



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

Fernanda da Cunha Puti

**APLICAÇÃO DE FILMES COM NANOPARTÍCULAS DE
PRATA NA CONSERVAÇÃO DE MORANGOS**

São Carlos – SP

2014

Fernanda da Cunha Puti

APLICAÇÃO DE FILMES COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
CONSERVAÇÃO DE MORANGOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadores:

Dr. Marcos David Ferreira

Dr. Daniel Souza Corrêa

São Carlos – SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P988af Puti, Fernanda da Cunha.
Aplicação de filmes com nanopartículas de prata na
conservação de morangos / Fernanda da Cunha Puti. -- São
Carlos : UFSCar, 2015.
82 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Filmes plásticos. 2. Nanotecnologia. 3. Embalagem. 4.
Polietileno de baixa densidade. I. Título.

CDD: 668.4 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda da Cunha Puti, realizada em 17/12/2014:

Prof. Dr. Marcos David Ferreira
Embrapa

Profa. Dra. Adriana Pavinatto
USP

Profa. Dra. Lucimara Aparecida Forato
Embrapa

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
por todo amor e incentivo constante.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte de minhas forças e alegrias, por estar sempre comigo e por me orientar em cada passo que dou.

A minha família, em especial meus pais Antonio e Sonia, por todo incentivo dado durante toda minha vida, por todo amor sem medidas recebido por eles e por acreditarem em mim.

Aos meus orientadores Dr. Marcos David Ferreira e Dr. Daniel Souza Corrêa pela orientação no mestrado, por cada ensinamento, pelos conselhos e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Aos colegas da Embrapa Instrumentação, pelo acompanhamento constante, desde o projeto até a defesa, e pelo convívio diário.

A todo o pessoal do Laboratório Tecnologia Pós-colheita, pela amizade, pelo convívio diário, pelas risadas e por terem me auxiliado nos experimentos realizados.

A todos meus amigos que sempre me acompanham e que tiveram contribuição indispensável para a concretização de mais essa etapa em minha vida.

A minha avó Aparecida (*in memoriam*) por todos os ensinamentos e valores passados e por me ensinar a encarar as dificuldades com gratidão a Deus e com toda garra que lhe cabe.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da minha bolsa de mestrado e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para que a concretização de mais essa etapa na minha vida.

*“Ousem nadar contra a corrente.
Sejam capazes de buscar a verdadeira felicidade.”*

Papa Francisco

Jornada Mundial da Juventude 2013

RESUMO

O consumo de alimentos como frutas e hortaliças vem crescendo juntamente com a busca por uma alimentação mais saudável. Neste contexto, o morango se destaca por seu valor nutritivo e também por ser uma fruta saborosa e atraente. Porém, nas condições brasileiras por ser colhido próximo a sua maturação fisiológica, as perdas em qualidade pós-colheita são altas. Filmes poliméricos com nanopartículas (NPs) metálicas têm sido utilizados em embalagens alimentícias, dispondo de propriedades que contribuem para a manutenção da qualidade de frutas e hortaliças e, dentre estas, as nanopartículas de prata (NPsAg) vem se destacando pela sua ação antimicrobiana. Objetiva-se nesse trabalho avaliar a qualidade pós-colheita de morangos embalados em filmes contendo NPsAg e filmes convencionais (sem adição de NPs). Para tanto, filmes comerciais de polietileno de baixa densidade (PEBD) contendo NPsAg foram caracterizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Difração de Raio X (DRX), além da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes. Para avaliar o efeito destes filmes na qualidade físico-química e microbiológica de morangos, os seguintes experimentos foram realizados: (I) morangos embalados com filmes PEBD e PEBD+NPAg armazenados em câmara fria a 5 e a 25°C por nove dias, foram avaliados por meio de análises físico-químicas e microbiológicas a cada três dias; (II) morangos embalados com filmes PEBD e PEBD+NPAg foram armazenados a 5 e a 20°C por nove dias, e submetidos às mesmas análises. Para investigar mais detalhadamente o efeito antimicrobiano das embalagens, dois outros experimentos foram realizados inoculando os morangos com *Eschechiria coli*: (III) morangos inoculados com *E. coli* a uma concentração inicial de 10^8 UFC mL⁻¹, armazenados a 5°C por dez dias, sendo realizadas análises microbiológicas e físico-químicas a cada dois dias; e (IV) morangos inoculados com *E. coli* a uma concentração inicial de 10^5 UFC mL⁻¹, armazenados a 10°C por dez dias, sendo realizadas apenas análises microbiológicas a cada dois dias. A adição de NPsAg na matriz de PEBD não interferiu nas propriedades térmicas e nas propriedades físico-químicas dos filmes. Os filmes contendo NPsAg apresentaram atividade antimicrobiana contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, com maior efetividade contra Gram-negativos. A qualidade físico-química dos morangos foi afetada principalmente pela temperatura e pelo tempo de armazenamento.

A ação antimicrobiana das NPsAg quando aplicadas nas embalagens de morango foi efetiva na diminuição da população microbiana nos morangos. A ação antimicrobiana e a manutenção da qualidade pós-colheita apresentada pelas embalagens de polietileno com NPsAg pode ser um indicativo de uso para outras frutas e hortaliças, podendo auxiliar na diminuição das perdas pós colheita, e contribuindo para questões de segurança do alimento.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch, nanotecnologia, qualidade microbiológica, qualidade pós-colheita, embalagem, polietileno de baixa densidade.

