UFC mL^{-1}). As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C e a densidade óptica a 600 nm ($\text{D.O.}_{600\text{ nm}}$) foi monitorada em um leitor de microplacas PowerWave XS (BioTek). Os ensaios foram realizados utilizando-se os meios de cultivo MRS e TSB, de acordo com o microrganismo avaliado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O controle foi realizado adicionando-se os nanomateriais não conjugados à nisina, nas respectivas diluições necessárias. Foi realizado ainda, um controle apenas com os respectivos

meios de cultura. A porcentagem de inibição para cada tratamento foi calculada em relação ao controle através da fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição: } (D.O._{600 \text{ nm C}} - D.O._{600 \text{ nm T}}) \times 100 / D.O._{600 \text{ nm C}}$$

$D.O._{600 \text{ nm C}}$ = Densidade óptica a 600 nm na ausência da nisina (controle)

$D.O._{600 \text{ nm T}}$ = Densidade óptica a 600 nm na presença da nisina

4.7. Ensaio de atividade antimicrobiana para as leveduras

O ensaio da atividade antimicrobiana da nisina contra as leveduras comerciais foi realizado pelo método de microdiluições em placas de 96 poços. Os microrganismos foram incubados a 30 °C por 24 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Posteriormente, a nisina foi diluída em meio de cultura YPD para a concentração final de 500 µg mL⁻¹. A cada poço foram adicionados 50 µL da solução de nisina diluídos serialmente e 50 µL das culturas celulares em fase de crescimento exponencial (10⁶ UFC/ mL). As placas foram incubadas por 30 °C por 24 horas e a densidade óptica a 550 nm ($D.O._{550 \text{ nm}}$) foi avaliada em leitor de microplacas PowerWave XS (BioTek). O controle consistiu do cultivo das linhagens de levedura em YPD, na ausência do peptídeo. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir totalmente o crescimento dos microrganismos.

4.8. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (two-way) seguidos de comparação múltipla por teste de Bonferroni (p-valor < 0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das nanopartículas

5.1.1. Caracterização das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (Figura 2) foram sintetizadas a partir da redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl₄). No protocolo 1, foi utilizado o agente redutor cloreto de tetra(hidroximetil)fosfônio (THPC); nos protocolos 2 e 3, o borohidreto de sódio (NaBH₄) foi o agente redutor. Após a obtenção das nanopartículas, fez-se a ligação do dodecanotiol à superfície dos nanomateriais e, posteriormente, a ligação da nisina ao dodecanotiol, por meio de ligações hidrofóbicas. Pode-se ver na Figura 4 os resultados de espectrofotometria

UV-visível para as e NPs Au (Figura 4a) e NPs Au-DT (Figura 3b) obtidas segundo os 3 diferentes protocolos executados neste estudo.

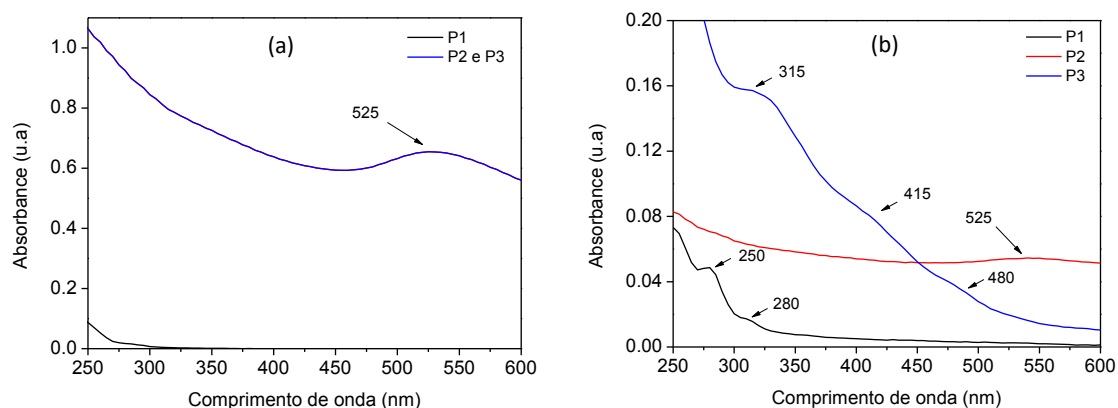


Figura 4: Espectros de absorção UV-visível das nanopartículas de ouro (a) NPs Au (b) NPs Au-DT. Protocolo 1: $[Au] = 1 \mu M$ (NPs Au) e $0,5 \mu M$ (NPs Au-DT). Protocolo 2: $[Au] = 500 \mu M$ (NPs Au) e $1 \mu M$ (NPs Au-DT). Protocolo 3: $[Au] = 500 \mu M$ (NPs Au) e $0,67 \mu M$ (NPs Au-DT).

Para o protocolo 1, foi observado um espectro que absorve na faixa do ultravioleta. Vale ressaltar que o sinal obtido é inferior ao obtido pelos demais protocolos e, por isso, encontra-se menos evidente na figura. Tal resultado se assemelha ao encontrado por Daniel e Baiker (1993), que sintetizaram nanopartículas de ouro produzidas a partir da redução do elemento com o agente THPC. Segundo os autores, diferentes concentrações de ouro deram origem a nanopartículas com tamanhos diferentes. Possivelmente, o baixo sinal de absorvância observado para as NPs Au obtidas pelo protocolo 1 (Figura 4a), está relacionado ao tamanho das nanopartículas, que devem se encontrar em tamanho inferior a 2 nm. As NPs Au do protocolo 1 recobertas com dodecanotiol (NPs Au-DT) (Figura 4b) apresentam um perfil semelhante ao obtido com as NPs Au, com destaque para os picos em 250 e 280 nm. Segundo Du et al. (2005), as nanopartículas de ouro podem apresentar deslocamento do pico para comprimentos de ondas maiores conforme ocorre o aumento do tamanho da partícula.

No espectro referente aos protocolos 2 e 3, foi observada uma banda com máximo de absorção em 525 nm para as NPs Au (Figura 4a). Esse resultado é semelhante ao obtido por Yang et al. (2013), que encontraram uma banda de plasmon para NPs Au em torno de 520 nm.

As NPs Au-DT obtidas com o protocolo 2 (Figura 4b) apresentaram perfil semelhante ao obtido com as NPs Au, com pico máximo de absorção em 525 nm. No entanto, a funcionalização reduziu a intensidade de absorção das nanopartículas.

No espectro de absorção das amostras obtidas a partir do protocolo 3 (Figura 4b), foi observado um pico mais intenso de absorção em 315 nm e picos menos intensos em 415 nm e

480 nm. Tal resultado possivelmente está relacionado com o recobrimento das nanopartículas com o dodecanotiol. No estudo realizado por Kyrychenko et al. (2011), foi observado um pico de plasmon em 516 nm para nanopartículas de ouro recobertas por dodecanotiol, as quais apresentavam dimensões entre 3 e 10 nm. Os autores relatam que a posição do pico de ressonância pode ser alterada em razão de diversos fatores, tais como o tamanho das partículas e a distância entre elas. A diferença observada para os espectros das NPs Au-DT dos protocolos 2 e 3 (Figura 4b), pode ser atribuída às diferentes metodologias de funcionalização utilizadas.

Na Figura 5, são mostrados os resultados da análise UV-visível para as NPs Au-DT/Nisina obtidas a partir da adoção dos três protocolos executados neste trabalho.

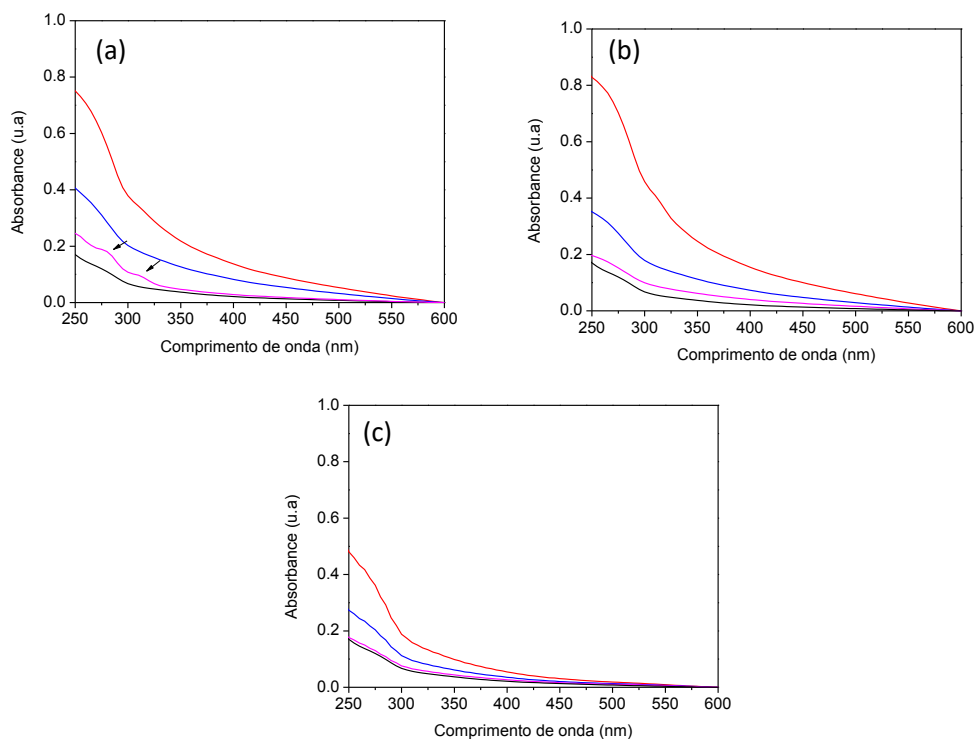


Figura 5: Espectros de absorção UV- visível das NPs Au-DT/ Nisina. a) Protocolo 1, b) Protocolo 2, c) Protocolo 3. A nisina livre foi diluída em tampão fosfato 20 mM. As concentrações dos componentes presentes em cada amostra estão descritas nas tabelas 2, 3 e 4, no item 4.3. Legenda (—) nisina livre 0,25 mM (—) NPs Au-DT/ Nisina 0,25 mM, (—) NPs Au-DT/ Nisina 0,5 mM (—) NPs Au-DT/ Nisina 1 mM.

Independentemente do protocolo empregado, o perfil dos espectros obtido para as NPs Au-DT/ Nisina foram muito semelhantes. A presença da banda de ressonância plasmônica, característica das NPs Au, não é observada, o que pode estar associada à baixa concentração das NPs Au em relação à nisina.

A nisina livre (0,25 mM) apresentou um pico de absorbância em 250 nm. O resultado encontrado condiz com o observado no estudo realizado por Pandit et al. (2017), que relataram

a ocorrência de um pico de absorvância em 235 nm. Quando se compara o espectro de absorvância da nisina livre (0,25 mM) aos obtidos com as NPs Au–DT/Nisina, observa-se que a intensidade de absorção de luz UV-visível é aumentada conforme se aumenta a concentração de nisina (Figura 5).

Na figura 6, são apresentados os espectros de emissão de fluorescência das NPs Au e das NPs Au–DT sintetizadas a partir dos três protocolos executados.

