

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

KARINA FAVORETO NASCIMENTO

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA CONSERVAÇÃO DE COUVE  
MINIMAMENTE PROCESSADA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO  
2015

KARINA FAVORETO NASCIMENTO

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA CONSERVAÇÃO DE COUVE  
MINIMAMENTE PROCESSADA**

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. Lívia Bracht

CAMPO MOURÃO

2015



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



---

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

### NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA CONSERVAÇÃO DE COUVE MINIMAMENTE PROCESSADA

por

KARINA FAVORETO NASCIMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 26 de novembro de 2015 às quatorze horas como requisito parcial para 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.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Fernanda Vitória Leimann  
Orientadora

---

Prof. Dr.<sup>o</sup>. Odinei Hess Gonçalves  
Membro da banca

---

Profa. Dr.<sup>o</sup>. Fábio Henrique Polisel  
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 pela determinação, força e fé concebidas a mim para chegar até aqui.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais que me deram todo o apoio, dedicação e incentivo para que eu concluísse essa etapa com coragem, a minha irmã que sempre esteve ao meu lado nessa fase da minha vida, e aos meus queridos avós que mesmo longe torciam por mim nessa minha caminhada.

Agradeço as minhas amigas de faculdade, Lais e Thais pelo total apoio, conselho e incentivos que recebi, mas principalmente pela amizade e por estar todo esse tempo ao meu lado.

Agradeço a minha amiga Jéssica, pela sua amizade, carinho e pela força que sempre me deu para ir até o final.

Agradeço a minha amiga Maysa, uma irmã de faculdade, que me ajudou nos momentos que mais precisei nesses anos e sempre esteve comigo me apoiando e me incentivando.

Agradeço a minha orientadora Livia Bratch, pelo apoio, conselhos, dedicação, disponibilidade e atenção, que recebi ao longo desse ano.

Agradeço a professora Fernanda Vitória Leimann que deu total apoio e atenção para a execução desse trabalho.

## RESUMO

NASCIMENTO, Karina Favoreto. **Nanopartículas de prata para conservação de couve minimamente processada**. 2015. 38p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

As hortaliças minimamente processadas são aquelas que foram fisicamente alteradas, mas que permanecem no estado fresco. Passam por sucessivas manipulações na sua produção aumentando as possibilidades de contaminação microbiológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de nanopartículas de prata na conservação de couve minimamente processada, em relação as análises dos microrganismos aeróbios mesófilos em placas e microrganismos aeróbios psicrotóxicos. Para a obtenção das nanopartículas de prata (AgNPs) foi utilizado os princípios da química verde, utilizando D-glicose como agente redutor e amido como estabilizante. O acompanhamento microbiológico durante o armazenamento da couve minimamente processada foi realizado através de análises microbiológicas nos intervalos de 0, 5 e 10 dias. A couve foi submetida ao processo de sanitização, com 4 diferentes tratamentos: Tratamento controle, onde as amostras de couve foram mergulhadas em água filtrada; Tratamento com hipoclorito de sódio (PuryVitta)  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ; Tratamento com as AgNPs na concentração de  $37,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$  (AgNP 1) e Tratamento com as AgNPs na concentração de  $75 \text{ } \mu\text{g/mL}$  (AgNP 2). Foram determinados o tamanho de partícula utilizando o espectro de UV-visível e a avaliação das cores das amostras de couve minimamente processadas. Pode-se comprovar a presença de nanopartículas de prata em solução, confirmando assim a eficiência das AgNPs na conservação da couve minimamente processada através das análises microbiológicas. Por meio das análises de cor observou-se através dos resultados que a degradação das couves durante o período analisado foi menor que os outros tratamentos utilizados.

Palavra-chave: minimamente processados, nanopartículas de prata, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Karina Favoreto. **Silver nanoparticles for conservation minimally processed cabbage**. 2015. 38p. Completion of course work (Food Engineering), Technological University Federal of Parana. Campo Mourão, 2015.

Minimally processed vegetables are those who have been physically altered, but remain fresh. Undergo a series of treatments in their production increasing microbiological contamination possibilities. The objective of this study was to evaluate the application of silver nanoparticles in the conservation of minimally processed kale, regarding the analysis of mesophilic aerobic microorganisms in plates and psychrotrophic aerobic microorganisms. To obtain the silver nanoparticles (AgNPs) was used with the principles of green chemistry using D-glicose as a reducing agent and starch as a stabilizer. Microbiological monitoring during minimally processed cabbage storage was carried out through microbiological analysis in the ranges of 0, 5 and 10 days. The cabbage was subjected to sanitization process with four different treatments: control, where the cabbage were dipped in filtered water; Treatment with sodium hypochlorite (PuryVitta) 200 mg.L-1; AGNPS Treatment with a concentration of 37.5 mg/mL (AgNP 1) and treatment with AGNPS at a concentration of 75 ug / ml (AgNP 2). Samples were analyzed for particle size using the UV-visible spectrum of the color and evaluation of minimally processed cabbage samples. One can prove the presence of silver nanoparticles in solution, thereby confirming the efficiency of AgNPs in the conservation of cabbage minimally processed through microbiological analyzes. Through color analysis it was observed from the results that the degradation of sprouts during the reporting period was smaller than the other treatments.

Keyword: minimally processed, silver nanoparticles antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando o mecanismo de formação de nanopartículas de prata utilizando a síntese verde.....	15
Figura 2. Ilustração do efeito do íon prata em células de micro-organismos. ....	16
Figura 3. Diferentes maneiras de ação da prata na célula bacteriana .....	17
Figura 4. Fluxograma do processamento da couve. ....	19
Figura 5. Espectro de UV-Vis da solução de AgNP (Concentração 1): cálculo da largura à meia altura (FWHM). ....	23
Figura 6. Espectro de UV-Vis da solução de AgNP (Concentração 2): cálculo da largura à meia altura (FWHM). ....	24
Figura 7. Quantidade de microrganismos mesófilos (UFC/g) em couve minimamente processada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 10 dias. Após lavagem e corte, as amostras de couve foram submetidas a um banho de imersão com (●) água (controle); (■) solução de hipoclorito (200 ppm); (▲) solução de nanopartículas de prata 37,5 mg.L <sup>-1</sup> (AgNP 1) ou (◆) solução de nanopartículas de prata com concentração 75 mg.L <sup>-1</sup> (AgNP2). *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (água). #Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Hipoclorito. ....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagem de microorganismos mesófilos em couve minimamente processada nos diferentes sanitizantes em placas de ágar PCA durante os três períodos de estocagem dado em $\log \text{UFC.g}^{-1}$ .....	26
Tabela 2. Contagem de microorganismos psicrotróficos em couve minimamente processada com diferentes sanitizantes em placas de ágar PCA durante os três períodos de estocagem dado em $\log \text{UFC.g}^{-1}$ .....	27
Tabela 3. Resultados obtidos através da análise instrumental de cor na couve minimamente processada nos diferentes tratamentos durante os 10 dias de armazenamento. ....	28

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 Hortaliças minimamente processados.....	11
2.2 Couve minimamente processadas .....	11
2.3 Microorganismos presentes nas hortaliças minimamente processadas	12
2.4 Síntese das nanopartículas de prata.....	13
2.5 Atividades antimicrobianas das nanopartículas de prata .....	15
3 METODOLOGIA .....	18
3.1 Preparação/obtenção das nanopartículas.....	18
3.2 Processamento da couve minimamente processada .....	18
3.3 Acompanhamento microbiológico .....	20
3.3.1 Microorganismos aeróbios mesófilos em placas .....	20
3.3.2 Microorganismos aeróbios psicrotróficos.....	21
3.4 Quantificação instrumental da cor .....	21
3.5 Caracterização das nanopartículas de prata .....	21
3.6 Análise estatística .....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4.1 Caracterização das nanopartículas de prata por espectroscopia UV- Visível.....	23
4.2 Estabilidade microbiológica durante a estocagem. ....	25
4.3 Cor .....	28
CONCLUSÃO .....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por vegetais frescos cortados tem crescido devido às suas características de frescor e conveniência. Entretanto a produção, a distribuição, a qualidade e a segurança de tais frutos e hortaliças são limitadas pelos conhecimentos que se têm acerca desse tipo de produto (BOLIN e HUXSOLL, 1989 apud PINHEIRO et al., 2005).

