

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
*CÂMPUS CAMPO MOURÃO*

ISABELA JORGE MANSO

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS  
EM SALSICHAS RECOBERTAS COM FILME COMESTÍVEL CONTENDO  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

ISABELA JORGE MANSO

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS  
EM SALSICHAS RECOBERTAS COM FILME COMESTÍVEL CONTENDO  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Câmpus* Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann.

Co-orientadora: Profa. Dra. Livia Bracht

CAMPO MOURÃO

2014



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Campo Mourão

Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos  
Engenharia de Alimentos



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM SALSICHAS RECOBERTAS COM FILME COMESTÍVEL CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

por

**ISABELA JORGE MANSO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 06 de março de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann  
Orientadora

---

Prof. Dr. Alberto Cavalcanti Vitorio  
Membro da banca

---

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai  
Membro da banca

---

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

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor, carinho e apoio, pelos valores e conselhos valiosos, pela dedicação, paciência, estímulo, força, se não fosse por vocês não estaria aonde cheguei, não teria ido tão longe. Esta é mais uma etapa de muitas que virão em nossas vidas. Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida e as que mais amo. Obrigada por tudo.

A minha amiga Laís, em especial, pela cumplicidade, amizade, carinho, compreensão, apoio, suporte e incentivo.

A minha amiga Jéssica que me incentivou e me ajudou nos momentos que mais precisei para concluir esta etapa tão importante.

As minhas amigas e amigos da faculdade que me ajudaram em momentos difíceis, com apoio, orientações, conselhos, durante todos estes cinco anos de curso.

A professora orientadora Fernanda Vitória Leimann pelos ensinamentos, dedicação, paciência, cumplicidade e respeito.

A professora Lívia Bracht pelo suporte, ajuda e por se dedicar também na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela ajuda, e por compartilharmos esta etapa de nossas vidas, tão importante, mas também tão difícil.

Aos professores da UTFPR pelos conselhos, apoio e colaboração e em especial a banca examinadora pela atenção a este trabalho.

## RESUMO

MANSO, Isabela Jorge. Avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em salsichas recobertas com filme comestível contendo nanopartículas de prata, 2014. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

O presente trabalho obteve nanopartículas de prata (AgNPs) com base nos princípios de química verde, utilizando D-glicose como agente redutor e amido como estabilizante, classificados como reagentes não tóxicos ao ambiente e aos seres humanos. As AgNPs foram caracterizadas por meio das técnicas de espectrofotometria de UV-Vis, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Através da espectroscopia de UV-Vis foi possível determinar a presença de AgNPs esféricas pela obtenção de uma banda de absorção a  $\cong 420$  nm e com grau de dispersão adequado (FWHM = 95,08 nm). A técnica de DLS obteve tamanho médio das partículas de 62,88 nm e identificou certo grau de aglomeração das partículas. As formas e a distribuição das AgNPs foram confirmadas através da análise de MEV, na qual se observaram partículas esféricas, bem dispersas e com algumas aglomerações. As nanopartículas de prata na solução também foram identificadas pelo espectro de infravermelho, no qual, ocorreram variações nas bandas características da presença de nanopartículas de prata. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) da solução contendo AgNPs, foram utilizadas as bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A CIM e CBM obtidas foram de 37,50 e 75  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para comprovar a atividade antimicrobiana das AgNPs, salsichas foram recobertas por um filme comestível contendo nanopartículas de prata. As amostras de salsichas contendo AgNPs tiveram sua carga microbiana significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as amostras do controle (sem o filme comestível). As amostras foram avaliadas durante um intervalo de tempo de 0, 15, 35 e 60 dias.

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

## ABSTRACT

MANSO, Isabela Jorge. Evaluation of the growth of lactic acid bacteria in sausages covered with edible film containing silver nanoparticles. 2014. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

The present work produced silver nanoparticles ( AgNPs ) based on the principles of green chemistry, using D- glucose as reducing agent and starch as a stabilizer , classified as non- toxic to the environment and to humans. The AgNPs were characterized by the techniques of UV- visible spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and Fourier Transform Infrared (FTIR). The UV-Vis spectroscopy analysis confirmed the formation of spherical silver nanoparticles with a scan range of  $\cong 420$  nm and full width at half maximum of 95,09 nm. The technique of Dynamic Light Scattering (DLS) showed mean particle size of 62.88 nm and identified degree of agglomeration of the particles. The forms and distribution of AgNPs were confirmed by analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM), in which, with a few well-dispersed and spherical clumps were observed. The silver nanoparticles in solution have also been identified by Fourier Transform Infrared (FTIR), in which changes occurred in the characteristic bands of the presence of silver nanoparticles. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (MBC) of the solution containing AgNPs, bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were used. The MIC and MBC were obtained 37.50 and 75 mg / mL, respectively. To prove the antimicrobial activity of AgNPs, sausages were coated with an edible film containing silver nanoparticles. The samples of sausages containing AgNPs significantly reduced their microbial load ( $p < 0.05$ ) when compared to the control samples (without edible film). The samples were evaluated over a period of 0, 15, 35 and 60 days.

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

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema representando o mecanismo proposto por Stevanović et al. (2011) de formação de nanopartículas de prata: (A) sem agente estabilizante (B) concentração ótima de PGA e (C) com excesso de PGA.....13
- Figura 2-** Ilustração do efeito do íon prata em células de microrganismos.....14
- Figura 3-** Imagens obtidas por TEM onde se visualiza efeitos das nanopartículas de prata sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*: perda da integridade da membrana celular e libertação de compostos intracelulares, (a) células de controle, (b) e (c) células tratadas com nanopartículas de prata.....15
- Figura 4-** (a) célula *e. coli* saudável. (b) célula *e. coli* tratada com Ag<sup>+</sup>.....16
- Figura 5-** Espectro de UV-vis da solução de AgNPs: cálculo da largura á meia altura (FWHM).....26
- Figura 6-** Distribuição de tamanhos das AgNPs obtida por DLS.....28
- Figura 7-** Microscopia das AgNPs sintetizadas pelo método do polissacarídeo modificado (magnificação de 8.000x).....29
- Figura 8-** Espectroscopia de infravermelho de nanopartículas de prata obtidas pela técnica de síntese verde.....30

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Resultados obtidos das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) da solução de AgNPs para cada bactéria .....31
- Tabela 2-** Contagem das colônias de bactérias nas placas de ágar para cada intervalo de tempo: salsichas controle e salsichas com tratamento (AgNPs) .....32
- Tabela 3-** Análise estatística (teste-t) para comparação das médias de contagem de colônias das amostras de salsicha controle e do tratamento com AgNPs. ....32



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
2.1 FILMES COMESTÍVEIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS .....	11
2.2 SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	12
2.3 EMBUTIDOS CÁRNEOS .....	16
2.4 MICRORGANISMOS CAUSADORES DE DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR DE INTERESSE EM SALSICHA .....	17
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 MATERIAS .....	21
4.2 MÉTODOS .....	22
4.2.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	22
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	22
4.2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMAS .....	23
4.2.4 APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	24
4.2.5 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	25
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>26</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	26
5.1.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL .....	26
5.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	27
5.1.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER ..	29
5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA .....	31
5.3 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	32
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos alimentícios seguros apresenta grandes desafios para a indústria de embalagens alimentícias no desenvolvimento materiais que promovam a manutenção da segurança e qualidade dos produtos. Neste contexto, as embalagens alimentícias ativas fornecem algumas funções adicionais em comparação com os materiais tradicionais, que são limitados a proteger o produto contra as influências externas (FORTUNATI et al., 2012).

Existem duas categorias de filmes que apresentam importância nesse sentido: filmes comestíveis e filmes de embalagens poliméricas. Os filmes comestíveis são filmes finos preparados a partir de materiais comestíveis que atuam como uma barreira a elementos externos (fatores como microrganismos, umidade, óleos, gases e vapores) protegendo assim o produto, prolongando sua vida útil e melhorando a sua qualidade. A aplicação dos filmes comestíveis a carnes, aves, peixes frescos, frutas e verduras tem tido crescente interesse, pois proporciona o aumento do tempo de prateleira e qualidade dos produtos (DU et al., 2011).

