

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS CAMPO MOURÃO

NICOLLI GRECCO MARCHIORE

**AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO DE PRATA EM SALSICHAS RECOBERTAS
COM FILMES COMESTÍVEIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS
ANTIMICROBIANAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

NICOLLI GRECCO MARCHIORE

**AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO DE PRATA EM SALSICHAS RECOBERTAS
COM FILMES COMESTÍVEIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS
ANTIMICROBIANAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia do Departamento Acadêmico de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *campus* Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Vitória Leimann.

CAMPO MOURÃO

2015



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Departamento Acadêmico de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO DE PRATA EM SALSICHAS RECOBERTAS COM
FILMES COMESTÍVEIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS
ANTIMICROBIANAS

por

NICOLLI GRECCO MARCHIORE

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 30 de junho de 2015, às 14:00 horas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. Fernanda Vitória Leimann

Orientadora

Prof. Dr. Paulo Henrique Março

Membro da banca

Prof. Dr. Nelson Consolin Filho

Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Campus* Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, a fé que tenho em ti meu Deus foi meu sustento e me deu coragem para enfrentar as realidades, e de sempre ter a certeza que depois de uma tempestade, vem o sol.

A toda minha família, tias, tios, primas, primos, vó Inez e irmãos, sou feliz e grata porque fui abençoada com um conjunto de pessoas únicas que são vocês, com quem compartilho a minha vida. São essas pessoas, através de seus sorrisos, seus abraços, suas palavras, apoio, compreensão, amor e amizade, que dão sentido à minha vida e a tornam mais fácil e prazerosa de viver.

Agradeço a Deus novamente pela pessoa que mandou para ser a minha mãe, minha melhor amiga, meu amor verdadeiro. Delcy, meu exemplo de humildade, bondade e determinação, minha rainha. Obrigada por tudo sempre, por deixar de viver a sua vida para me criar, por não terem medido esforços para me ajudar em todas as circunstâncias, pela compreensão, pelas palavras certas na hora propícia, por acreditar em mim. Tudo que sou devo a ti.

Agradeço ao meu Pai, Marcos, por investir e acreditar em mim, apesar da distancia e das diferenças você nunca deixou de me apoiar, quero agradecer pelo que fez para mim até hoje, e te dizer que ainda sentirá muito orgulho de eu ser sua filha.

Ao pai que Deus colocou em minha vida, meu padrasto Alberto. Por ti tenho uma grande admiração, consideração e respeito, obrigado por estar ao lado da minha mãe e ao meu lado nos momentos mais difíceis que a vida nos proporcionou.

Aos meus avós maternos, Neuza e Jair, vocês são com certeza a base de toda nossa família. Quando “crescer” quero ter o coração de ouro que vocês tem. Vó, minha ursinha, minha mãe, que me criou e me ensinou o que é caráter e a nunca desistir, pois como a Senhora sempre disse: Fé em Deus que tudo dá certo. Quero que a vida me ensine a caminhar como vocês caminharam, no amor e na esperança. Vô, o Senhor é a pessoa mais humilde e de bom coração que já conheci em toda a minha vida, me orgulho muito em ser sua neta.

A minha irmã Luanna por sempre me acalmar e me fazer feliz com suas palavras de uma criança de 11 anos.

Ao meu namorado, Marcio, pessoa com quem amo compartilhar minha vida. Com você tenho me sentido mais viva de verdade. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia.

As minhas companheiras de apartamento e amigas, Daiane e Carolina, sem vocês, minha historia em Campo Mourão e na faculdade não seria a mesma, não poderia ser melhor do que é.

As minhas amigas, Kelly, Claudia, Eloisa, Franciely, Rhayanna, Camila, Ana Carolina, Victoria, Renata e Luma obrigada por me aguentarem, por gostarem de mim do jeito que sou, por estarem presente nos sorrisos e nos choros, afinal, amizade verdadeira não é só na hora da festa né?! Espero que nossa harmonia nunca acabe, que nossa fraternidade seja eterna e que nossos encontros sejam constantes.

Agradeço a professora Dra. Fernanda Vitória Leimann, por quem tenho imensa admiração, minha orientadora de iniciação científica e trabalho de conclusão de curso, por ter me concedido essas oportunidades maravilhosas, por confiar em mim, no meu trabalho e por ter aceitado e escolhido me orientar na minha vida acadêmica. Obrigada pelos conselhos profissionais e para a vida. Obrigada por ser sempre tão atenciosa e por me dar o direcionamento necessário em meus experimentos.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por sua excelência em ensino e especialmente a banca examinadora pela atenção com esse trabalho.

A Gislaine, minha parceira de laboratório, obrigada pela ajuda sempre.

A todos que conheci nesses anos morando em Campo Mourão, me lembrarei de cada um, sempre.

Enfim, a todos que contribuíram de algum modo para a minha formação, meu muito obrigado!

*Não importa aonde você parou...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar".
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Carlos Drummond de Andrade*

RESUMO

MARCHIORE, Nicolli Grecco. **Avaliação da difusão de prata em salsichas recobertas com filmes comestíveis contendo nanopartículas antimicrobianas.** 2015. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

As bactérias ácido lácticas causadoras de limosidade em salsichas podem ter seu crescimento inibido por meio de recobrimentos comestíveis que contenham em sua formulação compostos antimicrobianos. As nanopartículas de prata (AgNPs) são agentes antimicrobianos conhecidos e que podem ser sintetizadas por métodos verdes, possibilitando sua aplicação em alimentos. Porém sua utilização só é adequada em baixas concentrações em função de possíveis efeitos cumulativos no organismo. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi a síntese verde de nanopartículas de prata e sua aplicação junto ao filme comestível de amido em salsichas para controle do crescimento de bactérias ácido lácticas. As salsichas foram avaliadas durante intervalos de tempo de 0, 15 e 30 dias quanto a concentração de AgNPs por Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) e quanto a sua textura pela análise de perfil de textura (TPA). As salsichas foram submetidas inicialmente a lavagem, cozimento e por fim trituradas, sendo retiradas amostras de cada passo de preparo para avaliação por ICP-MS. As amostras retiradas da água de cozimento indicaram que a maior concentração de AgNPs permanece nesta etapa. A concentração de AgNPs nas salsichas trituradas permaneceu em 0,5 µg/L para 15 e 30 dias de armazenamento. A análise do perfil de textura das salsichas demonstrou que após trinta dias de armazenamento houve diferença significativa entre os parâmetros de adesividade, dureza e gomosidade para os dois tratamentos, controle e recobrimento com filme comestível contendo AgNPs. Estas diferenças foram associadas ao crescimento de bactérias ácido lácticas nas salsichas controle, que causaram oxidação proteica e consequente oxidação lipídica nas salsichas, o que não ocorreu com as salsichas recobertas com AgNPs que controlaram o crescimento bacteriano.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, revestimento comestível e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

MARCHIORE, Nicoli Grecco. Silver diffusion of evaluation covered sausages with edible films containing antimicrobial nanoparticles. 2015. 43 f. Work Completion of course (Food Engineering) - Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2015.

Lactic acid bacteria slime producing in sausages can have their growth inhibited by means of edible coatings that contain in their formulation antimicrobial compounds. Silver nanoparticles (AgNPs) are known antimicrobial agents that may be synthesized by green methods, allowing its application in foods. However, its use is only suitable in low concentrations due to possible cumulative effects on the human body. Thus the objective of this work was the green synthesis of silver nanoparticles and their application on edible starch film in sausages to control the growth of lactic acid bacteria. The sausages were evaluated during time intervals of 0, 15 and 30 days regarding on concentration of AgNPs by Mass Spectroscopy Inductively Coupled Plasma (ICP-MS) and to its texture by the "texture profile analysis" (TPA). The sausages were initially subjected to washing, cooking and finally crushed. Samples were taken at every step of preparation for ICP-MS evaluation. Samples removed from cooking water indicated that the highest concentration of AgNPs remains at this stage. The concentration of AgNPs at the crushed sausages remained at 0.5 µg / L for 15 and 30 days storage. Analysis of sausages texture profile showed that after thirty days of storage there was significant difference between the adhesion parameters, hardness and gumminess for both treatments, control and covered by AgNPs. These differences were related to the growth of lactic acid bacteria at control sausages drove to protein oxidation and consequent in lipid oxidation. On the other hand the sausage covered with AgNPs controlled bacterial growth and did not presented texture variation.