A qualidade microbiológica dos alimentos minimamente processados está relacionada à presença de microrganismos deteriorantes que irão influenciar nas alterações sensoriais do produto durante sua vida útil. Contudo, a maior preocupação está relacionada à sua segurança, não apresentando contaminação por agentes químicos, físicos e microbiológicos em concentrações prejudiciais à saúde (VANETTI, 2004).

Um produto minimamente processado deve ser consistente, ter aparência fresca, ser de cor aceitável, livre de defeitos e seguro do ponto de vista microbiológico (PEREIRA *et al.*, 2001).

Por estes motivos, a pesquisa de agentes microbianos seguros, que possam ser utilizados na conservação de alimentos é de grande importância. Dentre estes, a prata metálica na forma de nanopartículas vem sendo aplicada com sucesso 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).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de nanopartículas de pratas obtidas por síntese verde como agente conservante em couve minimamente processada.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hortaliças minimamente processados

Segundo a International Fresh-Cut Producers Association (IFPA, 2015), produtos minimamente processados são definidos como qualquer fruta ou hortaliça, ou ainda qualquer combinação delas, que foi alterada fisicamente a partir de sua forma original, embora mantenha o seu estado fresco. Independente do tipo, ele é selecionado, lavado, descascado e cortado, resultando num produto 100% aproveitável que, posteriormente, é embalado ou pré-embalado.

As hortaliças minimamente processadas constituem uma classe que vem conquistando o consumidor de forma crescente e consistente. A sua aquisição proporciona ao consumidor o acesso a um produto muito parecido com o fresco, com uma vida útil prolongada e, ao mesmo tempo, tem garantia de segurança desde que seja mantida a boa qualidade nutricional, sanitária e sensorial (WILLEY, 1997 apud SANCHES, 2002)

Além da qualidade sensorial, a qualidade microbiológica e a segurança das hortaliças frescas minimamente processadas precisam ser garantidas e são dependentes da microbiota presente na matéria-prima, da contaminação em cada etapa do processo e das condições de manutenção do produto, que podem permitir o crescimento microbiano. O manuseio impróprio e os equipamentos não sanitizados contribuem para o aumento da população de microrganismos nas hortaliças, aumentando os riscos de patógenos e deterioradores nesses produtos (BOLIN *et al.*, 1977 apud FANTUZZI *et al.*, 2004).

O processamento mínimo de hortaliças inclui operações de seleção, lavagem, classificação, fatiamento, sanitização, centrifugação, embalagem e refrigeração, realizadas de modo a obter-se um produto comestível fresco e que não necessite de preparo subsequente (WILEY, 1994 apud SANCHES, 2002; MORETTI, 2002).

### 2.2 Couve minimamente processadas

A couve (*Brassicaoleracea*, L. var. *acephala*) é uma das hortaliças folhosas mais consumidas pela população brasileira, fazendo parte de nossa culinária típica.

A couve é consumida predominantemente cortada em finas tiras de 1 a 2 mm de espessura. A couve minimamente processada é um produto que possui alta perecibilidade, apresentando alta atividade respiratória, devido aos estresses ocorridos na fase pós-colheita e às injúrias mecânicas durante o processamento mínimo (CARNELOSSI, 2000).

A couve é uma hortaliça com rápida perda de turgescência e senescência pós-colheita. Pode ser encontrada comercialmente, na forma de minimamente processada, porém com curto prazo de validade (PUSCHMANN *et al.*, 2013).

### 2.3 Microorganismos presentes nas hortaliças minimamente processadas

Os alimentos de origem vegetal devem ser vistos como nichos ecológicos que sustentam uma microbiota dinâmica e variável (ROSA e CARVALHO, 2000). Embora a composição exata da biota inicial de frutos e hortaliças não possa ser antecipada, há uma biota característica presente e é possível que quase todos os organismos possam estar presentes em algum momento (APHA, 1992). Geralmente, a microflora das hortaliças não processadas consiste de espécies da família das *Enterobacteriaceae* e das *Pseudomonaceae* (OLIVEIRA e VALLE, 2000; ICMSF/IAMS, 1997).

A sua contaminação microbiana pode ocorrer antes e depois de sua colheita, através do solo, do ar, da rega ou lavagem com águas impróprias, das más condições higiênicas de envoltórios e recipientes, por transportes inadequados e agressões mecânicas contra a estrutura do produto (EVANGELISTA, 2001). Nos produtos minimamente processados, esta microflora é acrescida dos microrganismos provenientes das etapas do processo, caso estas não sejam realizadas segundo as Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 1997).

Entre as bactérias invasivas destacam-se a *Salmonella sp.* e a *Escherichia coli*, principal indicadora de contaminação fecal (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

O gênero *Salmonella* está inserido na família *Enterobacteriaceae*. Seu habitat natural é o trato intestinal do homem e outros mamíferos e animais, que contaminam a água e os alimentos a partir deste reservatório natural. Pode-se disseminar no ambiente principalmente pelo manuseio e outras práticas agrícolas em condições de higiene não satisfatórias e por processos de contaminação cruzada (LEITÃO, 2004).

O índice de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias deficientes levando-se em conta que a população deste grupo pode indicar outros patógenos internos. Em geral as bactérias do grupo coliformes são prejudiciais aos alimentos (CARDOSO, 2000).

As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas por espécies de *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Streptococcus*. A contagem padrão em placa (P.C.A.) tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também ideia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA *et al.*, 1997). Sua presença em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995).

O grupo de microrganismos psicrotróficos inclui bactérias gram-negativas e positivas. Os principais gêneros isolados, em estudos conduzidos em países de clima temperado, são: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (gram-negativas), *Clostridium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus* (gram-positivas) (ARCURI *et al.*, 2008). O metabolismo dos microrganismos psicrotróficos em temperaturas inferiores a 10°C torna-se predominantemente lipo-proteolítico, expressando-se pela produção de enzimas intra e extracelulares. A produção de enzimas hidrolíticas é máxima na fase de crescimento exponencial ou estacionária (MONTANHINI, 2012).