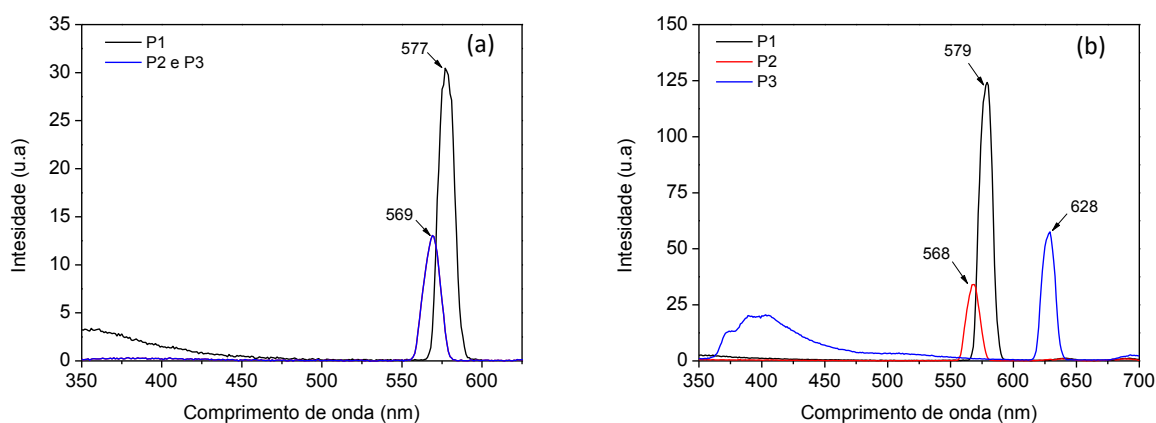


Figura 6: Espectros de emissão de fluorescência das nanopartículas de ouro (λ de excitação = 290 nm), (a) NPs Au (b) NPs Au–DT. Protocolo 1: [Au] = 1 μ M (NPs Au) e 0,5 μ M (NPs Au–DT). Protocolo 2: [Au] = 500 μ M (NPs Au) e 1 μ M (NPs Au–DT). Protocolo 3: [Au] = 500 μ M (NPs Au) e 0,67 μ M (NPs Au–DT).

Os espectros de emissão de fluorescência obtidos com as NPs Au sintetizadas de acordo com o protocolo 1 foram distintos dos observados com as nanopartículas obtidas segundo os protocolos 2 e 3. Foi observada uma banda de emissão de fluorescência em 577 nm para as NPs Au (Figura 6a) do protocolo 1. Resultado semelhante foi relatado por Kumar et al. (2013), que utilizaram THPC como agente redutor. De acordo com os resultados obtidos por aqueles autores, foi observada uma banda plasmônica entre 515 e 520 nm, a qual corresponde à região plasmônica característica de nanopartículas de ouro pequenas. Foi ainda observado no estudo realizado por Kumar et al. (2013) que ao se armazenar a mesma amostra e repetirem-se as análises posteriormente, ocorreu um deslocamento de Stokes do pico. Ao serem recobertas com dodecanotiol, as NPs Au–DT (Figura 6b) apresentaram um perfil semelhante ao obtido com as NPs Au, com um pequeno deslocamento de Stokes para 579 nm.

Nos espectros referentes às nanopartículas obtidas segundo os protocolos 2 e 3, foi observada, para as NPs Au, uma banda (Figura 6a) com pico de emissão máxima em 569 nm. Resultado semelhante foi relatado em Sun et al. (2015), que obtiveram nanopontos fluorescentes em uma região plasmônica com pico de emissão em 582 nm. Os diferentes

espectros observados na figura 6a, podem ter sido gerados em decorrência dos agentes redutores empregados na síntese das NPs Au (THPC para o protocolo 1 e NaBH_4 para os protocolos 2 e 3), os quais podem ter formado nanopartículas com tamanhos diferentes.

Ao serem recobertas com dodecanotiol (NPs Au-DT) (Figura 6b), as nanopartículas obtidas segundo o protocolo 2 mantiveram o perfil semelhante ao das NPs Au, com um pequeno deslocamento do pico de máxima emissão para 568 nm. As nanopartículas obtidas segundo o protocolo 3, ao serem recobertas por dodecanotiol (NPs Au-DT) (Figura 6b), apresentaram um deslocamento de Stokes de 569 nm para 628 nm. O resultado encontrado condiz com o observado no estudo publicado por Chen et al. (2015), no qual os autores relatam um espectro de emissão com máximo em 550 nm para nanopontos recobertos com dodecanotiol.

Os resultados da análise de emissão de fluorescência das NPs Au-DT/ Nisina, para os três protocolos utilizados neste trabalho, podem ser observados na Figura 7.

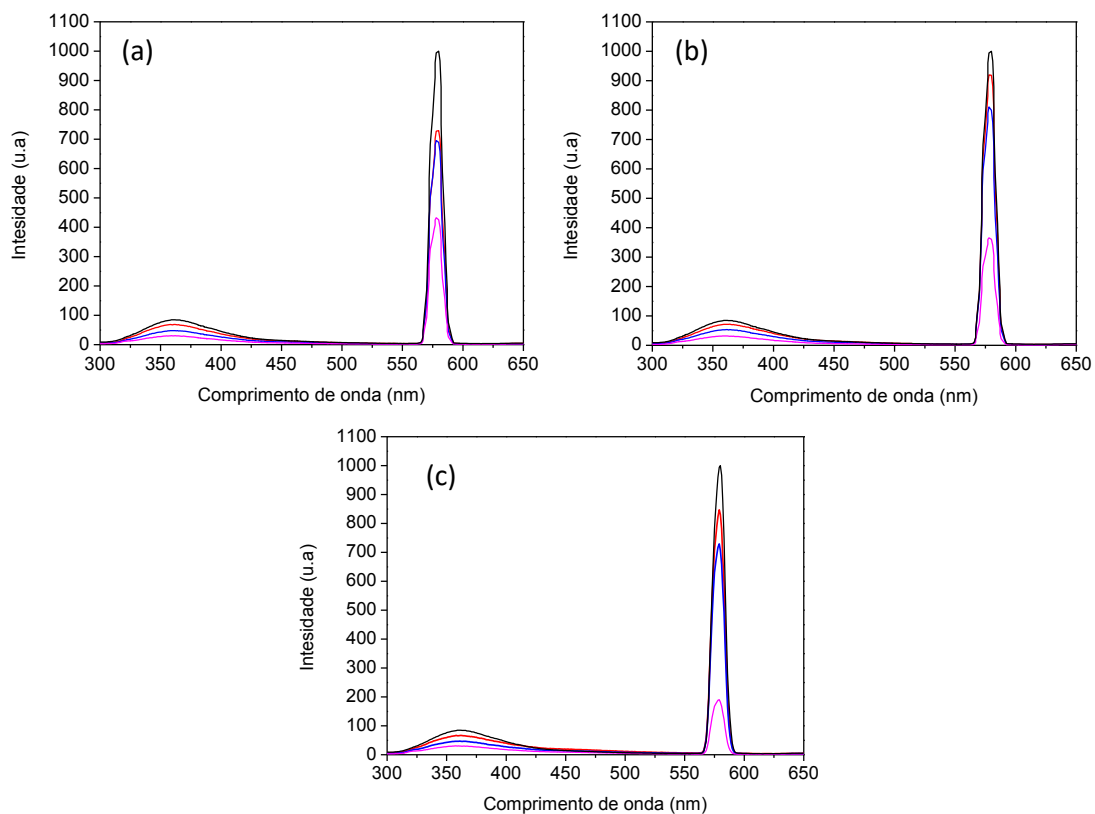


Figura 7: Espectros de emissão de fluorescência das NPs Au-DT/ Nisina (λ de excitação = 290 nm). a) Protocolo 1, b) Protocolo, c) Protocolo 3. As concentrações dos componentes presentes em cada amostra estão descritas nas tabelas 2, 3 e 4, item 4.3. Legenda (—) Nisina livre 0,25 mM (—) NPs Au-DT/ Nisina 0,25 mM, (—) NPs Au-DT/ Nisina 0,5 mM (—) NPs Au-DT/ Nisina 1 mM.

Os espectros de emissão de fluorescência foram similares para todos os protocolos executados (Figura 7), apresentando picos menos intensos em torno de 360 nm e picos mais intensos em torno de 580 nm. Além disso, os espectros observados foram semelhantes ao observado para a nisina livre, destacando-se que a associação da nisina com as nanopartículas reduz a intensidade da fluorescência do conjugado. De acordo com Chen et al. (2015), as propriedades que as nanopartículas de ouro têm de emitir luz são, em maior parte, dependentes da densidade e da carga das moléculas que recobrem sua superfície.

5.1.2. Caracterização dos pontos quânticos de carbono (PQC)

Os PQC obtidos neste trabalho (Figura 8) emitiram fluorescência característica ao serem excitados por luz UV a 365 nm. Esses materiais são amplamente conhecidos por suas propriedades fluorescentes (Dong et al., 2020). De acordo com Xiao & Sun (2018), a emissão de fluorescência está associada à temperatura de pirólise.

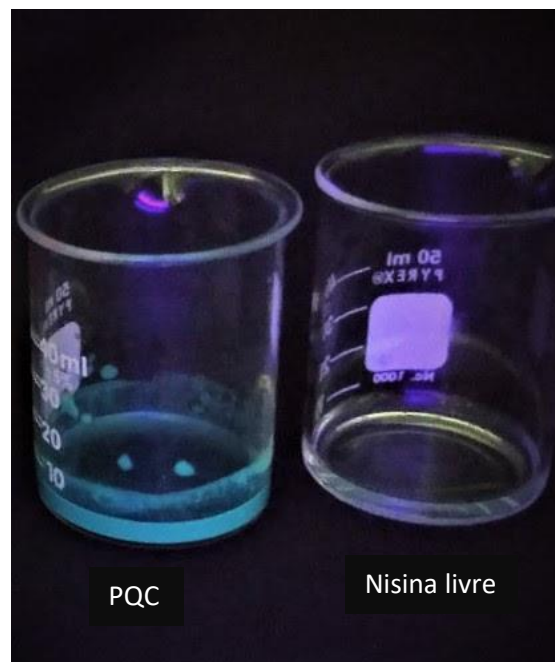


Figura 8: Emissão de fluorescência por pontos quânticos de carbono funcionalizados com nisina (PQC–Nisina) sob luz UV (365 nm), em comparação à nisina livre em solução aquosa.

Conforme se pode observar a partir dos resultados obtidos no ensaio de espectrofotometria UV-visível (Figura 9a), foi obtido um pico de absorção em 350 nm tanto para os PQC quanto para os PQC-Nisina (Figura 9a). Resultado semelhante foi obtido no estudo conduzido por Li et al., (2016), onde foram obtidos nanopontos de carbono com uma banda de absorção em 340 nm. Para a nisina livre sem tratamento térmico, foi observada uma banda na

região do visível em 250 nm. Pandit et al. (2017) relataram resultado semelhante para a nisina livre, com a ocorrência de um pico de absorbância em 235 nm. No entanto, não foi observada nenhuma banda de absorção na faixa UV-visível para a nisina livre tratada termicamente.

Os PQC apresentaram espectro de emissão de fluorescência (Figura 9b) entre cerca de 420 e 460 nm (Figura 9b), comportamento observado tanto para os PQC quanto para os PQC–Nisina. Tal resultado corrobora as informações relatadas por Li et al. (2016), que obtiveram pico de emissão no mesmo comprimento de onda quando o comprimento de excitação foi fixado em 365 nm. Neste trabalho, o comprimento de onda de excitação que resultou em máxima emissão de fluorescência foi 350 nm. Nessas condições, foi observado um pico de emissão de fluorescência para a nisina livre (sem tratamento térmico) a 1 mg mL⁻¹ em cerca de 410 nm, com baixa intensidade de fluorescência, e um outro pico mais intenso foi observado em 627 nm. Para a nisina tratada termicamente, não foi observada nenhuma emissão de fluorescência. Tal resultado, associado ao resultado observado para a absorção UV-visível, indica uma possível degradação do peptídeo, em decorrência do tratamento térmico.