De acordo com Campos, Gerschenson e Flores (2009) há possibilidade de incorporar nos filmes comestíveis diferentes aditivos, tais como antimicrobianos, antioxidantes, nutracêuticos e agentes aromatizantes. Em particular, a utilização de filmes comestíveis contendo ativos antimicrobianos tem mostrado ser uma ferramenta útil para proteção dos alimentos contra deterioração e para diminuição do risco de crescimento de patógenos. Diversos estudos têm demonstrado que filmes com propriedades antimicrobianas podem reduzir os níveis bacterianos em produtos cárneos (CAGRI, USTUNOL e RYSER, 2006). A prata metálica na forma de nanopartículas vem sendo aplicada a filmes comestíveis visando a inibição do crescimento de microrganismos em alimentos como cogumelos tipo shitake (Jiang, Feng e Wang, 2013), cenouras minimamente processadas (COSTA et al., 2012) e aspargos (AN et al., 2008). Dessa forma torna-se interessante a aplicação das nanopartículas de prata aos produtos cárneos como as salsichas, que podem apresentar alterações causados por microrganismos em condições de aerobiose podemos citar como a limosidade superficial (ALCANTARA et al., 2012)

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FILMES COMESTÍVEIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Filmes comestíveis (revestimentos comestíveis) são definidos como camadas finas de material comestível que são aplicadas em forma líquida sobre a superfície do alimento por imersão, aspersão ou por outro método apropriado (PASCALL e LIN, 2013).

Hidrocolóides apresentam boa aptidão para formar uma matriz contínua e coesa com propriedades mecânicas adequadas em filmes comestíveis (BOURTOOM, 2008; BOURTOOM, 2009). Diversos polímeros formadores de hidrocolóides tem sido estudados na formação de filmes comestíveis como o amido (AVILA-SOSA et al., 2012, VÁSCONEZ et al., 2009), galactomananos (CERQUEIRA et al., 2011), poli(vinil pirrolidona) (AN et al., 2008) e zeína (SCRAMIN et al., 2011).

Filmes comestíveis com propriedades antimicrobianas têm sido desenvolvidos para inibir ou parar o crescimento de microrganismos em superfícies de alimentos (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002). Como a maior intensidade da contaminação microbiana em alimentos se dá na sua superfícies uma alternativa viável à adição de agentes antimicrobianos diretamente aos alimentos ou à sua formulação é o uso de filmes comestíveis, que podem ser mais eficientes (FALGUERA et al., 2011).

São encontrados diversos exemplos de aplicação dos filmes comestíveis com propriedades antimicrobianas em trabalhos da literatura. Como agentes antimicrobianos destacam-se óleos essenciais (BRASIL et al., 2012; ROJAS-GRAÜ, SOLIVA-FARTUNY e MATÍN-BELLOSO, 2009), nanopartículas de óxido de zinco (MENG, ZHANG e ADHIKARI, 2014) e nanopartículas de prata (AN et al., 2008; JIANG, FENG e WANG, 2013). A prata metálica na forma de nanopartículas (AgNPs) tem se apresentado de forma notável como um agente antimicrobiano, ainda mais pela resistência adquirida pelos microrganismos contra diversos antibióticos (RAI, YADAV e GADE, 2009). An et al. (2008) avaliaram o efeito de nanopartículas de prata (AgNPs) incorporadas a um revestimento de polivinilpirrolidona (PVP), sobre aspargos, em relação à perda de peso, quantidade de ácido ascórbico, clorofila total, cor, firmeza e qualidades microbianas. Os

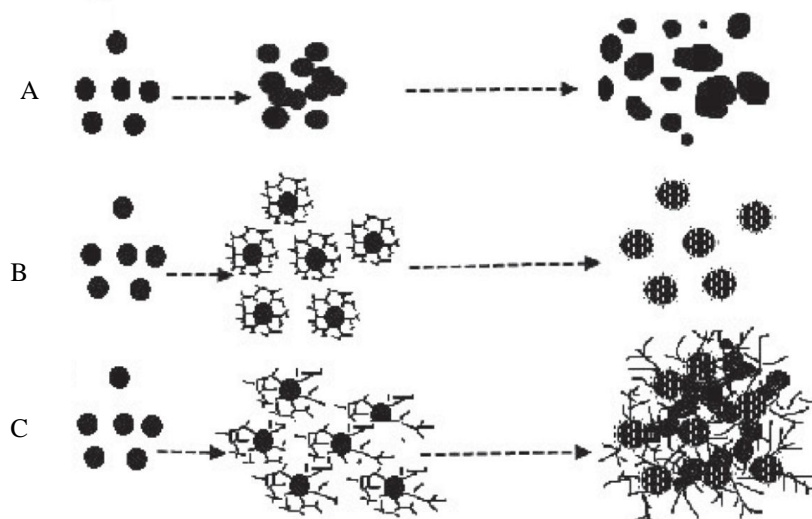
aspargos armazenados entre 2 e 10 °C com revestimento tiveram o crescimento de microrganismo significativamente impedido pela presença das AgNPs. Jiang, Feng e Wang (2013) determinaram o efeito do recobrimento de cogumelos shitake com filme comestível de alginato contendo AgNPs nas características físico-químicas e microbiológicas dos mesmos durante 16 dias a 4 °C. Os autores observaram que o tratamento mostrou-se uma alternativa atrativa à conservação dos cogumelos.

## 2.2 SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

De forma geral a preparação de nanopartículas metálicas envolve o tratamento dos sais metálicos com agentes redutores químicos tais como citrato de sódio, borohidreto de sódio, ou outros compostos orgânicos (HUANG & YANG, 2004). A redução dos íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) em solução aquosa geralmente resulta em prata coloidal com partículas de alguns nanômetros de diâmetro. (VIRENDER et al., 2009; KAPOOR et al., 1994).

Para reduzir ou eliminar as substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente, o desenvolvimento de processos químicos e de produtos “verdes” está se tornando cada vez mais importante na última década (CHIOU et al., 2013). 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, HAMEDİ e SHOJAOSADAT, 2012; KHAN et al., 2013).

O mecanismo de formação das nanopartículas de prata, apresentado na Figura 1, é descrito por Stevanović et al. (2011) onde o poli( $\alpha$ - $\gamma$ -L ácido glutâmico) (PGA) é utilizado como agente estabilizante e nitrato de prata é utilizado como agente redutor. O PGA atua pelo mecanismo de estabilização estérica (KRSMANOVIC, 2003), da mesma forma que outros agentes de estabilização como amido e PVP.



**Figura 1-** Esquema representando o mecanismo proposto por Stevanović et al. (2011) de formação de nanopartículas de prata: (A) sem agente estabilizante (PGA); (B) concentração ótima de PGA e (C) com excesso de PGA.  
**Fonte:** Adaptado de Stevanović et al. (2011).

Stevanović et al. (2011) descrevem que no primeiro passo os íons de prata são reduzidos levando à formação de clusters de prata, em seguida ocorre a redução de íons adjacentes e a sua acumulação nos clusters de prata, seguida pelo crescimento das nanopartículas de prata e estabilização coloidal pelo PGA.

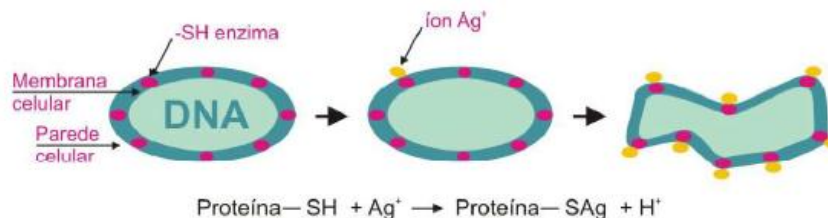
A prata é desde a antiguidade, sob a forma de prata metálica, nitrato de prata e sulfadiazina de prata utilizada para o tratamento de queimaduras, feridas e várias infecções bacterianas. Mas, devido ao aparecimento de vários antibióticos o uso destes compostos de prata foi diminuído expressivamente (RAI, YADAV e GADE, 2009). O efeito bactericida dos íons prata foi quantificado pela primeira vez pelo cientista suíço Karl Wihelm Von Naegelis, em 1983 contra células eucarióticas e procarióticas de algas (SONAI, 2008; DAMM, 2006).

A prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais, pois a concentração efetiva contra microrganismos é de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto para seres humanos a concentração tóxica é  $10 \text{mg.L}^{-1}$ . A dependência com o tamanho permite que as AgNPs potencializem tais propriedades (LEVIN et al., 2009; LEITE, 2003). No entanto, ainda precisam ser ampliados os estudos com a relação a toxicidade e bioacumulação da prata no organismo humano (ROCHA, 2010).

Quando metais são preparados na forma de nanopartículas (1 a 100 nm), espera-se uma melhor característica antimicrobiana devido ao aumento da área de superfície (YOON, 2007). Esta

grande área de superfície das AgNPs proporciona um melhor contato com os microrganismos (KIM et al., 2007; RAI et al., 2009). Adicionalmente, segundo Martinez-Castanon et al. (2008) quanto menores forem as nanopartículas (NPs) maior a sua atividade antimicrobiana no sentido em que maior é a superfície específica, aumentando a reatividade química e a atividade biológica. Assim, as AgNPs com tamanho reduzido e sem agregação são preferíveis nessa aplicação, demonstrando ação contra as bactérias (FERNANDES, 2010).

