



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LETÍCIA FRANCO GERVASONI

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE
SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DE *Pediococcus acidilactici* CE51 E
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO EM BIOFILMES DE *Listeria monocytogenes***

Presidente Prudente - SP
2025



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LETÍCIA FRANCO GERVASONI

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE
SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DE *Pediococcus acidilactici* CE51 E
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO EM BIOFILMES DE *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. – Área de concentração: Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lizziane Kretli Winkelströter Eller

Presidente Prudente - SP
2025

660.6
G386b

Gervasoni, Letícia Franco

Biossíntese de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de sobrenadante livre de células de *Pediococcus acidilactici* CE51 e avaliação do seu efeito em biofilmes de *Listeria monocytogenes* \ Letícia Franco Gervasoni – Presidente Prudente, 2025.

50 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2025.

Bibliografia.

Orientadora: Lizziane Kretli Winkelströter Eller

1. Bacteriocinas. 2. Biofilmes. 3. *Listeria
monocytogenes*. 4. Cromatografia com Fluido
Supercrítico. I. Título.

Catálogo na fonte: Bibliotecária Michele Mogni - CRB 8-6204

LETÍCIA FRANCO GERVASONI

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE
SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DE *Pediococcus acidilactici* CE51 E
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO EM BIOFILMES DE *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentado a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de concentração: Ciência Animal.

Presidente Prudente, 30 de janeiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Valeria Pereira Cataneli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Dra. Erika Kushikawa Saeki
Instituto Adolfo Lutz
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor e apoio incondicional. Ao meu companheiro, por ser minha força e inspiração nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar com fé e coragem em cada passo desta jornada. Nos momentos de incerteza, foi na oração que encontrei paz e força para continuar.

À minha família, que é meu alicerce inabalável. Aos meus pais, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado com apoio e incentivo. Aos meus irmãos, por trazerem leveza aos dias difíceis e que são essenciais na minha vida.

Ao meu companheiro, que esteve ao meu lado em cada desafio, celebrando cada pequena vitória como se fosse sua. Sua paciência, carinho e compreensão foram a força que me impulsionou. Obrigada por ser sempre presente e envolvido.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pela amizade, pelos momentos compartilhados e pelo suporte, tanto nas horas difíceis quanto nas de celebração. Agradeço por me lembrarem da importância da amizade mesmo em meio à correria.

À minha orientadora, Lizziane, que é minha maior inspiração. Agradeço por sua sabedoria e dedicação. Sua orientação não apenas moldou este trabalho, mas também me ensinou a importância da persistência e do rigor científico. Agradeço por cada conselho e por acreditar em mim.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Unoeste, pelo ótimo trabalho realizado no dia a dia.

Agradeço a Unoeste, por proporcionar um ambiente de aprendizado e crescimento.

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

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Biossíntese de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de sobrenadante livre de células de *Pediococcus acidilactici* CE51 e avaliação do seu efeito em biofilmes de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, uma doença grave com alta mortalidade, especialmente em imunocomprometidos. Sua capacidade de formar biofilmes em ambientes industriais alimentícios dificulta a eliminação com sanitizantes e aumenta o risco de contaminação de alimentos prontos para consumo. Estratégias alternativas, como o uso de nanopartículas de prata (AgNPs) associadas a bacteriocinas, têm mostrado potencial para combater biofilmes bacterianos. O objetivo deste estudo foi sintetizar nanopartículas de prata utilizando sobrenadante livre de células (CFS) de *Pediococcus acidilactici* CE51 e avaliar sua eficácia sobre biofilmes de *L. monocytogenes*. Foi realizada a produção de CFS de *Pediococcus acidilactici* CE51, utilizado para a biossíntese de nanopartículas de prata (Bac-AgNPs). As Bac-AgNPs obtidas foram caracterizadas por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), Índice de Polidispersão (PDI), Potencial Zeta, espectrofotometria UV-Vis e sua atividade antimicrobiana foi avaliada por testes de diluição seriada em placas de microtitulação para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A toxicidade aguda foi testada em larvas de *G. mellonella*, e a estabilidade das Bac-AgNPs foi analisada sob diferentes condições de pH, temperatura e proporções de CFS. O efeito de Bac-AgNPs sobre a formação e dispersão de biofilmes de *L. monocytogenes* foi também investigado. Análises estatísticas foram realizadas e diferença estatística foram estabelecidas quando $p < 0,05$. As Bac-AgNPs sintetizadas (164 mg/mL) apresentaram tamanho de 131,8 nm, PDI de 0,28, Potencial Zeta de -19,7 Mv e pico máximo de absorbância em 420nm. Em testes de toxicidade, Bac-AgNPs e CFS não afetaram a sobrevivência de *Galleria mellonella*. Para a *L. monocytogenes*, a CIM foi de 82 mg/mL e a CBM foi de 164 mg/mL, com redução de 3,06 log UFC/mL em 82 mg/mL. Não houve efeito antimicrobiano para outras cepas testadas. Em ensaios de estabilidade, as Bac-AgNPs mantiveram a atividade antimicrobiana a pH 2 e 7, mas não a pH 9. As Bac-AgNPs na proporção 1:10 com CFS apresentaram melhores resultados antimicrobianos. Após 7 dias de

armazenamento, o efeito antimicrobiano diminuiu, especialmente para Bac-AgNPs armazenadas a 4°C. No tratamento de biofilmes, Bac-AgNPs sozinhas não foram eficazes nas primeiras horas, mas associadas ao CFS causaram redução significativa nas contagens bacterianas após 6 horas, com até 2,5 log UFC/mL de redução após 24 horas. As Bac-AgNPs sintetizadas a partir de CFS de *P. acidulactici* CE51 mostraram grande potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes* e seus biofilmes, com boa biocompatibilidade e eficácia sinérgica com CFS, embora exijam ajustes para otimização da estabilidade a longo prazo.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; AgNPs; biofilmes; bacteriocinas; CFS

ABSTRACT

Biosynthesis of silver nanoparticles synthesized from cell-free supernatant of *Pediococcus acidilactici* CE51 and evaluation of their effect on *Listeria monocytogenes* biofilms

Listeria monocytogenes is the etiological agent of listeriosis, a severe disease with high mortality, especially in immunocompromised individuals. Its ability to form biofilms in food industrial environments makes it challenging to eliminate with sanitizers and increases the risk of contamination in ready-to-eat foods. Alternative strategies, such as the use of silver nanoparticles (AgNPs) associated with bacteriocins, have shown potential in combating bacterial biofilms. The aim of this study was to synthesize silver nanoparticles using the cell-free supernatant (CFS) of *Pediococcus acidilactici* CE51 and evaluate their effectiveness against *L. monocytogenes* biofilms. The CFS from *Pediococcus acidilactici* CE51 was produced and used for the biosynthesis of silver nanoparticles (Bac-AgNPs). The Bac-AgNPs obtained were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Polydispersity Index (PDI), Zeta Potential, UV-Vis spectrophotometry, and their antimicrobial activity was assessed through serial dilution in microtiter plates to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Acute toxicity was tested on *Galleria mellonella* larvae, and the stability of Bac-AgNPs was analyzed under different pH, temperature, and CFS ratio conditions. The effect of Bac-AgNPs on the formation and dispersion of *L. monocytogenes* biofilms was also investigated. Statistical analyses were performed, and significant differences were established at $p < 0.05$. The synthesized Bac-AgNPs (164 mg/mL) presented a size of 131.8 nm, PDI of 0.28, Zeta Potential of -19.7 mV, and a maximum absorbance peak at 420 nm. In toxicity tests, Bac-AgNPs and CFS did not affect the survival of *Galleria mellonella*. For *L. monocytogenes*, the MIC was 82 mg/mL, and the MBC was 164 mg/mL, with a reduction of 3.06 log CFU/mL at 82 mg/mL. No antimicrobial effect was observed for other tested strains. In stability assays, Bac-AgNPs maintained antimicrobial activity at pH 2 and 7 but not at pH 9. Bac-AgNPs in a 1:10 ratio with CFS showed better antimicrobial results. After 7 days of storage, antimicrobial efficacy decreased, particularly for Bac-AgNPs stored at 4°C. In biofilm treatment, Bac-AgNPs alone were ineffective during the initial hours;

however, when combined with CFS, they caused a significant reduction in bacterial counts after 6 hours, with up to a 2.5 log CFU/mL reduction after 24 hours. Bac-AgNPs synthesized from the CFS of *P. acidilactici* CE51 demonstrated strong antimicrobial potential against *L. monocytogenes* and its biofilms, with good biocompatibility and synergistic efficacy with CFS, though adjustments are required to optimize long-term stability.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; AgNPs; biofilms; bacteriocins; CFS.

LISTA DE SIGLAS

AgNO ₃	– Nitrato de Prata
AgNPs	– Nanopartículas de Prata
Bac-AgNPs	– Nanopartículas de prata sintetizadas a partir de sobrenadante livre de células de <i>Pediococcus acidilactici</i> CE51
BAL	– Bactérias Ácido Lácticas
BHI	– <i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	– Concentração Bactericida Mínima
CFS	– <i>Cell-Free Supernatant</i>
CIM	– Concentração Mínima Inibitória
DLS	– <i>Dynamic Light Scattering</i>
EPS	– <i>Extracellular Polymeric Substances</i>
EUA	– Estados Unidos da América
PDI	– <i>Polydispersity Index</i>
QS	– <i>Quorum sensing</i>
SPR	– Ressonância de Plasmon de Superfície

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
	ANEXO.....	37

1 ARTIGO CIENTÍFICO

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS A PARTIR DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DE *Pediococcus acidilactici* CE51 E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO EM BIOFILMES DE *Listeria monocytogenes*

Letícia Franco Gervasoni^a, Lizziane Kretli Winkelströter Eller^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista/Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.

*Autor correspondente:

Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade do Oeste Paulista (Unoeste)

Rua José Bongiovani,700 – Cidade Universitária, Presidente Prudente-SP, Brasil

CEP:19050-920

Email: lizziane@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Microbial Pathogenesis, Fator de impacto: 3.3, Qualis A3.