Microrganismos psicrófilos são aqueles cuja temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 0°C a 20°C, com ótimo entre 10°C e 15°C e microrganismos psicrotróficos são os capazes de se desenvolver entre 0°C e 7°C, com produção de colônias ou turvação do meio de cultura em sete a 10 dias. Alguns psicrotróficos, no entanto, crescem em temperatura de até 43°C, sendo, de fato, mesófilos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

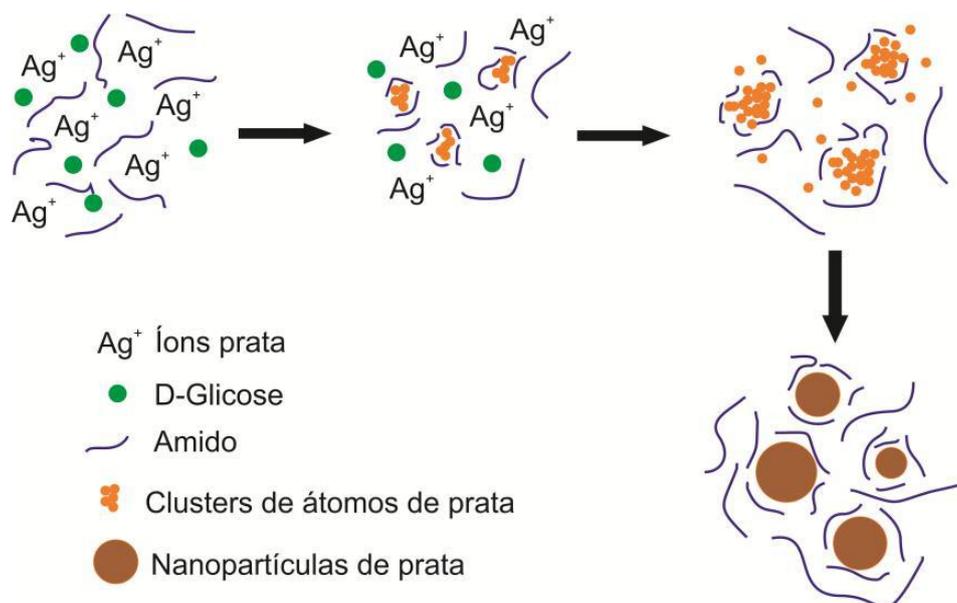
#### 2.4 Síntese das nanopartículas de prata

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 apud MANSO, 2014).

Recentemente as nanopartículas de prata tornaram-se foco de intensa pesquisa devido à sua ampla gama de aplicações em áreas como catálise, óptica, antimicrobianos e produção de biomaterial (LE, 2010; BATABYAL, 2007). A síntese química de AgNPs utiliza solventes orgânicos tóxicos e agentes redutores. Assim, é essencial desenvolver um método sintético verde eficiente e ambiental (HEBEISH, 2010). Entre os agentes de estabilização e redução, os polímeros naturais tais como quitosano, amido solúvel, carboximetil celulose, enzimas segregadas e proteínas de fungos, são materiais eco-friendly para a síntese de AgNPs (KOUVARIS, 2012).

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). Esse processo é simples, benigno para o meio ambiente e eficiente. Pelo aquecimento de uma solução de amido contendo nitrato de prata e glicose, pode-se obter nanopartículas de prata relativamente monodispersas (CASANOVA, 2010). Nele glicose é utilizada com agente redutor de íons prata e amido é utilizado como agente estabilizante. O processo de redução dos íons prata em prata metálica se por autoclavagem (121 °C e 15 psi). Além da glicose adicionada, nessas condições o amido é hidrolisado hidrotermicamente, produzindo glicose que contribui para a redução da prata. O mecanismo de formação das AgNPs pela técnica do polissacarídeo modificada é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema representando o mecanismo de formação de nanopartículas de prata utilizando a síntese verde.

**Fonte:** PIZOLLI (2014).

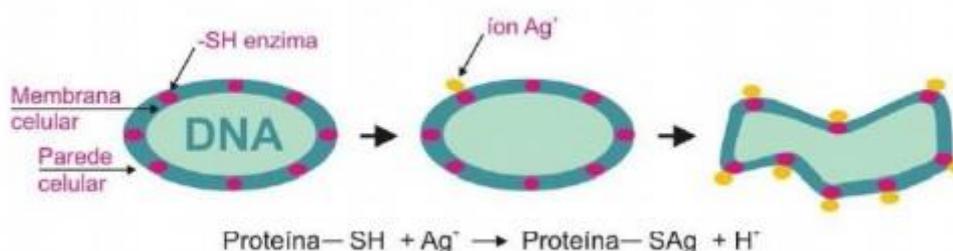
## 2.5 Atividades antimicrobianas das nanopartículas de prata

Compostos de prata, em especial o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), há séculos são empregados no tratamento e prevenção de infecções, muito embora o uso desses compostos tenha diminuído de maneira significativa a partir da década de 1940 com o advento de outros antibióticos, como a penicilina. A emergência de bactérias resistentes a diversos antibióticos faz retomar o interesse pela prata, que, dentre os outros metais já estudados, apresenta a maior atividade contra diversos microrganismos (RAI *et al.*, 2009). Quando comparadas a desinfetantes comuns com hipoclorito de sódio e fenol, nanopartículas de prata exibem concentração mínima bactericida inferior e atividade antimicrobiana mais duradoura do que os demais desinfetantes (CHAMAKURA *et al.*, 2011 apud BERTÉ, 2013).

Segundo Morones *et al.* (2005) apud WALL (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. Depois elas penetram dentro da bactéria e causam mais danos possivelmente pela interação com componentes a base de enxofre e

fósforo como o DNA e proteínas e finalmente as nanopartículas liberam íons de prata, que terão uma contribuição adicional ao efeito bactericida.

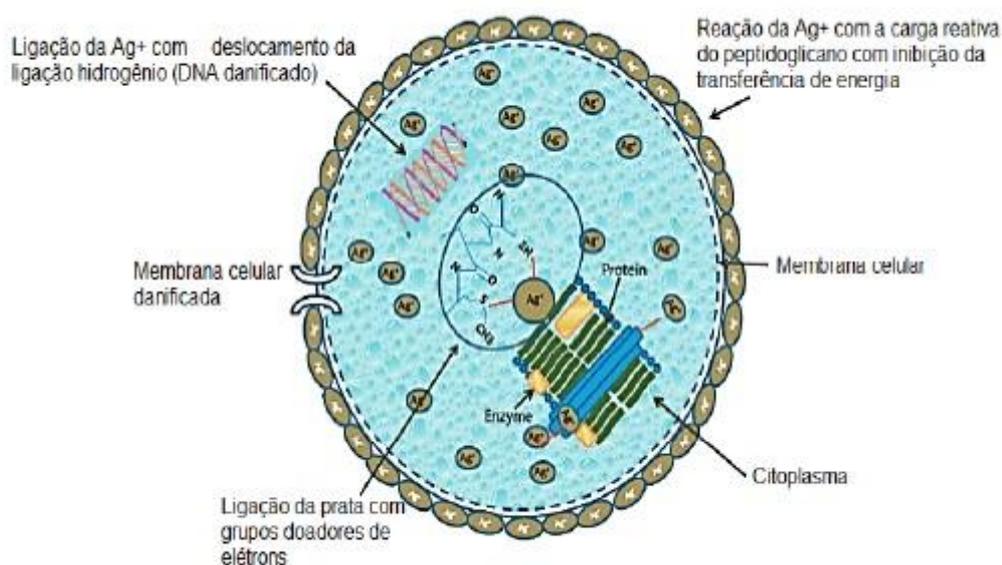
A ação antimicrobiana dos íons de prata não é totalmente compreendida, porém o efeito dos íons de prata na bactéria pode ser observado pelas mudanças estruturais e morfológicas. É sugerido que quando as moléculas de DNA estão num estado relaxado, a replicação do DNA pode ser conduzida efetivamente. Mas quando a molécula de DNA está na forma condensada ela perde sua habilidade de replicação por isso, quando o íon de prata penetra dentro da célula da bactéria, a molécula de DNA muda para a forma condensada e perde sua habilidade de replicação levando à morte celular, conforme a Figura 2. Também, já se relatou que metais pesados reagem com proteínas pela ligação com o grupo tiol e a proteína se torna inativa (KLABUNDE, 2001).