Algumas propostas foram desenvolvidas para explicar o efeito inibitório do íon prata nas bactérias (CHO et al., 2005). Estudos revelam que os íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) liberados a partir AgNPs (prata metálica) reagem com as proteínas das bactérias, pois estes possuem grande afinidade com grupos fosfatos e com ligações sulfídricas (-SH). A membrana celular bacteriana contém na sua constituição proteínas (que estabelecem ligações -SH) e grupos fosfatos (NETO, 2010). A reação da  $\text{Ag}^+$  com o grupo -SH, produz o grupo (-SAg) muito estável na superfície bacteriana levando a inativação das proteínas, como mostrado na Figura 2 (CHO et al., 2005).

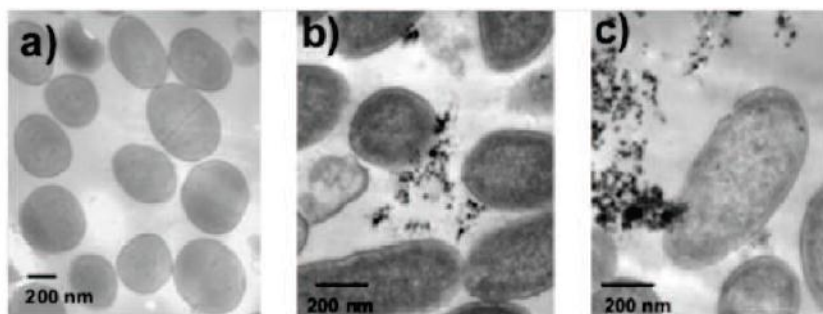


**Figura 2-** Ilustração do efeito do íon prata em células de microrganismos. **Fonte:** Segala (2007).

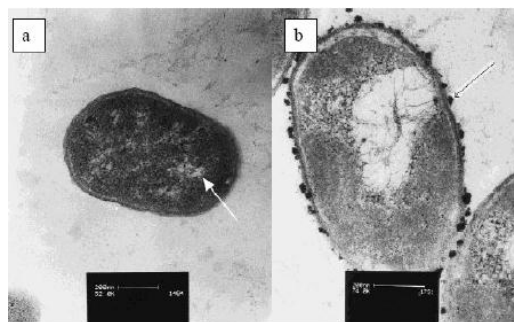
Finalmente, quando as células bacterianas entram em contato com as nanopartículas a multiplicação celular pode ser inibida (ação bacteriostática) ou ocorrer lise celular (ação bacteriolítica) (CASTELLANO et al., 2007). As nanopartículas ao estabelecerem uma ligação com a membrana celular bacteriana podem provocar rupturas tornando a célula permeável, ocorrendo então a liberação do conteúdo intracelular para o exterior e, conseqüentemente, levando a lise celular (AMRO et al., 2000; KIM et al., 2007; SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004). Ao interagir, as nanopartículas podem penetrar para o interior da célula bacteriana. Neste caso, as bactérias mantêm o DNA na forma superenrolada dada a presença das nanopartículas, comprometendo a sua replicação dada a necessidade que este se encontre (transientemente) no estado relaxado (FENG et

al., 2000; LI et al., 2011). A interação das nanopartículas com as bactérias pode também afetar a atividade metabólica através da inibição de atividades enzimáticas dada a sua grande afinidade por ligações -SH. Em particular, formam-se ligações entre proteínas, como é o caso de algumas enzimas intervenientes no metabolismo celular, tornando-as inativas (POMMERVILLE, 2010).

Rocha (2010) analisando resultados do trabalho desenvolvido por Elichiguerra et al. (2005) comenta que nas células de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com nanopartículas de prata ocorre rompimento celular (Figura 3). Para o caso de células de *Escherichia Coli*, estudadas por Levin et al. (2009) e Sonai (2008), em estado normal e após o tratamento do microrganismo com íons prata em excesso, Rosa (2012) analisando as imagens (Figura 4) conclui que somente a superfície da célula contendo os grupos sulfrídila (-SH) é afetada pelos íons  $Ag^+$ . Assim, nesse estudo constatou-se a ausência de prata no interior da célula, indicando possivelmente que a prata na forma de nanopartícula poderia ser, portanto, mais reativa e torna-se mais tóxica. As partículas com tamanhos reduzidos podem passar através da membrana celular, e o acúmulo intracelular de nanopartículas pode levar a uma deficiência no funcionamento da célula.



**Figura 3-** Imagens obtidas por TEM onde se visualiza efeitos das nanopartículas de prata sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*: perda da integridade da membrana celular e liberação de compostos intracelulares, (a) células de controle, (b) e (c) células tratadas com nanopartículas de prata. **Fonte:** Adaptado de Elichiguerra et al. (2005).



**Figura 4-** (a) Célula *E. coli* saudável. (b) Célula: *E. coli* tratada com  $Ag^+$ . **Fonte:** Adaptado de Levin et al. (2009), SONAI (2008).

### 2.3 EMBUTIDOS CÁRNEOS

O processo de industrialização da carne tem a finalidade de buscar um aumento na vida útil dos produtos cárneos e também aproveitar partes do animal que em sua forma in natura seria de difícil comercialização (TERRA, 1998). Nesse sentido o mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que o consumo de produtos cárneos como salsichas, linguiças, mortadelas, hambúrgueres e outros, tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores brasileiros (MELO FILHO e GUERRA, 1998).

Produtos embutidos cárneos podem ser definidos como os produtos elaborados com carne ou órgãos que são comestíveis podendo ser curados ou não, condimentados, podendo ser cozidos ou não, defumado e dessecado ou não, apresentado envoltório natural ou artificial (BRASIL, 1952).

O termo salsicha é definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, ou artificial ou por processo de extrusão e submetido a um processo térmico adequado (BRASIL, 2000). As salsichas são feitas a partir de uma emulsão que consiste em misturar ingredientes hidrossolúveis e ingredientes lipossolúveis em um *cutter*, de preferência a vácuo e baixa temperatura. A mistura resultante, devido a extração das proteínas solúveis, torna-se viscosa e os pedaços de carne tornam-se aderentes. A massa cárnea é então enchida, ou formada, preferencialmente sob vácuo, para prevenir bolsões de ar dentro do produto. As salsichas podem



ter como processo alternativo o tingimento, depelação, defumação e a utilização de recheios e molhos (OLIVIO e SHIMOKOMAKI, 2006).

Conforme dados do MAPA foi registrada em 2006 a produção de 347 mil toneladas de salsichas sob controle do Serviço de Inspeção Federal (SIF), sendo 93,7% da produção destinada ao mercado interno. O valor desse produto o torna acessível a todas as camadas sociais, sendo apreciado, por crianças, adultos e idosos, nas formas mais variadas, sendo aquecido ou não antes do consumo.

Quanto aos aspectos relacionados à segurança, o processamento de salsichas na indústria, tal como de outros alimentos cárneos, deve ser rigorosamente controlado a partir da origem. A contaminação microbiológica da matéria-prima cárnea associada a problemas de manipulação higiênica e desvios de processamento, em particular do cozimento, podem resultar na presença de níveis inaceitáveis de microrganismos deteriorantes ou patogênicos no produto acabado (CESAR, 2008).

No preparo, a salsicha pode ser utilizada sem aquecimento prévio pelo consumidor, que consiste em uma etapa final de destruição e ou redução da população de microrganismos eventualmente presentes no produto. Assim, a qualidade microbiológica do produto deve ser aceitável e rigorosamente garantida como tal no estado em que se encontra na embalagem, sem que o processador assuma que o produto será aquecido antes do consumo, principalmente quando não dispõe dessa informação por meio do rótulo do produto adquirido (PINTO, 1996). Visando manter esta qualidade o recobrimento de cobertura comestível com atividade antimicrobiana deve ser considerado.

#### 2.4 MICRORGANISMOS CAUSADORES DE DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR DE INTERESSE EM SALSICHA

As operações de empacotamento e de corte são os maiores pontos em que patógenos podem ser introduzidos em produtos cárneos cozidos e prontos para comer (CAGRI, USTUNOL, e RYSER, 2006).

De acordo com Gram et al. (2002) carnes e peixes embalados a vácuo inibem o crescimento de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* causando uma mudança da microflora

para bactérias ácido lácticas (BAL), *Enterobacteriaceae* e algumas vezes para *Brochothrix thermosphacta*.