RESUMO

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS A PARTIR DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DE *Pediococcus acidilactici* CE51 E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO EM BIOFILMES DE *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, uma doença grave com alta mortalidade, especialmente em imunocomprometidos. Sua capacidade de formar biofilmes em ambientes industriais alimentícios dificulta a eliminação com sanitizantes e aumenta o risco de contaminação de alimentos prontos para consumo. Estratégias alternativas, como o uso de nanopartículas de prata (AgNPs) associadas a bacteriocinas, têm mostrado potencial para combater biofilmes bacterianos. O objetivo deste estudo foi sintetizar nanopartículas de prata utilizando sobrenadante livre de células (CFS) de *Pediococcus acidilactici* CE51 e avaliar sua eficácia sobre biofilmes de *L. monocytogenes*. Foi realizado a produção de CFS de *Pediococcus acidilactici* CE51, utilizado para a biossíntese de nanopartículas de prata (Bac-AgNPs). As Bac-AgNPs obtidas foram caracterizadas por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), Índice de Polidispersão (PDI), Potencial Zeta, espectrofotometria UV-Vis e sua atividade antimicrobiana foi avaliada por testes de diluição seriada em placas de microtitulação para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A toxicidade aguda foi testada em larvas de *G. mellonella*, e a estabilidade das Bac-AgNPs foi analisada sob diferentes condições de pH, temperatura e proporções de CFS. O efeito de Bac-AgNPs sobre a formação e dispersão de biofilmes de *L. monocytogenes* foi também investigado. Análises estatísticas foram realizadas e diferença estatística foram estabelecidas quando $p < 0,05$. As Bac-AgNPs sintetizadas (164 mg/mL) apresentaram tamanho de 131,8 nm, PDI de 0,28, Potencial Zeta de -19,7 Mv e pico máximo de absorvância em 420nm. Em testes de toxicidade, Bac-AgNPs e CFS não afetaram a sobrevivência de *Galleria mellonella*. Para a *L. monocytogenes*, a CIM foi de 82 mg/mL e a CBM foi de 164 mg/mL, com redução de 3,06 log UFC/mL em 82 mg/mL. Não houve efeito antimicrobiano para outras cepas testadas. Em ensaios de estabilidade, as Bac-AgNPs mantiveram a atividade antimicrobiana a pH 2 e 7, mas não a pH 9. As Bac-AgNPs na proporção 1:10 com CFS apresentaram melhores resultados antimicrobianos. Após 7 dias de armazenamento, o efeito antimicrobiano diminuiu, especialmente para Bac-AgNPs armazenadas a 4°C. No tratamento de biofilmes, Bac-AgNPs sozinhas não foram eficazes nas primeiras horas, mas associadas ao CFS causaram redução significativa nas contagens bacterianas após 6 horas, com até 2,5 log UFC/mL de redução após 24 horas. As Bac-AgNPs sintetizadas a partir de CFS de *P. acidilactici* CE51 mostraram grande potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes* e seus biofilmes, com boa biocompatibilidade e eficácia sinérgica com CFS, embora exijam ajustes para otimização da estabilidade a longo prazo.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, AgNPs, biofilmes, bacteriocinas, CFS

Highlights

- A síntese verde de nanopartículas de prata a partir de CFS de *P. acidilactici* CE51 produz nanopartículas de alta qualidade.
- A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas biossintetizadas foi de 82 mg/mL para *L. monocytogenes* com redução de 3,06 log UFC/mL.
- As nanopartículas biossintetizadas combinadas com o CFS demonstraram eficácia anti-biofilme contra *L. monocytogenes*, com redução de até 2,5 log UFC/mL.
- As nanopartículas biossintetizadas são seguras e eficazes.

1. Introdução

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastão, anaeróbia facultativa, geralmente móvel, encontrada colonizando solo, água e plantas. Também considerada patógeno oportunista transmitido principalmente por alimentos como carne crua, leite e salada pronta para consumo [1].

A Listeriose, causada por *L. monocytogenes*, é associada a alta morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos e/ou idosos. A Listeriose Humana é uma zoonose adquirida principalmente pelo consumo de alimentos contaminados pela bactéria em questão e que pode ser dividida em Listeriose Invasiva Grave e Gastroenterite Febril Não Invasiva [2].

O principal local onde ocorre a contaminação do alimento pela bactéria é nas plantas de processamento nas indústrias alimentícias. Apesar da contaminação ser decorrente principalmente de animais infectados, acredita-se que a *L. monocytogenes* possa estar aderida a pisos, ralos de pisos, prateleiras e esteiras, dentre outras superfícies [2]. Isso se deve principalmente pois *L. monocytogenes* é capaz de formar biofilmes em superfícies e equipamentos. Esse fato permite que a mesma seja resistente a agentes sanitizantes, tornando difícil a sua remoção e favorece a contaminação cruzada com o alimento podendo resultar em surtos de origem alimentar [1, 3].

A formação de biofilmes por microrganismos é considerada um fator de virulência importante e tem se tornado um sério problema de saúde global [4, 5]. Os biofilmes são comunidades microbianas organizadas que vivem dentro de uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*) produzidas por elas mesmas e ligada a uma superfície [6]. Os EPS são compostos principalmente por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, que contribui para a estrutura tridimensional formada [6, 7].

A matriz tem capacidade de proteger os microrganismos de condições extremas, como exposição à radiação ultravioleta (UV), temperaturas extremas, pH extremo, alta salinidade, alta pressão, nutrientes pobres, antibióticos, entre outros fatores [8], o que contribui para sua permanência em diversas superfícies, como no meio ambiente, indústrias alimentícias e hospitais [6].

A incidência de infecções associadas ao biofilme tem aumentado anualmente. Dados do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (EUA) sugerem que aproximadamente 80% das infecções microbianas crônicas e

recorrentes no corpo humano são devidas ao biofilme bacteriano. Infecções pulmonares crônicas, como fibrose cística e rinossinusite crônica, infecções crônicas de feridas e de ouvido, como otite média, são infecções bacterianas relacionadas ao biofilme [5, 9].

Na indústria de alimentos o biofilme também vem sendo uma preocupação, principalmente nas indústrias de fabricação de cerveja, processamento de frutos do mar, de laticínios, de aves e de carne, sendo responsável por mais de 20% dos casos de intoxicação alimentar nos EUA [9].

A ineficácia do tratamento dos biofilmes por antimicrobianos e sanitizantes convencionais reforça a necessidade da busca de alternativas para o controle e prevenção da sua formação [6]. As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são consideradas microrganismos Gram-positivos e catalase-negativos, não formadores de esporos e de morfologia cocos ou bastonetes [10]. Possuem enorme valor de aplicação na indústria alimentícia, pois prologam a vida útil do alimento, ao mesmo tempo em que promove o processo de fermentação, atribuindo as características sensoriais desejadas, intensificando por exemplo a textura, sabor e aroma [11].

A aplicação de BAL na preservação de alimentos se destaca pela sua capacidade de inibir microrganismos indesejados através da liberação de substâncias bioativas com ação antimicrobiana, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, peptídeos antimicrobianos e bacteriocinas, que podem ser encontradas no sobrenadante livre de células (CFS, do inglês *Cell-Free Supernatant*) [12, 13].

Entre essas substâncias, as bacteriocinas merecem destaque como pós-bióticos, isto é, metabólitos bioativos derivados de probióticos que apresentam elevada segurança, estabilidade e facilidade de produção, além de apresentar atividade antimicrobiana eficiente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [11, 12, 14]. A pediocina, por exemplo, é uma bacteriocina da classe IIa produzida por *Pediococcus acidilactici*, amplamente reconhecida pela sua eficácia contra *Listeria monocytogenes*, atuando através da formação de poros na membrana celular do patógeno [15].

Dessa forma, as bacteriocinas presentes em CFS mostram-se potenciais agentes antimicrobianos e conservantes eficazes, particularmente contra *L. monocytogenes*, como evidenciado por outros estudos [16, 17].

Atualmente, o avanço da tecnologia permite o desenvolvimento de novas opções no controle de *L. monocytogenes*. Nanomateriais tem mostrado grande aplicação em

diversas áreas de atuação [18]. As nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam por suas propriedades antimicrobianas contra uma variedade de bactérias, em função da ação dos íons de Ag⁺ liberadas pelas mesmas que agem na membrana celular de Gram-positivas e Gram-negativas, além de também gerar outros efeitos como estresse oxidativo e danos no DNA [19]. Além disso, possui atividade anti-biofilme ao se ligar na matriz exopolissacarídica, desorganizando essa estrutura e podendo atingir as células bacterianas [20].

Na literatura, são escassos os trabalhos que avaliam o papel das nanopartículas associadas a bacteriocina nos biofilmes de *L. monocytogenes*. O efeito benéfico do sobrenadante livre de células de culturas contendo bacteriocina de *P. acidilactici* CE51 associadas a nanotecnologia tem potencial de atuar como agente anti-biofilme de alta eficácia a ser explorado pela indústria farmacêutica e alimentícia. Neste contexto, este estudo teve como objetivo realizar a biossíntese de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de sobrenadante livre de células de *Pediococcus acidilactici* CE51 e avaliar o seu efeito em biofilmes de *Listeria monocytogenes*.

2. Material e métodos

2.1. Produção de sobrenadante livre de células

A obtenção de sobrenadante livre de células (CFS, do inglês *Cell-Free Supernatant*) foi realizada de acordo com o método descrito por Rocha et al. [16]; Sidhu; Nehra, [21]; Zhao et al. [22] com modificações. Uma cultura em meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) de *P. acidilactici* CE51 (isolada previamente de presunto) [17] foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min e o sobrenadante livre de células foi coletado. O sobrenadante foi neutralizado a pH 6,0 e, em seguida, filtrado em membrana de 0,45 µm.

2.2. Biossíntese Bac-AgNPs

Uma alíquota de 5 mL de sobrenadante livre de células foi adicionada à 45 mL de solução de nitrato de prata 2 mM (Pa Acs, Exodo Científica) recentemente preparada. A solução mista resultante foi incubada sob luz ultravioleta por 120 minutos em temperatura ambiente. Uma mudança na cor de amarelo claro para marrom avermelhado indicou a formação de AgNPs. A suspensão obtida foi então centrifugada a 15.000 rpm por 20 minutos para sedimentar as Bac-AgNP (nanopartículas de prata sintetizadas a partir de sobrenadante livre de células). O

pellet foi lavado com água destilada para remover o nitrato de prata não ligado e sobrenadante livre. O pellet final foi ressuspensão em 2 mL de água destilada [21, 22].