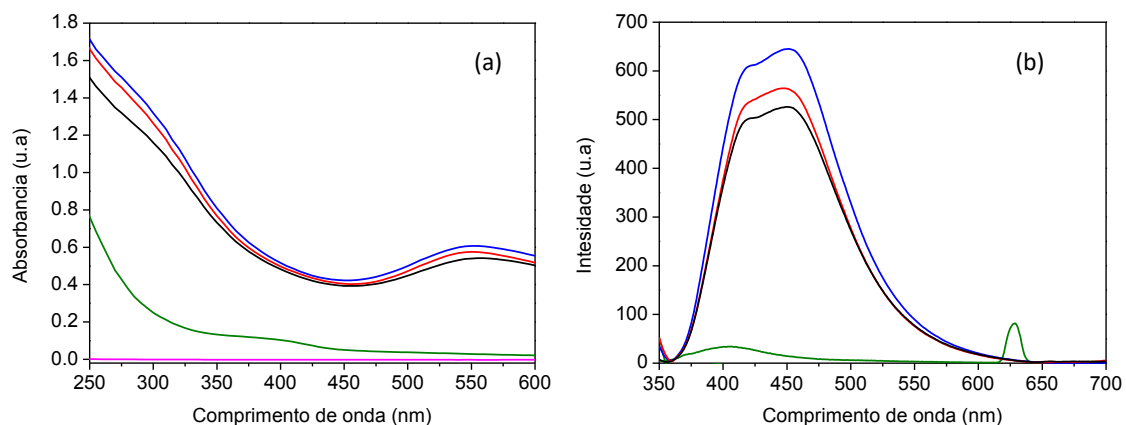


Figura 9: a) espectros de absorção de UV-visível dos pontos quânticos de carbono (PQC); b) espectros de emissão de fluorescência (λ de excitação = 350 nm) dos pontos quânticos de carbono (PQC). Em razão da coloração muito escura obtida após a síntese dos pontos quânticos de carbono, as amostras contendo carbono foram diluídas na proporção 1:50, em água ultrapura, para as análises. Legenda: (—) Nisina livre (1 mg mL⁻¹) tratada termicamente; (—) Nisina livre (1 mg mL⁻¹) sem tratamento térmico; (—) PQC-Nisina 0,5 mg mL⁻¹; (—) PQC-Nisina 1 mg mL⁻¹; (—) PQC.

5.2 Ensaios de atividade antibacteriana

5.2.1 Ensaios de atividade antibacteriana com as NPs Au-DT/ Nisina

Ensaios de inibição bacteriana foram realizados com os materiais obtidos e os resultados se encontram nas Figuras 10 a 16.

A nisina livre inibiu completamente 13 dos 19 isolados obtidos de amostras de cervejas com contaminação bacteriana (Figura 10). Apenas os isolados CTUG05, CJFP05, CTUG06, CJFC03, CTUG04 e CTUG09, destacados com setas, não foram totalmente inibidos nas concentrações avaliadas ($\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Destaca-se ainda que, à exceção do resultado obtido com os seis isolados destacados acima, a menor concentração de nisina avaliada ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi tão eficaz quanto as concentrações mais elevadas.

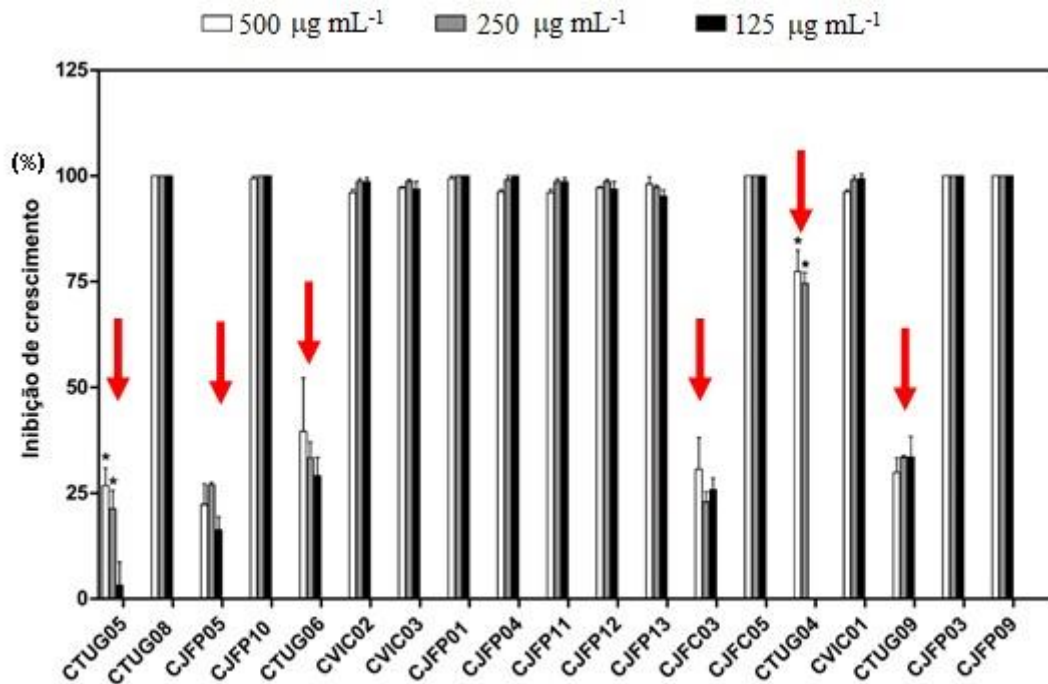


Figura 10: Atividade antimicrobiana da nisina livre contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com contaminação bacteriana. A identificação dos isolados bacterianos é apresentada na Tabela 1, item 4.2.

Embora a nisina livre tenha sido pouco eficiente em inibir o isolado *Acetobacter* sp. CTUG05 (Figura 11), houve completa inibição desse isolado pelas NPs Au-DT na maior dosagem avaliada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), independentemente do protocolo utilizado. Houve também inibição desse isolado pelo conjugado, isto é, pelas NPs Au-DT/Nisina; na maior concentração avaliada houve mais de 50% de inibição para os protocolos 1 e 3 (Figura 11). Aparentemente, ao recobrir a nanopartícula de ouro, a nisina inibe ou reduz o efeito do ouro sobre esse microrganismo.

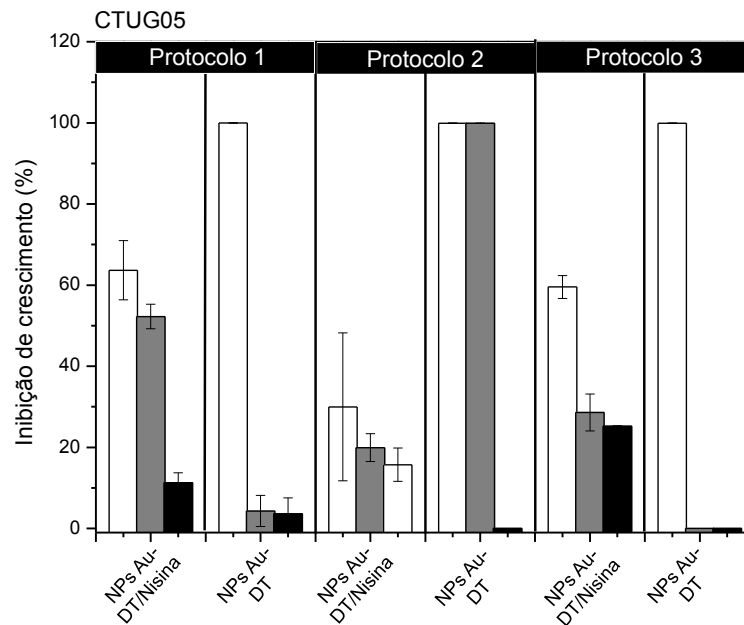


Figura 11: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo os três protocolos executados contra o isolado bacteriano *Acetobacter* sp. CTUG05. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos referem-se às NPs Au-DT/Nisina, nas diferentes concentrações testadas. A suspensão de nanopartículas utilizada como controle, não possui nisina. Dessa forma, as concentrações referentes a cada concentração avaliada, conforme descritas na legenda, são referentes às diluições realizadas na mesma proporção dos tratamentos para cada concentração. Assim, ainda que na ausência de nisina, os demais componentes presentes na suspensão de nanopartículas do controle (ouro e dodecanotiol) sofreram diluição de forma semelhante aos tratamentos. Legenda (□) 500 µg mL⁻¹; (■) 250 µg mL⁻¹; (■) 125 µg mL⁻¹.

A nisina livre foi também pouco efetiva em inibir o crescimento dos isolados de *Bacillus* sp. CJFP05 e CTUG06 (Figura 10). Porém, o conjugado NPs Au-DT/Nisina (Figuras 12 e 13) obtidos segundo os protocolos 1 e 2, na concentração de 500 µg mL⁻¹ de suspensão de nanopartícula, apresentaram valores de inibição superiores a 60%. Esses resultados são relevantes quando se considera o processo de produção de cervejas, uma vez que o gênero *Bacillus* compreende bactérias formadoras de endosporos e de biofilmes, o que torna esses microrganismos difíceis de serem removidos do processo produtivo, uma vez que tenham se estabelecido (Munford et al., 2017).

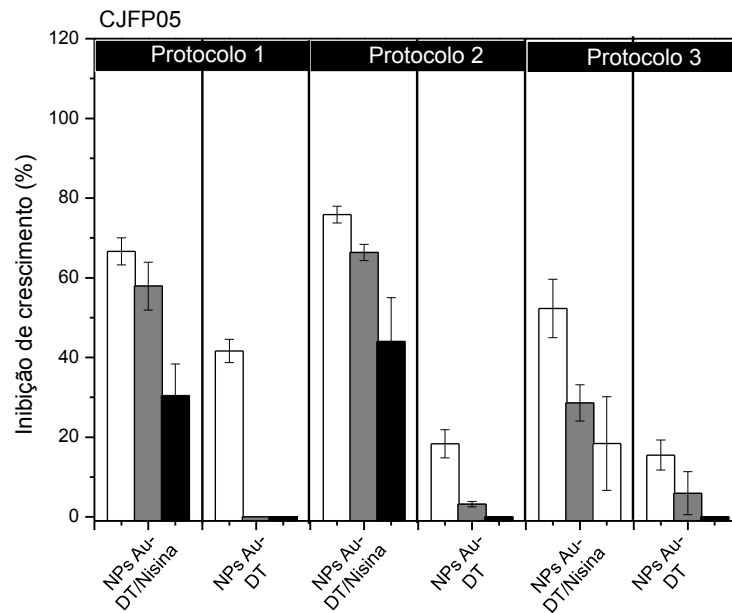


Figura 12: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo os três protocolos executados contra o isolado bacteriano *Bacillus* sp. CJFP05. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos referem-se às NPs Au-DT/Nisina, nas diferentes concentrações testadas. A suspensão de nanopartículas utilizada como controle, não possui nisina. Dessa forma, as concentrações referentes a cada concentração avaliada, conforme descritas na legenda, são referentes às diluições realizadas na mesma proporção dos tratamentos para cada concentração. Assim, ainda que na ausência de nisina, os demais componentes presentes na suspensão de nanopartículas do controle (ouro e dodecanotiol) sofreram diluição de forma semelhante aos tratamentos. Legenda (□) 500 µg mL⁻¹; (■) 250 µg mL⁻¹; (■) 125 µg mL⁻¹.