Key-words: Silver nanoparticles, edible coating, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de TPA de dois ciclos de penetração um pedaço de carne de costela de *longissimus thoracis*.

Figura 2. Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata sintetizadas.

Figura 3. Concentração de AgNPs nas amostras após a lavagem das salsichas, cozimento e das salsichas trituradas em água.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da análise de textura (TPA) das salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata 0 dias após o tratamento.

Tabela 2. Parâmetros da análise de textura (TPA) das salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata 15 dias após o tratamento.

Tabela 3. Parâmetros da análise de textura (TPA) das salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata 30 dias após o tratamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/L: micro(10^{-6}) grama por litro

Ag: Prata

Ag⁺: íon Prata

AgNO₃: Nitrato de prata

AgNPs: Nanopartículas de prata

CMI: Concentração inibitória mínima

DLS: Espalhamento de luz dinâmico

Dz: Diâmetro médio em intensidade

FWHM: Full width at half maximum

ICP-MS: Espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado

IPD: Índice de polidispersão

nm: Nanômetro (10^{-9} m)

NPs: Nanopartículas

OMS: Organização mundial de saúde

SPR: *Surface Plasmon Resonance*

TPA: Texture profile analysis - análise do perfil de textura

USEPA: United States Environment Protection Agency

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Embalagens antimicrobianas	15
2.2. Nanotecnologia, nanopartículas de prata e a síntese verde	16
2.3. Toxicidade da prata e a segurança da ingestão de AgNPs	18
2.4. Filmes antimicrobianos comestíveis de amido para aplicação em produtos cárneos	20
2.5. Efeito do revestimento sobre as propriedades de textura dos alimentos	21
3. OBJETIVO.....	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Materiais	24
4.2. Obtenção das nanopartículas de prata	24
4.3. Caracterização das Nanopartículas de prata	24
4.4. Aplicação das nanopartículas de prata	25
4.5. Avaliação da concentração de AgNPs nas salsichas.....	25
4.6. Avaliação da textura das salsichas recobertas com filme comestível de AgNPs.....	26
4.7. Análise estatística	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5.1. Caracterização das nanopartículas de prata.....	27
5.2. Avaliação da concentração de AgNPs por espectrofotometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	28
6. CONCLUSÃO.....	33
7. AGRADECIMENTOS	34
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	35
9. REFERENCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios depende diretamente de fatores de natureza química, física e biológica que atuam sobre o alimento durante o período de tempo entre sua produção e seu consumo. Para que o alimento permaneça em condições adequadas muitas formas de conservação são utilizadas, seja isoladamente ou combinadas, como tratamento térmico, radiação, incorporação de aditivos e embalagens (MIDIO e MARTINS, 2000).

A prata foi usada durante séculos como um antisséptico (BREGGIN *et al.*, 2009) porém na forma de nanopartículas tem uma superfície de contato muito maior e suas propriedades são enormemente aumentadas (YOON *et al.*, 2007). Outras vantagens a serem citadas podem ser a estabilidade térmica e às radiações de UV / Visível (CONWAY, EYLES e ALPAR, 1997). As propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido cada vez mais exploradas em produtos de consumo, tais como desodorantes, roupas, bandagens, bem como em produtos de limpeza.

Revestimentos comestíveis têm sido utilizados para proteger produtos alimentares perecíveis de deterioração retardando a desidratação, melhorando a textura, a qualidade, ajudando a reter os compostos voláteis de aroma e a redução do crescimento microbiano (DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY, 1998). Embalagens comestíveis especialmente formuladas podem fornecer proteção adicional contra a contaminação de microrganismos (CHO, 2005).

Filmes comestíveis contendo nanopartículas com atividade antimicrobiana podem ajudar a controlar o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores na superfície dos alimentos (AZEREDO, 2009), como o caso de produtos cárneos que são suscetíveis a bactérias lácticas (KIM, CHO e HAN, 2013).

A efetividade do uso de nanopartículas de prata como agente antimicrobiando adicionado a filmes comestíveis vem sendo investigado por diferentes grupos de pesquisa (An *et al.*, 2008; Jiang, Feng e Wang, 2013; Costa *et al.*, 2012). Contudo a migração das nanopartículas do revestimento para o interior dos alimentos pode acarretar consequências toxicológicas ao consumidor bem como comprometer as propriedades de textura do mesmo. A síntese verde de nanopartículas visa à utilização de organismos biológicos, ou

partes deles (como órgãos, tecidos, células ou biomoléculas), como substituintes de reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese de nanocompostos, apresentando-se como uma alternativa sustentável.

Dessa forma, observando as informações apresentadas na literatura é possível concluir que existe viabilidade para produção de nanopartículas de prata utilizando técnicas de síntese verde e que a incorporação das mesmas a filmes comestíveis é conveniente para conservação dos alimentos. Então, é proposto neste projeto, caracterizar as nanopartículas de prata, levando em consideração a importância da síntese verde das AgNPs, avaliar e analisar a propriedade de textura de salsicha após aplicação superficial das AgNPs, bem como sua concentração no interior deste alimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Embalagens antimicrobianas

De um modo geral, as embalagens fornecem proteção e aumentam a qualidade ao produto, prolongando sua vida de prateleira, em especial para aqueles alimentos susceptíveis a oxidação e/ou a deterioração microbiana (COMA, 2008).

Segundo Coma (2008), uma alternativa para o desenvolvimento de embalagens ativas são os filmes produzidos a partir de fontes renováveis, pois, possuem capacidade de carregar compostos ativos e, adicionalmente, minimizam o impacto ambiental causado pela utilização dos polímeros sintéticos. A adição de compostos ativos no material da embalagem pode tornar-se mais eficiente que outros métodos de conservação dos alimentos, pois pode fornecer maior segurança ao consumidor, já que o composto ativo presente na embalagem está em contato com a superfície do alimento, possibilitando o aumento da proteção na superfície do produto, onde o crescimento microbiológico e a oxidação lipídica se iniciam. Além disso, a migração do composto ativo, presente na embalagem, para o produto acontece lentamente e, possibilita a redução da quantidade de conservantes no alimento, em relação aos métodos de incorporação direta do mesmo.

Dentre as inovações, as embalagens ativas têm ganhado destaque no mercado mundial. Segundo Pereira *et al.*, (2012), esse sistema proporciona grandes benefícios para a indústria de alimentos, pois, por meio dele, pode-se obter um maior controle nas condições de armazenamento, podendo contribuir para a melhoria da qualidade e aumento da vida de prateleira do produto, em relação às embalagens tradicionais. As embalagens tradicionais devem ser totalmente inertes, isso significa que não deve haver interação entre a embalagem e o alimento (AZEREDO, 2000; SUPPAKUL *et al.*, 2003). Ao contrário deste sistema, as embalagens ativas podem facilitar a interação do produto embalado com o meio em que o alimento se encontra ou com compostos ativos incorporados no sistema da embalagem.

Embalagens antimicrobianas podem eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e sua deterioração. O princípio básico deste tipo de embalagem é acondicionar ao produto uma barreira microbiológica além das

barreiras físicas ao oxigênio e à umidade. Tem sido sugerido que os agentes antimicrobianos podem ser incorporados em sistemas de embalagem de alimentos para criar um ambiente que vai manter a sua atividade durante o armazenamento de alimentos (HAN, 2003).

De acordo com Santiago e Silva *et al.* (2009), um dos tipos de sistema antimicrobiano em alimentos inclui a aplicação de revestimentos comestíveis com o componente antimicrobiano, e a incorporação de agentes antimicrobianos diretamente ao material da embalagem. Vale ressaltar que a migração do composto ativo, presente na embalagem, para o produto acontece lentamente (COMA, 2008) o que possibilita a redução da quantidade de conservantes no alimento, em relação aos métodos de incorporação direta do mesmo. Além disso, quando o agente é incorporado diretamente ao alimento, em determinados produtos, como por exemplo, em produtos cárneos, a substância ativa pode inativar os compostos nutricionais presentes no produto (COMA, 2008).

Portando, os filmes ativos podem apresentar propriedades funcionais, como capacidade antioxidante e antimicrobiana. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas, visando-se avaliar a estabilidade de produtos alimentícios embalados com esses filmes à base de fontes renováveis aditivados com substâncias ativas. Segundo Lee (2011), a liberação de antioxidante para a superfície do alimento pode inibir a oxidação química e/ou reações enzimáticas durante o armazenamento do produto e a liberação de composto usado pode reduzir o crescimento microbiano.