2.3. Caracterização de Bac-AgNPs

As Bac-AgNPs foram caracterizadas usando várias técnicas físico-químicas, como DLS, PDI e Potencial Zeta mensurados no aparelho Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) para observar tamanho e carga. Análise espectrofotométrica UV-Vis também foi realizada para confirmar formação de AgNPs.

2.4. Determinação de concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Patógenos comumente encontrados em alimentos e formadores de biofilme, como *Listeria monocytogenes* ATCC 19015, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 18h à 37 °C. Concentrações seriadas da Bac-AgNP foram utilizadas em uma diluição seriada em placa de microtitulação. O crescimento bacteriano das cepas mencionadas foi ajustado para uma densidade óptica de $0,1 \pm 0,001$ no comprimento de onda de 600 nm, utilizando um espectrofotômetro, o que correspondia a concentração final de aproximadamente 2×10^9 UFC/mL. Em seguida, 20 µL das cepas foram semeados nos poços, seguidos de incubação por 24 h a 37 °C. A presença e a ausência de crescimento bacteriano foram verificadas visualmente [23]. CBM é a concentração mais baixa do agente antibacteriano capaz de matar completamente as bactérias. O teste de CBM foi realizado semeando a suspensão de cada poço (100 µL) nas placas de ágar BHI. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi considerada como valor de CBM [21].

2.5. Avaliação da toxicidade aguda em larvas de *Galleria mellonella*

O ensaio utilizou larvas de *G. mellonella* com peso entre 100 a 200 mg, livre de melanização de acordo com as orientações de Marena et al. [23], Spadari et al. [24] com modificações. Cada grupo experimental foi composto por 10 larvas (n = 10). As larvas foram inoculadas com 10 µL/larva de cada tratamento (água como controle,

Bac-AgNPs, CFS e AgNO₃ 2mM) no último proleg esquerda com seringa de insulina com agulha 13 x 0,45mm. Ao final da administração, as larvas foram transferidas para uma placa de Petri à temperatura de 30°C, restrita de alimentação. A avaliação do potencial tóxico agudo dos tratamentos foi realizada em intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas (5 dias). Considerou-se que as larvas estavam mortas quando não apresentavam resposta após estímulo físico.

2.6. Avaliação da Estabilidade de Bac-AgNPs em Diferentes Valores de pH, Temperatura e Proporções de CFS

Foram avaliados o impacto do pH e da proporção de CFS na biossíntese de Bac-AgNPs. Em relação às proporções, o CFS (ajustado em pH 6) foi misturado separadamente com nitrato de prata em proporções variadas (1:1, 1:10 e 1:100). Para estudar o efeito do pH, o CFS foi ajustado para pH 3, 6, 7 e 9, usando 1 N NaOH ou 1 N HCl, e em seguida foi utilizado na síntese na proporção 1:10. As diferentes sínteses foram então incubadas à temperatura ambiente por 24 horas. Após a incubação, foram submetidas a medidas de DLS (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), Índice de Polidispersidade (PDI, do inglês *Polydispersity Index*), e Potencial Zeta. Além disso, foi avaliado o efeito antilisteriano das Bac-AgNPs por meio de plaqueamento em agar BHI e incubação 37°C por 24h.

Para avaliar o efeito da temperatura, as Bac-AgNPs (com CFS ajustado para pH 6 e na proporção 1:10) foram armazenadas a 4°C, 25°C e 37°C e avaliadas quanto a medidas DLS, PDI, Potencial Zeta e efeito antimicrobiano durante período de 0, 7, 14 e 21 dias [21, 25].

2.7. Efeito de Bac-AgNPs no combate de biofilmes

Para a análise do efeito de Bac-AgNPs nos biofilmes, foi utilizada a técnica desenvolvida por Silva et al. [26]. Para a avaliação do efeito sinérgico entre CFS com Bac-AgNPs, foram formados grupos com diferentes proporções, descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos grupos de Bac-AgNPs e CFS avaliados.

Grupos	Volume de CFS (μL)	Volume de Bac-AgNPs (μL)
100 % de Bac-AgNPs + 0 % de CFS	0	1000
75 % de Bac-AgNPs + 25 % de CFS	250	750
50 % de Bac-AgNPs + 50 % de CFS	500	500
25 % de Bac-AgNPs + 75 % de CFS	750	250
0 % de Bac-AgNPs + 100 % de CFS	1000	0

A cultura de *L. monocytogenes* ATCC 19015 foi ajustada para o valor de 0,1 em espectrofotometria a 600 nm. Uma alíquota de 1 mL foi adicionada a 20 mL de caldo BHI e emergidos placas de aço inoxidável AISI 304 (dimensões: 24x24 mm). As placas de aço inoxidável foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi descartado e placa lavada três vezes com 20 mL de solução salina 0,9 % (m/v) para remoção das células não aderidas. As soluções para tratamento foram adicionadas na superfície das lâminas de aço inoxidável contendo biofilme formado e avaliado nos diferentes tempos (1, 6, 12 e 24 horas) de incubação a 37 °C, sendo as Bac-AgNPs utilizadas na concentração mínima inibitória definida para *L. monocytogenes*.

As placas foram, então, lavadas com 5 mL de solução salina 0,9% (m/v) para remoção do tratamento. O biofilme aderido foi removido por meio de 100 fricções com um swab estéril e as células aderidas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,9 % (m/v). Foi realizada a diluição decimal seriada e em seguida, plaqueado na superfície de ágar BHI e incubado a 37 °C para contagem em placa.

2.8. Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os valores foram apresentados como a média \pm D.P. Foi utilizado o programa Graphpad Prism 6. As comparações múltiplas dos grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Newman-Keuls. As diferenças estatísticas foram estabelecidas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Foi sintetizada uma nanopartícula com concentração de 164 mg/mL. As características físico-químicas demonstraram DLS de $131,8 \pm 2,7$ nm, PDI de $0,28 \pm 0,02$, Potencial Zeta de $-19,7 \pm 0,6$ mV e pico característico em 420 nm por espectrofotometria UV-Vis (Figura 1).

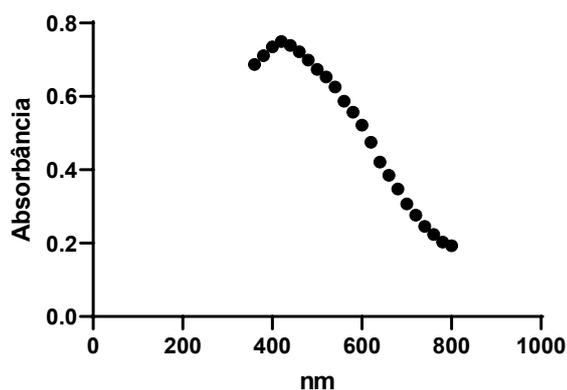


Figura 1. Espectro de absorção na região UV/Vis referente a Bac-AgNPs.

As substâncias envolvidas no processo de síntese das nanopartículas foram avaliadas frente ao ensaio de sobrevivência em *Galleria mellonella*. Foi observado que Bac-AgNPs e CFS não impactaram na sobrevivência de *Galleria mellonella*, entretanto, AgNO_3 reduziu 40% das larvas analisada a partir de 96h da inoculação ($p < 0,05$) (Figura 2).

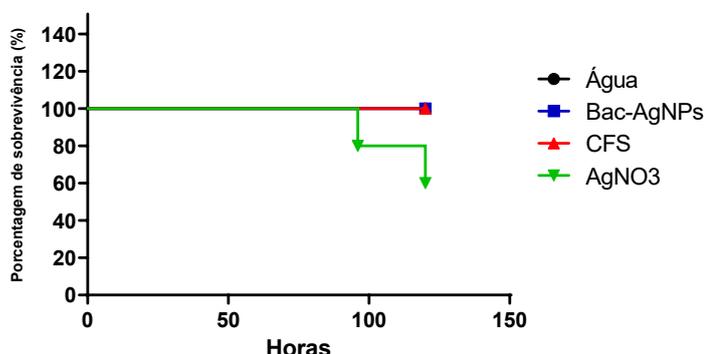


Figura 2. Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* quando inoculadas com água, Bac-AgNP, CFS e AgNO_3 e incubadas por até 120h por 37°C .

Não foram observados efeitos antimicrobianos para as cepas *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 29213, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *P. aeruginosa* ATCC 15442. No entanto, foi definido CIM e observado ausência de turvação até diluição 1/2 (82 mg/mL) para *L. monocytogenes*. Os valores do CBM demonstraram ausência de contagem em placa com a utilização de Bac-AgNP (164 mg/mL) e uma redução de 3,06 log UFC/mL quando utilizado Bac-AgNP (82 mg/mL), se comparado com o cultivo de *L. monocytogenes* em caldo BHI ($p < 0,05$).

O ensaio de estabilidade das Bac-AgNP avaliou o efeito antimicrobiano, DLS, PDI e potencial Zeta de acordo com alguns parâmetros como: pH, proporção de CFS e temperatura.

Foram avaliados os pH 2, pH 6, pH 7 e pH 9, sendo considerado pH 6 como valor de referência. Ao avaliar o efeito antimicrobiano, foi observado que este se manteve em pH 2 a pH 7, com a ausência de microrganismos, entretanto, em pH 9 foi notado um aumento de cerca de 3 log UFC/mL para *L. monocytogenes*. Em relação a análise de DLS foi notado o menor valor para pH 6 se comparado com os outros avaliados ($p < 0,05$). Nanopartículas desenvolvidas em pH 6 foram diferentes em relação ao PDI apenas para aquelas em pH 2. O potencial zeta para o pH6 foi menor se comparado as outras condições ($P < 0,05$) (Figura 3).