**Figura 2.** Ilustração do efeito do íon prata em células de micro-organismos.

Fonte: SONAI (2008).

Outro mecanismo proposto para a ação antimicrobiana da prata está apresentado na figura 3. O modo de ação é diferente para bactérias gram positivas e gram-negativas. Tanto *P. aeruginosa* e *E. coli* são bactérias gram-negativas e seguem quase o mesmo padrão de inativação quando desinfetadas com prata. Os íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) ligam-se ao peptidoglicano carregado negativamente na parede celular/membrana bacteriana. Esta ligação causa o bloqueio do sistema de transferência de energia, resultando na morte celular (THURMAN, 1989; NAWAZ e. al., 2012).



**Figura 3.** Diferentes maneiras de ação da prata na célula bacteriana

Fonte: NAWAZ (2012).

A prata tem capacidade de marcar as proteínas que reagem com grupos tiois (-SH) na célula bacteriana e enquanto presentes nas proteínas (enzimas) favorecem a sua inativação (FENG, 2000; THURMAN, 1989; LIAU *et al.*, 1973 apud OLIANI, 2013). A prata também se liga a grupos doadores de elétrons que contêm nitrogênio, oxigênio, e enxofre, tais como aminas, hidroxilas, e fosfatos (THURMAN, 1989 apud OLIANI, 2013; MODAK, 1973; RUSSELL *et al.*, 2004). A ligação da prata com o ácido desoxirribonucleico (DNA) é também uma das ações da prata nas bactérias (THURMAN, 1989 apud OLIANI, 2013). A prata rompe as ligações de hidrogênio entre átomos adjacentes de nitrogênio de bases de purina e pirimidina, o que pode estabilizar a hélice do DNA e impedir a sua replicação e a divisão celular subsequente (KLUEH *et al.*, 2000; LAGARON *et al.*, 2011 apud OLIANI, 2013).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Preparação/obtenção das nanopartículas

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram produzidas através da técnica de Síntese Verde - Técnica do Polissacarídeo Modificada (GHASEMINEZHAD, HAMED I e SHOJAOSADATI, 2012).

Foram preparadas soluções de nitrato de prata (0,168 g em 40 mL de água Milli-Q) e de D-glicose (0,36 g em 80 mL de água Milli-Q). Para a preparação da solução de amido foram pesados 10 g de amido sendo solubilizado em 1000 mL de água Milli-Q aquecida a 90 °C para gelatinização do amido. A solução de nitrato de prata e a solução de D-glicose foram misturadas aos 1000 mL da solução de amido. A solução resultante foi autoclavada a 121 °C e 15 psi por 15 minutos (autoclave Primatec). A concentração final de prata desta solução é de 135,62 mg/L. Esta solução foi adequadamente diluída com água destilada de modo a se obter soluções com concentração de prata de 37,5 mg/L ( $\mu\text{g/mL}$ ) e 75 mg/L ( $\mu\text{g/mL}$ ), que foram então utilizadas nos experimentos com a couve minimamente processada.

#### 3.2 Processamento da couve minimamente processada

Para o processamento da couve foram seguidas as etapas demonstradas no fluxograma:



**Figura 4.** Fluxograma do processamento da couve.

As amostras utilizadas para o processamento foram coletadas em uma horta privada, localizada na cidade de Cianorte-PR. Após a colheita, as amostras foram encaminhadas para o laboratório da UTFPR – *Campus* de Campo Mourão, onde foram realizadas todas as etapas de processamento.

As folhas de couve foram lavadas com água corrente e logo em seguida retiradas os talos. O corte foi realizado com auxílio de uma faca, gerando fatias de couve com espessuras de 2 mm. A seguir, a couve já cortada foi submetida ao processo de sanitização, com 4 diferentes tratamentos: 1) Tratamento controle, onde as amostras de couve foram mergulhadas em água filtrada; 2) Tratamento com hipoclorito de sódio (PuryVitta) 200 mg.L<sup>-1</sup>; 3) Tratamento com as AgNPs na concentração de 37,5 µg/mL (AgNP 1) e 4) Tratamento com as AgNPs na

concentração de 75 µg/mL (AgNP 2) . Todas as amostras ficaram submersas por 15 minutos. A seguir, para as amostras tratadas com hipoclorito de sódio, foi feito um enxague em água filtrada, para retirada do excesso de sanitizante. As amostras submetidas aos tratamentos com as AgNPs não foram enxaguadas. Todas as amostras submetidas aos 4 diferentes tratamentos foram submetidas à centrifugação para retirada do excesso de solução, utilizando-se uma centrífuga manual para saladas (Dynasty). Após a centrifugação, foram pesados em balança 25 gramas de couve para cada amostra necessária, em seguida o produto pesado foi embalado em bandejas de isopor pequenas sendo cobertas com filme plástico. As amostras prontas foram identificadas de acordo com o tratamento utilizado e armazenadas em geladeira específica para a armazenagem de alimentos.

### 3.3 Acompanhamento microbiológico

O acompanhamento microbiológico durante o armazenamento da couve minimamente processada foi realizado através de análises microbiológicas nos seguintes intervalos: 0, 5 e 10 dias. Para estes ensaios microbiológicos, foram preparados homogenatos a partir de 25 g da amostra de couve em 225 mL de água peptonada 0,1%, esterilizada, *em stomacher*, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ , A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), as demais diluições foram efetuadas até a  $10^{-3}$ . Foram realizadas contagens totais de: 1) microrganismos aeróbios mesófilos em placas e 2) microrganismos aeróbios psicrotróficos. Foram utilizadas as metodologias conforme a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 e Silva (2006) apud Silva (2013).

#### 3.3.1 Microrganismos aeróbios mesófilos em placas

A metodologia empregada para pesquisa de Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis aplica-se a amostras de matérias-primas, água e alimentos. Fundamenta-se na semeadura em profundidade da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem (ágar PCA) seguida de incubação em temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas, segundo a Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003).

### 3.3.2 Microrganismos aeróbios psicrotróficos

A metodologia empregada para pesquisa Contagem Padrão de Microrganismos Psicrotróficos aplica-se a amostras de matérias-primas, água e alimentos, baseia-se na semeadura em profundidade da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem (PCA) seguida de incubação em temperatura de  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 dias (SILVA 2006, apud SILVA 2013).

### 3.4 Quantificação instrumental da cor

Um método básico no qual as cores podem ser expressas de forma precisa e serem compreendidas são a colorimetria, que descreve cada elemento da composição de uma cor numericamente, por meio de um aparelho apropriado. Este método de análise de cor é usado em diferentes sistemas de produção fabril, como por exemplo, indústrias têxteis, químicas e plásticas. Um dos sistemas mais utilizados para medição de cores é o sistema CIELAB (Comissão Internacional de Iluminantes), 1976, que é obtido através de coordenadas cromáticas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h$ . Este sistema é baseado em três elementos: a luminosidade ou claridade, a tonalidade ou matiz e a saturação ou cromaticidade (STANZIOLA, 1979).