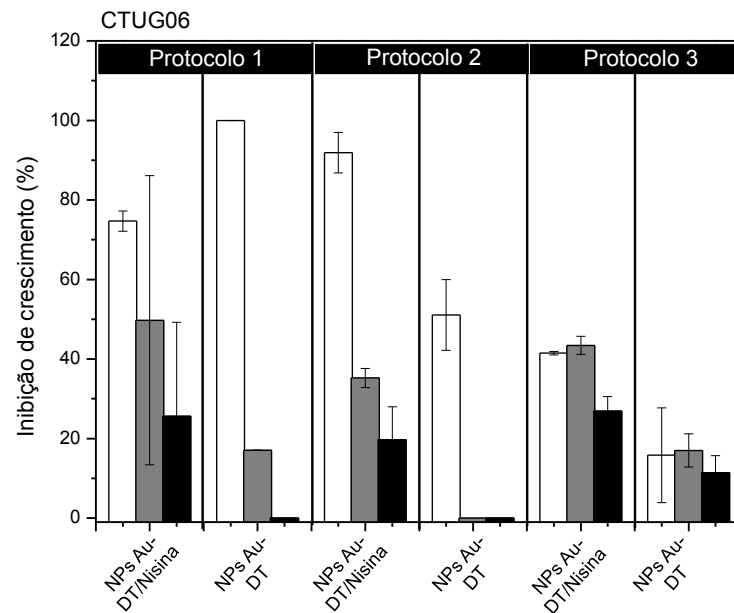


Figura 13: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo os três protocolos executados contra o isolado bacteriano *Bacillus* sp. CTUG06. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos referem-se às NPs Au-Dt/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas. A suspensão de nanopartículas utilizada como controle, não possui nisina. Dessa forma, as concentrações referentes a cada concentração avaliada, conforme descritas na legenda, são referentes às diluições realizadas na mesma proporção dos tratamentos para cada concentração. Assim, ainda que na ausência de nisina, os demais componentes presentes na suspensão de nanopartículas do controle (ouro e dodecanotiol) sofreram diluição de forma semelhante aos tratamentos. Legenda (□) 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (■) 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (■) 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Lactobacillus sp. CJFC03 e CTUG04 foram os únicos representantes desse gênero que não foram completamente inibidos pela nisina livre (Figura 10), apresentando valores de inibição menores que 30% e 80%, respectivamente. Para CJFC03 (Figura 14), o conjugado NPs Au-DT/ Nisina na maior concentração avaliada (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), obtido segundo o protocolo 1, proporcionou um aumento da inibição para aproximadamente 55%. Para os demais protocolos, a eficiência de inibição foi inferior a 35%.

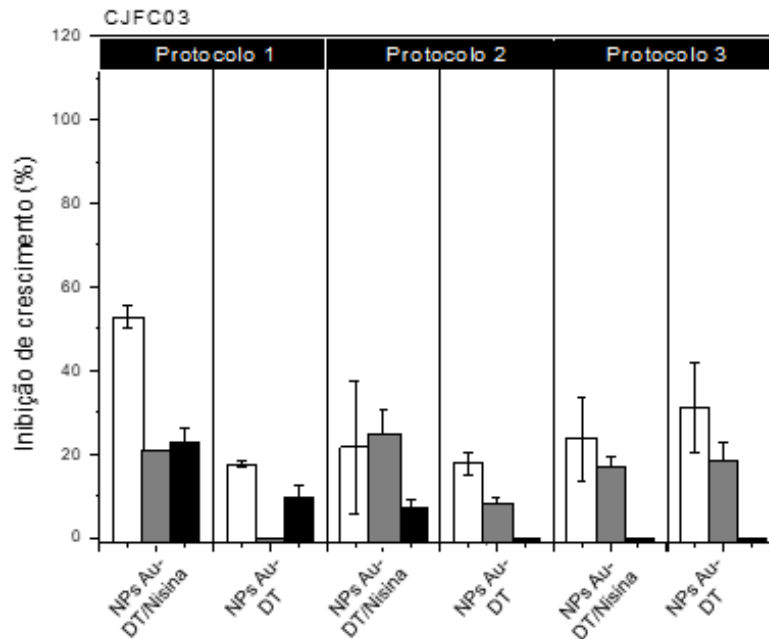


Figura 14: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo os três protocolos executados contra o isolado bacteriano *Lactobacillus* sp. CJFC03. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos às NPs Au-Dt/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas. A suspensão de nanopartículas utilizada como controle, não possui nisina. Dessa forma, as concentrações referentes a cada concentração avaliada, conforme descritas na legenda, são referentes às diluições realizadas na mesma proporção dos tratamentos para cada concentração. Assim, ainda que na ausência de nisina, os demais componentes presentes na suspensão de nanopartículas do controle (ouro e dodecanotiol) sofreram diluição de forma semelhante aos tratamentos. Legenda (□) 500 µg/ mL, (■) 250 µg/ mL, (■) 125 µg/ mL.

Com relação ao isolado *Lactobacillus* sp. CTUG04 (Figura 15), a nisina livre apresentou eficiência de inibição inferior a 77%. O efeito inibitório foi ainda menor quando se empregaram os conjugados, NPs Au-DT/ Nisina, independentemente do protocolo utilizado, obtendo-se eficiência de inibição inferior a 60%.

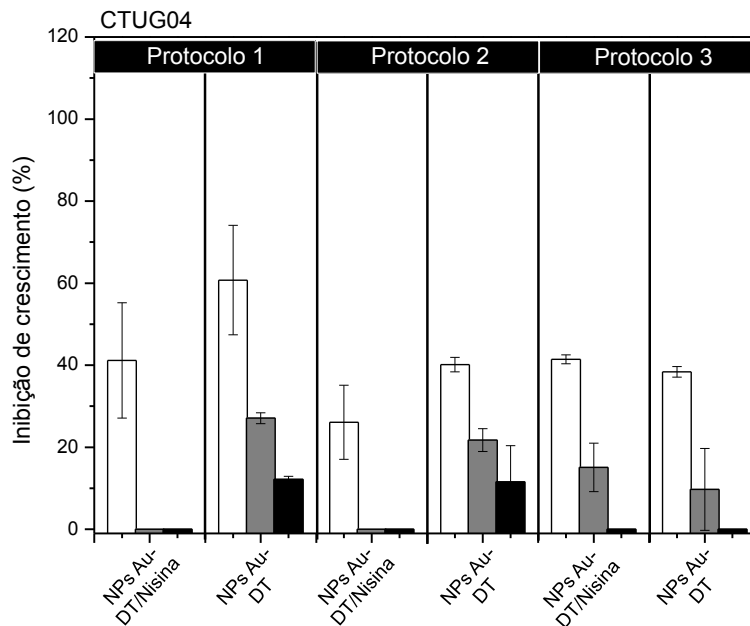


Figura 15: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo os três protocolos executados contra o isolado bacteriano *Lactobacillus* sp. CTUG04. O controle é referente às NPs Au–DT e os tratamentos às NPs Au–Dt/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas. A suspensão de nanopartículas utilizada como controle, não possui nisina. Dessa forma, as concentrações referentes a cada concentração avaliada, conforme descritas na legenda, são referentes às diluições realizadas na mesma proporção dos tratamentos para cada concentração. Assim, ainda que na ausência de nisina, os demais componentes presentes na suspensão de nanopartículas do controle (ouro e dodecanotiol) sofreram diluição de forma semelhante aos tratamentos. Legenda (□) 500 µg mL⁻¹, (■) 250 µg mL⁻¹, (■) 125 µg mL⁻¹.

A elevada eficiência da nisina em inibir a maioria dos isolados de *Lactobacillus* sp., assim como mencionado anteriormente sobre o gênero *Bacillus*, é de grande relevância industrial, tendo em vista que bactérias desse gênero estão entre as mais frequentemente encontradas em casos de contaminação microbiológica de cerveja (Suzuki, 2020). Dentro desse gênero, destaca-se a espécie *L. brevis*, a qual é capaz de formar biofilme, o que dificulta sua remoção do processo de produção quando está presente (Garofalo et al., 2015).

Sphingomonas sp. CTUG09 mostrou-se resistente à maioria dos tratamentos (Figura 16), sendo a inibição obtida com nisina livre inferior a 30%. A maior eficiência de inibição foi obtida com as NPs Au–DT/ Nisina sintetizadas segundo o protocolo 2, com aproximadamente 55% de inibição. Considerando-se que tanto a nisina livre (Figura 10) quanto as NPs Au–DT apresentam baixo efeito inibitório sobre esse isolado, esses resultados indicam a ocorrência de um efeito sinérgico entre as NPs Au–DT e a nisina quando a síntese é realizada segundo o protocolo 2.

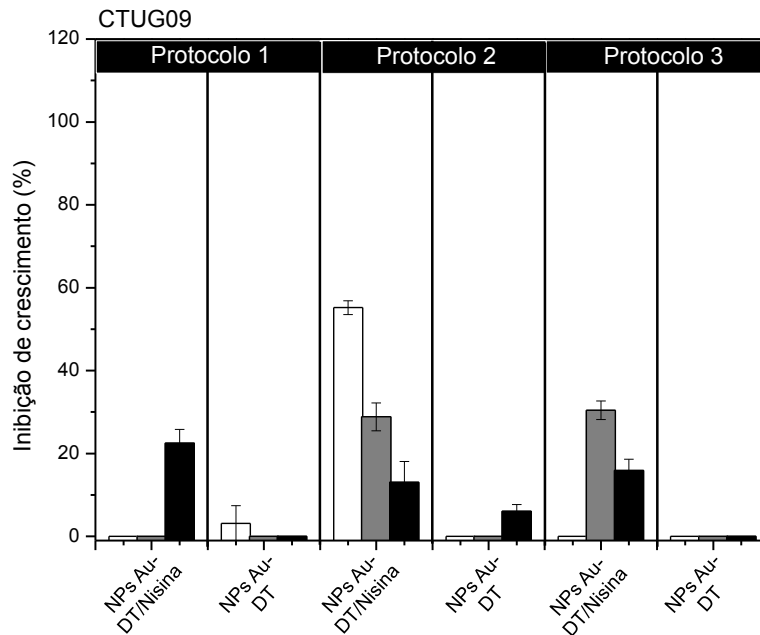


Figura 16: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo os três protocolos executados contra o isolado bacteriano *Sphingomonas* sp. CTUG09. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos às NPs Au-Dt/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas. A suspensão de nanopartículas utilizada como controle, não possui nisina. Dessa forma, as concentrações referentes a cada concentração avaliada, conforme descritas na legenda, são referentes às diluições realizadas na mesma proporção dos tratamentos para cada concentração. Assim, ainda que na ausência de nisina, os demais componentes presentes na suspensão de nanopartículas do controle (ouro e dodecanotiol) sofreram diluição de forma semelhante aos tratamentos. Legenda (□) 500 µg mL⁻¹, (■) 250 µg mL⁻¹, (■) 125 µg mL⁻¹.

Para os demais isolados, como mostrado na Figura 17 para a concentração de 500 µg mL⁻¹, os conjugados apresentaram um efeito inibitório menor do que o obtido com a nisina livre. Os demais resultados são mostrados nas Figuras 20 a 22, item 9 (Apêndice).