Outros microorganismos comumente relacionados à contaminação de alimentos são *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, formadora de esporos, que pode contaminar alimentos cozidos, cenoura, carne, produtos lácteos, arroz, molhos e sopas (FRIEDMAN et al., 2006). Pode estar presente em produtos cárneos condimentados porque as especiarias são de fácil contaminação por esta bactéria (ANDERSON e PASCUAL, 2000). Esta bactéria é responsável por intoxicações alimentares, caracterizada por uma diarreia e desconforto abdominal ou náuseas e vômitos (SENESI e GHELARDI, 2010) devido à produção de dois tipos de toxina - diarreica e emética. É durante a fase exponencial de multiplicação da bactéria no alimento que são produzidas as toxinas (ALMEIDA et al., 2011).

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos, catalase positivos, que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uvas (TRABULSI et al., 1999). A presença de *Staphylococcus aureus*, é uma indicação de perigo potencial à saúde pública devido à enterotoxina estafilocócica termoestável, bem como à sanitização questionável, principalmente quando o processo de produção envolve manipulação do alimento (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Os seres humanos portadores de *S. aureus* enterotoxigênicos, são os responsáveis pela contaminação que ocorre com os alimentos. A grande maioria dos portadores são assintomáticos, ou seja, não estão doentes, tendo o *S. aureus* em sua flora normal principalmente na região do nariz. As situações que levam à intoxicação alimentar estafilocócica normalmente são: a contaminação das mãos dos portadores com secreção nasal; as mãos dos portadores inoculam o microorganismo no alimento durante seu processamento; a conservação do alimento é feita sem a adequada refrigeração, ocorrendo à multiplicação e a produção da enterotoxina. O cozimento não destrói a enterotoxina, mantendo-se ativa após fervura por 30 minutos ou mais (PELCZAR, 1996). Os alimentos envolvidos são: carne e frango cozidos, presunto, batatas e saladas de batatas, leite, queijo, cremes, chantili e tortas (SILVA JR, 1995). O período de incubação pode ser mais curto que 2 horas, mas geralmente é de 4 a 6 horas. Os sintomas aparecem rapidamente, caracterizados predominantemente por vômitos severos, com diarréias, dores abdominais e câibras, as vezes seguidos de colapsos. A recuperação geralmente se dá em 6 a 24 horas (HOBBS e ROBERTS, 1998).

A *Escherichia coli* são coliformes bacilos Gram-negativos, não esporulado, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Apresenta como habitat natural a flora intestinal de animais de sangue quente, a contaminação pode ser observada em alimentos de origem vegetal e animal, que não tenham passado por processamento ou o mesmo tenha sido realizado de forma errada, e quem tenham entrado em contato com material fecal (PINTO, 1996). A contaminação por *E. coli* pode ocorrer pela contaminação cruzada, entre o contato de alimentos crus com alimentos cozidos, utensílios não higienizados adequadamente, higienização das mãos após o processamento de um alimento e início de outro e principalmente após a utilização dos sanitários (SILVA JUNIOR, 2007). O período de incubação das gastroenterites por *E. coli* é de 12 horas a 3 dias. Os sintomas consistem principalmente em diarreia, algumas vezes com presença de sangue e muco nas fezes. Os microrganismos das espécies de coliformes podem ser inativados pela utilização de sanitizantes desde que aplicados de forma adequada e também esses micro-organismos não resistem ao tratamento térmico (HOBBS e ROBERTS, 1998).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa extremamente versátil, que pode ser encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, onde pode causar infecções oportunistas. Sua participação como patógeno oportunista é resultante de suas mínimas necessidades nutricionais. Além disso, apresenta resistência a uma ampla variedade de condições físicas, incluindo capacidade de se multiplicar mesmo sob refrigeração, com elevadas concentrações de corantes e sais, propriedades que contribuem para sua presença em diversos ambientes (PIRNAY et al., 2005). Possui intensa atividade metabólica, degradando proteínas, gorduras, carboidratos e outros substratos, além de produzir pigmentos, causando alterações nas características químicas e sensoriais, representando o grupo de microrganismos mais frequente em alimentos frescos, tanto de origem animal quanto vegetal. Sua presença em níveis elevados no final do processamento resulta na redução da vida de prateleira dos produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo de grande importância para a indústria de alimentos (GUAHYBA, 2003)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente projeto é sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) através de técnica de baixo impacto ambiental (síntese verde) e aplicá-la em filmes comestíveis.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar as AgNPs quanto ao diâmetro médio utilizando Espectrofotometria UV-Vis e Espalhamento Dinâmico de Luz (diâmetro);
- Caracterizar a morfologia das AgNPs por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Determinar os grupos funcionais presentes na superfície das AgNPs por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Determinadas as concentrações inibitória mínima e bactericida mínima das AgNPs das seguintes bactérias: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar o efeito das AgNPs sobre o crescimento de bactérias lácticas em salsichas recobertas com filmes comestíveis contendo as mesmas.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAS

Amido solúvel (Merk), D-glicose (Isofar) e nitrato de prata (Proquímios) foram utilizados na síntese das nanopartículas de prata. As bactérias Gram positivas, *Bacillus cereus* IAL55 e *Staphylococcus aureus* IAL1875 e bactérias Gram negativas, *Escherichia coli* IAL339 e *Pseudomonas aeruginosa* IAL2081, caldo de soja tríplica (Biomark), caldo Muller-Hinton (Biomark), ágar MRS (Biomak) e solução salina foram utilizados nas análises microbiológicas. Para preparação da solução padrão McFarland de 0,5 foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de bário (Vetec) e ácido sulfúrico (Proquímios). Brometo de potássio (KBr, Sigma Aldrich) foi utilizado para a análise de FTIR. As salsichas foram compradas em um mercado local, na cidade de Campo Mourão-PR, em pacote de 2 kg. As análises foram realizadas no laboratório de análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campo Mourão, onde se encontram instalados os equipamentos necessários para a realização da pesquisa como o espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments) e o Infra Vermelho com Transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu) utilizados na caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs). No laboratório de microbiologia encontra-se a estrutura necessária para preparação das análises de atividade antimicrobiana (geladeira para armazenamento das amostras, autoclave para produção das nanopartículas e esterilização dos materiais, estufa digital para cultura bacteriológica e cabine de segurança biológica para preparação das análises). A morfologia das nanopartículas de prata foi avaliada com o uso do microscópio eletrônico de varredura (MEV-SHIMADZU, SS 550) localizado no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e o tamanho médio das nanopartículas foi determinado por Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dinamic Light Scattering* – DSL), no Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas do Centro de Ciências e Saúde da UFSC utilizando o equipamento Zetasizer, Nano Series da Malvern Instruments.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram produzidas pela seguinte técnica: Síntese Verde - Técnica do Polissacarídeo Modificada (GHASEMINEZHAD, HAMEDI e SHOJAOSADATI, 2012). Foram preparadas as soluções de nitrato de prata (0,0420 g em 10 mL de água Milli-Q) e de D-glicose (0,0450 g em 10 mL de água Milli-Q). Para a preparação da solução de amido foram pesados 0,5 g de amido e posteriormente solubilizados em 50 mL de água Milli-Q aquecida a 90 °C para gelatinização do amido. Com o auxílio de uma proveta 2 mL da solução de nitrato de prata e 4 mL da solução de D-glicose foram misturados aos 50 mL da solução de amido. A solução resultante foi autoclavada a 121 °C e 15 psi por 15 minutos (Primatec). Ao final do procedimento a solução apresentou coloração amarela, indicando a formação das AgNPs.

### 4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Foram determinados o tamanho de 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) (BECHTOLD, 2010). Para as análises de UV-Vis e DLS uma cubeta de quartzo foi utilizada e a amostra foi analisada sem diluição prévia.

A morfologia das nanopartículas de prata foi avaliada com o uso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-SHIMADZU, SS 550). A amostra foi gotejada sobre uma lamínula de microscopia ótica e então deixada secar a temperatura ambiente em dessecador. Após a secagem a amostra foi recoberta com ouro em *sputter*. A análise foi realizada no MEV a 15 kV.

Para a caracterização dos grupos funcionais nas superfícies das nanopartículas utilizou-se Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu) (GHASEMINEZHAD, HAMED I e SHOJAOSADATI, 2012). As nanopartículas foram pesadas secas em estufa (10 mg) e então trituradas com KBr (100 mg). As pastilhas de KBr foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). Finalmente os espectros foram obtidos na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  utilizando 32 acumulações e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMAS

*Preparo dos inóculos bacterianos:* Para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* foram utilizadas bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) e bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Para padronização dos inóculos microbianos, foram selecionadas, pelo menos, de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico, em placa de ágar. Os inóculos de cada cultura foram transferidos com o auxílio de uma alça de semeadura para tubos contendo caldo de soja tríptica. As culturas foram incubadas a 35 °C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5 (em geral, de duas a seis horas) em estufa para cultura bacteriológica. A turbidez da cultura em crescimento ativo foi ajustada com solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5, resultando-se numa suspensão contendo aproximadamente  $10^8$  UFC/mL.

*Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):* A atividade antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas foi avaliada utilizando o método de microdiluição padrão, o qual determina a concentração mínima inibitória (CIM) (MARTINEZ-CASTAÑON et al., 2008). Placas de microtitulação (96 poços) foram utilizadas para os testes. Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de caldo Müller-Hinton (CMH) nos poços da microplaca acrescentando um poço para controle da droga e outra da bactéria. A partir da solução de 50 mL contendo as AgNP foi pipetado 100  $\mu\text{L}$  para o primeiro poço, obtendo-se uma concentração de 1.000  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{L}$  para o poço controle

da solução (contendo as AgNPs). Foram realizadas diluições 1:2 transferindo 100  $\mu\text{L}$  do primeiro poço para os poços subsequentes. Após, foram realizadas diluições 1:10 em tubo Eppendorf da suspensão padronizada ( $10^8$  UFC/mL), obtendo-se uma suspensão de  $10^7$  UFC/mL. Foram pipetados 5  $\mu\text{L}$  desta última suspensão em cada poço, adicionando-se, portanto, 50.000 UFC/poço, exceto no poço controle da solução. Foram utilizadas 2 microplacas (96 poços), uma placa foi dividida para análise de CIM das bactérias Gram positivas e a outra dividida para análise das bactérias Gram negativas. A CIM foi determinada após 24 h de incubação a 37 °C, sendo a menor concentração das AgNP capaz de causar inibição total do crescimento microbiano.

*Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM):* A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada pela transferência de uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível no teste de CIM, para a superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton. Após 48h de incubação a 37 °C em estufa para cultura bacteriológica se definiu a concentração bactericida mínima, que foi a menor concentração capaz de causar a morte do inóculo.

#### 4.2.4 APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A solução de amido contendo as nanopartículas de prata foi aplicada no recobrimento de salsichas de acordo com o resultado obtido na análise de CIM para o microrganismo de maior resistência (menor diluição entre os microrganismos). Todos os materiais e utensílios utilizados no procedimento foram previamente esterilizados em autoclave (Prismatec). Esse procedimento teve como objetivo avaliar o efeito das nanopartículas sobre o crescimento de bactérias nas salsichas durante o armazenamento. Para isso as salsichas foram mergulhadas, durante 1 minuto, na solução contendo AgNPs, anteriormente diluída para atingir a concentração inibitória mínima. Para cada intervalo de tempo em que os testes seriam feitos (0, 15, 30 e 60 dias), 6 salsichas eram recobertas com a solução de AgNPs e embaladas a vácuo (Sulpack), 3 salsichas em cada embalagem, em duplicata. O mesmo método foi realizado para as salsichas sem o recobrimento com filme comestível (controle), ou seja, 6 salsichas eram embaladas a vácuo (3 em cada pacote) para cada intervalo de tempo, para que as análises subsequentes fossem realizadas em duplicata. Todas as



amostras embaladas a vácuo (controle e tratamento com AgNPs), foram armazenadas na geladeira a 10 °C.

#### 4.2.5 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

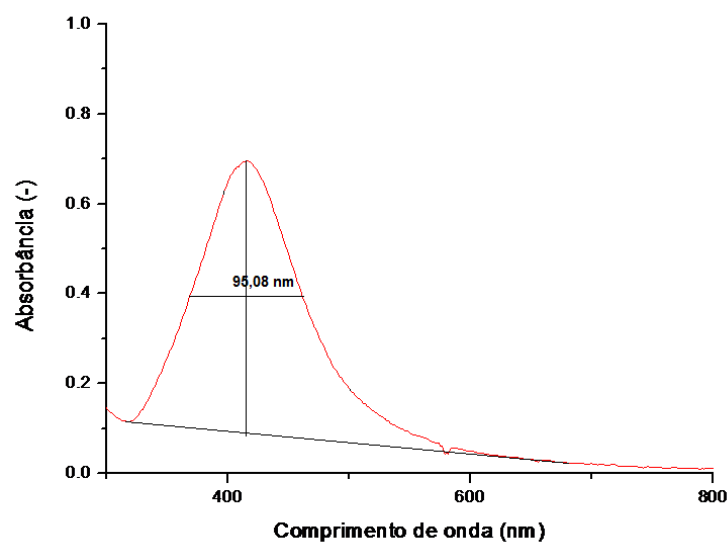
Foi determinada a quantidade de bactérias nas salsichas com e sem tratamento com AgNPs em diferentes períodos (0, 15, 30 e 60 dias). Porções de 25 g de salsicha foram pesadas assepticamente e homogeneizadas com 225 mL de solução salina, durante 60 segundos, em um stomacher (ITR, MR1204). A partir desta diluição ( $10^{-1}$ ), foram realizadas diluições decimais seriadas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Posteriormente 1 mL de cada diluição foram plaqueados, em triplicata, por meio da técnica de semeadura em profundidade em ágar MRS (seletivo para bactérias ácido lácticas). O procedimento foi realizado sob um fluxo laminar (Veco). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas em estufa para cultura bacteriológica (Quimis). Após incubação, as colônias características da espécie foram contadas (Phoenix). Os resultados foram submetidos ao teste-t a um nível de significância de 5% utilizando o *software* Statistica 7.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

#### 5.1.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

O resultado obtido da análise de espectroscopia UV-Vis está apresentado na Figura 5.



**Figura 5** – Espectro de UV-Vis da solução de AgNP: cálculo da largura à meia altura (FWHM).

Na Figura 5 é possível observar a absorção máxima próxima a 420 nm. Fu e Wallen (2002) analisaram o espectro de absorção UV de nanopartículas obtidas utilizando a mesma síntese verde do presente trabalho, D-glicose (agente redutor) e a amido (estabilizante), e obtiveram resultados semelhantes, com comprimento de onda em 419 nm.

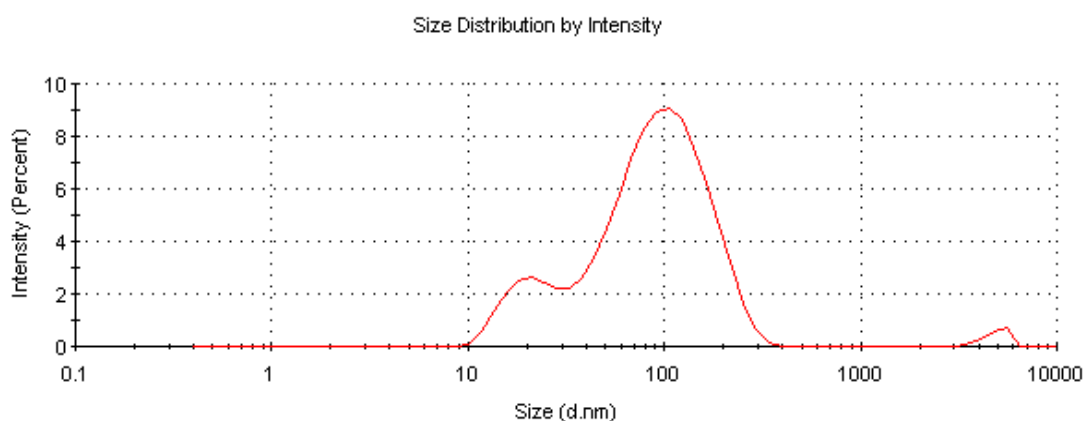
Este pico é característico da presença de AgNPs em solução, devido a sua banda de ressonância de plasmão de superfície (SPR) como descreve a teoria de Mie que prevê um pico acentuado na faixa entre 380 a 450 nm (SKOOG, 2002). De acordo com a teoria de Mie apenas

uma única banda de *plasmon* é esperada no espectro de absorção de nanopartículas esféricas 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 distribuição do tamanho das partículas. A largura a meia altura da banda de absorção é uma indicação da distribuição do tamanho das AgNPs. 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). Na figura 5 também se observa o cálculo da largura a meia altura (FWHM -*Full width at half maximum*) de 95,08 nm praticamente simétrico, caracterizando AgNPs com superfícies regulares e distribuição de tamanho de partículas dentro de uma faixa estreita de valores (ROCHA, 2010). Por apresentar um pico bem definido, em cerca de 420 nm, indica um ótimo grau de dispersão das nanopartículas (SONG et al., 2009; GARCIA, 2011), típico para nanopartículas com geometria esférica e estreita distribuição de tamanho (FWHM pequeno) (WILCOXON, 2006). Vigneshwaran et al., (2006) analisaram a estabilidade das AgNPs estabilizadas com amido solúvel através do armazenamento das amostras a temperatura ambiente (25°C) por 90 dias. A absorbância a 420 nm foi monitorada com um intervalo de 24 horas para verificar uma possível aglomeração. Nenhuma mudança significativa (ao nível de 1,0% de significância) na absorbância foi notada durante o armazenamento, indicando a estabilidade das AgNPs.