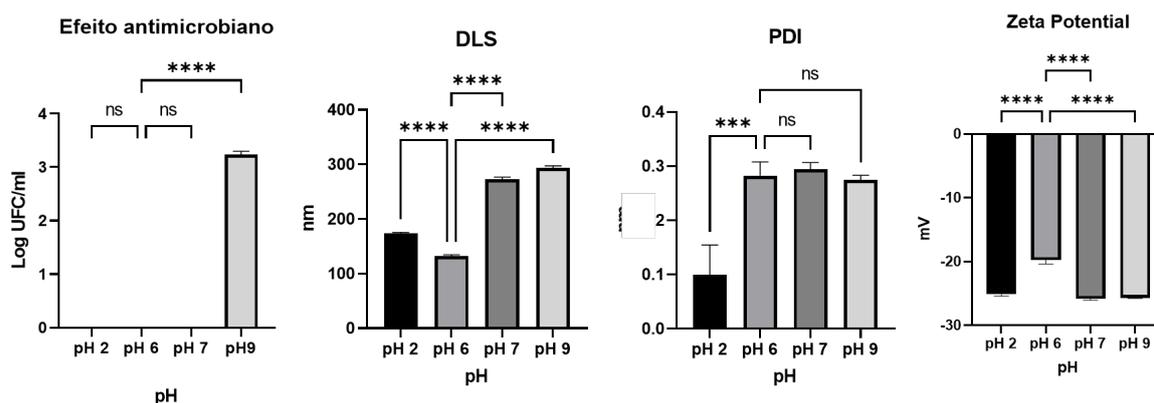


Figura 3. Resultados para efeito antimicrobiano, DLS, PDI e potencial Zeta de Bac-AgNP sintetizadas em diferentes pHs (pH2, pH6, pH7 e pH9) (* $p < 0,05$ se comparado com o pH6).

A análise das diferentes proporções de CFS (1:1, 1:10 e 1:100) foram avaliados em relação ao impacto no efeito antimicrobiano das nanopartículas, DLS,

PDI e Potencial Zeta. Bac-AgNPs 1:10 foi considerada padrão de comparação e foi observada que ela inibiu completamente o crescimento microbiano de *L. monocytogenes* ($p < 0,05$). Os parâmetros DLS e Potencial Zeta demonstraram um valor proporcional ao aumento de CFS, uma vez que Bac-AgNPs 1:10 apresentou valores intermediários ($p < 0,05$). Em relação ao PDI, Bac-AgNPs 1:10 apresentou menor valor avaliado (Figura 4).

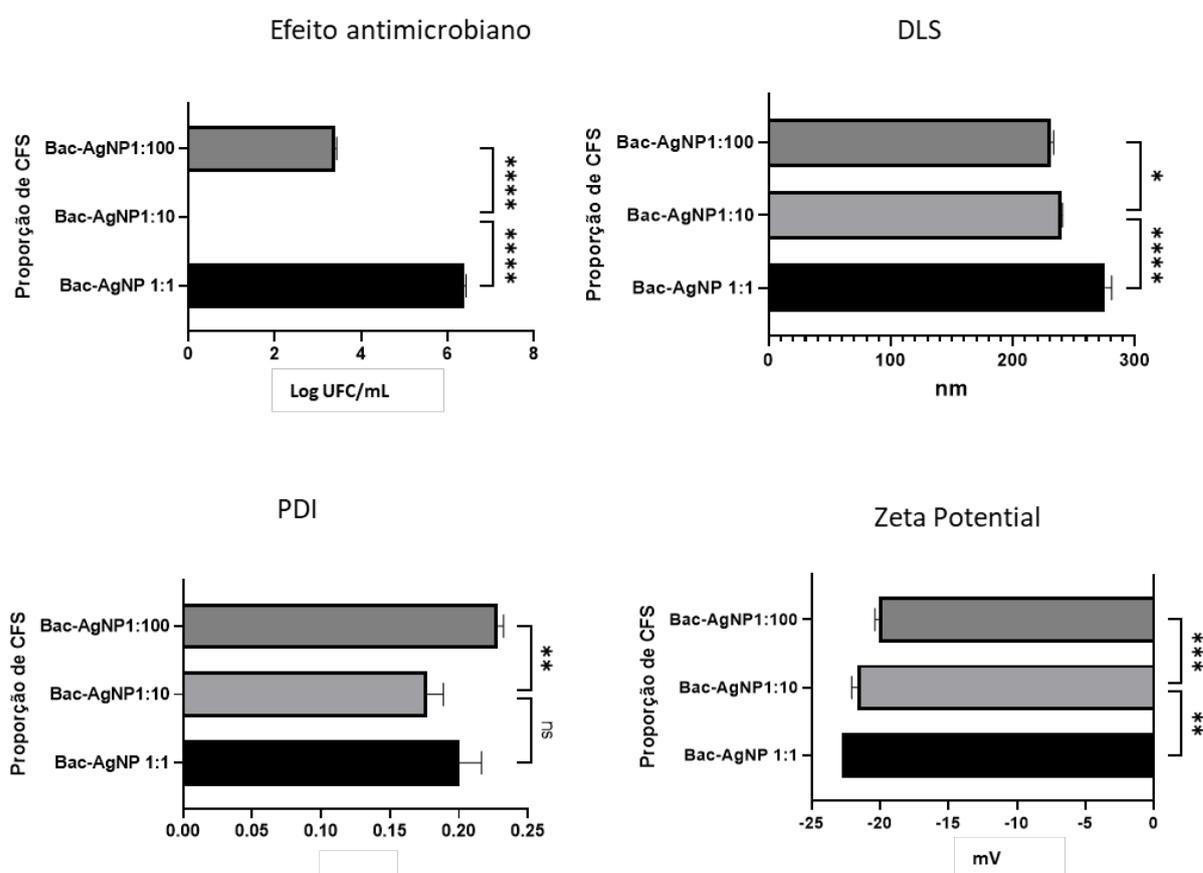


Figura 4. Resultados para efeito antimicrobiano, DLS, PDI e potencial Zeta de Bac-AgNP sintetizadas em diferentes proporções de CFS (1:1, 1:10 e 1:100) (* $p < 0,05$ se comparado com a proporção 1:10).

Conforme avaliado na Figura 5, a partir de 7 dias foi observado uma diminuição na atividade antimicrobiana das Bac-AgNPs em relação a multiplicação de *L. monocytogenes* para todas as temperaturas de armazenamento testadas, se comparado com a síntese inicial ($p < 0,05$). Foi observado maior aumento nas contagens bacterianas de 7 dias quando usado nanopartículas armazenadas a 4°C ($p < 0,05$). A partir de 14 dias as contagens atingiram valores de cerca de 8 log

UFC/mL para todas as condições. Também foram observados aumento dos valores de DLS e PDI de nanopartículas armazenadas em 4, 25 e 37°C ($p < 0,05$) partir de 7 dias. Entretanto, o potencial zeta se manteve estável na maioria das condições, sendo significativamente menor apenas a partir de 21 dias de incubação a 4°C ($p < 0,05$).

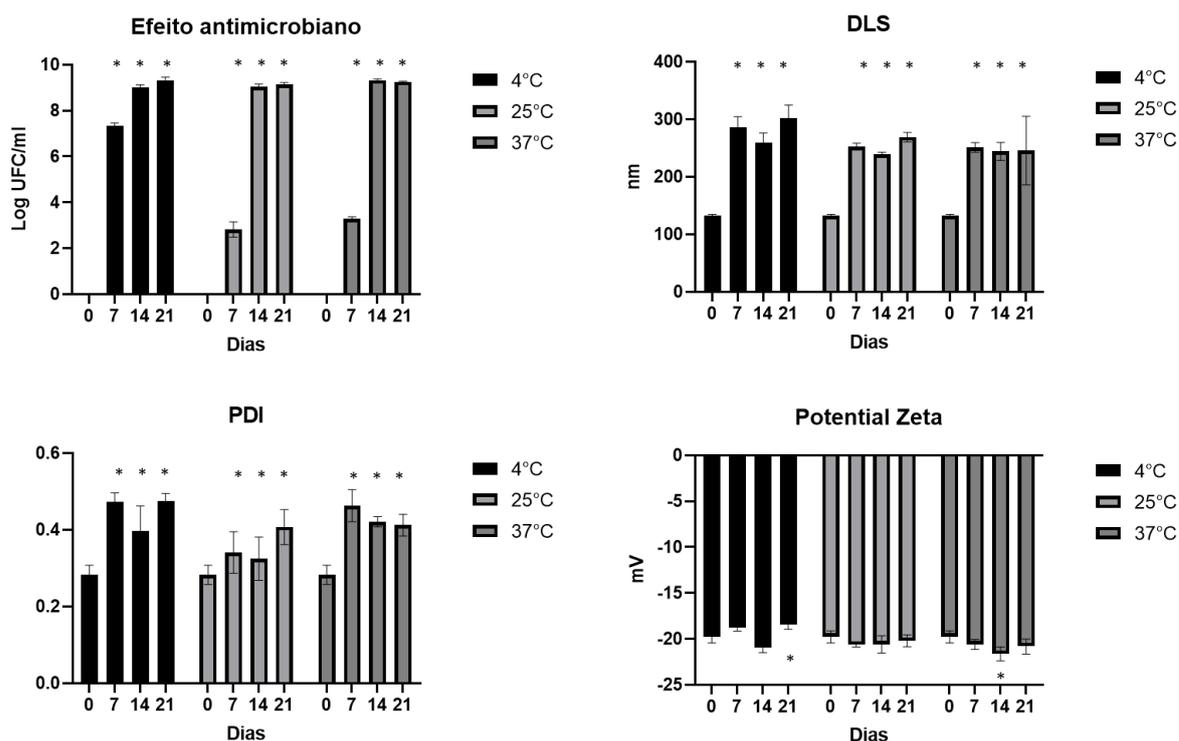


Figura 5. Resultados para efeito antimicrobiano, DLS, PDI e potencial Zeta de Bac-AgNP armazenadas em diferentes temperaturas (4, 25, 37°C) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. (* $p < 0,05$ se comparado com o tempo 0).

Foi utilizado a concentração do CIM (82 mg/mL) da Bac-AgNPs para tratar biofilmes de *L. monocytogenes* por 1, 6, 12 e 24 horas. Além disso, foi avaliado possível efeito sinérgico entre as Bac-AgNP e CFS em diferentes proporções. Após 1h de tratamento foi possível notar que Bac-AgNP isoladamente não apresentou potencial de reduzir as contagens bacterianas de biofilmes aderidos. Entretanto, nesse mesmo tempo de incubação, a associação das Bac-AgNP com CFS foi notável para o efeito antimicrobiano, sendo obtidas reduções de até 1,58 log UFC/mL. A partir de 6h de tratamento, foi demonstrado redução significativa das contagens de células em biofilmes ($p < 0,05$), sendo observada decréscimo de cerca

de 2,5 log UFC/mL para tratamento com Bac-AgNP isoladamente e quando associada a CFS por 24h ($p<0,05$) (Figura 6).