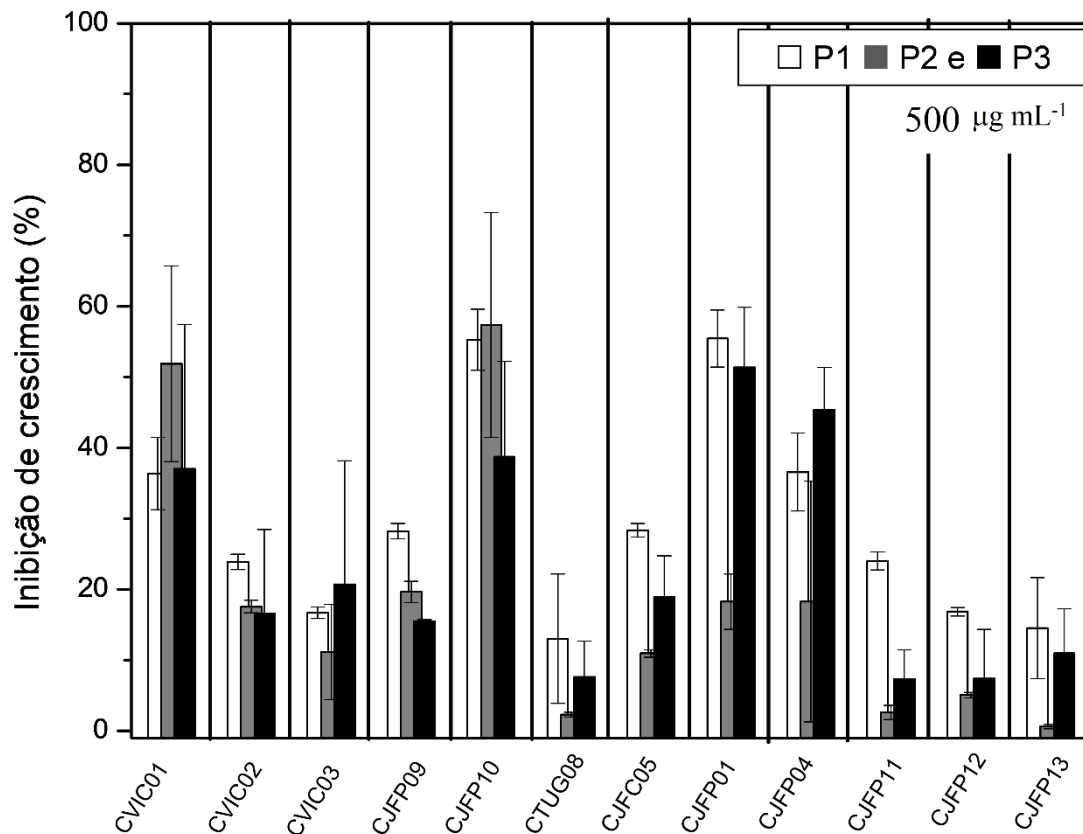


Figura 17: Atividade antimicrobiana das NPs Au-DT/ Nisina dos 3 protocolos realizados contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com índices elevados de contaminação bacteriana, para a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados para as demais concentrações encontram-se no item 9. A identificação dos isolados bacterianos é apresentada na Tabela 1, item 4.2.

5.2.2. Ensaio de atividade antibacteriana dos PQC

No ensaio de inibição do crescimento das bactérias selecionadas, os PQC–Nisina apresentaram resultados semelhantes aos PQC, na ausência do peptídeo (Figura 18). Acredita-se que o efeito proeminente dos PQC sobre os microrganismos tenha sido causado pelo carbono. No ensaio de UV-visível (Figura 9a), observou-se que a nisina livre exposta ao tratamento térmico não apresenta absorvância em toda a região analisada, diferentemente do observado com o peptídeo que não foi submetido ao tratamento térmico. Dessa forma, ainda que a nisina seja estável a altas temperaturas, conclui-se que a exposição do peptídeo à temperatura de 260°C por 2 horas tenha causado alterações significativas na estrutura da molécula, desencadeando a perda da função da mesma. De acordo com Modugno et al. (2018), a estrutura da nisina é a principal responsável por sua atividade antimicrobiana. As ligações tioéter e os anéis de lantionina são importantes para a que a nisina exerça sua atividade antimicrobiana (Modugno et al., 2015; Khusainov & Kuipers, 2013).

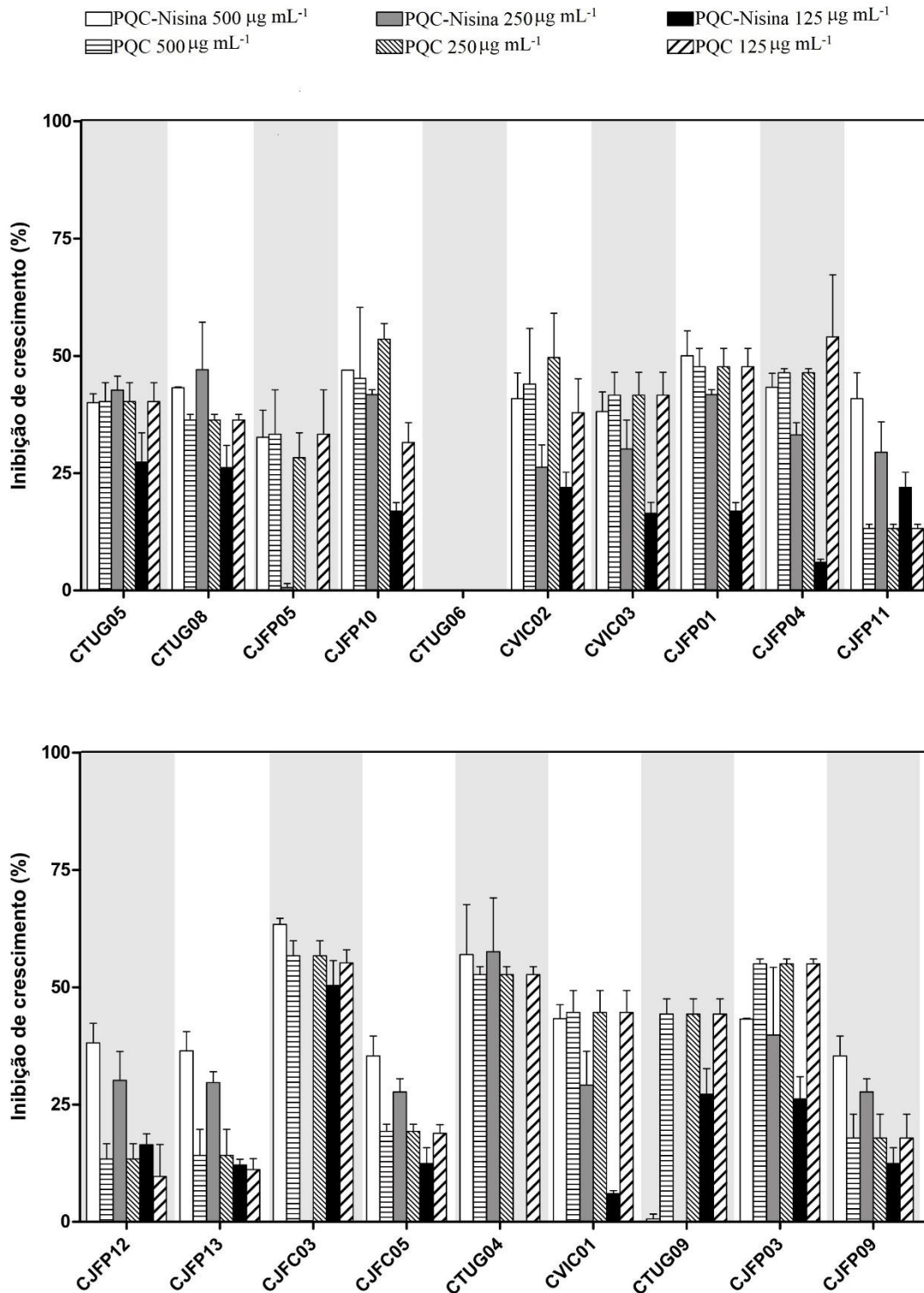


Figura 18: Atividade antimicrobiana dos PQC contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com índices elevados de contaminação bacteriana. A identificação dos isolados bacterianos é apresentada na Tabela 1, item 4.2. O controle é referente aos PQC e os tratamentos aos PQC-Nisina nas diferentes concentrações testadas.

5.3. Ensaio de inibição das leveduras

A eficiência da fermentação está diretamente ligada à vitalidade e viabilidade das células de levedura, as quais são afetadas pelo estresse causado a essas células durante todo o processo. A viabilidade está relacionada à porcentagem de células vivas em uma população, enquanto a vitalidade se refere às células metabolicamente ativas (Luarazi et al., 2016). Além disso, as leveduras podem ser reutilizadas por diversos ciclos de fermentação, o que irá depender das condições de viabilidade e vitalidade das mesmas (Wang et al., 2019). Dada a importância da viabilidade celular das leveduras para o processo fermentativo, a nisina foi avaliada quanto a um possível efeito inibitório do crescimento de leveduras cervejeiras comerciais.

Ao contrário do observado para a maioria das bactérias contaminantes testadas, para as quais a menor concentração de nisina avaliada exerceu efeito inibitório sobre as mesmas (Figura 10), o peptídeo não chegou a inibir o crescimento das leveduras selecionadas (Figura 19), mesmo na maior concentração. O ideal é que a viabilidade do fermento para inoculação na cerveja seja de, no mínimo, 90% (Wray, 2020). Apenas para a levedura *Saison Ale* SY064, a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nisina exerceu efeito significativo sobre o crescimento. Tais resultados corroboram com a literatura, onde é reportado que essa bacteriocina não exerce efeito inibitório sobre leveduras (Gharsallaoui et al., 2016).

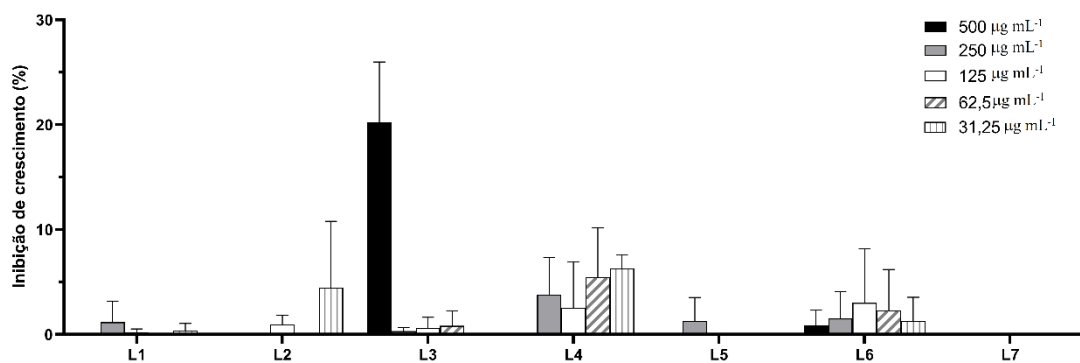


Figura 19: Porcentagem de inibição das leveduras comerciais selecionadas para o tratamento com nisina livre. As leveduras avaliadas foram: *Saccharomyces cerevisiae safale* S-04 (L1), *Trappist Ale* SY065 (L2), *California Ale Yeast* WLP001 (L3), *Saison Ale* SY064 (L4), *Belgian Ale* 04 YLB3003 (L5), *American Ale* SY025 (L6), *Brettanomyces lambicus* YLB900 (L7).

6. CONCLUSÕES

A caracterização das nanopartículas de ouro e dos pontos quânticos de carbono demonstrou que os mesmos foram obtidos com sucesso.

A nisina na sua forma livre foi, de modo geral, muito eficiente em inibir o crescimento de bactérias contaminantes de cervejas, e não afeta a viabilidade das leveduras cervejeiras comerciais analisadas.

Em comparação aos conjugados NPs Au-DT/ Nisina, a nisina livre foi mais eficaz no controle bacteriano para a maioria dos isolados. No entanto, para alguns microrganismos testados, as NPs Au-DT/Nisina foram mais eficientes.

Os PQC-Nisina apresentaram baixa eficiência de inibição de bactérias contaminantes de cervejas. Os efeitos de inibição, quando observados, podem ser atribuídos ao carbono, dado que a nisina sofreu degradação térmica durante o processo de obtenção dos PQC. Embora o peptídeo nisina seja estável a altas temperaturas, a exposição do mesmo a temperaturas altas por um longo período de tempo causa a perda parcial ou total da sua atividade.