A luminosidade ou brilho é expresso pelo parâmetro  $L^*$  que é uma medida da escala de cinza, entre o preto e o branco, em uma faixa de medida que varia de 0 - 100, onde  $L^* = 0$  tem-se o preto absoluto e 100, o branco total. A tonalidade é expressa pelas cores primárias vermelho, verde, amarelo e azul. Valores positivos de  $a^*$  indicam cores vermelhas, enquanto que valores negativos representam cores verdes. Da mesma forma, valores positivos de  $b^*$  demonstram cores amarelas e valores negativos demonstram cores azuis (BARROS, 2002).

Para a avaliação das cores das amostras de couve minimamente processadas, foram realizadas leituras no instrumento colorímetro da marca Miniscan. As análises foram realizadas em amostras de couve contendo 25 gramas, sendo feita a leitura nos seguintes intervalos: 0, 5 e 10 dias de armazenagem, para cada tratamento utilizado. As leituras foram realizadas em triplicatas.

### 3.5 Caracterização das nanopartículas de prata

Foram determinados o tamanho de partícula utilizando o espectro de UV-visível (OCEAN OPTICS, USB650UV) através do cálculo da largura à meia altura (*Full-Widthat Half Maximum*, FWHM). Para as análises de UV-Vis, uma cubeta de quartzo foi utilizada e a amostra foi analisada sem diluição prévia.

### 3.6 Análise estatística

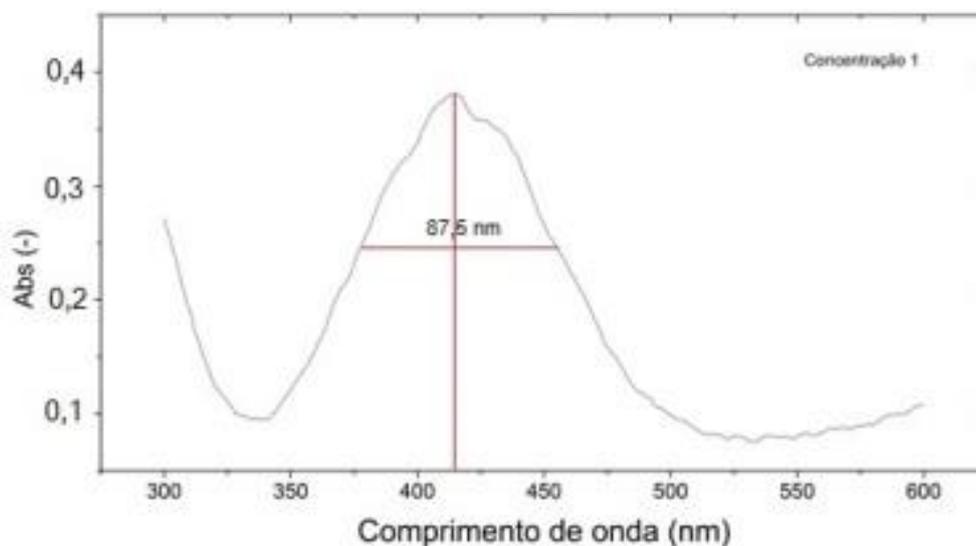
Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para a diferença mínima significativa de 5% entre as médias, utilizando o programa estatístico STATISTICA versão 7.0. Todos os testes do presente estudo foram realizados em triplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

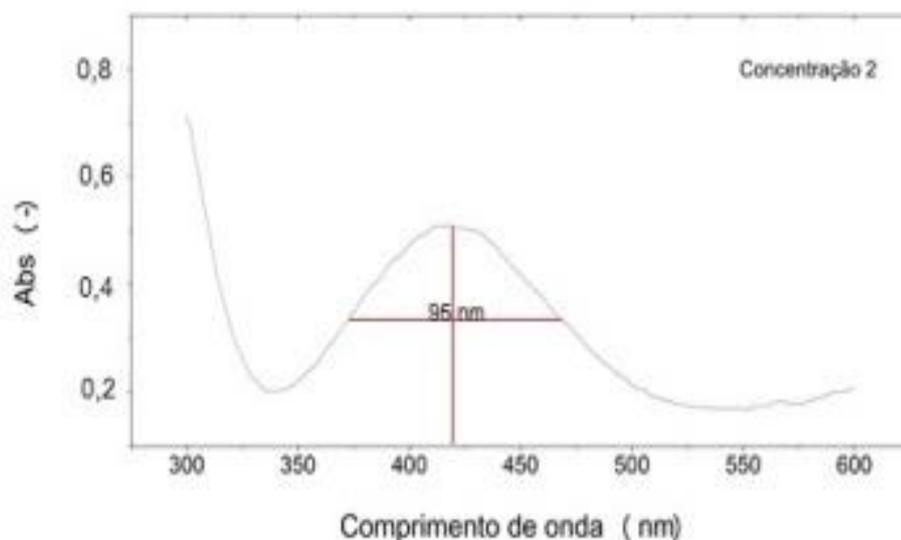
4.1 Caracterização das nanopartículas de prata por espectroscopia UV-Visível.

Espectroscopia UV-Vis se refere à análise de absorção de luz por uma amostra. Luz UV e/ou visível numa faixa de comprimentos de ondas é passada pela amostra, enquanto a quantidade de luz absorvida pela amostra é medida por um espectrofotômetro. Assim, a absorbância é determinada como uma função de uma faixa de comprimentos de onda (CASANOVA, 2010).

A figura 5 e 6 demonstram os resultados obtidos através da análise espectroscópica por UV-Vis para a concentração 1 e 2 de AgNPs, respectivamente.



**Figura 5.** Espectro de UV-Vis da solução de AgNP (Concentração 1): cálculo da largura à meia altura (FWHM).



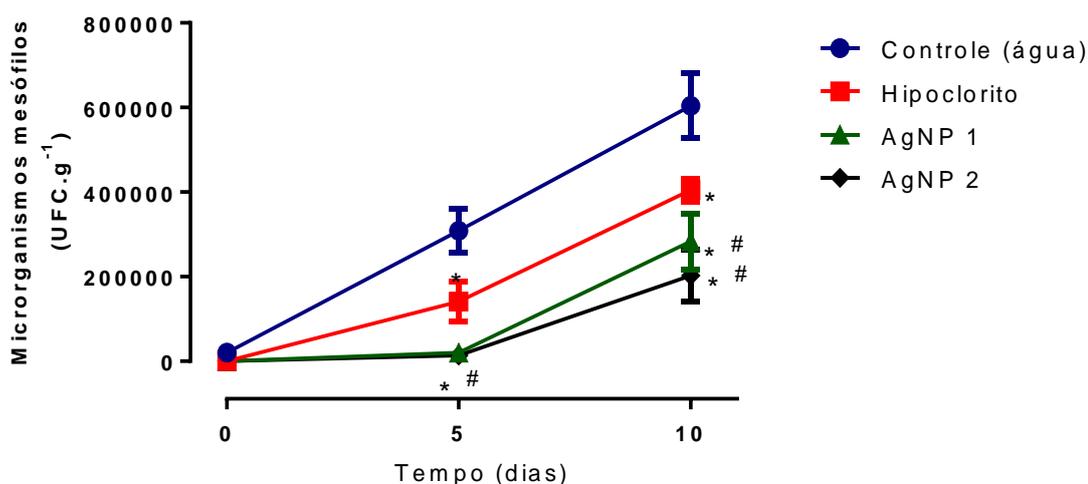
**Figura 6.** Espectro de UV-Vis da solução de AgNP (Concentração 2): cálculo da largura à meia altura (FWHM).