### 5.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

O tamanho médio em intensidade determinado por DLS para as AgNPs foi de 62,88 nm. Este tamanho de partícula apresenta-se próximo aos valores encontrados na literatura. Agentes redutores menos potentes como a D-glicose mostram um processo de redução mais lento. No entanto a D-glicose possui baixa toxicidade e relativa facilidade de obtenção (GARCIA, 2011). O diâmetro médio em intensidade obtido neste trabalho está de acordo com os resultado obtido por

Sharma et al. (2008), que avaliaram a síntese de AgNPs usando como agentes redutores mono e dissacarídeos. Os autores verificaram que os tamanhos das partículas coloidais de prata foram menores para dissacarídeos (maltose e lactose) do que para monossacarídeos (glicose e galactose). A galactose teve as maiores partículas de AgNPs com 50 nm, enquanto a glicose obteve partículas com 44 nm. A distribuição de tamanhos obtida por DLS é apresentada na Figura 6.

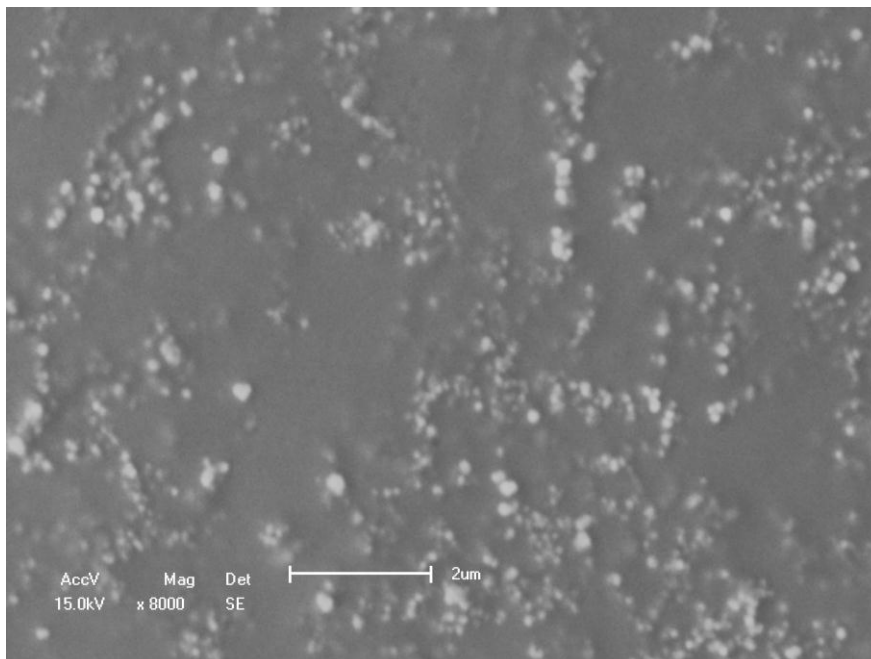


**Figura 6-** Distribuição de tamanhos das AgNPs obtida por DLS.

A distribuição do tamanho das partículas obtido através do ensaio de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostra dois grupos principais de nanopartículas como distribuição bimodal: um com nanopartículas menores na faixa de 10 a 30 nm, e outro composto de nanopartículas maiores, 30 a 400 nm. O maior percentual de nanopartículas encontra-se abaixo de 100 nm, tamanhos maiores que este possivelmente são resultado de agregação. As dimensões das partículas devem estar no intervalo de 1 – 100 nm em pelo menos uma dimensão (CASANOVA, 2010; ROCHA 2010; PEREZ et al., 2012; GARCIA, 2011). O terceiro pico que surge na ordem de micrometros, de acordo com PANACEK et al. (2006) é devido a impurezas existentes como, por exemplo, poeira.

### 5.1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Figura 7 apresenta a imagem de MEV das AgNPs.

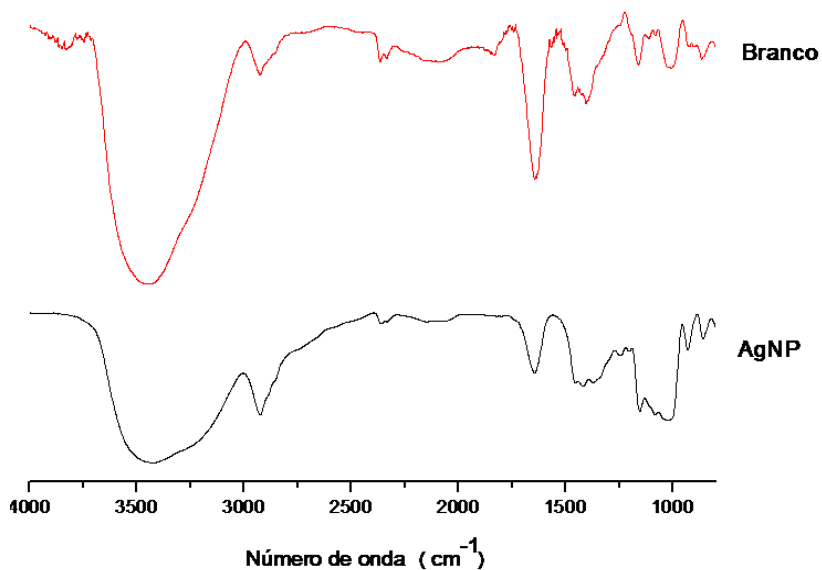


**Figura 7-** Micrografia das AgNPs sintetizadas pelo método do polissacarídeo modificado (magnificação de 8.000x).

É possível observar na Figura 7 que as AgNps apresentam formato esférico e bem dispersa, como esperado pelos resultados de espectrofotometria UV-Vis. As nanopartículas apresentam-se em alguns pontos da imagem como aglomerados o que comprova a distribuição de tamanhos obtida com a técnica de DLS.

### 5.1.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

O espectro de Infra Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é apresentado na Figura 8.



**Figura 8** – Espectroscopia de infravermelho de nanopartículas de prata obtidas pela técnica de síntese verde.

Podem ser observados na Figura 8 o espectro referente ao branco, ou seja, a solução de amido (estabilizante) e D-glicose (reduzidor) sem a presença de nitrato de prata e conseqüentemente sem a formação das nanopartículas e o espectro em preto representa as AgNPs. De acordo com Wang et al (2008), as AgNPs apresentam picos característicos nas frequências de 3400, 3140, 1600, 1364 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas próximas aos picos característicos podem ser visualizados no espectro das AgNPs (Figura 8). É possível observar que algumas bandas estão presentes também na amostra “branco”. Pode-se considerar que os espectros de infravermelho de nanopartículas de prata e a do amido e glicose são bastante semelhantes (SREERAM, NIDHIN, NAIR, 2008). As frequências características das bandas, próximos de 3.140  $\text{cm}^{-1}$  e 1.364  $\text{cm}^{-1}$ , foram perceptíveis, no entanto, as bandas de estiramento da ligação O-H, na região de 3.400  $\text{cm}^{-1}$ , C=O, em 1.600  $\text{cm}^{-1}$  e C-O em 1.000  $\text{cm}^{-1}$  foram as mais afetadas pela presença das nanopartículas de prata, indicando que a estabilização dá-se principalmente pela interação das nanopartículas de prata com as hidroxilas. Além disso, observa-se o deslocamento acompanhado de uma diminuição da intensidade na banda localizada 3.400  $\text{cm}^{-1}$  comparando o espectro do branco com as AgNPs. Na banda, próximo a 1.600  $\text{cm}^{-1}$ , também ocorreu uma diminuição da intensidade e na banda 1.000  $\text{cm}^{-1}$  nota-se um aumento da intensidade da banda.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA

Na Tabela 1 estão apresentados os valores determinados para as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) da solução de AgNPs, obtida pela técnica de síntese verde.

**Tabela 1-** Resultados obtidos das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) da solução de AgNPs para cada bactéria.