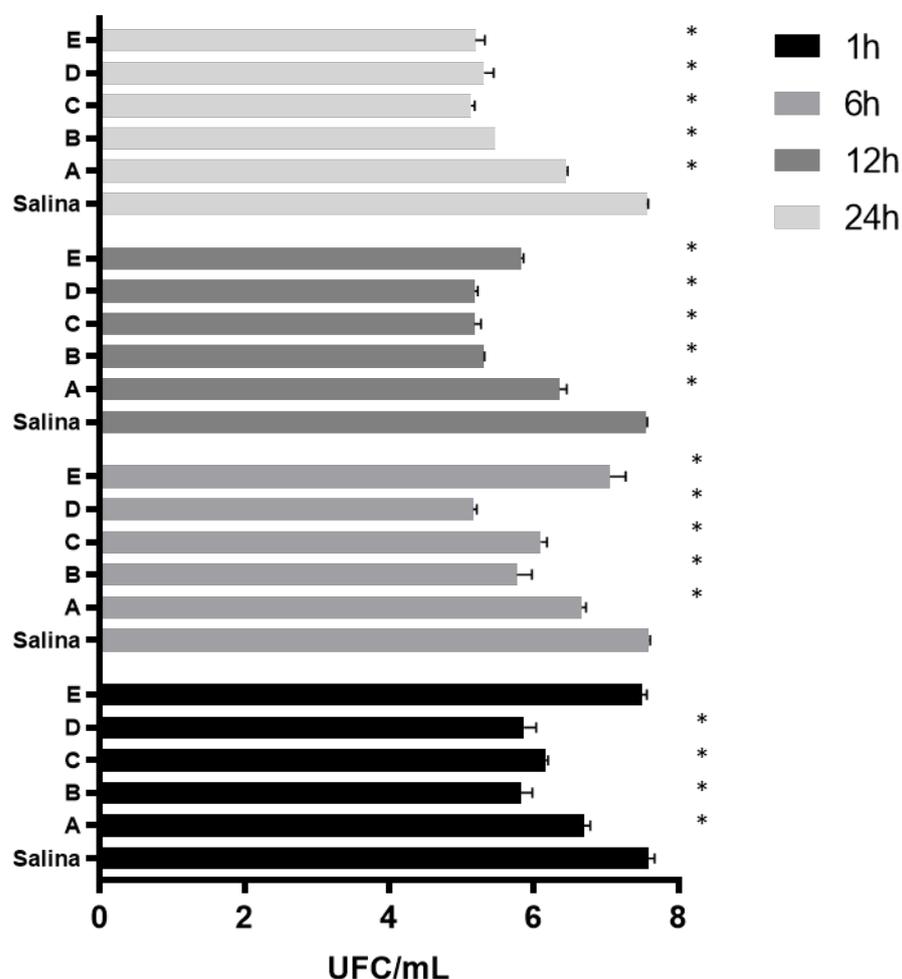


Figura 6. Resultados para contagem em placa de células aderidas aos biofilmes de *L. monocytogenes* quando tratados com diferentes associações de Bac-agNPs e CFS (A) 0% de Bac-AgNPs + 100% de CFS, B) 25% de Bac-AgNPs + 75% de CFS, C) 50% de Bac-AgNPs + 50% de CFS D) 75% de Bac-AgNPs + 25% de CFS E) 100% de Bac-AgNPs + 0% de CFS), com incubação de 1, 6, 12 e 24 horas por 37°C. (* $p<0,05$ se comparado com salina)

4. Discussão

A crescente demanda por alimentos processados e prontos para o consumo tem elevado a incidência de listeriose, causada por *L. monocytogenes*, um patógeno capaz de formar biofilmes resistentes em equipamentos de processamento alimentar, tornando-se um problema crítico para a indústria alimentícia [27]. Métodos

convencionais de desinfecção frequentemente são ineficazes e apresentam riscos ambientais, dessa forma, o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de CFS produzidos por *P. acidilactici* CE51 (Bac-AgNPs) foi realizado.

A síntese realizada produziu aproximadamente 164 mg/mL de Bac-AgNPs, que foram caracterizadas em seguida. A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) foi utilizada para determinar o tamanho médio das Bac-AgNPs, obtendo um valor de $131,8 \pm 2,7$ nm. Estudos similares sobre caracterização de nanopartículas de prata associadas a bacteriocina relataram tamanhos variando entre 65,6 nm a 208,2 nm conforme descrito por Ansari et al. [28], Sidhu e Nehra, [21] Alagumuthu et al. [29] e Chandrika e Sachan [30].

Outro parâmetro relevante na avaliação de nanopartículas é a uniformidade de tamanho, indicada pelo Índice de Polidispersidade (PDI, do inglês *Polydispersity Index*). O PDI varia de 0,0 para uma amostra perfeitamente uniforme, a 1,0, para uma amostra altamente polidispersa com diversas populações de tamanho [31]. Dessa forma, valores de PDI inferiores a 0,5 são considerados indicativos de nanopartículas monodispersas [31]. As Bac-AgNPs apresentaram um PDI de $0,28 \pm 0,02$, indicando uma distribuição de tamanho uniforme e monodispersidade. Essa característica é fundamental para garantir uma síntese padronizada e repetível, permitindo obtenção de um grande número de nanomateriais do tamanho esperado e com desempenho superior [32].

Analisar a carga elétrica na superfície de nanopartículas dispersas em solução por meio do Potencial Zeta é fundamental para prever sua tendência a se aglomerar ou repelir, o que indica a estabilidade da suspensão. No presente estudo, o valor encontrado ($-19,7 \pm 0,6$ mV), possivelmente favoreceu uma maior penetração das Bac-AgNPs no biofilme, uma vez que a carga negativa favorece a repulsão entre as partículas, ajudando a manter a estabilidade e evitar aglomeração [21]. Estudo que desenvolveram nanopartículas semelhantes também apresentaram valores negativos, como de Sidhu e Nehra, [21] que reportaram valores de $-20,12 \pm 1,33$ mV e $-32,12 \pm 1,23$ mV, enquanto Yazdi et al. [33] apresentou nanopartículas com carga $-13,3$ mV.

Para confirmar a segurança de Bac-AgNPs, analisou-se a curva de sobrevivência do organismo modelo *Galleria mellonella* após a aplicação do produto final (Bac-AgNPs) e de seus componentes utilizados na sua síntese, incluindo CFS de *P.*

acidulactici CE51 e nitrato de prata 2 mM (AgNO_3). Esse organismo modelo é amplamente utilizado em estudos de toxicidade devido à semelhança de seu sistema imunológico com a resposta inata de mamíferos, permitindo a simulação de aspectos relevantes desse sistema [34].

Apesar de seu uso crescente, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos tóxicos de AgNPs associadas a biomoléculas bacterianas em modelos biológicos, entretanto, Santos et al. [35] observaram que nanopartículas de zinco sintetizadas com extrato de casca de maçã não apresentaram toxicidade, com 100% de sobrevivência de *Galleria mellonella* após o tratamento. Resultado este que compactua com o encontrado no presente trabalho uma vez que CFS e Bac-AgNPs testadas também não são tóxicas, pois apresentaram 100% de sobrevivência das larvas durante o período de avaliação.

Para determinar a atividade antimicrobiana de Bac-AgNPs, foi realizado um ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em estudo prévio realizado por Rocha et al. [16], foi reportado a atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células (CFS) de *P. acidilactici* CE51 contra *L. monocytogenes*, quantificada em unidades AU/mL. No presente estudo, a síntese das Bac-AgNPs foi realizada na presença de CFS, sugerindo que a associação com AgNPs potencializou a ação antimicrobiana do CFS. Estudos prévios também documentaram o efeito sinérgico de AgNPs com diferentes bacteriocinas no aumento da eficácia antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, como Sidhu and Nehra [21] e Amer et al. [25]. O estudo de Kumar et al. [36] é especialmente relevante para comparação, pois utilizou bacteriocina de *P. pentosaceus*, do mesmo gênero bacteriano de nossa formulação, no entanto, com processo de biossíntese diferente. Aqueles autores avaliaram a eficácia antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, atingindo uma CIM de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ e observando uma redução de 2 log UFC/mL após 3 horas de exposição, valores comparáveis aos encontrados neste estudo. Desta forma, torna-se evidente a potencialização da atividade antimicrobiana através da sinergia entre CFS e AgNPs.

O ensaio de estabilidade das Bac-AgNP avaliou o efeito antimicrobiano, DLS, PDI e potencial Zeta de acordo com alguns parâmetros como: pH, proporção de CFS e temperatura.

As Bac-AgNPs apresentaram efeito antimicrobiano em uma faixa de pH entre 2 e 7, indicando boa estabilidade em condições ácidas a neutras, corroborando com

estudo prévio em que a CFS de *P. acidulactici* CE51 mantinha sua atividade antimicrobiana estável em pH 2 e pH 6,5, mas foi totalmente inibida em pH 9 [16].

Foi observado também que o pH influenciou as características físico-químicas das Bac-AgNPs, conforme evidenciado em nossos resultados. Existem poucos estudos que investigaram DLS, PDI e Potencial Zeta em diferentes pH de AgNPs sintetizadas por métodos verdes, especialmente em associação com bacteriocinas. No entanto, Gontijo et al. [37], que utilizaram o método de redução química para a síntese de AgNPs, relataram que um pH entre 3 e 7 resultou em nanopartículas maiores, com tamanhos médios entre 150 a 200 nm, ao contrário do nosso estudo, que indicou Bac-AgNPs menores em pH 6 quando comparado aos outros pH testados. Além disso, Gontijo et al. [37] observaram que nanopartículas em pH inferior a 3 e superior a 7 têm maior estabilidade coloidal, corroborando nossos dados, onde o potencial zeta foi menor em pH 6 quando comparados aos outros pH testados.

A formulação de Bac-AgNPs na proporção 1:10 de CFS e nitrato de prata foi estabelecida com padrão de comparação. Esta proporção demonstrou uma capacidade excelente de inibir completamente o crescimento microbiano, possivelmente devido ao equilíbrio ideal promovido pela quantidade de CFS e nitrato de prata utilizado na formação das Bac-AgNPs. Por outro lado, as proporções 1:1 e 1:100 não foram adequadas para a formação de Bac-AgNPs com atividade antimicrobiana eficiente, possivelmente devido à saturação de CFS na proporção 1:1 e à quantidade insuficiente de CFS na proporção 1:100.