2.2. Nanotecnologia, nanopartículas de prata e a síntese verde

Nanomateriais são estruturas que têm dimensões na escala do nanômetro (nm), ou seja, um bilionésimo (10^{-9}) de um metro, com tamanho estabelecido entre 1 e 100 nanômetros. Estes materiais podem apresentar diferentes propriedades físicas, químicas e/ou biológicas, abrindo muitas novas possibilidades para a nanotecnologia (SUDARENKOV, 2012).

A nanotecnologia é responsável pela produção e estudo de nanopartículas metálicas. Essas estruturas apresentam várias aplicações onde se destacam atividade antimicrobiana, a qual é uma ferramenta importante na

ação contra microrganismos resistentes a drogas e antibióticos convencionais (SHENASHEN *et al.*, 2014). As nanopartículas metálicas e seus óxidos têm inúmeras aplicações, especialmente medicinais, pela ação dos íons e metais reduzidos contra bactérias e fungos patogênicos, graças à sua interação com células vivas (GARCIA, 2011).

A utilização da prata na forma de nanopartículas potencializa a ação bactericida, pois implica que ela tem uma área superficial grande para ficar em contato com a célula bacteriana (SANTOS, 2010). Estudos realizados utilizando nanopartículas de prata como agentes bactericidas mostram que as nanopartículas de prata menores que 10 nm interagem com a bactéria e produzem efeitos eletrônicos, que aumentam a reatividade das nanopartículas concluindo-se que o efeito bactericida das nanopartículas de prata é dependente do tamanho das mesmas (PANACEK *et al.*, 2006).

As AgNPs são um novo tipo de material com várias aplicações, tais como sensores, catalisadores, agentes anticancerígenos e agentes antimicrobianos. Conforme Kashyap *et al.* (2013), AgNPs exibiram atividade contra bactérias, fungos e vírus. No entanto, a síntese convencional de AgNPs, que se utiliza de agentes redutores como boro hidreto de sódio, produz resíduos tóxicos, o que pode afetar a saúde humana e para o ambiente (SHENASHEN *et al.*, 2014).

A síntese verde de nanopartículas visa à utilização de organismos biológicos, ou partes deles (como órgãos, tecidos, células ou biomoléculas), como substituintes de reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese de nanocompostos, apresentando-se como uma alternativa sustentável. De acordo com Albernaz (2014), pode-se definir nanobiotecnologia verde quando a mesma é baseada em princípios limpos de sínteses de nanopartículas, como, por exemplo, a partir de processos biotecnológicos.

Conforme Rai (2009), a síntese verde, síntese biológica e síntese biogênica são termos comumente usados para a síntese ecologicamente correta de nanopartículas. Normalmente, as nanopartículas são sintetizadas através de métodos químicos, físicos e biológicos. As sínteses físicas e químicas possuem consumo intensivo de energia e às vezes podem envolver substâncias químicas tóxicas, enquanto as técnicas biológicas são rentáveis, limpas, atóxicas e ecologicamente corretas.

Dentre os agentes redutores utilizados para formar as nanopartículas de prata existem opções que seguem a tendência da química verde. As técnicas do polissacarídeo, do ácido ascórbico e modificações destas são sínteses verdes já estudadas para preparação das AgNPs (GHASEMINEZHAD, HAMED I e SHOJAOSADAT, 2012; KHAN *et al.*, 2013). Alguns açúcares, como a D-glicose, têm propriedades redutoras e são utilizados na produção de nanopartículas. O processo não prejudica o meio ambiente porque não produz resíduos tóxicos e não requer o uso de nenhum catalisador. Em estudos anteriores utilizou-se glicose como agente de redução (OLUWAFEMI *et al.*, 2013).

De acordo com Morones *et al.*, (2005), a atividade antibacteriana depende do tamanho das partículas. Pequenas partículas exibem maior atividade antimicrobiana do que as partículas maiores. Este resultado possivelmente se deve à maior penetração das partículas no interior dos microrganismos quando estas têm menores tamanhos. Alguns estudos sugerem que os íons prata liberados reagem com grupos SH de proteínas e desempenham um papel essencial na inativação bacteriana (DURÁN, *et al.*, 2010).

As AgNPs agem de três maneiras contra bactérias gram-negativas: primeiramente nanopartículas de 1 a 10 nm atacam a superfície da membrana da célula e prejudicam funções como permeabilidade e respiração. Em seguida ocorre a penetração na bactéria e consequentes danos, possivelmente pela interação com componentes a base de enxofre e fósforo como o DNA e finalmente as nanopartículas liberam íons de prata, que conferem o efeito bactericida (MORONES *et al.*, 2005).

2.3. Toxicidade da prata e a segurança da ingestão de AgNPs

De acordo com Durán *et al.*, 2010, a nanotecnologia representa uma abordagem moderna e inovadora para desenvolver e testar novas formulações à base de nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas. Nanopartículas de prata representam um nanoproduto proeminente com potencial de aplicação na medicina, área alimentícia e outras áreas.

A prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais, pois a concentração efetiva contra microrganismos é de 0,1 µg/L,

enquanto para seres humanos a concentração tóxica é 10 mg/L (LEVIN *et al.*, 2009; LEITE, 2003). Alguns pesquisadores investigaram a segurança das soluções contendo pequenas concentrações de íons de prata (USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2001; ZHANG, DUAN, E SHAN, 2005). O órgão americano *US Environmental Protection Agency* (USEPA) propôs que o nível máximo de íons de prata em água potável deve ser inferior a 0,10 mg/L (USEPA, 2001).

A absorção da prata através das membranas bucal e gastrointestinal é determinada pelo grau de ionização do composto. A prata torna-se disponível na forma Ag^+ , assim, interage com os receptores de proteínas presentes nas membranas celulares. Biologicamente ativa, a Ag^+ se liga prontamente aos constituintes orgânicos de alguns alimentos, como fibras, e também com cátions inorgânicos, reduzindo sua absorção (LANSDOWN, 2010). A extensão da absorção parece estar relacionada com o tempo de trânsito ao longo do trato gastrointestinal, sendo essa explicação dos autores para as diferenças interespecies na retenção de prata, já que o trânsito rápido denota uma menor dose absorvida (ATSDR, 1999).

A meia-vida biológica, ou seja, o tempo necessário para a redução em 50% da prata do organismo é de até 50 dias. O fígado desempenha um papel decisivo na eliminação da prata, já que a maior parte do que é absorvido é eliminado através da bile, pelas fezes (OMS, 2003). Numa revisão de estudos com animais conduzida pela USEPA (United States Environmental Protection Agency), concluiu-se que exposições contínuas com doses de até 0,2 mg/L em água potável, durante o período de 11 meses, não causaram efeitos deletérios. Em doses de 0,5 mg/L foram relatados efeitos imunológicos e diminuição de reflexo.

A prata não é classificável quanto à carcinogenicidade para humanos (IRIS/USEPA, 2011). De acordo com Hussein *et al.*, (2006) o contato das nanopartículas com o corpo humano leva a uma série de processos tais como a ligação e reação com proteínas, fagocitose, deposição, depuração etc. Foi recentemente demonstrado que várias linhagens de células expostas a AgNPs apresentavam diminuição da função das mitocôndrias. No entanto, os mecanismos subjacentes a este efeito ainda não estão esclarecidos, mas provavelmente envolvem a interação entre os íons de prata e grupos SH das proteínas (YACOBI *et al.*, 2007).

Tendo em vista a revisão da literatura, a utilização de nanopartículas de prata em revestimentos comestíveis já foi aplicada a vegetais, porém faltam estudos relacionados a sua aplicação a produtos cárneos, como a salsicha. Além disso, embora existam excelentes propriedades antimicrobianas associadas às AgNPs, estas partículas apresentam efeitos tóxicos quando acima de concentrações iguais a 10 mg/L. Desta forma torna-se imperativa a avaliação da concentração de prata nos alimentos ^{tratados} com tais nanopartículas.

2.4. Filmes antimicrobianos comestíveis de amido para aplicação em produtos cárneos

Uma fina camada de material comestível pode ser utilizada como revestimento depositado diretamente à superfície de um alimento formando um filme sem alterar os ingredientes originais ou o método de processamento do mesmo (KAMEI, 2014).