Bactéria	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Bacillus cereus</i> (IAL55)	2,34	2,34
<i>Staphylococcus aureus</i> (IAL1875)	37,50	75,00
<i>Escherichia coli</i> (IAL339)	1,17	4,69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IAL2081)	4,69	9,38

Dentre os microrganismos testados, a bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou inibição ao crescimento a uma menor diluição e, portanto, maior concentração inibitória mínima, que foi de 37,50, ou seja, foi o microrganismo que apresentou maior resistência. Deste modo, esta foi a concentração utilizada para a aplicação no recobrimento das salsichas, garantindo, a ação inibitória sobre todas as outras culturas de bactérias. Martínez-Castañon et al. (2008) determinaram a CIM de AgNPs contra *E. coli* e *S. aureus* com diferentes tamanho médios de AgNPs e observaram que a CIM das amostras analisadas foi menor em todos os casos analisados para *E. coli*, o que segundo os autores pode ser explicado com base na diferença entre a parede celular de Gram-positivo (*S. aureus*) e Gram-negativo (*E. coli*), tendo bactérias Gram-positivas parede celular mais espessa, o que dificulta a penetração e absorção dos íons na célula. No presente trabalho o mesmo comportamento foi observado. Além disso, Fernandes (2010) observou para o diâmetro médio de 89 nm CIM para *S. aureus* similar ao apresentado na Tabela 1 (33,71  $\mu\text{g/mL}$ ). Sharma et al. (2008) também determinaram a CIM semelhante no caso do microrganismo *S. aureus* (27  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.3 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das médias finais obtidas nas contagens das colônias das bactérias ácido lácticas (BAL) que cresceram nas placas contendo meio de cultura tanto para o grupo de controle quanto para o grupo tratado com as AgNPs. As amostras de salsichas revestidas com as nanopartículas e as do controle, armazenadas durante 60 dias, tiveram crescimento elevado de colônias de bactérias e produção de halos de diâmetros maiores, o que dificultou sua análise impedindo as contagens das mesmas.

**Tabela 2-** Contagem das colônias de bactérias nas placas de ágar para cada intervalo de tempo: salsichas controle e salsichas com tratamento (AgNPs).

<b>0 dias</b> <b>(UFC/25 g)</b>	<b>15 dias</b> <b>(UFC/25 g)</b>	<b>30 dias</b> <b>(UFC/25 g)</b>
AgNP ( $10^{-1}$ ) <b><math>1,5 \times 10^1</math></b>	AgNP ( $10^{-1}$ ) <b>&lt;10</b>	AgNP ( $10^{-1}$ ) <b><math>1,275 \times 10^3</math></b>
Controle ( $10^{-1}$ ) <b><math>3,33 \times 10^1</math></b>	Controle ( $10^{-1}$ ) <b><math>3,85 \times 10^2</math></b>	Controle ( $10^{-3}$ ) <b><math>19,53 \times 10^4</math></b>

Entre parenteses estão as diluições das placas em que foram feitas as contagens.

O teste t, que compara a média de duas amostras submetida a tratamentos diferentes, foi realizado separadamente para cada dia, para verificar se houve diferença estatística entre as médias do crescimento bacteriano das salsichas recobertas com AgNPs e das salsichas controle.

A tabela 3 mostra a saída do programa Statistica 7.0 a um nível de significância de 5%.

**Tabela 3-** Análise estatística (teste-t) para comparação das médias de contagem de colônias das amostras de salsicha controle e do tratamento com AgNPs.

<b>Tempo</b> <b>(dias)</b>	<b>Média AgNPs</b> <b>(UFC/25g)</b>	<b>Média controle</b> <b>(UFC/25g)</b>	<b>t-valor</b>	<b>Graus de</b> <b>liberdade</b>	<b>P</b>
0	5,00	33,30	-3,20	4	0,032505
15	0,00	385,00	-5,11	4	0,006895
30	1.275,00	195.333,3	-14,95	4	0,000117

É possível observar que em todos os dias analisados o crescimento de bactérias foi significativamente maior nas salsichas que não foram recobertas com a solução contendo AgNPs (controle). O teste-t mostrou que, para todos os intervalos de tempo em que foram realizadas as



análises, as duas médias diferem significativamente entre si ao nível de 95 % de confiança, pois o valor de p foi menor que 5% para todos os testes.

Na contagem de colônias para as amostras preparadas no primeiro dia (0 dias) houve crescimento de bactérias nas placas tanto para as salsichas contendo AgNPs quanto para o controle. As nanopartículas de prata causaram redução significativa de bactérias mesmo em pouco tempo de contato, o que indica uma rápida atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata. Além disso as amostras que permaneceram armazenadas na geladeira, após 15 dias não apresentaram crescimento bacteriano significativo (<10 UFC/25g) em nenhuma placa das amostras de salsichas que foram recobertas com filme contendo AgNPs.

As salsichas analisadas após 30 dias (ainda dentro do prazo de validade do produto) apresentaram alto crescimento microbiano. Apesar de haver ocorrido crescimento nas salsichas tratadas com AgNPs esse crescimento ainda apresentou diferença significativa com relação ao controle. No caso do controle, além das placas apresentarem maior número de colônias de bactérias, as contagens foram realizadas nas placas com diluição  $10^{-3}$ , pois nas diluições menores pelo alto índice de crescimento, não foi possível fazer a leitura.

Como não houve crescimento significativo de bactérias nas salsichas recobertas com AgNPs após 15 dias de armazenamento é possível afirmar que as AgNPs mantiveram a segurança das mesmas por um período 15 dias maior que as salsichas sem tratamento. An et al. (2008) reportaram que AgNPs em um revestimento de PVP aplicado a aspargos impediram significativamente o crescimento de microrganismos, aumentando sua vida de prateleira em 10 dias quando armazenados sob refrigeração (2°C a 10°C).

## 6 CONCLUSÃO

As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por Espectroscopia de UV-Vísivel, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia De Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR), e por meio destas técnicas, pode-se comprovar a presença de nanopartículas de prata em solução, com morfologia esférica e bem distribuída.

A eficiência antimicrobiana das nanopartículas de prata foi confirmada pelas análises microbiológicas. As salsichas armazenadas na geladeira contendo o filme com nanopartículas de prata tiveram crescimento de bactérias significativamente inferior as salsichas do controle, sendo que as amostras de salsichas revestidas com as AgNPs, avaliadas após 15 dias de armazenamento, não apresentaram crescimento microbiano significativo.

## 7 REFERÊNCIAS

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de Março de 1952.** Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, 1952.

BRASIL, **Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº4, de 31 de março de 2000.** Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça, de salsicha. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF, 05 abr.2000.

ALMEIDA, D.; ALMEIDA, A., & VENTURAD. **Perigos biológicos - bacillus cereus.** Coimbra: Escola Superior Agrária de Coimbra, p.14, 2011.

AMRO, N. A.; KOTRA, L. P.; WADU-MESTHRIGE, K.; BULYCHEV, A.; MOBASHERY, S., and LIU, G. Y. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. **Langmuir**, p. 2789–279, 2000.

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

ANDERSON, M. D.; PASCUAL, V. C. **Microbiologia Alimentaria.** 2ª edição. Madrid: Díaz de Santos, S.A, p. 291, 2000.

ANDRADE DE, J.E. **Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH.** Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2008.

AVILA-SOSA, R.; ENRIQUE PALOU, E.; MUNGUÍA, M. T. J.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; CRUZ, A. R. N.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential oil loaded to amaranth, chitosan, or star chitosan films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 66–72, 2012.

BECHTOLD, M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2011.

BERNI, E; RIBEIRO, C; ZUCOLOTTI, V. **Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens.** São Carlos, SP, 2008.

BRASIL, I.M.; GOMES, C.; PUERTA-GOMEZ, A.; CASTELL-PEREZ, M.E.; MOREIRA, R.G. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. **LWT**, v.47, p.39-57, 2012.

BREGGIN, L.; FALKNER R.; JASPERS N.; PENDERGRASS J. and PRTER R. Securing the Promise of Nanotechnologies. **Royal Institute of International Affairs**, Registration, n. 208223, 2009.

BRIGIDO, B. M., et al. **Queijo minas frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 63, n. 2, p. 177-185, 2004.

BOURTOOM, T. Edible film sand coatings: Characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 3, 237–248, 2008.

BOURTOOM, T. Edible protein films: Properties enhancement. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 1–9, 2009.

CAGRI, A.; USTUNOL,Z.; RYSER, E.T. Inhibition of Three Pathogens on Bologna and Summer Sausage Using Antimicrobial Edible Films. **Journal of Food Science**, v.67, n.6, p.2317-2324, 2002.

CASANOVA, M.C.R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. São Carlos, 2010.