Os dados obtidos por DLS e Potencial Zeta mostraram um aumento proporcional com a elevação da concentração de CFS, sendo que a formulação Bac-AgNPs 1:10 apresentou valores intermediários. Em relação ao PDI, esta mesma formulação apresentou o menor valor, indicando uma distribuição de tamanho mais homogênea das nanopartículas. Dessa forma, observa-se que a proporção 1:10 não apenas resultou em características físico-químicas aceitáveis, mas também apresentou o melhor efeito antimicrobiano, tornando-se a proporção preferencial para a síntese de Bac-AgNPs avaliados no presente estudo

Um outro parâmetro avaliado foi a temperatura de armazenamento das Bac-AgNPs. Este estudo analisou a estabilidade das Bac-AgNPs armazenadas em 4, 25 e 37°C ao longo de 21 dias, avaliando semanalmente a atividade antimicrobiana, DLS, PDI e potencial zeta.

Observou-se uma redução significativa na atividade antimicrobiana, com consequente aumento do crescimento bacteriano. Além disso, foi notado um aumento dos valores de DLS e PDI das Bac-AgNPs a partir do sétimo dia de armazenamento em 4, 25 e 37°C. Rocha et al. [16] reportaram que a atividade da bacteriocina de *P. acidilactici* CE51 (utilizada neste estudo) diminuiu ação inibitória contra *L. monocytogenes* após 14 dias de armazenamento a 4°C. No entanto, nossos resultados indicam que a associação com AgNPs pode ter reduzido ainda mais a estabilidade da bacteriocina, evidenciada pela queda de atividade já a partir do sétimo dia nesta temperatura, levando ao aumento do crescimento bacteriano, embora não tenham sido realizadas comparações com outras temperaturas em estudos anteriores.

A literatura sobre o comportamento físico-químico de AgNPs associadas a bacteriocinas em condições de armazenamento é limitada, mas Izak-Nau et al. [38] relataram que AgNPs sintetizadas por métodos de redução química tendem a se aglomerar com o tempo, especialmente à temperatura ambiente. No entanto, aqueles autores sugerem que a armazenagem a 4°C pode conferir maior estabilidade às AgNPs, reduzindo a taxa de aglomeração. Em nosso estudo, o potencial zeta das Bac-AgNPs permaneceu estável na maioria das condições, com uma diminuição significativa apenas após 21 dias de armazenamento a 4°C. Esse resultado indica que, apesar de uma certa estabilidade na carga superficial, as Bac-AgNPs ainda sofrem alterações estruturais ao longo do tempo.

Esses resultados indicam que não há uma temperatura de armazenamento ideal para nanopartículas no geral, sendo necessária avaliação individual, uma vez que a estabilidade depende de diversos fatores específicos de cada síntese [39]. No caso das Bac-AgNPs desenvolvidas neste estudo, as mudanças estruturais observadas podem estar relacionadas à interação com moléculas biológicas, que são mais sensíveis a variações ambientais. Dessa forma, o armazenamento prolongado não é recomendado, sendo necessários ajustes na formulação para garantir maior estabilidade físico-química e de atividade antimicrobiana.

É importante destacar que os ensaios de estabilidade das Bac-AgNPs desenvolvidas neste estudo preenchem uma lacuna significativa na literatura, que ainda carece de estudos sobre as características físico-químicas de nanopartículas de prata sintetizadas por métodos verdes, especialmente em relação a variáveis como pH, proporção de síntese e estabilidade a longo prazo. Esses ensaios são

fundamentais para validar a viabilidade do uso dessas nanopartículas ao longo do tempo, garantindo que elas preservem suas propriedades originais e continuem eficazes em aplicações práticas.

A concentração de CIM de Bac-AgNPs foi utilizada para tratar biofilmes de *L. monocytogenes* formados em aço inoxidável AISI 304 durante 1, 6, 12 e 24 horas. O aço inoxidável é amplamente empregado na indústria de alimentos devido a sua resistência a corrosão e ao calor [40]. É bem documentado que *L. monocytogenes* tem a capacidade de formar biofilmes persistentes em aço inoxidável, conforme demonstrado em estudos anteriores que evidenciaram a formação de biofilmes por isolados de *L. monocytogenes* nesse material, mesmo sob condições adversas de estresse [41]. Diante desse contexto, o presente estudo investigou o potencial das Bac-AgNPs no tratamento de biofilmes pré-formados em aço inoxidável, em diferentes intervalos de tempo.

Além de avaliar CFS e Bac-AgNPs isoladamente, foram formados novos grupos que combinam CFS e Bac-AgNPs em diferentes proporções (75:25, 50:50 e 25:75). Essa estratégia foi necessária porque o presente estudo não utilizou bacteriocinas purificadas, mas sim CFS, que pode conter concentrações menores de bacteriocinas. A investigação dessas combinações é relevante para compreender a eficácia de uma aplicação mais adequada de CFS em sinergia com as nanopartículas de prata.

Os resultados revelaram que após 1 hora de tratamento, as Bac-AgNPs isoladamente não reduziram significativamente as contagens bacterianas nos biofilmes aderidos. No entanto, a combinação de Bac-AgNPs com CFS demonstrou um efeito antimicrobiano notável, resultando em reduções de até 1,58 log UFC/mL, evidenciando mais uma vez o efeito sinérgico entre os compostos.

A bacteriocina do gênero *Pediococcus* atua formando poros na membrana celular, resultando no vazamento imediato de íons e moléculas essenciais. Esse processo interrompe rapidamente a produção de energia e causa um colapso nas funções celulares, o que, além de reduzir a viabilidade celular, compromete a integridade do biofilme [42]. Essa ação rápida pode explicar a eficácia observada no tratamento de 1h. As AgNPs geram estresse oxidativo e toxicidade devido à liberação de íons metálicos [43], o que explica por que a combinação de CFS com Bac-AgNPs resultou em um efeito antimicrobiano que se intensificou ao longo do tempo, já que partir de 6h de tratamento, foi demonstrado redução significativa das

contagens de células em biofilmes, sendo observada decréscimo de cerca de 2,5 log UFC/mL para tratamento com Bac-AgNP isoladamente e quando associada a CFS por 24h, reforçando a hipótese de que a sinergia entre Bac-AgNPs e CFS contribui para uma maior eficácia no controle de biofilmes já formados.

Além disso, as Bac-AgNPs se demonstraram eficazes na redução do biofilme de *L. monocytogenes* utilizando concentração de CIM. Em comparação, o estudo de Kumar et al. [36], mencionado anteriormente, ressaltou que foi necessária uma concentração cinco vezes maior que o MIC estabelecido para erradicar o biofilme de *L. monocytogenes*.

Dessa forma, as Bac-AgNPs desenvolvidas neste estudo apresentam vantagens importantes para a indústria alimentícia, unindo eficiência antimicrobiana e antibiofilme contra *L. monocytogenes* a um processo de biossíntese simples, econômico e sustentável. Com esse potencial, podem substituir desinfetantes químicos agressivos, que muitas vezes são menos eficazes e prejudiciais ao meio ambiente. Além disso, essas nanopartículas podem aumentar a segurança alimentar ao prevenir contaminações, reduzindo perdas financeiras e trazendo benefícios tanto para o setor industrial quanto para os consumidores finais.

5. Conclusão

A caracterização das Bac-AgNPs sintetizadas a partir de CFS produzidos por *P. acidilactici* CE51 demonstraram grande potencial antimicrobiano, especialmente no combate a *L. monocytogenes* e no controle de seus biofilmes. A combinação sinérgica entre Bac-AgNPs e CFS resultou em uma redução significativa das contagens bacterianas nos biofilmes após 6 a 24 horas de tratamento, com ótima biocompatibilidade, como evidenciado pelos testes de toxicidade em *Galleria mellonella*. Embora a proporção 1:10 tenha mostrado os melhores resultados em termos de atividade antimicrobiana e características físico-químicas, os testes de estabilidade indicaram que a formulação necessita de ajustes para otimizar a conservação a longo prazo. Esses resultados destacam o potencial das Bac-AgNPs como uma alternativa promissora para a indústria alimentícia no combate de biofilmes de *L. monocytogenes*.

Letícia Franco Gervasoni: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Conceptualization.

Lizziane Kretli Winkelstroter Eller: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

6. Referências

- [1] Q. Dong, L. Sun, T. Fang, et al., Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* in a simulated chicken processing environment, *Foods* 11 (13) (2022) 1917, doi:10.3390/foods11131917
- [2] I. Matle, K. R. Mbatha, E. Madoroba, et al., A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis, *Onderstepoort J. Vet. Res.* 87 (1) (2020) 1869, doi:10.4102/ojvr.v87i1.1869
- [3] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), *EFSA J.* 17 (12) (2019), doi:10.2903/j.efsa.2019.5926
- [4] N. Blanco-Cabra, J. Alcàcer-Almansa, J. Admella, et al., Nanomedicine against biofilm infections: A roadmap of challenges and limitations, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. Adv. Rev.* (2024), doi:10.1002/wnan.1944
- [5] D. Sharma, L. Misba, A. U. Khan, et al., Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities, *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 8 (76) (2019), doi:10.1186/s13756-019-0533-3
- [6] M. A. Rather, K. Gupta, M. Mandal, et al., Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies, *Braz. J. Microbiol.* 52 (4) (2021) 1701–1718, doi:10.1007/s42770-021-00624-x
- [7] L. Pai, S. Patil, S. Liu, et al., A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: insights from reviews on antibiotic resistance, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13 (2023) 1327069, doi:10.3389/fcimb.2023.1327069