Filmes e revestimentos comestíveis antimicrobianos são apresentados como uma tecnologia emergente capaz de aumentar a segurança e o prazo de validade dos produtos alimentares quando em contato direto com os alimentos. O seu mecanismo de ação se baseia na liberação controlada de agentes ativos sobre a superfície do produto, onde eles são colocados, portanto, mantendo concentrações eficazes onde e quando eles forem necessários (FERNÁNDEZ-PAN *et al.*, 2014).

A qualidade da carne é altamente dependente da manipulação do animal no pré-abate e da carne no pós abate. Existem três mecanismos envolvidos durante o processamento e armazenamento na deterioração da carne e de produtos cárneos: deterioração microbiana, a oxidação lipídica e oxidação enzimática. A população microbiana pode ser proveniente da microflora nativa do trato intestinal e da pele dos animais ou através de contaminações provenientes do ser humano, no manuseio, armazenamento; além dos ambientais associados à cadeia de produção. O crescimento microbiano na carne pode resultar na formação de limo, degradação de componentes estruturais, diminuição da capacidade de retenção de água, odores, e textura, bem como alterações da aparência. Agentes antimicrobianos ou compostos antioxidantes incorporados no filme comestível podem impedir o crescimento e

deterioração por microrganismos patogênicos, e reduzir a rancificação da gordura de carne, prevenção da descoloração, e ainda a melhoria da qualidade nutricional (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

Entre os materiais de revestimento comestível, o amido é o mais promissor devido as suas propriedades semelhantes com as dos polímeros sintéticos (UTAMI *et al.*, 2014), sendo transparente, inodoro, insípido, semipermeável a CO₂ e resistentes a difusão de O₂ (VASCONEZ *et al.*, 2009), de baixo custo, biodegradável e renovável (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2007). O amido vem sendo utilizado como matriz polimérica para revestimentos comestíveis antimicrobianos aplicados a diferentes produtos cárneos, incluindo peru (JIANG *et al.*, 2011) e filés de peixe *Pangasius* sp. (UTAMI *et al.*, 2014).

A adição de nanopartículas de prata em filmes comestíveis já foi proposta por An *et al.*, (2008) para revestimento antimicrobiano de aspargos, por Jiang e por Feng e Wang (2013) em cogumelos shitake.

2.5. Efeito do revestimento sobre as propriedades de textura dos alimentos

A textura é um dos componentes mais importantes para qualidade organoléptica em produtos cárneos. A textura, como o sabor, é um atributo de vários parâmetros (GONZÁLES-FERNANDES *et al.*, 2006). O crescimento microbiano pode gerar alterações na textura da carne (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

As propriedades de textura estão intimamente relacionadas à deformação, desintegração e ao fluxo do alimento, sob a aplicação de uma força. São objetivamente medidas pelas funções: tempo, força, massa e distância (GIESE, 1995). A viscosidade pode ser definida como a fricção interna de um fluido ou sua tendência a resistir ao fluxo, ou seja, é uma medida da intensidade da interação energética entre as moléculas do fluido. A distinção entre textura e viscosidade parece bastante simples; viscosidade relaciona-se a alimentos fluidos, ou seja, que apresentam propriedade de escoamento, já a textura relaciona-se a alimentos sólidos (CAMPOS, 1989; GIESE, 1995).

Dureza, adesividade, elasticidade, gomosidade, coesividade e espalhabilidade são características de textura que dependem da estrutura e do

rearranjo das moléculas de proteína. Estes parâmetros podem ser analisados pelo método de TPA (*Texture Profile Analysis*) apresentado na figura 1, aplicável tanto para medidas sensoriais como instrumentais. O método instrumental consiste em comprimir o alimento pelo menos duas vezes e quantificar os parâmetros mecânicos a partir das curvas de força-deformação (GIESE, 1995).

A dureza é definida pelo pico de força durante o primeiro ciclo de compressão, expressa em quilograma. A elasticidade é definida como a capacidade da amostra para recuperar seu formato original depois de sofrer uma força de deformação, expressa em [cm] (entre o final da primeira mordida e início da segunda). A coesão é calculada como a razão entre a área da curva sob a segunda compressão e a área da curva da primeira compressão, expressando o grau em que a amostra poderia ser deformada antes da ruptura. Mastigabilidade é o produto de dureza, elasticidade e coesividade e expressa em [kg.mm] (GONZÁLES-FERNANDES *et al.*, 2006).

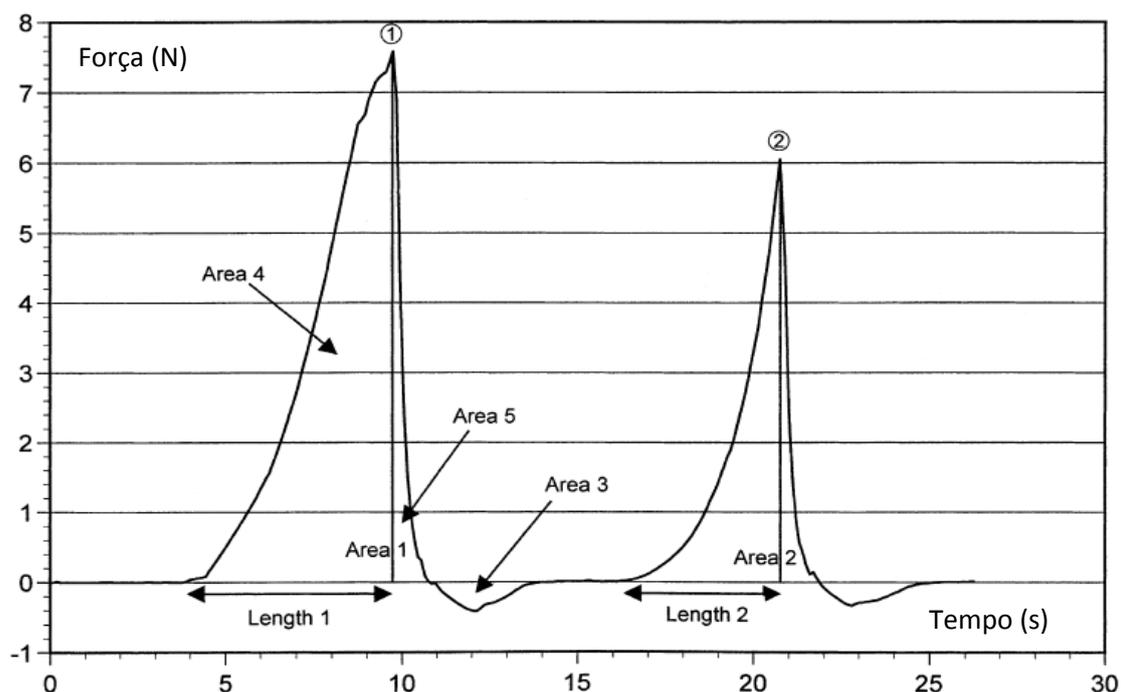


Figura 1. Diagrama de TPA de dois ciclos de penetração um pedaço de carne de costela de *longissimus thoracis*, onde: dureza é a força máxima; coesividade = área 2/área 1; espalhabilidade = altura 2/altura 1; resiliência = (área 1 - área 2) / 2; mastigabilidade = Dureza x coesividade x espalhabilidade; adesão = área 3.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi revestir salsichas com filme comestível contendo nanopartículas de prata e avaliar sua segurança de consumo quanto à concentração de prata metálica.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar as AgNPs pela técnica de síntese verde do polissacarídeo;
- Caracterizar as AgNPs quanto ao diâmetro médio utilizando Espectrofotometria UV-Vis e Espalhamento Dinâmico de Luz (diâmetro);
- Aplicar as AgNPs em salsichas e embalá-las a vácuo, bem como o grupo controle (sem tratamento);
- Caracterizar a concentração total de AgNPs na solução de síntese, na água de lavagem, na água de cozimento e no interior das salsichas, por Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) durante diferentes períodos de armazenamento;
- Avaliar a textura das salsichas recobertas com filme comestível contendo AgNPs e o grupo controle em função do tempo de armazenamento;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Amido solúvel (Merk), D-glicose (Isofar) e nitrato de prata (Proquímios) foram utilizados na síntese das nanopartículas de prata. As salsichas de frango foram adquiridas em um mercado local, na cidade de Campo Mourão-PR, em 4 pacotes de 0,360 kg/cada da mesma marca e do mesmo lote.