Os nanomateriais são uma tecnologia promissora, passíveis de aplicação em diversos campos e, outros protocolos devem ser testados a fim de se obterem nanomateriais com elevada eficiência de inibição de microrganismos indesejáveis na indústria cervejeira.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuramente, espera-se proceder com o processo de diálise das nanopartículas para eliminarem-se impurezas que possam interferir em caracterizações e ensaios posteriores. Espera-se ainda, após a purificação, avaliar-se a atividade das nanopartículas contra biofilmes bacterianos e caracterizá-las mais detalhadamente a partir de outras metodologias, como microscopia eletrônica de transmissão e análise de infravermelho (FTIR). Além disso, deve-se buscar outro modo de funcionalizar os pontos quânticos de carbono, a fim de se manter a atividade da nisina. A fim de complementar os resultados obtidos, espera-se ainda avaliar o efeito das nanopartículas produzidas contra as leveduras comerciais avaliadas. Ensaios buscando avaliar o efeito de todos os componentes utilizados, na sua forma livre, bem como a avaliação da citotoxicidade dos mesmos, bem como os nanomateriais produzidos, devem ser realizados. Por fim, é relevante avaliar-se também o efeito da nisina, na presença e ausência de tratamento térmico, contra todos os microrganismos selecionados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL AWAK, M. M.; WANG, P.; WANG, S.; TANG, Y.; SUN, Y. P.; YANG, L. Correlation of carbon dots' light-activated antimicrobial activities and fluorescence quantum yield. **RSC advances**, v. 7, n. 48, p. 30177-30184, 2017.

ALMEIDA, A. D. R.; MACIEL, M. V. D. O. B.; MACHADO, M. H.; BAZZO, G. C.; ARMAS, R. D. D.; VITORINO, V. B.; VITALI, L.; BLOCK, J. M.; BARRETO, P. L. M. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 340-347, 2020.

ARAKHA, M.; BORAH, S.M.; SALEEM, M.; JHA, A.N.; JHA, S. Interfacial assembly at silver nanoparticle enhances the antibacterial efficacy of nisin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 101, p. 434-445, 2016.

ASHTAVINAYAK, P.; ELIZABETH, H. A. Gram Negative Bacteria in Brewing. **Advances in Microbiology**, v. 6, n. 03, p. 195, 2016.

BAHRAMI, A.; DELSHADI, R.; JAFARI, S. M.; WILLIAMS, L. Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 94, p. 20-31, 2019.

BAHRAMI, A.; DELSHADI, R.; JAFARI, S. M. Active delivery of antimicrobial nanoparticles into microbial cells through surface functionalization strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 217-228, 2020.

BERGSVEINSON, J.; BAECKER, N.; PITTET, V.; ZIOLA, B. Role of plasmids in *Lactobacillus brevis* BSO 464 hop tolerance and beer spoilage. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1234-1241, 2015.

BERTUZZI, T.; RASTELLI, S.; MULAZZI, A.; DONADINI, G.; PIETRI, A. Known and emerging mycotoxins in small-and large-scale brewed beer. **Beverages**, v. 4, n. 2, p. 46, 2018.

BHAT, K. U.; VIDYA, S. M. Nisin gold nanoparticles assemble as potent antimicrobial agent against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 37, p. 20-27, 2017.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W.; MILLS, D. A. A review of molecular methods for microbial community profiling of beer and wine. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 70, n. 3, p. 150-162, 2012.

BORONAT, A., SOLDEVILA-DOMENECH, N., RODRÍGUEZ-MORATÓ, J., MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; DE LA TORRE, T. Beer phenolic composition of simple phenols, prenylated flavonoids and alkylresorcinols. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2582, 2020.

CABRAS, I.; HIGGINS, D. M. Beer, brewing, and business history. **Business History**, v. 58, n. 5, p. 609-624, 2016.

CALLEJO, M. J.; GONZÁLEZ, C.; MORATA, A. Use of non-*Saccharomyces* yeasts in bottle fermentation of aged beers. **Brewing technology**, p. 101-119, 2017.

CALLEJO, M. J.; NAVAS, J. G.; ALBA, R.; ESCOTT, C.; LOIRA, I.; GONZÁLEZ, M. C.; MORATA, A. Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 6, p. 1229-1238, 2019.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; SIESTO G.; PIETRAFESA, R.; ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 22–30, 2018.

CHEN, W. Y.; CHANG, H. Y.; LU, J. K.; HUANG, Y. C.; HARROUN, S. G.; TSENG, Y. T.; LI, Y. J.; HUANG, C.C.; CHANG, H. T. Self-assembly of antimicrobial peptides on gold nanodots: against multidrug-resistant bacteria and wound-healing application. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 46, p. 7189-7199, 2015.

CHEN, H.; ZHOU, K.; ZHAO, G. Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 83-94, 2018.

CHUNG, I. M.; RAJAKUMAR, G.; GOMATHI, T.; PARK, S. K.; KIM, S. H.; THIRUVENGADAM, M. Nanotechnology for human food: advances and perspective. **Frontiers in Life Science**, v. 10, n. 1, p. 63-72, 2017.

CHUGUNOV, A.; PYRKOVA, D.; NOLDE, D.; POLYANSKY, A.; PENTKOVSKY, V.; EFREMOV, R. Lipid-II forms potential “landing terrain” for lantibiotics in simulated bacterial membrane. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1678, 2013.

CRUZ, M. L.; RESENDE, M. M. D.; RIBEIRO, E. J. Evaluation of process conditions in the performance of yeast on alcoholic fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 6, p. 846-855, 2018.

DE SOUZA, C. D.; NOGUEIRA, B. R.; ROSTELATO, M. E. CM. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714-740, 2019.

DOS SANTOS, C. A.; DOS SANTOS, G. R.; SOEIRO, V. S.; DOS SANTOS, J. R.; REBELO, M. D. A.; CHAUD, M. V.; GERENUTTI, M.; GROTTTO, D.; PANDIT, R.; RAI, M.; JOZALA, A, F. Bacterial nanocellulose membranes combined with nisin: a strategy to prevent microbial growth. **Cellulose**, v. 25, n. 11, p. 6681-6689, 2018.

DONG, X.; AWAK, M. A.; TOMLINSON, N.; TANG, Y.; SUN, Y. P.; YANG, L. Antibacterial effects of carbon dots in combination with other antimicrobial reagents. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185324, 2017.

DONG, X.; LIANG, W.; MEZIANI, M. J.; SUN, Y. P.; YANG, L. Carbon dots as potent antimicrobial agents. **Theranostics**, v. 10, n. 2, p. 671, 2020.

DU, Y. K.; XU, J. Z., SHEN, M.; YANG, P.; JIANG, L. Alkanethiol-stabilized decahedron of gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 257, p. 535-537, 2005.

DUFF, D. G.; BAIKER, A.; EDWARDS, P. P. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. **Langmuir**, v. 9, n. 9, p. 2301-2309, 1993.

DYSVIK, A.; LA ROSA, S. L.; DE ROUCK, G.; RUKKE, E. O.; WESTERENG, B.; WICKLUND, T. Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 14, 2020.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537-556, 2018.

ESMAEILI, S.; MOGHARRABI, M.; SAFI, F.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; BAGHERIPOOR-FALLAH, N. THE COMMON SPOILAGE MICROORGANISMS OF BEER: OCCURRENCE, DEFECTS, AND DETERMINATION-A REVIEW. **Carpathian Journal of Food Science & Technology**, v. 7, n. 4, 2015.

FRATODDI, I.; VENDITTI, I.; CAMETTI, C.; RUSSO, M.V. How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. **Nano Research**, v. 8, n. 6, p. 1771-1799, 2015.

GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; MILANOVIĆ, V.; TACCARI, M.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. 2845–2852, 2015.

GERHARDS, S.; TALAVERANO, M. I.; ANDRÉS, A. I.; SÁNCHEZ-VICENTE, C.; LOZANO, JESÚS.; GARCÍA-LATORRE, C.; PETRÓN, M. J.; RODRIGO, S. Different dry hopping and fermentation methods: influence on beer nutritional quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; DEGRAEVE, P.G. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262-1274, 2016.

GUO, Y.; WANG, Z.; SHAO, H.; JIANG, X. Hydrothermal synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from sodium citrate and their use for the detection of mercury ions. **Carbon**, v. 52, p. 583-589, 2013.

GUTIÉRREZ, A.; BOEKHOUT, T.; GOJKOVIC, Z.; KATZ, M. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 389-402, 2018.

HASSAN, M.; KJOS, M.; NES, I. F.; DIEP, D. B.; LOTFIPOUR, F. Antimicrobial peptides from prokaryotes. **Edited by David A. Phoenix, Frederick Harris, and Sarah R. Dennison**, 2015.

HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ-NEVADO, F.; RUIZ-MOYANO, S.; SERRADILLA, M.J.; VILLALOBOS, M. C.; MARTÍN, A.; CÓRDOBA, M.G. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages?. **International journal of food microbiology**, v. 286, p. 98-110, 2018.

HUMIA, B.V.; SANTOS, K. S.; BARBOSA, A.M.; SAWATA, M.; MENDONÇA, M. D. C.; PADILHA, F. F. Beer molecules and its sensory and biological properties: a review. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1568, 2019.

IBARRA-SÁNCHEZ, L.A.; EL-HADDAD, N.; MAHMOUD, D.; MILLER, M. J.; KARAM, L. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 3, p. 2041-2052, 2020.

JARDIM, C. D. C.; SOUZA, D. D.; MACHADO, I. C. K.; PINTO, L. M. N.; RAMOS, R. C. D. S.; GARAVAGLIA, J. Sensory profile, consumer preference and chemical composition of craft beers from Brazil. **Beverages**, v. 4, n. 4, p. 106, 2018.

JAYANT, D.; HALAMI, P, M. Industrial perspective of food preservatives from microbial origin. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2020. p. 243-261.

JIA, Y. P.; MA, B. Y.; WEI, X. W.; QIAN, Z. Y. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 4, p. 691-702, 2017.

KARABÍN, M.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P. Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 3, p. 691-706, 2017.

KAPHLE, A.; NAVYA, P.N.; UMPATHI, A.; DAIMA, H.K. Nanomaterials for agriculture, food and environment: applications, toxicity and regulation. **Environmental chemistry letters**, v. 16, n. 1, p. 43-58, 2018.

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

KHUSAINOV, R; KUIPERS, O. P. The presence of modifiable residues in the core peptide part of precursor nisin is not crucial for precursor nisin interactions with NisB-and NisC. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74890, 2013.

KRAMER, B.; THIELMANN, J.; HICKISH, A.; MURANVI, P.; WUNDERLICH, J.; HAUSER, C. Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 3, p. 648-657, 2015

KUMAR, R.; KORIDECK, H.; NGWA, W.; BERBECO, R. I.; MAKRIGIORGOS, G. M.; SRIDHAR, S. Third generation gold nanoplatfrom optimized for radiation therapy. **Translational cancer research**, v. 2, n. 4, 2013.

KYRYCHENKO, A.; KARPUSHINA, G. V.; BOGATYRENKO, S. I.; KRYSHAL, A. P.; DOROSHENKO, A. O. Preparation, structure, and a coarse-grained molecular dynamics model for dodecanethiol-stabilized gold nanoparticles. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 977, n. 1-3, p. 34-39, 2011.

LARROQUE, M. N.; CARRAU, F.; FARIÑA, L.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; MEDINA, K. Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 108953, 2021.

LI, Y. J.; HARROUN, S. G.; SU, Y. C.; HUANG, C. F.; UNNIKRISHNAN, B.; LIN, H. J.; LIN, C.H.; HUANG, C.C. Synthesis of self-assembled spermidine-carbon quantum dots effective against multidrug-resistant bacteria. **Advanced healthcare materials**, v. 5, n. 19, p. 2545-2554, 2016.

LI, Q.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against Gram-negative pathogens. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 12, 2018.

LIU, J.; LI, L.; LI, B.; PETERS, B. M.; DENG, Y.; XU, Z.; SHIRTLIFF, M. E. First study on the formation and resuscitation of viable but nonculturable state and beer spoilage capability of *Lactobacillus lindneri*. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 219–224, 2017.

LOPEZ-CHAVES, C.; SOTO-ALVAREDO, J.; MONTES-BAYRON, M.; BETTMER, J.; LLOPIS, J.; SANCHEZ-GONZALEZ, C. Gold nanoparticles: distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2018.