- [8] W. Yin, Y. Wang, L. Liu, J. He, et al., Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (14) (2019) 3423, doi:10.3390/ijms20143423
- [9] C. Carrascosa, D. Raheem, F. Ramos, et al., Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review, *Environ. Res. Public Health* 18 (4) (2021), doi:10.3390/ijerph18042014
- [10] P. M. Mokoena, C. A. Omatola, A. O. Olaniyan, et al., Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens, *Molecules* 26 (22) (2021) 7055, doi:10.3390/molecules26227055
- [11] A. Zapaśnik, B. Sokołowska, M. Bryła, et al., Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety, *Foods* 11 (9) (2022) 1283, doi:10.3390/foods11091283
- [12] A. Pompilio, E. Kaya, V. Lupetti, et al., Cell-free supernatants from *Lactobacillus* strains exert antibacterial, antibiofilm, and antivirulence activity against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients, *Microbes and Infection* 26 (2024) 105301, doi:10.1016/j.micinf.2024.105301.
- [13] E. Kaya, M. Bianchi, G. Maisetta et al., Strong activity and no resistance induction exerted by cell-free supernatants from *Lacticaseibacillus rhamnosus* against mono-species and dual-species biofilms of wound pathogens in in vivo-like conditions, *International Journal of Molecular Sciences* 25 (2024) 2087, doi:10.3390/ijms25042087
- [14] I. Sugrue, R. P. Ross, C. Hill et al., Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials, *Nature Reviews Microbiology* 22 (2024) 556–571, doi:10.1038/s41579-024-01045-x.
- [15] Anjana, S. K. Tiwari, et al., Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12 (2022) 851140, doi:10.3389/fcimb.2022.851140
- [16] I. P. M. Rocha, V. R. D. Costa, Y. A. de Moraes, et al., Bacteriocin-like substance produced by *Pediococcus acidilactici* CE51 as a biopreservative in orange beverage, *Biocontrol Sci. Technol.* 32 (4) (2022) 520–526, doi:10.1080/09583157.2021.1998367

- [17] K. C. O. Vieira, C. D. S. Ferreira, E. B. T. Bueno, et al., Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici* CE51, *LWT-Food Sci. Technol.* 130 (2020) 109637, doi:10.1016/j.lwt.2020.109637
- [18] M. Holay, Z. Guo, J. Pihl, et al., Bacteria-inspired nanomedicine, *ACS Appl. Bio Mater.* 4 (5) (2021) 3830–3848, doi:10.1021/acsabm.0c01072
- [19] H. A. Hemeg, Combatting persisted and biofilm antimicrobial resistant bacteria by using nanoparticles, *Z. Naturforsch. C* 77 (9–10) (2022) 365–378, doi:10.1515/znc-2021-0296
- [20] D. D. L. Coriolano, J. B. de Souza, E. V. Bueno, et al., Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Braz. J. Microbiol.* 52 (1) (2021) 267–278, doi:10.1007/s42770-020-00406-x
- [21] P. K. Sidhu, K. Nehra, et al., Bacteriocin-capped silver nanoparticles for enhanced antimicrobial efficacy against food pathogens, *IET Nanobiotechnol.* 14 (3) (2020) 245–252, doi:10.1049/iet-nbt.2019.0323
- [22] X. Zhao, O. P. Kuipers, et al., Synthesis of silver-nisin nanoparticles with low cytotoxicity as antimicrobials against biofilm-forming pathogens, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 206 (2021) 111965, doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111965
- [23] G. D. Marena, M. A. S. Ramos, L. C. Lima, et al., *Galleria mellonella* for systemic assessment of anti-*Candida auris* using amphotericin B loaded in nanoemulsion, *Sci. Total Environ.* 807 (2022), doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151023
- [24] C. C. Spadari, F. W. M. S. Bastiani, L. B. Lopes, et al., Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis, *Int. J. Nanomed.* 14 (2019) 5187–5199, doi:10.2147/IJN.S205350
- [25] S. A. Amer, H. M. Abushady, R. M. Refay, et al., Enhancement of the antibacterial potential of plantaricin by incorporation into silver nanoparticles, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 19 (1) (2021) 13, doi:10.1186/s43141-020-00093-z
- [26] H. R. A. Silva, G. M. de Souza, J. D. Fernandes, et al., Unravelling the effects of the food components ascorbic acid and capsaicin as a novel anti-biofilm agent against *Escherichia coli*, *J. Food Sci. Technol.* 57 (3) (2020) 1013–1020, doi:10.1007/s13197-019-04134-5
- [27] X. Liu, X. Xia, Y. Liu, et al., Recent advances on the formation, detection, resistance mechanism, and control technology of *Listeria monocytogenes* biofilm

- in food industry, *Food Res. Int.* 180 (2024) 114067, doi:10.1016/j.foodres.2024.114067
- [28] A. Ansari, S. Pervez, U. Javed, et al., Characterization and interplay of bacteriocin and exopolysaccharide-mediated silver nanoparticles as an antibacterial agent, *Int. J. Biol. Macromol.* 115 (2018) 643–650, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.104.
- [29] T. S. Alagumuthu, S. Samidurais, Y. Khambhaty, et al., Evaluation of antimicrobial property of bacteriocin capped silver nanoparticles prepared from cell free supernatant of *Lactobacillus brevis* isolated from marine fishes, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 29 (2023) art. 95, doi:10.1007/s10989-023-10569-4.
- [30] K. Chandrika, A. Sachan, Biosynthesis of bacteriocin BacZY05-silver nanoconjugates and evaluation of their antibacterial properties, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 40 (2024) art. 287, doi:10.1007/s11274-024-04093-w.
- [31] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, et al, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics* 10 (2) (2018) 57, doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [32] N. Liaqat, N. Jahan, K. Khalil-Ur-Rahman, et al., Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay, *Front. Chem.* 10 (2022), doi:10.3389/fchem.2022.952006.
- [33] M. Yazdi, A. Yousefvand, H. Mahmoodzadeh Hosseini, S. A. Mirhosseini, Green synthesis of silver nanoparticles using nisin and its antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Adv. Biomed. Res.* 11 (2022) 56, doi:10.4103/abr.abr_99_21.
- [34] A. Andırın, N. D. Yaycı, M. Idikut, et al., Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract: Characterization and analysis of toxic effects in model organism *Galleria mellonella* L. (The greater wax moth). *Environ Sci Pollut Res* 31, 57778-57788 (2024). doi:10.1007/s11356-024-34996-y
- [35] C. F. Santos, S. M. Andrade, D. Mil-Homens, et al., Antibacterial activity of ZnO nanoparticles in a *Staphylococcus aureus*-infected *Galleria mellonella* model is tuned by different apple-derived phytocargos, *Journal of Functional Biomaterials* 14 (9) (2023) 463, doi:10.3390/jfb14090463.
- [36] P. Kumar, A. A. Shaikh, P. Kumar et al., Double-edged nanobiotic platform with protean functionality: leveraging the synergistic antibacterial activity of a

- food-grade peptide to mitigate multidrug-resistant bacterial pathogens, *ACS Applied Materials & Interfaces* 14 (18) (2022) 20652-20668, doi:10.1021/acsami.2c01385.
- [37] L. A. P. Gontijo, E. Raphael, D. P. S. Ferrari et al., pH Effect on the Synthesis of Different Size Silver Nanoparticles Evaluated by DLS and Their Size-Dependent Antimicrobial Activity, *Matéria (Rio de Janeiro)* 25 (4) (2020), e-12845, doi:10.1590/S1517-707620200004.1145.
- [38] E. Izak-Nau, A. Huk, B. Reidy et al., Impact of Storage Conditions and Storage Time on Silver Nanoparticles' Physicochemical Properties and Implications for Their Biological Effects, *RSC Advances* 102 (2015), doi:10.1039/c5ra10187e.
- [39] S. Kuehr, B. Meisterjahn, N. Schroeder et al., Evaluation of Extraction and Storage Conditions for Quantification and Characterization of Silver Nanoparticles in Complex Samples by Single Particle-ICP-MS, *Chemosphere* (2024), doi:10.1016/j.chemosphere.2024.143460.
- [40] S. Dula, T. A. Ajayeoba, O. A. Ijabadeniyi, Bacterial Biofilm Formation on Stainless Steel in the Food Processing Environment and Its Health Implications, *Folia Microbiologica* 66 (2021) 293–302, doi:10.1007/s12223-021-00864-2.
- [41] D. A. L. da Silva, R. de Melo Tavares, A. C. Camargo et al., Biofilm Growth by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel and Expression of Biofilm-Related Genes Under Stressing Conditions, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37 (2021) 119, doi:10.1007/s11274-021-03092-5.
- [42] N. Khorshidian, E. Khanniri, M. Mohammadi, A. M. Mortazavian, M. Yousefi, et al., Antibacterial activity of pediocin and pediocin-producing bacteria against *Listeria monocytogenes* in meat products, *Front. Microbiol.* 12 (2021), doi:10.3389/fmicb.2021.709959
- [43] M. E. B. Pineda, D. F. V. Sánchez, P. A. C. Caycedo, J. Rozo, Nanocomposites: Silver Nanoparticles and Bacteriocins Obtained from Lactic Acid Bacteria Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40 (2024) 341, doi:10.1007/s11274-024-04151-3.

ANEXO

Normas Microbial Pathogenesis

Writing and formatting

File format

We ask you to provide editable source files for your entire submission (including figures, tables and text graphics). Some guidelines:

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Lay out text in a single-column format.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

We advise you to read our [Step-by-step guide to publishing with Elsevier](#).

Title page

You are required to include the following details in the title page information:

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g., DNA).
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the

email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The address where the author carried out the work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

You are required to provide a concise and factual abstract which does not exceed 250 words. The abstract should briefly state the purpose of your research, principal results and major conclusions. Some guidelines:

- Abstracts must be able to stand alone as abstracts are often presented separately from the article.
- Avoid references. If any are essential to include, ensure that you cite the author(s) and year(s).
- Avoid non-standard or uncommon abbreviations. If any are essential to include, ensure they are defined within your abstract at first mention.

Keywords

You are required to provide 1 to 7 keywords for indexing purposes. Keywords should be written in English. Please try to avoid keywords consisting of multiple words (using "and" or "of").

We recommend that you only use abbreviations in keywords if they are firmly established in the field.

Highlights

You are required to provide article highlights at submission.

Highlights are a short collection of bullet points that should capture the novel results of your research as well as any new methods used during your study. Highlights will help increase the discoverability of your article via search engines. Some guidelines:

- Submit highlights as a separate editable file in the online submission system with the word "highlights" included in the file name.
- Highlights should consist of 3 to 5 bullet points, each a maximum of 85 characters, including spaces.

We encourage you to view example [article highlights](#) and read about the benefits of their inclusion.