4.2. Obtenção das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram produzidas pela técnica do polissacarídeo modificado (GHASEMINEZHAD, HAMED I e SHOJAOSADATI, 2012). O nitrato de prata é reduzido por D-glicose e o amido é usado como estabilizante para prevenir aglomeração das nanopartículas. Foram preparadas as soluções de nitrato de prata (0,0420g em 10 mL de água destilada) e de D-glicose (0,0450 g em 10 mL de destilada). Para a preparação da solução de amido, foi pesado 0,5 g de amido e posteriormente solubilizados em 50 mL de água destilada aquecida a 90°C para a gelatinização do amido. Com o auxílio de uma proveta, 2,0 mL da solução de nitrato de prata e 4,0 mL da solução de D-glicose foram misturados à 50 mL da solução de amido. Finalmente, a solução resultante foi autoclavada a 121°C e 15 psi, por 15 minutos. Ao final do procedimento a solução apresentou coloração amarelo marrom, indicando a formação das AgNPs (GHASEMINEZHAD, HAMED I e SHOJAOSADATI, 2012).

4.3. Caracterização das Nanopartículas de prata

Foram determinados o tamanho da partícula e o índice de polidispersão utilizando o espectro de UV-visível (OCEAN OPTICS, USB650UV) através do cálculo da largura à meia altura (*Full-Width at Half Maximum*, FWHM), bem como o diâmetro médio de partícula pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, MALVERN - Zetasizer Nano S) (MANSO, 2014). Para as

medidas de UV-Vis e DLS uma cubeta de quartzo de 1 centímetro foi utilizada e a amostra foi analisada sem diluição prévia.

4.4. Aplicação das nanopartículas de prata

A solução de amido contendo as nanopartículas de prata (56 mL) foi inicialmente diluída para alcançar a concentração mínima inibitória (CMI = 37,5 mg/L), obtida anteriormente por Manso (2014), para o microorganismo mais resistente avaliado (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538) totalizando 224 mL de solução para aplicação. Todos os materiais e utensílios que foram utilizados no procedimento foram previamente esterilizados em autoclave (Prismatec). Para isso, as salsichas foram mergulhadas durante 1 minuto na solução contendo AgNPs anteriormente diluída. Em seguida as salsichas recobertas com a solução de AgNPs foram embaladas a vácuo em embaladora (Sulpack), sendo 3 salsichas em cada embalagem, em duplicata para cada intervalo de tempo de armazenamento avaliado (0, 15 e 30 dias). O mesmo método foi realizado para as salsichas sem o recobrimento com filme comestível (controle). As amostras foram armazenadas na geladeira a 10°C.

4.5. Avaliação da concentração de AgNPs nas salsichas

A concentração de prata metálica presente nas amostras foi determinada por Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), marca Perkin Elmer, modelo Nexlon 300 D, Shelton, USA. As salsichas recobertas com o filme comestível contendo AgNPs foram inicialmente removidas da embalagem a vácuo (3 salsichas), pesadas em balança analítica e lavadas em 1L de água destilada, que foi armazenada para análise (amostra lavagem). Em seguida as salsichas foram cozidas em água destilada por 5 min e a água após o cozimento também foi armazenada (amostra cozimento). As salsichas cozidas foram então trituradas em liquidificador doméstico com 1L de água destilada. A suspensão resultante foi centrifugada em uma centrífuga para eppendorf's (Mini Spin Plus, Eppendorf) por 30 minutos a 14.500 rpm, e então armazenadas (amostra salsicha). Todas as amostras foram armazenadas em um freezer (-18 °C). Este procedimento foi

realizado após 15 e 30 dias de armazenamento das salsichas embaladas a vácuo.

4.6. Avaliação da textura das salsichas recobertas com filme comestível de AgNPs

A análise do perfil de textura instrumental (TPA) (BOURNE, 1978; GONZÁLEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2006) foi realizada com um analisador de textura TA-XT Express (Stable Micro Systems). Uma sonda cilíndrica de 5 cm de diâmetro foi usada para realizar a análise e o Software Expression foi utilizado para análise dos dados. Seis amostras de formato cilíndrico (2,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura) para cada condição experimental foram compactadas duas vezes até 50% da sua altura original. A velocidade foi mantida constante (1 mm/s). O teste foi realizado à temperatura ambiente e os parâmetros determinados a partir das curvas força-tempo foram adesividade, espalhabilidade, mastigabilidade, gomosidade, coesividade, resiliência e dureza.

4.7. Análise estatística

Os resultados obtidos para concentração de prata nas amostras e os parâmetros de TPA foram avaliados pelo teste-t a 95% de confiança no software Statistica 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização das nanopartículas de prata

As AgNPs foram caracterizadas quanto a largura à meia altura, obtida a partir do espectro UV-Vis da solução coloidal de prata sintetizada, apresentado na Figura 2.

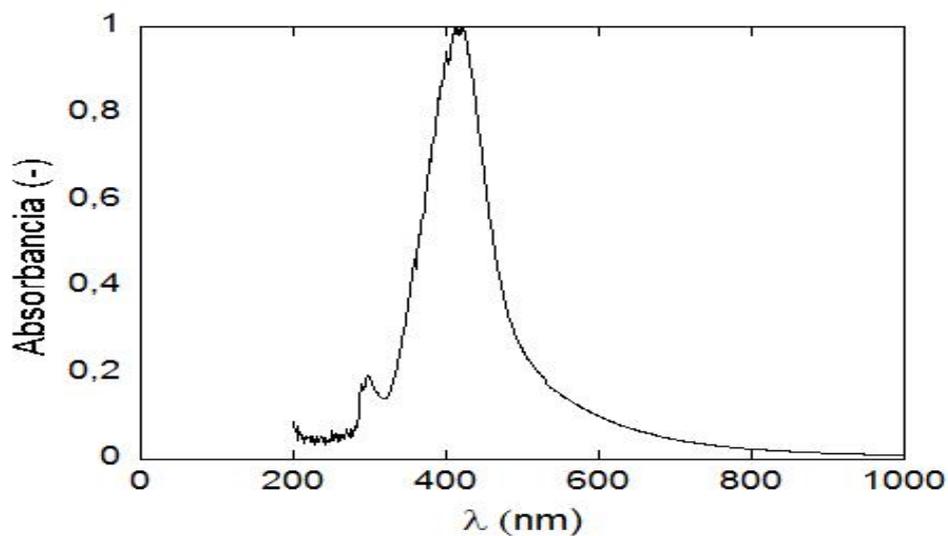


Figura 2. Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata sintetizadas.

É possível observar que o espectro apresenta distribuição bimodal com maior intensidade em 420 nm e um ombro de menor tamanho a esquerda (300 nm). A largura à meia altura calculada apresentou valor igual a 140 nm. Vigneshwaran *et al.*, (2006) analisaram AgNPs estabilizadas com amido solúvel observando também o pico de ressonância em 420 nm.

De acordo com Klabunde (2001) a absorbância de amostras de prata na região de comprimento de onda entre 380 a 450 nm é característica da presença de AgNPs em solução, devido a sua banda de ressonância de plasmon de superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). Ainda, quando apenas uma única banda de plasmon é obtida no espectro de absorção, nanopartículas esféricas compõe o colóide, enquanto partículas anisotrópicas (não esféricas) podem dar origem a duas ou mais faixas de plasmon dependendo das formas diferentes das nanopartículas (KLABUNDE, 2001).

De acordo com os resultados observados no espectro obtido experimentalmente as bandas de plasmon são ampliadas com uma cauda de

absorção nos comprimentos de onda mais longos, o que de acordo com Mulvaney (1996) pode ser devido à maior distribuição do tamanho das partículas. Um aumento desta largura sugere que ocorreu um processo de aglomeração (SON *et al.*, 2006). Em geral, a largura da banda de absorção de plasmon ressonante diminui à medida que a simetria das nanopartículas aumenta (ROCHA, 2010).

Valores de IPD maiores que 0,1 indicam distribuição de tamanhos larga (Leimann *et al.*, 2013).