LUARASI, L.; TROJA, R.; PINGULI, L. The relationship between yeast viability and concentration in the fermentation process of wort for beer production. **European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering Vol**, v. 3, n. 1, 2016.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da cerveja 2019, 2020. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2019#:~:text=A%20cerveja%20em%202017%20alcan%C3%A7ou,v%C3%A1lidos%20em%20todo%20o%20pa%C3%ADs>> . Acesso em: 10/03/2021.

MATHNER, Y.; HUTZLER, M.; MATOULKOVÁ, D.; JACOB, F.; MICHEL, M. Screening for the brewing ability of different non-Saccharomyces yeasts. **Fermentation**, v. 5, n. 4, p. 101, 2019.

MENON, S.; RAJESHKUMAR, S.; KUMAR, V. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 516-527, 2017.

MONERAWELA, C.; BOND, U. Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 4, p. 512-519, 2017.

MODUGNO, C.; LOUPIAC, C.; BERNARD, A.; JOSSIER, A.; NEIERS, F.; PERRIER-CORNET, J. M.; SIMONIN, H. Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 9-15, 2018.

MÜLLER-AUFFERMANN, K.; GRIIALVA, F.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Nisin and its usage in breweries: a review and discussion. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 3, p. 309-319, 2015.

MUNFORD, A. R.; ALVARENGA, V. O.; PRADO-SILVA, L.; CRUCELLO, A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; CHAVES, R. D.; OTEIZA, J. M.; SANT'ANA, A. S. Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. **Food control**, v. 81, p. 126-136, 2017.

OBI, C. N. Brewery contaminants, challenges and remedies-a review. **Nigerian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 3926-3940, 2017

ÖZEL, B.; SIMSEK, Ö.; AKÇELİK, M.; SARIS, P.E. Innovative approaches to nisin production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6299-6307, 2018.

PAIDARI, S.; IBRAHIM, S. A. Potential application of gold nanoparticles in food packaging: a mini review. **Gold Bulletin**, p. 1-6, 2021.

PANDIT, R.; RAI, M.; SANTOS, C. A. Enhanced antimicrobial activity of the food-protecting nisin peptide by bioconjugation with silver nanoparticles. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 3, p. 443-452, 2017.

PANDIT, R. Biocompatible polymers impregnated with nisin and nanoparticles for food preservation. **Biopolymer-Based Nano Films. Elsevier**, p. 85-98. 2021.

PAYNE, J. N.; WAGHWANI, H. K.; CONNOR, M. G.; HAMILTON, W.; TOCKSTEIN, S.; MOOLANI, H. CHAVDA, F.; BADWAIK, V.; LAWRENZ, M. B.; DAKSHINAMURTHY, R. Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 607, 2016.

PETRUZZI, L.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. **Food Reviews International**, v. 32, n. 4, p. 341-363, 2016.

PIACENTINI, K.C.; ROCHA, L.O.; FONTES, L.C.; CARNIELLI, L.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food chemistry**, v. 218, p. 64-69, 2017.

PIACENTINI, K.C.; ROCHA, L.O.; SAVI, G. D.; CARNIELLI-QUEIROZ, L.; CORRÊA, B. Beer industry in Brazil: Economic aspects, characteristics of the raw material and concerns. **KVASNÝ PRŮMYSL**, v. 64, n. 6, p. 284-286, 2018.

PIELECH-PRZYBYLSKA, K.; BALCEREK, M.; NOWAK, A.; WOJTCZAK, M.; CZYZOWSKA, A.; DZIEKONSKA-KUBCZAK, U.; PATELSKI, P. The effect of different starch liberation and saccharification methods on the microbial contaminations of distillery mashes, fermentation efficiency, and spirits quality. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1647, 2017.

PISOSCHI, A. M., POP, A., GEORGESCU, C.; TURCUS, V.; OLAH, N. K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922-935, 2018.

PRINCE, A.; SANDHU, P.; ROR, P.; DASH, E.; SHARMA, S.; ARAKHA, M.; JHA, S.; AKHTER, Y.; SALEEM, M. Lipid-II independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

PUNYAUPPA-PATH, S.; PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. **International Journal of Current Research and Review**, v. 7, n. 2, p. 47, 2015.

QI, X.; POERNOMO, G.; WANG, K.; CHEN, Y.; CHAN-PARK, M.B.; XU, R.; CHANG, M.W. Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: superior antimicrobial and anti-biofilm properties. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1874-1880, 2011.

RABE, D. I. A.; AL AWAK, M. M.; YANG, F.; OKONJO, P. A.; DONG, X.; TEISL, L. R.; WANG, P.; TANG, T.; PAN, N.; SUN, Y-P.; YANG, L. The dominant role of surface functionalization in carbon dots' photo-activated antibacterial activity. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 2655, 2019.

RATTANATA, N.; KLAYNONGSRUANG, S.; LEELAYUWAT; C.; LIMPIBOON, T.; LULITANOND, A.; BOONSIRI, P.; CHIO-SRICHAN, S.; SOONTARANON, A.; RUGMAI, S.; DADUANG, J. Gallic acid conjugated with gold nanoparticles: antibacterial activity and mechanism of action on foodborne pathogens. *International journal of nanomedicine*, v. 11, p. 3347, 2016.

RODOLFI, M.; SILVANINI, A.; CHIANCONE, B.; MARIESCHI, M.; FABBRI, A.; BRUNI, R.; GANINO, T. Identification and genetic structure of wild Italian *Humulus lupulus* L. and comparison with European and American hop cultivars using nuclear microsatellite markers. **Genetic resources and crop evolution**, v. 65, n. 5, p. 1405-1422, 2018.

ROOS, J. D.; VUYST, L. D. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current opinion in biotechnology**, v. 49, p. 115-119, 2018.

SAERENS, S. MG.; DUONG, C. T.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1195-1212, 2010.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International journal of food microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 105-124, 2003.

SALANTA, L. C.; COLDEA, T. E.; IGNAT, M. V.; POP, C. R.; TOFANA, M.; MUDURA, E.; BORSA, A.; PASQUALONE, A.; ANJOS, O.; ZHAO, H. Functionality of special beer processes and potential health benefits. **Processes**, v. 8, n. 12, p. 1613, 2020.

SANTOS, J.C.; SOUSA, R.C.; OTONI, C.G.; MORAES, A.R.; SOUZA, V.G.; MEDEIROS, E.A.A.; ESPITIA, P. J. P.; PIRES, A. C. S.; COIMBRA, J.S. R.; SOARES, N. F. F. Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 179-194, 2018.

SCHNEIDERBANGER, J.; GRAMMER, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 2, p. 173-181, 2018.

SCHAEUBLIN, N.M.; BRAYDICH-STOLLE, L.K.; SCHRAND, A.M.; MILLER, J.M.; HUTCHISON, J.; SCHLAGER, J.J; HUSSAIN, S.M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 410-420, 2011.

SHAH, M.R.; ALI, S.; ATEEG, M.; PERVEEN, S.; AHMED, S.; BERTINO, M.F.; ALI, M. Morphological analysis of the antimicrobial action of silver and gold nanoparticles stabilized with ceftriaxone on *Escherichia coli* using atomic force microscopy. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 11, p. 5633-5640, 2014.

SHI, X.; WEI, W.; FU, Z.; GAO, W.; ZHANG, C.; ZHAO, Q.; FANGMING, D.; LU, XIANGYANG, L. Review on carbon dots in food safety applications. **Talanta**, v. 194, p. 809-821, 2019.

SHIMOTSU, S.; ASANO, S.; IJIMA, K.; SUZUKI, K.; YAMAGISHI, H.; AIZAWA, M. Investigation of beer-spoilage ability of Dekkera/Brettanomyces yeasts and development of multiplex PCR method for beer-spoilage yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 177-180, 2015.

SIQUEIRA, Tatiane. Identificação e controle de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira por peptídeos antimicrobianos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 20. 2019.

SK, M. P.; JAISWAL, A.; PAUL, A.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY, A. Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. **Scientific reports**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2012.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Advanced analytical methods for the analysis of chemical and microbiological properties of beer. **Journal of food and drug analysis**, v. 19, n. 2, p. 202-222, 2011.

SPEDDING, G.; AIKEN, T. Sensory analysis as a tool for beer quality assessment with an emphasis on its use for microbial control in the brewery. In: **Brewing Microbiology**. Woodhead Publishing, 2015. p. 375-404.

STEWART, G. G. Saccharomyces species in the Production of Beer. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 34, 2016.

STEENACKERS, B.; DE COOMAN, L.; DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742-756, 2015.

SUN, Y.; WANG, D.; XU, L.; ZHAO, T.; WANG, C.; SUN, H.; LIN, Q. Fluorescent small Au nanodots prepared from large Ag nanoparticles for targeting and imaging cancer cells. **RSC Advances**, v. 5, n. 64, p. 52088-52094, 2015.

SUZUKI, K. Emergence of New Spoilage Microorganisms in the Brewing Industry and Development of Microbiological Quality Control Methods to Cope with This Phenomenon: A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 4, p. 245-259, 2020.

TAO, C. Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research progress, challenges and prospects. **Letters in applied microbiology**, v. 67, n. 6, p. 537-543, 2018.

THIRUMURUGAN, A.; RAMACHANDRAN, S.; SHIAMALA GOWRI, A. Combined effect of bacteriocin with gold nanoparticles against food spoiling bacteria-an approach for food packaging material preparation. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, 2013.

THIRUVENGADAM, M.; RAJAKUMAR, G.; CHUNG, M. Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

VARGHESE, S.; KURIAKOSE, S.; JOSE, S. Antimicrobial activity of carbon nanoparticles isolated from natural sources against pathogenic Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Nanoscience**, v. 2013, 2013.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; VAN SINDEREN, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer—a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 4, p. 355-371, 2005.

VUKOMANOVIC, M.; ŽUNIC, V.; KUNEJ, Š.; JANCAR, B.; JEVERICA, S.; SUVOROV, D. Nano-engineering the antimicrobial spectrum of lantibiotics: activity of nisin against gram negative bacteria. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

XIAO, L.; SUN, H. Novel properties and applications of carbon nanodots. **Nanoscale Horizons**, v. 3, n. 6, p. 565-597, 2018.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

WALKER, G. M.; WALKER, R. SK. Enhancing yeast alcoholic fermentations. **Advances in applied microbiology**. Academic Press, p. 87-129, 2018.

WANG, J.; DING, H.; ZHENG, F.; LI, Y.; LIU, C.; NIU, C.; LI, Q. Physiological changes of beer brewer's yeast during serial beer fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 1, p. 10-20, 2019.

WRAY, E. Common faults in beer. In: **The Craft Brewing Handbook**. Woodhead Publishing, p. 217-246, 2020.

WU, Y.; LI, C.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J.; REN, Y. Carbon Quantum Dots Derived from Different Carbon Sources for Antibacterial Applications. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 623, 2021.

YANG, C.; AN, G.; ZHAO, X. Synthesis of thiol-stabilized monodispersed gold nanoclusters with narrow near-infrared fluorescence emission. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 24, n. 9, p. 3490-3495, 2013.

ZHANG, Y.; SHAREENA, DASARI, T.P.; DENG, H.; YU, H. Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 33, n. 3, p. 286-327, 2015.

ZHENG, Y.; ZHANG, R.; YIN, H.; BAI, X.; CHANG, Y.; XIA, M.; WANG, M. *Acetobacter pasteurianus* metabolic change induced by initial acetic acid to adapt to acetic acid fermentation conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 7007–7016, 2017.