Graphical abstract

You are encouraged to provide a graphical abstract at submission.

The graphical abstract should summarize the contents of your article in a concise, pictorial form which is designed to capture the attention of a wide readership. A graphical abstract will help draw more attention to your online article and support readers in digesting your research. Some guidelines:

- Submit your graphical abstract as a separate file in the online submission system.
- Ensure the image is a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more and is readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi.
- Our preferred file types for graphical abstracts are TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

We encourage you to view example [graphical abstracts](#) and read about the benefits of including them.

Units, classifications codes and nomenclature

This journal requires you to use the international system of units (SI) which follows internationally accepted rules and conventions. If other units are mentioned within your article, you should provide the equivalent unit in SI.

Math formulae

- Submit math equations as editable text, not as images.
- Present simple formulae in line with normal text, where possible.
- Use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms such as X/Y.
- Present variables in italics.
- Denote powers of e by exp.
- Display equations separately from your text, numbering them consecutively in the order they are referred to within your text.

Tables

Tables must be submitted as editable text, not as images. Some guidelines:

- Place tables next to the relevant text or on a separate page(s) at the end of your article.

- Cite all tables in the manuscript text.
- Number tables consecutively according to their appearance in the text.
- Please provide captions along with the tables.
- Place any table notes below the table body.
- Avoid vertical rules and shading within table cells.

We recommend that you use tables sparingly, ensuring that any data presented in tables is not duplicating results described elsewhere in the article.

Figures, images and artwork

Figures, images, artwork, diagrams and other graphical media must be supplied as separate files along with the manuscript. We recommend that you read our detailed [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

When submitting artwork:

- Cite all images in the manuscript text.
- Number images according to the sequence they appear within your article.
- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Please provide captions along with the artwork.
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Artwork formats

When your artwork is finalized, "save as" or convert your electronic artwork to the formats listed below taking into account the given resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations:

- Vector drawings: Save as EPS or PDF files embedding the font or saving the text as "graphics."
- Color or grayscale photographs (halftones): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 300 dpi (for single column: min. 1063 pixels, full page width: 2244 pixels).
- Bitmapped line drawings: Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 1000 dpi (for single column: min. 3543 pixels, full page width: 7480 pixels).
- Combinations bitmapped line/halftones (color or grayscale): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 500 dpi (for single column: min. 1772 pixels, full page width: 3740 pixels).

Please do not submit:

- files that are too low in resolution (for example, files optimized for screen use such as GIF, BMP, PICT or WPG files).
- disproportionately large images compared to font size, as text may become unreadable.

Figure captions

All images must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. We advise you to keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbols and abbreviations used should be explained.

Provide captions in a separate file.

Color artwork

If you submit usable color figures with your accepted article, we will ensure that they appear in color online.

Please ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. Learn more about [color and web accessibility](#).

For articles appearing in print, you will be sent information on costs to reproduce color in the printed version, after your accepted article has been sent to production. At this stage, please indicate if your preference is to have color only in the online version of your article or also in the printed version.

Generative AI and Figures, images and artwork

Please read our policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork, which can be found in Elsevier's [GenAI Policies for Journals](#).

This policy states:

- We do not permit the use of Generative AI or AI-assisted tools to create or alter images in submitted manuscripts.
- The only exception is if the use of AI or AI-assisted tools is part of the research design or methods (for example, in the field of biomedical imaging). If this is the case, such use must be described in a reproducible manner in the methods section, including the name of the model or tool, version and extension numbers, and manufacturer.
- The use of generative AI or AI-assisted tools in the production of artwork such as for graphical abstracts is not permitted. The use of generative AI in the production of cover art may in some cases be allowed, if the author obtains prior permission from the journal editor and publisher, can demonstrate that all

necessary rights have been cleared for the use of the relevant material, and ensures that there is correct content attribution.

Supplementary material

We encourage the use of supplementary materials such as applications, images and sound clips to enhance research. Some guidelines:

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit supplementary materials at the same time as your article. Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same file type as received. These files will not be formatted or typeset by the production team.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file describing its content.
- Provide updated files if at any stage of the publication process you wish to make changes to submitted supplementary materials.
- Do not make annotations or corrections to a previous version of a supplementary file.
- Switch off the option to track changes in Microsoft Office files. If tracked changes are left on, they will appear in your published version.

We recommend you upload research data to a suitable specialist or generalist repository. Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Video

This journal accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. We encourage you to include links to video or animation files within articles. Some guidelines:

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.

- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide text (for both the electronic and the print version) to be placed in the portions of your article that refer to the video content. This is essential text, as video and animation files cannot be embedded in the print version of the journal.

We publish all video and animation files supplied in the electronic version of your article.

For more detailed instructions, we recommend that you read our guidelines on [submitting video content to be included in the body of an article](#).

Research data

We are committed to supporting the storage of, access to and discovery of research data, and our [research data policy](#) sets out the principles guiding how we work with the research community to support a more efficient and transparent research process.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

For this journal, the following instructions from our [research data guidelines](#) apply.

Option B: Research data deposit, citation and linking

You are **encouraged** to:

- Deposit your research data in a relevant data repository.
- Cite and link to this dataset in your article.
- If this is not possible, make a statement explaining why research data cannot be shared.

Data statement

To foster transparency, you are encouraged to state the availability of any data at submission.

Ensuring data is available may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you can state the reason why (e.g., your research data includes sensitive or confidential information such as

patient data) during the submission process. This statement will appear with your published article on ScienceDirect.

Read more about the importance and benefits of providing a [data statement](#).

Data linking

Linking to the data underlying your work increases your exposure and may lead to new collaborations. It also provides readers with a better understanding of the described research.

If your research data has been made available in a data repository there are a number of ways your article can be linked directly to the dataset:

- Provide a link to your dataset when prompted during the online submission process.
- For some data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.
- You can also link relevant data or entities within the text of your article through the use of identifiers. Use the following format: Database: 12345 (e.g. TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Learn more about [linking research data and research articles in ScienceDirect](#).

Research Elements

This journal enables the publication of research objects (e.g. data, methods, protocols, software and hardware) related to original research in [Elsevier's Research Elements journals](#).

Research Elements are peer-reviewed, open access journals which make research objects findable, accessible and reusable. By providing detailed descriptions of objects and their application with links to the original research article, your research objects can be placed into context within your article.

You will be alerted during submission to the opportunity to submit a manuscript to one of the Research Elements journals. Your Research Elements article can be prepared by you, or by one of your collaborators.

Article structure

Article sections

- Divide your article into clearly defined and numbered sections. Number subsections 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), then 1.2, etc.
- Use the numbering format when cross-referencing within your article. Do not just refer to "the text."

- You may give subsections a brief heading. Headings should appear on a separate line.
- Do not include the article abstract within section numbering.

Glossary

Please provide definitions of field-specific terms used in your article, in a separate list.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section. Acknowledgements should be placed in a separate section which appears directly before the reference list. Do not include acknowledgements on your title page, as a footnote to your title, or anywhere else in your article other than in the separate acknowledgements section.

Author contributions: CRediT

Corresponding authors are required to acknowledge co-author contributions using [CRediT \(Contributor Roles Taxonomy\)](#) roles:

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition
- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation
- Visualization
- Writing – original draft
- Writing – review and editing

Not all CRediT roles will apply to every manuscript and some authors may contribute through multiple roles.

We advise you to read [more about CRediT and view an example of a CRediT author statement](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

- Identify individual appendices within your article using the format: A, B, etc.
- Give separate numbering to formulae and equations within appendices using formats such as Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. and in subsequent appendices, Eq. (B.1), Eq. (B. 2) etc. In a similar way, give separate numbering to tables and figures using formats such as Table A.1; Fig. A.1, etc.

References

References within text

Any references cited within your article should also be present in your reference list and vice versa. Some guidelines:

- References cited in your abstract must be given in full.

- We recommend that you do not include unpublished results and personal communications in your reference list, though you may mention them in the text of your article.
- Any unpublished results and personal communications included in your reference list must follow the standard reference style of the journal. In substitution of the publication date add "unpublished results" or "personal communication."
- References cited as "in press" imply that the item has been accepted for publication.

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research.

Before submission, check that all data provided in your reference list are correct, including any references which have been copied. Providing correct reference data allows us to link to abstracting and indexing services such as Scopus, Crossref and PubMed. Any incorrect surnames, journal or book titles, publication years or pagination within your references may prevent link creation.

We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links as they provide a permanent link to the electronic article referenced.

Reference format

This journal does not set strict requirements on reference formatting at submission.

Some guidelines:

- References can be in any style or format as long as the style is consistent.
- Author names, journal or book titles, chapter or article titles, year of publication, volume numbers, article numbers or pagination must be included, where applicable.
- Use of DOIs is recommended.

Our journal reference style will be applied to your article after acceptance, at proof stage. If required, at this stage we will ask you to correct or supply any missing reference data.

Reference style

Indicate references by adding a number within square brackets in the text. You can refer to author names within your text, but you must always give the reference number, e.g., "as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result".

Number references in the order they appear in your article.

Abbreviate journal names according to the [List of Title Word Abbreviations](#) (LTWA).

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, T. Handgraaf, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2020) 51 – 59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, T. Handgraaf, R.A. Lupton, 2022. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in a book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2020, pp. 281 - 304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2023 (accessed 13 March 2023).

Reference to a dataset:

[6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions [dataset], Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.1234/abc12nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 [software], Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.1234/zenodo.3727209>.

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known. You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

We encourage you to cite underlying or relevant datasets within article text and to list data references in the reference list.

When citing data references, you should include:

- author name(s)
- dataset title
- data repository
- version (where available)
- year
- global persistent identifier

Add [dataset] immediately before your reference. This will help us to properly identify the dataset. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

We ask you to mark preprints clearly. You should include the word "preprint" or the name of the preprint server as part of your reference and provide the preprint DOI.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, use the formal publication as your reference.

If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but they are not yet formally published, you may reference the preprint.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in popular reference management software products. These include products that support [Citation Style Language \(CSL\)](#) such as [Mendeley Reference Manager](#).

If you use a citation plug-in from these products, select the relevant journal template and all your citations and bibliographies will automatically be formatted in the journal style. We advise you to [remove all field codes](#) before submitting your manuscript to any reference management software product.

If a template is not available for this journal, follow the format given in examples in the reference style section of this Guide for Authors.