Foi obtido com a análise de DLS um valor de diâmetro médio em intensidade (Dz) igual a 63 nm e índice de polidispersão (IPD) igual a 0,4 indicando que as nanopartículas possuem uma distribuição de tamanhos larga.

Hamedi *et al.*, (2012) obtiveram nanopartículas de prata sintetizadas pelo mesmo método do presente trabalho com diâmetro médio em intensidade (Dz) igual a 20 nm. Os autores não apresentaram valores de IPD, porém analisando o gráfico da distribuição de tamanhos apresentado pelos autores é possível inferir que a distribuição de tamanho obtida pelos mesmos foi estreita, ao contrário da obtida no presente trabalho. Isto confirma que os valores de (Dz) e largura à meia altura representam diâmetros médios de aglomerados de nanopartículas de menor tamanho.

5.2. Avaliação da concentração de AgNPs por espectrofotometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A concentração de AgNPs foi determinada por ICP-MS para a solução diluída antes do tratamento das salsichas e após o recobrimento das mesmas. Foi determinado que inicialmente a solução continha $23,47 \pm 0,04$ mg/L de prata. Após o tratamento das salsichas (18 salsichas no total) uma nova amostra da solução foi analisada resultando em uma concentração igual a $19,27 \pm 0,12$ mg/L.

As salsichas armazenadas por 15 e 30 dias foram então submetidas à lavagem, cozimento e trituração (amostra salsicha), e os resultados das análises de concentração de prata destas amostras encontram-se apresentados na figura 3 em função do tempo de armazenamento.

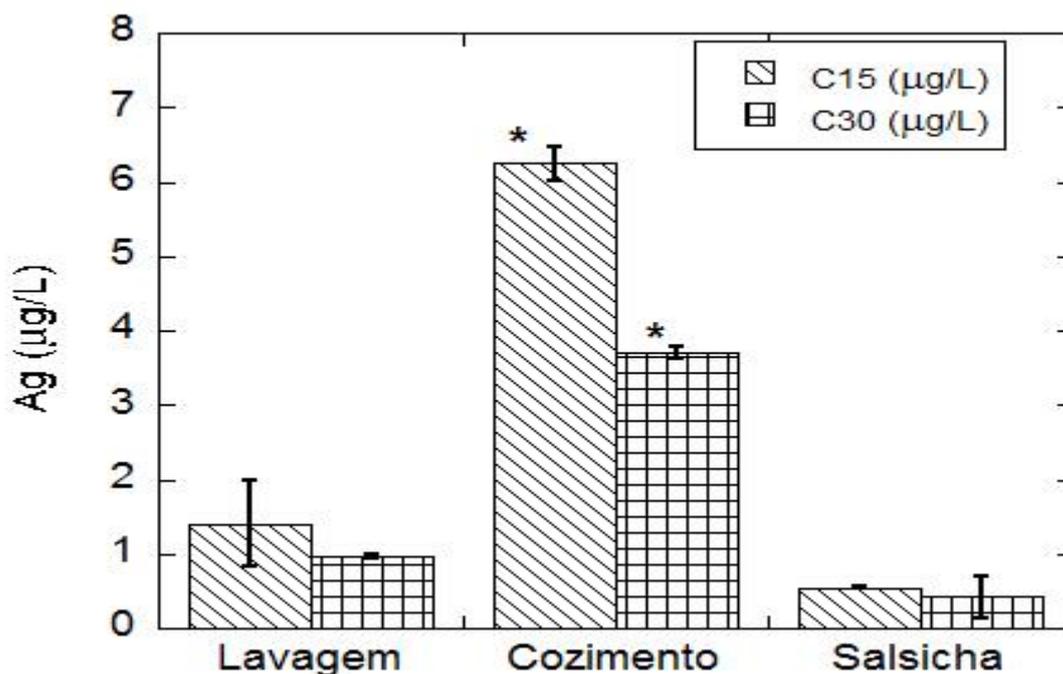


Figura 3. Concentração de AgNPs nas amostras após a lavagem das salsichas, cozimento e das salsichas trituras em água. *diferença significativa pelo teste-t ($p < 0,05$).

As concentrações de AgNPs na amostra de água utilizada para lavar as salsichas antes do cozimento bem como as amostras de salsichas trituras apresentaram concentração de Ag^+ de aproximadamente 1,0 e 0,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. É possível observar que a concentração de Ag^+ das amostras de água de cozimento das salsichas foi maior em ambos os períodos de armazenamento. Além disso, foi detectada, com a análise estatística, que há diferença significativa entre as médias de concentração das amostras de cozimento nos tempos avaliados.

Esse resultado mostra que houve redução da concentração total de prata metálica, ou seja, das AgNPs ao longo do período de armazenamento. Esta redução ocorreu principalmente na superfície das salsichas, já que a diferença significativa foi detectada entre as amostras de cozimento. A redução da concentração está relacionada com a liberação de íons prata a partir da superfície das nanopartículas (DAMM *et al.*, 2008; KUMAR-KRISHNAN, 2015).

De acordo com Sotirious e Pratsinis (2010), quanto menor o diâmetro médio das AgNPs maior a taxa de liberação de íons prata em função da maior área superficial. Os autores ainda afirmam que as nanopartículas com diâmetro menor que 10 nm apresentam maior capacidade de liberar íons Ag^+ . No presente trabalho o diâmetro médio em intensidade encontrado foi 6 vezes

maior, porém não exclui a possibilidade da existência de nanopartículas de tamanhos de 10 nm, já que a distribuição de tamanhos encontrada foi larga (IPD > 0,1).

Com os resultados da Figura 3 pode-se ainda inferir que a simples lavagem das salsichas não é suficiente para eliminar a maior parte das AgNPs presentes. O cozimento mostrou-se essencial para extração da prata e diminuição da concentração residual nas salsichas.

Siqueira *et al.*, (2013) analisaram a toxicidade oral aguda de nanopartículas de prata em ratos e observaram que na concentração de 1mg/L houve degeneração celular no fígado, indicando que o uso dessas nanopartículas nesta concentração somente deve ser utilizada na função de embalagem, sem ingestão como embalagem comestível. No caso do presente trabalho foi detectado o nível máximo de AgNPs de 0,5 µg/L nas salsichas após o cozimento. Esta concentração é 2000 vezes menor do que a avaliada por Siqueira *et al.* (2013).

5.3. Avaliação da textura das salsichas recobertas com filme comestível contendo AgNPs

Os parâmetros obtidos na análise de perfil de textura (TPA) das salsichas controle e recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata estão apresentados em função do tempo de armazenamento nas Tabelas 1, 2 e 3 para 0, 15 e 30 dias respectivamente.

Tabela 1. Parâmetros da análise de textura (TPA) das salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata 0 dias após o tratamento.

Propriedade	0 dias	
	Controle	AgNPs
Adesividade [N.s]	-84,94 ± 0,31	-176,58 ± 0,20
Espalhabilidade [-]	0,92 ± 0,03	0,92 ± 0,02
Mastigabilidade [-]	1642,80 ± 371,10	1559,31 ± 191,05
Gomosidade [-]	1793,58 ± 404,51	1740,27 ± 201,38
Coesividade [-]	0,75 ± 0,03	0,75 ± 0,01
Resiliência [-]	0,43 ± 0,03	0,43 ± 0,01
Dureza [N]	23,54 ± 6,48	22,81 ± 2,95

Tabela 2. Parâmetros da análise de textura (TPA) das salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata 15 dias após o tratamento.

15 dias		
Propriedade	Controle	AgNPs
Adesividade [N.s]	-0,16 ± 0,08	-0,23 ± 0,22
Espalhabilidade [-]	0,98 ± 0,01	0,912± 0,02
Mastigabilidade [-]	2060,52 ± 238,25	2081,47 ± 269,50
Gomosidade [-]	2267,24 ± 255,30	2283,95 ± 294,02
Coesividade [-]	0,71 ± 0,02	0,72 ± 0,02
Resiliência [-]	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,02
Dureza [N]	31,32 ± 4,39	31,43 ± 4,55

Tabela 3. Parâmetros da análise de textura (TPA) das salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata 30 dias após o tratamento.