Nas figuras 5 e 6 é possível observar que o pico de ressonância de plasma de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) obtido da solução de nanopartículas de prata foi de aproximadamente 420 nm. Oliveira (2005) monitorou por espectroscopia de UV-visível soluções de nanopartículas de prata, que apresentaram uma banda com absorção máxima em 420 nm, correspondente a superfícies plasmon ressonante. As bandas de absorção de UV-visível de partículas metálicas variam conforme o modo de preparação. Sabe-se que a absorbância e a largura à meia altura da banda plasmon dependem de inúmeros fatores, entre eles o tamanho, a distribuição de tamanhos, o formato e a natureza do meio em que as nanopartículas se encontram.

Através do cálculo da largura à meia altura (FWHM) foi determinado o diâmetro médio das nanopartículas para a concentração 1 de 87,5 nm e para concentração 2 de 95 nm. Pizzoli (2014) utilizou a mesma técnica de síntese verde do presente trabalho e obteve tamanho de nanopartículas de prata de diâmetros de 100 nm. Manso (2014) obteve nanopartículas com diâmetro de 95,08 nm utilizando também a mesma técnica do polissacarídeo utilizada neste trabalho.

#### 4.2 Estabilidade microbiológica durante a estocagem.

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos presentes na microbiota de couve minimamente processada submetida aos diferentes tratamentos está apresentada na figura 5. Pode-se perceber nesta figura que a quantidade de microrganismos mesófilos aumentou significativamente ao longo dos 10 dias de armazenamento para todos os tratamentos. Todavia, fica também evidente nesta figura que a utilização do sanitizante hipoclorito de sódio e das AgNPs reduziu significativamente a quantidade de microrganismos mesófilos nas amostras de couve minimamente processada. Pode-se notar, inclusive, que os tratamentos com as soluções de AgNPs foram significativamente mais eficazes do que o tratamento com hipoclorito, nos dias 5 e 10.



**Figura 7.** Quantidade de microrganismos mesófilos (UFC/g) em couve minimamente processada submetida a diferentes tratamentos e armazenada por 10 dias. Após lavagem e corte, as amostras de couve foram submetidas a um banho de imersão com (●) água (controle); (■) solução de hipoclorito (200 ppm); (▲) solução de nanopartículas de prata 37,5 mg.L<sup>-1</sup> (AgNP 1) ou (◆) solução de nanopartículas de prata com concentração 75 mg.L<sup>-1</sup> (AgNP2). \*Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (água). #Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Hipoclorito.

Estes resultados podem também ser visualizados nos dados expostos na tabela 1, que mostra a quantidade de microrganismos mesófilos nas amostras de couve minimamente processada, expressa em log de UFC.g<sup>-1</sup>. Em escala logarítmica, é possível observar melhor as diferenças na contagem de

microrganismos nos tempos iniciais, quando esta ainda é baixa. Pode-se perceber nesta tabela que os tratamentos da couve minimamente processada com a solução de hipoclorito e com as soluções de AgNPs foram eficazes em reduzir a quantidade de microrganismos mesófilos desde o dia 0. Neste dia, inclusive, nota-se a maior diferença na contagem de mesófilos entre tratamentos com hipoclorito ou AgNPs, em relação ao controle. No dia 0, o tratamento com hipoclorito causou uma redução decimal de 1,61 na quantidade de mesófilos, comparado ao controle. Os tratamentos com a solução de AgNPs causaram reduções da quantidade destes microrganismos de 1,8 e 2,31 ciclos logarítmicos, para as soluções com 37,5 e 75 µg/mL de prata, respectivamente, no dia 0. Estes resultados tornam clara a necessidade de uma sanitização eficiente da superfície da couve antes do seu consumo. É preconizado que três reduções decimais (ou 99,9 % de redução) são necessárias para se considerar uma solução de sanitizante eficiente para a remoção de células bacterianas aderidas (Andrade, 2008). Neste sentido, a solução com AgNP na concentração de 75 µg/mL foi a que mais se aproximou deste valor.

**Tabela 1.** Contagem de microorganismos mesófilos em couve minimamente processada nos diferentes sanitizantes em placas de ágar PCA durante os três períodos de estocagem dado em log UFC.g<sup>-1</sup>.

	0 dia	5 dias	10 dias
Controle (Água)	4,28 ± 0,28 <sup>Aa</sup>	5,48 ± 0,07 <sup>6Ba</sup>	5,77 ± 0,05 <sup>Ca</sup>
Hipoclorito	2,67 ± 0,26 <sup>Ab</sup>	5,12 ± 0,15 <sup>Bb</sup>	5,71 ± 0,17 <sup>Cb</sup>
AgNP <sub>1</sub>	2,48 ± 0,21 <sup>Ab</sup>	4,29 ± 0,05 <sup>Bc</sup>	5,44 ± 0,09 <sup>Cc</sup>
AgNP <sub>2</sub>	1,97 ± 0,55 <sup>Ab</sup>	4,11 ± 0,14 <sup>Bc</sup>	5,29 ± 0,12 <sup>Cc</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem (P<0,05) estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Resultados muito semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2015a), que avaliaram a atividade antimicrobiana em couve minimamente processada sanitizada com soluções de nanopartículas de prata em concentrações de 6 e 60 mg/L. Estes autores também observaram que as nanopartículas de prata apresentaram resultados satisfatórios na descontaminação da couve minimamente processada, quando comparadas ao controle (água), com diferenças significativas nas reduções decimais, sendo essas acima de dois ciclos logarítmicos, para ambas as concentrações (6 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup>). Em outro trabalho realizado pelo mesmo

grupo de pesquisa (Araujo et al., 2015b), foi também observado uma redução decimal de 3,73 na contagem de microrganismos mesófilos em cenoura minimamente processada. Todavia, as AgNPs utilizadas nestes estudos foram obtidas por uma técnica diferente da técnica utilizada no presente trabalho. Para obtenção das nanopartículas de prata, estes autores utilizaram o surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio e sulfadiazina de prata.

Levando-se em consideração que os vegetais minimamente processados são mantidos sob refrigeração até o seu consumo, torna-se interessante investigar a presença da microbiota denominada psicrotrófica, que independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, multiplica-se bem sob refrigeração. Os resultados da quantidade desta classe de microrganismos na couve minimamente processada submetida aos diferentes tratamentos pode ser visualizada na tabela 2.

**Tabela 2.** Contagem de microrganismos psicrotróficos em couve minimamente processada com diferentes sanitizantes em placas de ágar PCA durante os três períodos de estocagem dado em log UFC.g<sup>-1</sup>.

	0 dia	5 dias	10 dias
Controle (Água)	3,39 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	5,35 ± 0,07 <sup>Ba</sup>	5,58 ± 0,04 <sup>Ca</sup>
Hipoclorito	2,54 ± 0,09 <sup>Ab</sup>	5,01 ± 0,08 <sup>Bb</sup>	5,52 ± 0,06 <sup>Cb</sup>
AgNP <sub>1</sub>	2,37 ± 0,18 <sup>Ab</sup>	4,64 ± 0,17 <sup>Bc</sup>	5,05 ± 0,16 <sup>Cc</sup>
AgNP <sub>2</sub>	2,17 ± 0,30 <sup>Ab</sup>	4,64 ± 0,14 <sup>Bc</sup>	4,97 ± 0,07 <sup>Cc</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem (P<0,05) estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Em relação aos microrganismos psicrotróficos, foi observado um padrão muito semelhante ao encontrado para microrganismos mesófilos. A sanitização com hipoclorito ou com a solução de AgNPs nas duas concentrações testadas diminuiu significativamente a quantidade de microrganismos psicrotróficos em relação ao controle, desde o dia 0 até o dia 10. Adicionalmente, a solução com AgNPs foi ainda mais eficaz do que o hipoclorito como sanitizante no 5<sup>o</sup> e no 10<sup>o</sup> dia de armazenamento.