9. APÊNDICE

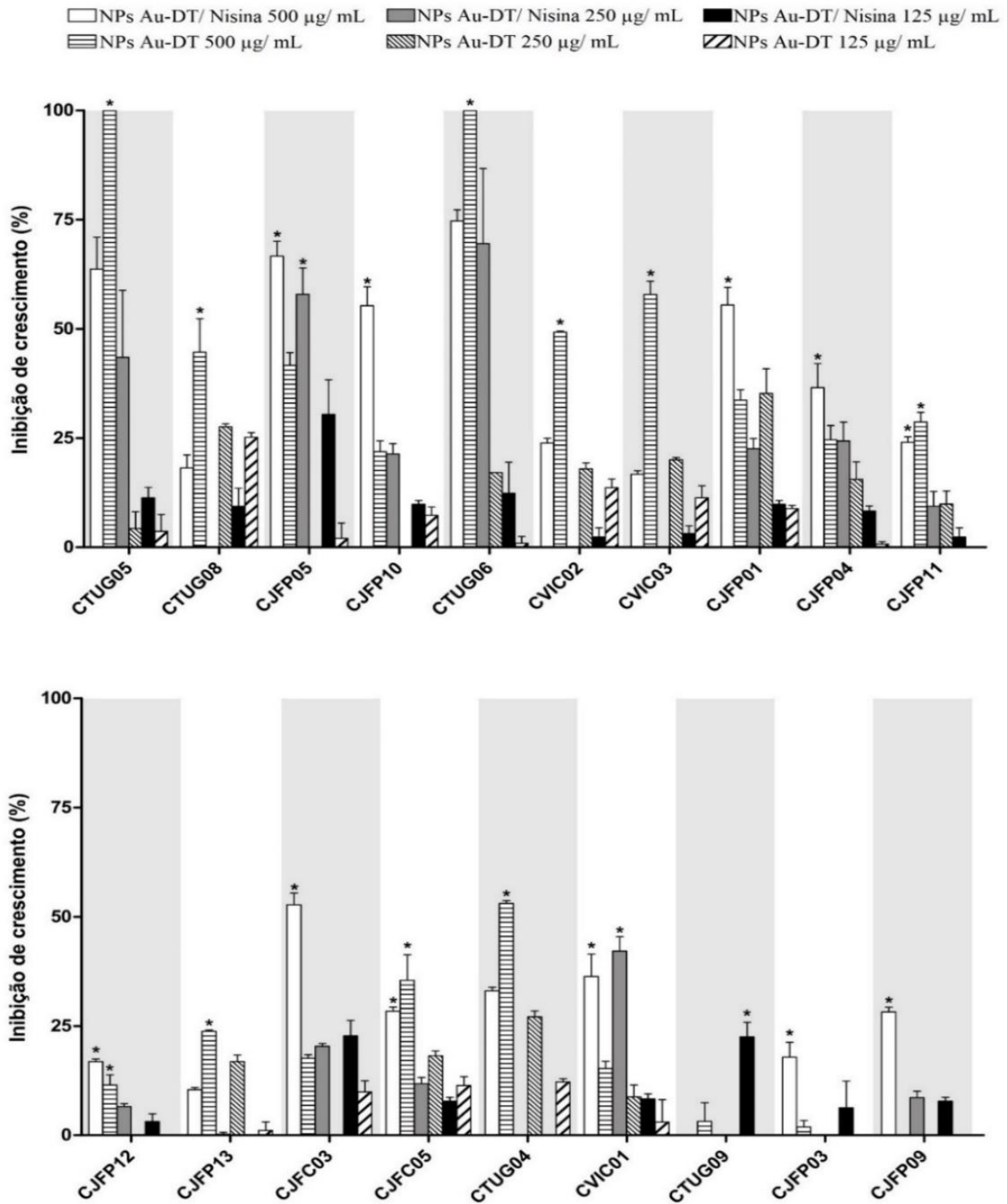


Figura 20: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo o protocolo 1 contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com índices elevados de contaminação bacteriana. A identificação dos isolados bacterianos é apresentada na Tabela 1, item 4.2. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos às NPs Au-Dt/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas.

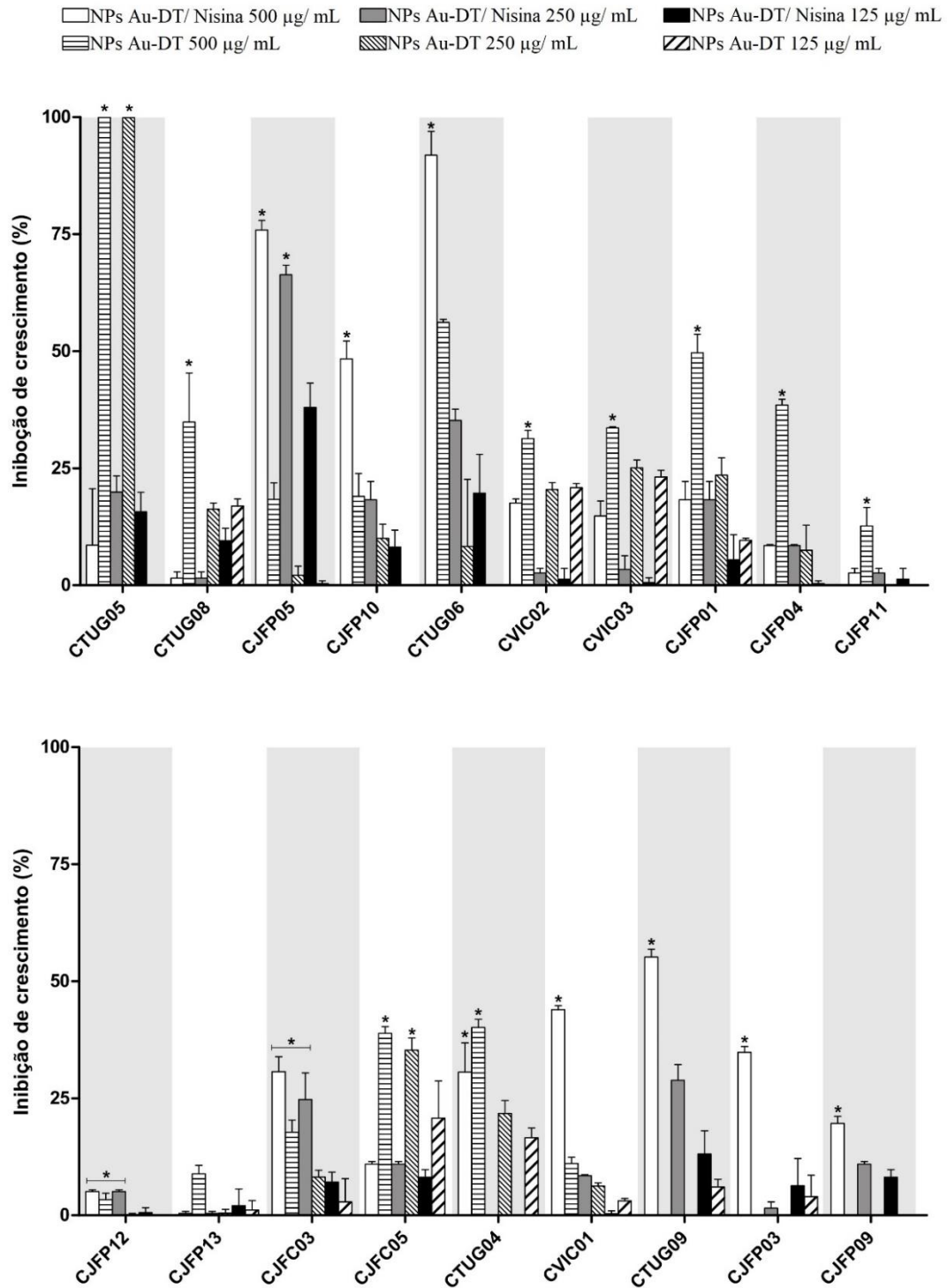


Figura 21: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo o protocolo 2 contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com índices elevados de contaminação bacteriana. A identificação dos isolados bacterianos é apresentada na Tabela 1, item 4.2. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos às NPs Au-Dt/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas.

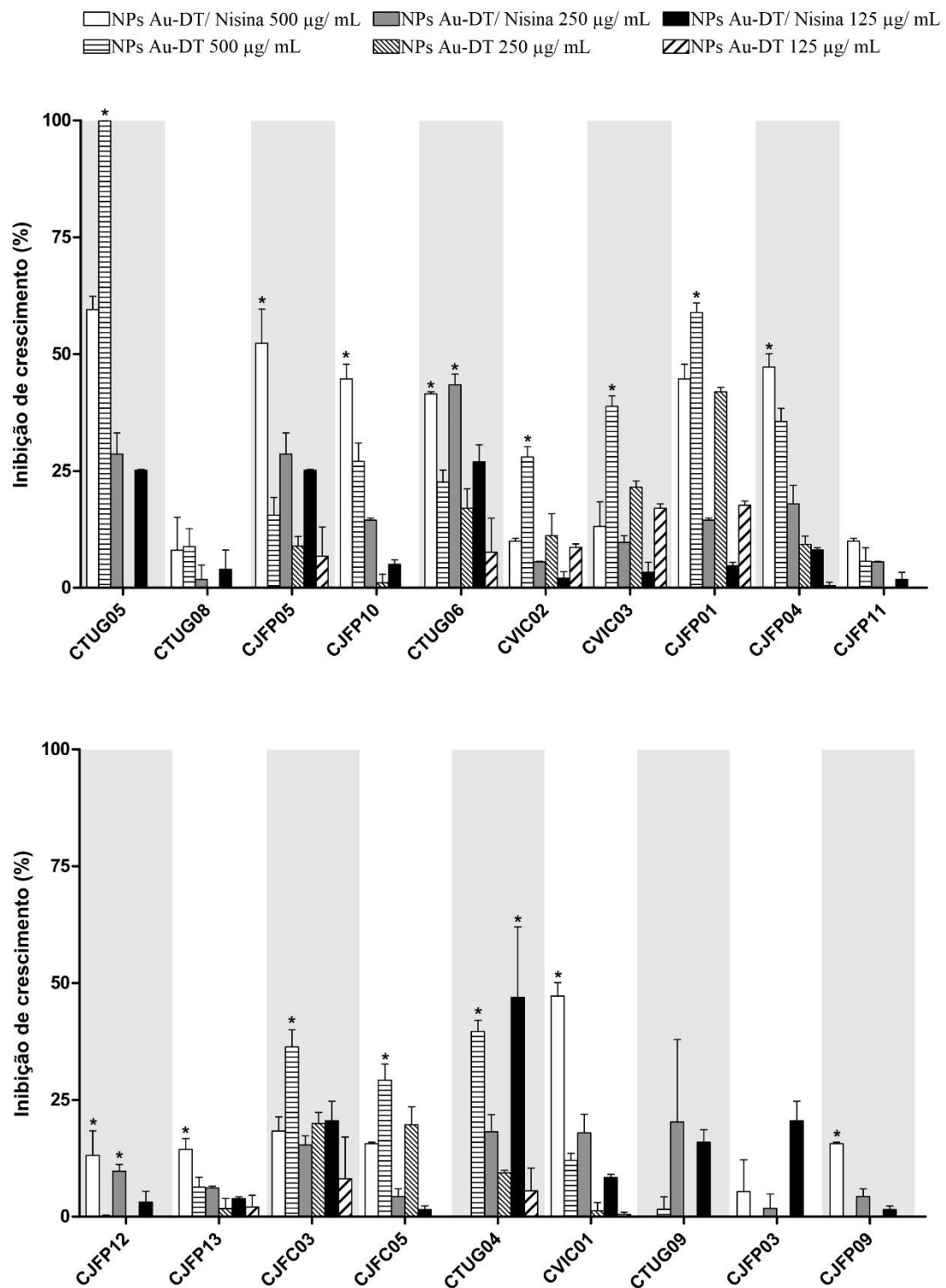


Figura 22: Atividade antimicrobiana das nanopartículas obtidas segundo o protocolo 3 contra isolados bacterianos obtidos de amostras de cerveja com índices elevados de contaminação bacteriana. A identificação dos isolados bacterianos é apresentada na Tabela 1, item 4.2. O controle é referente às NPs Au-DT e os tratamentos às NPs Au-DT/ Nisina, nas diferentes concentrações testadas.