30 dias		
Propriedade	Controle	AgNPs
Adesividade [N.s]	-0,19 ± 0,16*	-0,40 ± 0,29*
Espalhabilidade [-]	0,92 ± 0,02	0,923± 0,12
Mastigabilidade [-]	1527,32 ± 235,54	1776,90 ± 374,92
Gomosidade [-]	1667,26 ± 257,00*	1910,92 ± 252,71*
Coesividade [-]	0,75 ± 0,02	0,75 ± 0,01
Resiliência [-]	0,42 ± 0,02	0,41 ± 0,01
Dureza [N]	21,72 ± 3,59*	25,27 ± 3,72*

* médias com diferença significativa pelo teste-t ($p < 0,05$).

Os parâmetros da análise de textura da Tabela 1, 0 dias de armazenamento, apresentaram valores adequados para salsichas de acordo com outros autores (AVILA *et al.*, 2014; RUIZ-CAPILLAS *et al.*, 2014).

Para os dois primeiros períodos de armazenamento não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos controle e AgNPs. Porém após 30 dias houve uma redução na adesividade da amostra controle que proporcionou diferença significativa ($p < 0,05$). De acordo com de Ávila *et al.*, (2014) redução na adesividade está relacionada com a redução no teor de gordura.

Outros dois parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os dois tratamentos avaliados foram a gomosidade e a dureza. A redução dos parâmetros indicam o amolecimento da textura da salsicha. Maqsood *et al.*, (2012) avaliaram a adição de ácido tânico como agente antioxidante na formulação de salsichas de peixe e observaram que o controle (sem ácido tânico) apresentava amolecimento da textura após 20 dias de armazenamento a 4 °C. Os autores concluíram que este comportamento provavelmente era resultado da ação proteolítica promovida por enzimas proteases bacterianas.

Ainda de acordo com Lorenzo *et al.*, (2014) os produtos da oxidação de proteínas levam à oxidação de lipídeos, ou seja, alteração da composição da gordura, que possivelmente levou a redução da adesividade.

Korkeala *et al.*, (1988) concluíram em sua investigação que o “limo” formado em produtos cárneos embalados a vácuo é causado por bactérias ácido lácticas. De acordo com Settanni e Moschetti (2010) as bactérias ácido lácticas apresentam um sistema complexo de enzimas proteolíticas em função do requerimento de aminoácidos para seu metabolismo. Dessa forma pode-se concluir que existe um efeito complexo da ação das bactérias ácido lácticas na salsicha: a oxidação proteica seguida da oxidação lipídica. Nas amostras recobertas com filme comestível contendo AgNPs este efeito foi reduzido pelo controle do crescimento das bactérias ácido lácticas previamente apresentado no trabalho antecedente a este desenvolvido por Manso (2014).

6.CONCLUSÃO

Foi possível avaliar durante intervalos de tempo de 0, 15 e 30 dias a concentração de nanopartículas de prata nas salsichas tratadas com filme comestível contendo as mesmas. As salsichas avaliadas foram lavadas, cozidas e trituradas, sendo que em cada um dos passos de preparo as amostras retiradas indicaram que a maior concentração de AgNPs permanece na água de cozimento. A concentração de AgNPs nas salsichas permaneceu em 0,5 µg/L para 15 e 30 dias de armazenamento. A análise do perfil de textura das salsichas demonstrou que após trinta dias de armazenamento houve diferença significativa entre os parâmetros de adesividade, dureza e gomosidade para os dois tratamentos, controle e recobrimento com filme comestível contendo AgNPs. Estas diferenças foram associadas ao crescimento de bactérias ácido lácticas nas salsichas controle, que causaram oxidação proteica e consequente oxidação lipídica nas salsichas. O que não ocorreu com as salsichas recobertas com AgNPs que controlaram o crescimento bacteriano.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária pelo apoio financeiro (Edital Programa Universal/ Pesquisa Básica e Aplicada, chamada 24/2012, convênio 386/2014).

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a oxidação lipídica das salsichas ao longo do tempo de armazenamento;
- Avaliar a oxidação proteica das salsichas ao longo do armazenamento;
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas na concentração de prata ingerida com as salsichas.
- Reavaliar a conservação das salsichas com recobrimento comestível contendo nanopartículas de óxido de zinco ao invés das AgNPs.
- Determinar a cinética de liberação de íons Ag^+ da salsicha para a água.

9. REFERENCIAS

ALBERNAZ, L. V. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. **Dissertação de mestrado** - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, 2014.

AN, J.; ZHANG, M.; WANG, S.; TANG, J. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles- PVP. **LWT**, v. 41, p. 1100–1107, 2008.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. **Silver profile - potential for human exposure** [1999]. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/>> Acesso em: 19 jun. 2015.

AZEREDO, H. M. C.; MATTOSO, L. H. C., WOOD, D.; WILLIAMS, T. G.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H. Nanocomposite Edible Films from Mango Pure Reinforced with Cellulose Nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. 31-35, 2009.

AZEREDO, H.M.C.; Faria J.A.F.; Brito, E.S.S. **Embalagens estabilidade de alimentos**. In: AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 195p. 2000.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, 62–66, 1978.

BRASEC. **Manual de auxílio do software XY – Texture Analyser**, 1998.

BREGGIN, L.; FALKNER, R.; JASPERS, N.; PENDERGRASS, J. and PORTER, R. Securing the Promise of Nanotechnologies. **Royal Institute of International Affairs**, 2009.

CAMPOS, S. D. Metodologia objetiva para avaliação de parâmetros de textura. In: CAMPOS, S. D. **Reologia e Textura de Alimentos**. Campinas: ITAL, p. 43-59. 1989.

CHIOU, J.-R.; LAI, B.-H.; HSU, K.-C.; CHEN, D.-H. One-pot green synthesis of silver / iron oxide composite nanoparticles for 4-nitrophenol reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248-249, p. 394–400, 2013.

CHO, K. H.; PARK, J. E.; OSAKA, T.; PARK, S. G. The Study of Antimicrobial Activity and Preservative Effects of Nanosilver Ingredient. **Electrochimica Acta**. v.51, p.956-960, 2005.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 90-103, 2008.

CONWAY, B.R., EYLES. J., ALPAR, H. A comparative study on th immune responses to antigens in PLA and PHB microspheres. **Jounal of Controlled Released**. 1-9, 1997.

COWAN, M. M. Antimicrobial Efficacy of Silver-Zeolite Matrix Coating on Stainless Steel. **Journal of Biotechnology**, v.30,p.102-106, 2003.

DAMM C., MÜNSTEDT H., RÖSCH A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. **Materials Chemistry and Physics**. v.108, p.61–66, 2008.

DE ÁVILA M. R., CAMBERO M. I., ORDÓÑEZ J., HOZ L. I., HERRERO M. A. Rheological behaviour of commercial cooked meat products evaluated by tensile test and texture profile analysis (TPA). **Meat Science**. v. 98. p.310–315. 2014

DEBEAUFORT, F., QUEZADA-GALLO, J. A., & VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packaging: A review. **Critical Review in Food Science**, 38, 299–313. 1998.

DURÁN N., MARCATO P. D., CONTI R., ALVES L. O., COSTA F., BROCCHI M. Potencial de uso de nanopartículas de prata em bactérias patogênicas, sua toxicidade e possíveis mecanismos de ação. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.21. n.6, 2010.

F. V. LEIMANN, L. CARDOZO FILHO, C. SAYE; P. H. H. ARAÚJO. poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by a miniemulsion/solvente evaporation technique. effect of ph bv molar mass and

concentration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 30, n. 02, p. 369 - 377, 2013.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; AND KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ion on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 662–8, 2013.

FERNÁNDEZ-PAN I., CARRIÓN-GRANDA X., MATÉ J. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. **Food Control**. V. 36 p. 69-75, 2014.

GARCIA, M. V. D. 2011. Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, **Faculdade de Engenharia Química**. 89f.

GHASEMINEZHAD, S. M.; HAMEDI, S.; SHOJAOSADATI, S. A. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 467– 472, 2012.

GIESE J. Color measurement in foods as a quality parameter. **Food Technology**. V.54. 1995.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., SANTOS, E. M., ROVIRA J., JAIME, I. The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. **Meat Science**, v. 74. 467-75. 2006.

HAMEDI S., MASUMEH S., GHASEMINEZHAD., SHOJAOSADATI S. A., Comparative study on silver nanoparticles properties produced by green methods. **Iranian journal of biotechnology**, v.10, n. 3, 2012.

HAN, J.H . Antimicrobial foods packaging In: Ahvenainen, R. **Novas técnicas de Embalagem de Alimentos**. p. 50-65, 2003.