Estes resultados confirmam o efeito antimicrobiano da prata e aumentam ainda mais o leque de aplicações das nanopartículas de prata, como conservante de alimentos minimamente processados.

### 4.3 Cor

Outro aspecto que nos chamou muito a atenção nestes experimentos, foi que as amostras de couve tratadas com a solução de AgNPs mantinham a coloração verde, ou ficavam menos amareladas, durante o período de armazenamento de 10 dias. Por esta razão, foi realizada também a análise instrumental de cor da couve minimamente processada submetida aos diferentes tratamentos. Os resultados desta análise podem ser visualizados na tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados obtidos através da análise instrumental de cor na couve minimamente processada nos diferentes tratamentos durante os 10 dias de armazenamento.

	Dia0			Dia 05			Dia 10		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
<b>Controle</b>	45,29	-9,17	32,03	42,05	-7,60	37,99	40,74	-6,14	41,17
	±0,94	±0,20	±0,75	±0,24	±0,15	±0,93	±0,37	± 0,28	±0,44
	Aa	Aa	Aa	Ba	Ba	Ba	Ca	Ca	Ca
<b>Hipoclorito</b>	45,64	-9,18	32,22	42,17	-7,95	35,89	40,89	-6,99	39,03
	±1,15	±0,13	±0,36	±0,81	±0,19	±0,97	±0,21	±0,13	±0,26
	Aa	Aa	Aa	Ba	Ba	Ba	Ca	Ca	Ca
<b>AgNPs<sub>[1]</sub></b>	45,70	-9,12	32,07	39,97	-8,74	33,27	38,04	-7,86	34,88
	±0,58	±0,25	±0,37	±0,63	±0,23	±0,39	±0,53	±0,18	±0,20
	Aa	Aa	Aa	Bb	Bb	Bc	Cb	Cb	Cb
<b>AgNPs<sub>[2]</sub></b>	45,44	-9,18	32,22	39,60	-8,77	32,63	37,79	-7,82	34,52
	±0,51	±0,18	±0,47	±0,77	±0,28	±0,56	±0,28	±0,17	±0,67
	Aa	Aa	Aa	Bb	Bb	Bc	Cb	Cb	Cb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferiram entre si pelo teste de *Tukey* ( $P < 0,05$ )

A luminosidade ou brilho é expressa pelo parâmetro  $L^*$  que é uma medida da escala de cinza, entre o preto e o branco, em uma faixa de medida que varia de 0 - 100, onde  $L^* = 0$  tem-se o preto absoluto e 100, o branco total. Pode-se perceber na tabela 3 que os valores de  $L^*$  tiveram uma tendência à diminuição ao longo do período de armazenamento, para todas as amostras. Nota-se, entretanto, que nos dias 5 e 10, as amostras tratadas com a solução de AgNPs apresentaram valores de

$L^*$  significativamente menores do que os grupos controle e hipoclorito. Estes resultados indicam que as folhas tratadas com AgNPs se mantiveram mais escuras. Esta pode ser uma característica desejável, já que, segundo Novo et al. (2011) a preferência para os produtos minimamente processados deve ser por variedades com valores de  $L^*$  e  $b^*$  menores (mais escuros) e com  $a^*$  mais negativos.

Em relação à coordenada  $a^*$ , que indica a posição da cor entre verde (-a) e vermelho (+a), pode-se perceber que os valores foram ficando menos negativos ao longo do período de armazenamento, o que pode ser indicativo da perda da cor verde. Novamente, no 5º e 10º dia de armazenamento, as amostras tratadas com AgNPs apresentaram valores da coordenada  $a^*$  significativamente mais negativos do que os grupos controle e hipoclorito. Ou seja, estes resultados confirmam, quantitativamente, que a solução de AgNP foi capaz de manter a coloração verde das amostras.

O parâmetro  $b^*$  indica coloração entre azul (- $b^*$ ) e amarelo (+b). Em relação a esta coordenada, podemos notar que todas as amostras, durante todo o período de armazenagem, apresentaram valores positivos de  $b^*$ , indicando coloração mais amarelada. Todavia, foi observado um aumento dos valores de  $b^*$  ao longo do período de armazenamento para todas as amostras (mais positivos), indicando aumento da coloração amarelada e diminuição da cor verde. Todavia, as amostras tratadas com as soluções de AgNPs, nas duas concentrações testadas, apresentaram valores de  $b^*$  significativamente menores do que as amostras controle e hipoclorito, no 5º e 10º dia de armazenamento. Estes resultados são indicativos de que estas amostras foram menos suscetíveis ao amarelecimento.

A couve minimamente processada é um produto com alta perecibilidade devido à rápida perda de turgescência e senescência pós-colheita uma vez que esse tipo de produto, por sofrer estresse mecânico durante o preparo, apresenta alta atividade respiratória e elevada perda de água. A perda de cor verde durante o armazenamento é atribuída à degradação da clorofila. Um dos produtos de degradação da clorofila, a feofitina, possui cor marrom azeitona. Outro tipo comum de deterioração é a remoção da cadeia fitol, conduzindo à formação de clorofilida ou feoforbídeo, que são incolores (Streit et al, 2005). É possível que as AgNPs utilizadas neste trabalho sejam capazes de diminuir a degradação da clorofila em couve minimamente processada. Outros autores também já relataram resultados semelhantes em relação à coloração verde de vegetais. Jowkar et al (20013), por

exemplo, demonstraram que a aplicação de nanopartículas de prata em flores recém-cortadas foi capaz de manter o conteúdo de clorofila estável e em maior concentração do que o controle. An et al. (2008), também demonstraram que aspargos recobertos com nanopartículas de prata e PVP (polivinilpirrolidona) se mantiveram mais verdes durante os 25 dias de armazenamento.

## **CONCLUSÃO**

Através do Espectroscopia de UV-Vísivel foi possível comprovar a presença de nanopartículas de prata.

Foi confirmada a eficiência das nanopartículas de prata como agentes sanitizantes para as couves minimamente processadas, confirmada pelas análises microbiológicas, sendo que para as duas concentrações de AgNPs a eficácia foi confirmada, comparadas com trabalhos já realizados e com os outros tratamentos também realizados neste trabalho.

Através das análises instrumentais de coloração concluiu-se que os resultados obtidos indicam que as folhas tratadas com AgNPs se mantiveram mais escuras, com capacidade de manter a coloração verde das amostras e que foram menos suscetíveis ao amarelecimento, durante o período avaliado.

## REFERÊNCIAS

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

ARAUJO, E. A.; RIBEIRO, L.; BERNARDES, P. C.; DORES, M. T. das, JUNIOR, J. F. Q. F. **Sanitização de cenoura minimamente processada com nanopartículas de prata.** Ciência Rural, São Paulo, 2010.

ARAUJO, E. A.; RIBEIRO, L.; BERNARDES, P. C.; DORES, M. T. das, JUNIOR, J. F. Q. F. **Nanopartículas de prata: método alternativo de sanitização para couve minimamente processada.** Goiânia, 2015.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. **Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado.** Ciências Rural, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250- 2255, 2008.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 2008.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3rd ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

BRASIL. M.A.A. Portaria 368 de 04/09/1997. **Regulamento técnico sobre condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos.** Diário Oficial da União, de 08/09/97.