CASTELLANO, J. J.; SHAFII, S. M.; KO, F., DONATE, G.; WRIGHT, T. E.; MANNARI, R. J.; PAYNE, W. G.; SMITH, D. J.; and ROBSON, M. C. Comparative evaluation of silver containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, p. 114–122, 2007.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 662-671, 2011.

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.; PARK, J.; OSAKA, T. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. **Electrochimica Acta**, v.51, p. 956–960, 2005.

DAMM, C.; NEUMANN, M.; MUSTEDT, H. Proprieties of nanosilver coating son polymethyl methacrylate. **Chemical Communications**, p.71-82, 2006.

DE SANTANA, H., et al. **Preparação e caracterização de substratos SERS ativos: Um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata**. Química nova, v. 29, n. 2, 194-199, 2006.

ECOLAB, Acessado em 02 de janeiro de 2014, Disponível em: <http://www.ecolab.com/PublicHealth/BCereus.asp>.

ELICHIGUERRA, J.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.; RAMIREZ, J.; and YACAMAN, M. The bactericida effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, p. 2346–2353, 2005.

ELIAS, W.C. **Estudos Metodológicos de Nanopartículas Catalíticas de Ag-PVP a partir da Análise Multivariada, Aplicadas à Catálise de Redução de Compostos Nitroaromáticos**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J.P.; JIMENEZ, A; MUNOS, J.A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **LWT**, v.22, p. 293-303, 2011.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; AND KIM, J. O. Amechanistic study of the antibacterial effect of silver ion son Escherichia coli and staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 662–8, 2000.

FERNANDES, P.E. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano**. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneus, 2003.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.; LEVIN, C.; MANDRELL, R.; KOZUKUE, N., & USDA, A. **Atividades antimicrobianas das catequinas do chá e teaflavinas e extratos de chá contra bacillus cereus**. *Jornal da Proteção de Alimentos*, v.69, p. 354-361, 2006.

FU, J.; WALLEN, S.L. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, 2002.

FORTUNATI, E.; ARMENTANO, I.; ZHOU, Q.; IANNONI, D. A.; SAINO, E.; VISAI, L.; BERGLUND, L. A.; J. M. KENNY. Multi functional bionano composite films of poly (lacticacid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1596– 1605, 2012.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

GLOMM, W. R. Functionalized gold nanoparticles for application sin bionano technology. **Journal of dispersion science and technology**, v. 26, n. 3, p. 389-414, 2005.

GHASEMINEZHAD, S. M.; HAMED, 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.

GRAM, G.; RAVN, L.; RASCH, M; BRUHN, J.B.; CHRISTENSEN, A.B.; GIVSKOV, M. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.79-97, 2002.

GUAHYBA, A. S. **Microrganismos Deteriorantes**. Apostila Técnico em Química do Centro Universitário Univates, Lajedo, RS. 2003.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1998.

KAPOOR, S.; LAWLESS, D.; KENNEPOHL, P.; MEISEL, D.; SERPONE, N. Reduction and aggregation of silver ions in aqueous gelatin solutions. **Langmuir**, v. 10, n. 9, p. 3018–3022, 1994

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, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM,S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C.Y., et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine nanotechnology biology and medicine**, p.95–101, 2007.

KLABUNDE, K. J. Nanoscale material sin chemistry. **New York: John Wiley & Sons, Inc.**, 2001.

KRSMANOVIC, J.L. **Adsorption of Novel Block Copolymers for Steric Stabilization and Flocculation of Colloidal Particles in Aqueous Environments**. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemical Engineering, Blacksburg, Virginia, 2013.

JUNG,C. “Fourier transformin frared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs)”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 6, p. 1031-1058, 2008.

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-PlasmonicCore-ShellNanoparticles. **JournalAmericanChemicalSociety-ACSNano**, v.3,n.6, p. 1379-1388, 2009.

LI, W.R.; XIE, X.B; SHI, Q.S.; DUAN, S.S.; OUYANG, Y.S., and CHEN, Y.B. Antibacterialeffectofsilvernanoarticlesonstaphylococcusaureus. **Biometal san international. Journal on the role of metal ion sinbiology biochemistry and medicine**, p. 135–141, 2011.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J. R.; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 10, p. 1343–1348, 2008.

MELO FILHO, A. B.; GUERRA, N. B. **Avaliação da qualidade nutricional de produtos cárneos: salsichas e mortadelas comercializadas na Região Metropolitana do Recife**. In: Congresso Latinoamericano de Nutricionistas-cietistas, Montevideo. 1998. p. 186.

MENG, X.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. The Effects of Ultrasound Treatment and Nano-zinc Oxide Coating on the Physiological Activities of Fresh-Cut Kiwifruit. **Food Bioprocess Technol**, v.7, p.126-132, 2014.

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. 23462353, 2005

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

NETO, A. E. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.

POMMERVILLE, J. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. **Jones & Bartlett Learning**, 2010.

RAI, M.; YADAVAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76–83, 2009.

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

ROJAS-GRAU, M.A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh cut fruits: a review. **Food Science & Technology**, v.20, p.438-447, 2009.

ROSA, R. M. M. **Incorporação de nanopartículas de prata em matrizes de nanofibras de polivinilpirrolidona e avaliação do seu potencial antibacteriano**. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.

SCRAMIN, J. A.; DE BRITTO, D.; FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. Characterisation of zein–oleic acid films and applications in fruit coating. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 2145–2152, 2011.

SEGALA, K. **Estudo da ação antimicrobiana em diferentes compósitos impregnados com nanopartículas de prata.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

SENESI, S.; GHELARDI, E. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p.1690-1703, 2010.

STEVANOVIĆ, M.; KOVAČEVIĆ, B.; PETKOVIĆ, J.; FILIPIČ, M.; USKOKOVIĆ, D. Effect of poly- $\alpha$ ,  $\gamma$ , L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p. 2837–2847, 2011.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação.** São Paulo: Livraria Varela, 1995.

SILVA, M. V. **Segurança alimentar de produtos cárneos tradicionais, enchidos e produtos curados.** Porto: AESBUC/UCP, p. 34, 2003.

SILVA, N., et al. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos.** 3ª edição. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos.** 6ª edição. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SIQUEIRA, M.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata em filmes de CMC para uso em embalagens de alimentos.** Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SONAI, G. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas de prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone contendo  $\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$  para fim antimicrobiano.** Programa de Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

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

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

SONNICHSEN, C.; FRANZL, T.; WILK, T., et al. "Plasmon resonance in large noble metal clusters", p.93, 2002.



SONG, K. C. et al. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 26, p. 153-155, 2009.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes/Industrialização da carne**. 1ª edição. São Leopoldo: Editora Unisinos, 1998.

TRABULSI, L. R., et al. **Microbiologia**. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Inglaterra: Faraday Discussions London**, v. 11, p.55, 1999.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Atualidades em Ciências e Tecnologia de Carnes**. Livraria Varela, p. 123-127, 2006.

PASCALL, M. A.; LIN, S. The Application of Edible Polymeric Films and Coatings in the Food Industry. **Food Process Technol**, v.4, 2013.

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V. K.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. **Journal of Physical Chemistry**, 2006.

PEREZ, F.S.; BERTAGNOLLI, S.S.M.; ALVEZ, M.P.; PENNA, N.G. Nanotecnologia: aplicações na área de alimentos. **Ciências da Saúde**, Santa Maria, RS, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2012.

PINTO, A. F. M. A. **Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos**. Millenium, 1996.

PIRES, N. R., et al. **Síntese verde de nanopartículas de prata com atividade bactericida estabilizadas por galactomana da fava danta (*Dimorphandra gardneriana*)**. Departamento de Biologia – UFC, Fortaleza, CE, 2011.

PIRNAY, J. P. et al. Pseudomonas aeruginosa biodiversity as reflected in a Belgian river. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 969-980, 2005.

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.

VIGNESHWARAN, N.; NACHANE, R. P.; BALASUBRAMANYA, R. H.; VARADARAJAN, P.V. **Anovelone-pot ‘green’ synthesis of stable silver nanoparticle using soluble starch**, p. 2012-2018, 2006.

VIRENDER, K.; SHARMA, R.; YNGARD, A.; YEKATERINA, L. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83–96, 2009.

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

WILCOXON, J. P.; ABRAMS, B. L. Synthesis, structure and properties of metal nano clusters. **Chemical Society Review**, v. 35, n., p. 1162–1194, 2006.

WU, Y.; JIA, W.; AN, Q.; LIU, Y.; CHEN, J.; and LI, G. Multi-action antibacterial nanofibrous membranes fabricated by electro spinning: an excellent system for antibacterial applications. **Nanotechnology**, p. 245101, 2009.