HUSSAIN S., JAVORINA A., SCHRAND A., DUHART H., ALI S., SCHLAGER J. **Toxicological Sciences**. v.92, p.456, 2006.

IRIS/USEPA - INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM / UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY SECONDARY DRINKING

WATER REGULATIONS. Disponível em:
<<http://www.epa.gov/iris/subst/0099.htm>> Acesso em: 20 jun. 2015.

JIANG Z., NEETOO R., CHEN H. Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. **Food Microbiology**. v.28. p.1394-1401, 2011.

KAMEL M. S. Utilization of Cactus Dear Peels Mucilage as an Edible Coating of Chicken Meat to Prolong its Shelf Life. **Food Science and quality management**. v.28. 2014.

KASHYAP, P.L., KUMAR, S., SRIVASTAVA, K.A., SHARMA, A.K. Myconanotechnology in agriculture: A perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29. 191-207. 2013.

KHAN, Z.; SINGH, T.; HUSSAIN, J. I.; OBAID, A, Y.; AL-THABAITI, S. H.; EL-MOSSALAMY, E. H. Starch-directed green synthesis, characterization and morphology of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 578–584, 2013.

KIM, S-J., AH CHO, R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of green vegetable extract and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v. 29, p. 112-120, 2013.

KLABUNDE, K. J. – **Nanoscale materials in chemistry**, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

KORKEALA H., SUORTTI T., MAKELA P. Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. **International Journal of Food Microbiology**. v.7. p.339-347, 1988.

KUMAR-KRISHNAN S., PROKHOROV E., HERNANDEZ-ITURRIAGA M.,

LANSDOWN, A.B.G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. **Advances Pharmacological Sciences**. p.1-16. 2010

LEE, D. S. Active Packaging. In: SUN, D. W. **Handbook of Frozen Food Processing and Packaging**. Boca Ranton: CRC Press, 2011. Cap. 37, p. 819-836.

LEITE, M. S. **Diferenças Estruturais em Nanopartículas de Ag e Au Coloidais**. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

LEVIN, S.C.; HOFMANN, C.; ALI, A.T.; KELLY, T. A.; MOROSAN, E.; NORDLANDER, P.; WHITMIRE, H.K.; HALAS, J. N. **Magnetic-Plasmonic Core-Shell Nanoparticles**. *Journal American Chemical Society-ACS Nano*, v.3,n.6, p. 1379-1388, 2009.

LORENZO J. M., PATEIRO M., FONTÁN M. C. G., CARBALLO J. Effect of fat content on physical, microbial, lipid and protein changes during chill storage of foal liver pâté. **Food Chemistry**. v.155. p.57–63, 2014.

MANSO, I. J. Avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata. **Trabalho de conclusão de curso**. 42 f, 2014.

MAQSOOD S., BENJAKUL S., KHANSAHEB A., BALANGE. Effect of tannic acid and kiam wood extract on lipid oxidation and textural properties of fish emulsion sausages during refrigerated storage. **Food Chemistry**. V.130. 408–416. 2012.

MELO, N.R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina** (Dissertação de mestrado). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de alimentos, 88p, 2003.

MIDIO, A.F., MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos**. 1ed. 295p, 2000.

MORONES, J.; ELECHIGUERRA, J.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.; RAMIREZ, J. YACAMAN, M. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, p.2346-2353, 2005.

MOTA-MORALES J.D., VAZQUEZ-LEPE M., KOVALENKO Y., SANCHEZ Y. C., LUNA-BARCENAS G. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**. v.67. p.242–251, 2015.

MULVANEY, P. Surface Plasmon spectroscopy of nano size metal particles. **Langmuir**, v. 12, p. 788 – 800, 1996.

OLUWAFEMI, O.S., LUCWAB, Y., GURA, A., MASABEYA, M., NCAPAYI, V., OLUJIMI, O.O. A facile completely 'green' size tunable synthesis of maltose-reduced silver nanoparticles without the use of any accelerator. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.102, p.718-23, 2013.

PANACEK, A.; KOLAR, M.; VECEROVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J.; KRYSTOF, V.; HAMAL, P.; ZBORIL, R.; KVÍTEK, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Biomaterials. **Journal of Biomaterials**. v.30, p.6333-6340, 2006.

PEREIRA-DE-ABREU, D. A.; CRUZ, J. M.; LOSADA-PASEIRA, P. Active and Intelligent Packaging for the Food Industry. **Food Reviews International**, New York, v. 28, n. 2, p. 146-187, 2012.

RAI, M., GADE, A. and YADAV, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnologic Advanced**. Vol.27, nº.1, p.76-82, 2009.

ROCHA, R. R. **Química verde: síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais**. Florianópolis, SC, 2010.

RUIZ-CAPILLAS C., HERRERO A.M., TAHMOUZI S., RAZAVI S. H., TRIKI M., RODRIGUEZ-SALAS L., SAMCOVA K., JIMENEZ-COLMENERO F. Properties of reformulated hot dog sausage without added nitrites during chilled storage. **Food Science and technology internacional**, 2014.

SÁNCHEZ-ORTEGA I., GARCÍA-ALMENDÁREZ B. E., SANTOS-LÓPEZ E. M., AMARO-REYES A., BARBOZA-CORONA E. J., AND REGALADO C. Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. **The Scientific World Journal**. p.18. 2014.

SANTIAGO-SILVA P., SOARES N. F. S., NÓBREGA J. E., JUNIOR M. A. W., BARBOSA K. B. F., VOLP A. C. P., ZERDAS E. R. M. A., WURLITZER, N. J. Eficiência antimicrobiana de filme incorporado com pediocina sobre a preservação de presunto fatiado. **Revista Ceres**. 2009.

SANTOS, O. K. **Nanopartículas de prata estabilizadas pela polietilenoimina linear funcionalizada: formação, caracterização e aplicações catalíticas**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

SETTANNI L., MOSCHETTI G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**. v.27. p.691-697, 2010.

SHENASHEN M. A., EL-SAFY S. A., ELSHEHY E. A. Síntese, controle morfológico e propriedades de nanopartículas de prata em aplicações potenciais. **Revista Fapesp**. 2014.

SHOKROLLAHZADEH S. Comparative study on silver nanoparticles properties produced by green methods. **Iranian Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 3. 2012.

SIQUEIRA M.C., AOUADA M. R. M., CASTRO V. L. S., BRANDÃO H. M., RECH R. R., MARCONCINI J. M., MATTOSO L. H. C. Caracterização e avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata para incorporação em matriz polimérica para uso em embalagens de alimentos. **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. 2013.

SON, W.; YOUK, J.,PARK, W. Antimicrobial cellulose acetat nanofibers containing silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, p. 430–434, 2006.

SONDI, I., & SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid Interface Science**, v.275,p.177–182, 2004.

SOTIRIOU, GEORGIOS A., AND SOTIRIS E. PRATSINIS. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. **Environmental science & technology**. V.44.14, p.5649-5654, 2010.

SUDARENKOV, V. Nanotechnology: balancing benefits and risks to public health and the environment. **Committee on Social Affairs, Health and Sustainable Development**. p.21, 2012.

SUPPAKUL, P. et al. Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 2, p. 408-420, 2003.

UTAMI R., KAWIJI, NURHARTADI E., PUTRA A. Y. T., SETIAWAN A. The effect of cassava starch-based edible coating enriched with *Kaempferia rotunda* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oil on refrigerated patin fillets quality. **International Food Research Journal**. p.413-419. 2014.

VÁSCONEZ, M.B., FLORES, S.K., CAMPOS, C.A., ALVARADO, J., GERSCHENSON, L.N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**. v. 42, p. 762–769, 2009.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch–gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. **Food Chemistry**. v.103, p.255, 2007.

VIGNESHWARAN N., NACHANE R. P., BALASUBRAMANYA R. H., VARADARAJAN P. V. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. **Carbohydrate Research**. v.4. p.341, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Silver in Drinking-water. **Guidelines for Drinking-water Quality**, 2003.

YOON, K.; BYEON, J. H.; PARK, J.; HWANG, J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v.373, p;572–575, 2007.

ZHANG, M., DUAN, Z., & SHAN, W. A study on the preservation of vegetable juices using 'Quasi-nanoscale' silver particles. **International Journal of Food Engineering**, p.1–7, 2005.