BARROS, J. F. M. **Desdobro e caracterização tecnológica das madeiras de Eucalyptus grandis Hill ex-Maiden e Eucalyptus cloeziana F. Muell para a**

**indústria moveleira.** 54p. 2002 Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

BATABYAL, S. K., BASU, C., DAS, A. R., SANYAL, G. S, **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, 1 (2007) 143-147.

BERTÉ, R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata conjugadas com peptídios antimicrobianos.** São Carlos, 2013.

BOLIN, H, R; HUXSOLL, C. C. **Storage stability of minimally processed fruit.** **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v.13, p.281-292, 1989.

CARDOSO, A. M.. **Trabalhar, verbo transitivo: destinos profissionais dos deserdados da indústria automobilística.** Rio de Janeiro: Editora da Fundação Getúlio Vargas, 2000.

CARNELOSSI, M.A.G. **Fisiologia pós-colheita de folhas de couve (Brassica oleracea, L. var. acephala) minimamente processada.** Viçosa, MG.: UFRV, 79 p., 2000. Dissertação, (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2000.

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

CHAMAKURA, K.; PEREZ-BALLESTERO, R.; LUO, Z.; BASHIR, S.; LIU, J. **Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants.** **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 88-96, 2011.

COSTA, C.; CONTE, A.; BUONOCORE, G. G.; LAVORGNA, M.; DEL NOBILE, M. A. Calcium-alginate coating loaded with silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf-life of fresh-cut carrots. **Food Res. Int.**, v. 48, p. 164-169, 2012.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2001.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. **Microbiota contaminante em repolho minimamente processado**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(2): 207-211, abr.-jun. 2004.

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.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 182p.

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.

HEBEISH, A. A., EL-RAFIE, M. H., ABDEL-MOHDY, F. A., ABDEL-HALIM, E. S., EMAM, H. E, **Carbohydrate Polymers**, 3 (2010) 933–941.

HUNTERLAB. **CIE L\*a\*b\* color scale**. Applications Note, v. 8, n. 7, p.1-4, 1996.

ICMSF e IAMS – **APPCC na Qualidade e Segurança microbiológica de Alimentos, Comissão Internacional para especificação Microbiológicas dos Alimentos da União internacional das Sociedade de Microbiologia**, 1997.

IFPA. **International fresh-cut produce association**. Disponível em:<<http://www.fresh-cuts.org>> . Acesso em: 12 ago. 2015.

JIANG, T.; LIFANG F.; YANBO W. Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage. **Food Chem.**; v. 141, p. 954-960, 2013.

JOWKAR, MOHAMMAD MAHDI; KHALIGHI. AHMAD, KAFI, MOHSEN; HASSANZADEH, NADER. Nano silver application impact as vase solution biocide on postharvest microbial and physiological properties of 'Cherry Brandy' rose. **Food, Agriculture and Environment.** v. 11, n. 1, p. 1045-1050, 2013.

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.

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

KLUEH, U.; WAGNER, V.; KELLY, S.; JOHNSON, A.; BRYERS, J. D. **Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization na subseuqent device-based biofilm formation.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 53, p. 621-31, 2000.

KOUVARIS, P., DELIMITIS, A., ZASPALIS, V., PAPADOPOULOS, D., TSIPAS, S.A, **Materials Letters**, 1 (2012) 18-20.

LAGARÓN, J.M.; OCIO, M.J.; RUBIO, A. L. Editors. **Antimicrobial Polymer. Chapter 11 – Silver and nanosilver based plastic Technologies.** Antonio Marinez Abad. Wiley – New Jersey, p. 287-316, 2012.

LE, A. T., HUY, P. T., TAM, P. D., HUY, T. Q., CAM, P. D., KUDRINSKIY, A. A., KRUTYAKOV, Y. A, **Current Applied Physics**, 3 (2010) 910-916.

LEITÃO, M.F. de F. **Perigos em Produtos Agrícolas Frescos. In: Elementos e apoio para as boas praticas agrícolas e o sistema APPCC. Brasília, 200p. (Série qualidade e segurança dos alimentos)** Convênio: CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA, 2004. p.29-60.

LIAU, S. Y.; READ, D. C.; PUGH, W. J.; FURR, J. R.; RUSSEL, A. D. **Interaction of silver-nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions.** *Left. Appl. Microbiol.*, v.25, p. 279-83, 1997.

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 (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

MODAK, S. M.; FOZ, Jr C. L. **Blinding of silver sulfadiazine to the cellular componentes of Peseudomonas aeruginosa.** *Biochem. Pharmacol.*, v.22, p. 2391-404, 1973.

MONTANHINI, M. T. M. **Caracterização fenotípica e genotípica de Bacillus cereus isolado em produtos lácteos com relação ao seu comportamento psicrotrófico.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.

MORETTI, C.L.; MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. **Respiratory activity and browning of minimally processed sweet potatoes.** *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, p.497-500, 2002.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; RAMIREZ, J. T.; **The Bacterial Effect of Silver Nanoparticles.** *Nanotechnology*, 16, 2005; 2346-2353.

NAWAZ, M.; HAN, M. Y.; KIM, T.; MANZOOR, U.; AMIN, M. T. **Silver disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* in rooftop harvested Rainwater for potable purposes.** *Sci total. Environ.*, v431, p. 20-25, 2012.

NOVO, M.C.S; PRELA-PANTANO, A.; DEUBER, R.; TORRES< R.B.; TRANI, P.E.; BRON, I.U. **Caracterização morfológica e da coloração de folhas de couve do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico de Campinas.** 2011. Artigo



<<http://www.cnph.embrapa.br/novidade/eventos/semipos/texto19.pdf>>. Acesso em: 04 out. 2015.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, n. 1, p. 76-83, 2009.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. **Características Microbiológicas de Frutos e Hortaliças Minimamente Processados. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n.2, p.84-92, 2000.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE. In: Adam PF, Peter AL, Jean-Yves M, editors. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**, 4th ed. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing. P. 61, 304-305, 2004.

SANCHES, M. **Hortaliças: consumo e preferência das escolas**. Piracicaba, 2002.

SILVA, A. C. **Caracterização microbiológica e importância da pesquisa de estafilococos coagulase positiva em couves minimamente processadas, comercializadas no município de campo mourão**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

SILVA, N.da.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.I. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.295p.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159 p.

STANAZIOLA, R. **Colorimetry and the calculation of color difference**. São Paulo: Superlab, 1986. 27p.

STREIT, Nivia Maria; CANTERLE, Liana Pedrolo; CANTO, Marta Weber do and HECKTHEUER, Luísa Helena Hycheki. **As clorofilas**. *Cienc. Rural* [online]. 2005, vol.35, n.3, pp. 748-755. ISSN 1678-4596.

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**, Trabalho de conclusão de curso – UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

THURMAN, R. B.; GERBA, C. O. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit. Ver. Eviro. Contr.*, v.18, p. 295-315, 1989.

VANETTI, M.C. D. **Segurança microbiológica em produtos minimamente processados**. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MINIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 3., 2004. Viçosa- MG. Palestras, resumos e oficinas. Viçosa:..UFV, 2004. p.30-32.

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.

WALL, R. **Prata nanoparticulada: avaliação das potencialidades de aplicação e dos riscos associados na desinfecção de água em comparação com sistemas convencionais de cloração**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2010.

WILEY, R.C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. London: Chapman & Hall, 1994. 357 p.