ABSTRACT

The consumption of fruits and vegetables has been growing due to the efforts for a healthier diet. In this context, strawberry can be highlighted for its nutritional value and for being a tasty and attractive fruit. However, on Brazil conditions, for being harvested near its physiological maturity, losses in post-harvest quality are high. Polymeric films containing metal nanoparticles (NPs) have been used in food packaging, once they present properties that contribute in maintaining the quality of fruits and vegetables. For instance, silver nanoparticles (AgNPs) stands out for its antimicrobial action. The goal of this work was to evaluate the post-harvest quality of strawberries packed in polymeric films containing AgNPs and conventional net polymeric films (without NPs). For this purpose, commercial low-density polyethylene films (LDPE) containing AgNPs were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FTIR), thermogravimetry (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-Ray Diffraction (XRD), antimicrobial activity tests. For evaluating the films influence on the physical-chemical and microbiological quality of strawberry, the following experiments were performed: (I) strawberry packaged in LDPE and LDPE+AgNP films were stored in cold chamber at 5 and 25 °C for nine days, where physical-chemical and microbiological analyzes were carried out at every three days; (II) Strawberry packaged by LDPE and LDPE+AgNP films were stored in cold chamber at 5 and 25 °C for nine days, and were submitted to the same physical-chemical analysis. To investigate in more details the antimicrobial effects of packaging, two experiments were carried out with strawberry inoculated by *E. coli*: (III) firstly, strawberry inoculated with *E. coli* with an initial concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ were stored at 5°C for ten days; subsequently, the physical-chemistry and microbiological analyses were carried out; and (IV) strawberry inoculated with *E. coli* with an initial concentration at 10^5 CFU mL⁻¹ were stored at 10°C for ten days; subsequently, the microbiological analyses were carried out at every two days. Adding AgNPs on LDPE matrix did not influence the thermal and physical-chemical properties of films. Films containing AgNPs showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative microrganims. Physical-chemical quality of strawberry was affected mainly by temperature and storage period. AgNPs contained in LDPE packaging was efficient on controlling microbial population growth. Antimicrobial activity and post-harvest quality attained by polyetilene films containing AgNPs may be an indicative for using such

type of active packing for other fruits and vegetables, which can help decreasing post harvest losses, and may contribute to improve food safety.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch, nanotechnology, microbiological quality post harvest quality, packaging, low density polyethylene, embalagem, polietileno de baixa densidade.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação morfológica da flor do morangueiro e do morango (Adaptado de Pimo (2009)).	7
Figura 2. Estrutura molecular do polietileno e ilustração da ramificação de PEBD (modificado de COUTINHO, MELLO e SANTA MARIA, 2003).	10
Figura 3. Escala de comprimento para contextualização das nanopartículas (Modificado de: GOESMANN e FELDMANN, 2010).	11
Figura 4. Modelo ilustrando a área superficial dos nanomateriais (Modificado de: GOESMAN e FELDMANN, 2010).	12
Figura 5. Ilustração dos possíveis mecanismos de ação das NPsAg contra as bactérias.	14
Figura 6. Fluxograma ilustrativo do teste antimicrobiano segundo norma JIS Z 2801: 2000.	19
Figura 7. Fluxograma ilustrando a colheita e seleção dos morangos utilizados no experimento.	21
Figura 8. Fluxograma ilustrando a embalagem e armazenamento de morangos.	21
Figura 9. Produto final do Experimento I: morangos embalados em filmes convencionais (PEBD) e com filmes contendo NPsAg (PEBD+NPAg).	21
Figura 10. Determinação da firmeza de morangos: (A) região central do corte transversal e (B) epiderme (região externa) dos morangos.	23
Figura 11. Determinação da Acidez Titulável de morangos.	23
Figura 12. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis em refratômetro.	24
Figura 13. Determinação da Coloração da superfície dos morangos embalados com filmes de PEBD e de PEBD com NPsAg.	25
Figura 14. Espaço de cores CIE.	25
Figura 15. Sanitização dos morangos antes de serem embalados.	27
Figura 16. Etapas do ensaio com inoculação de E. coli: (A) sanitização dos morangos selecionados, (B) drenagem dos morangos em gazes estéreis, (C) inoculação dos morangos, (D) drenagem dos morangos em papel alumínio estéril, (E) embalagem e selagem a vácuo e (F).	29
Figura 17. Imagem de microscopia óptica (Objetiva.40, aumento de 400x).	32
Figura 18. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do filme de PEBD contendo NPsAg (imagem esquerda) e o mapeamento por EDS (Energy Dispersive X-Ray) (imagem direita).	33
Figura 19. Mapeamento dos principais elementos que compõe os filmes de PEBD contendo NPsAg.	33
Figura 20. Imagem de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG-SEM) dos filmes PEBD+NPAg: imagem da espessura do filme por meio da fratura criogênica (imagem esquerda) e imagem das estruturas de SiO ₂ nos filmes (imagem direita).	34
Figura 21. Curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos filmes de PEBD e de PEBD+NPAg.	35

Figura 22. Análise termogravimétrica nos filmes convencionais (PE) e filmes com nanopartículas de prata (NP) em atmosfera oxidativa.....	36
Figura 23. Espectro de FTIR de filmes convencionais PEBD e filmes PEBD+NPAg. .	37
Figura 24. Difratoograma de Raio X de filme de PEBD e PEBD+NPAg.	38
Figura 25. Teste do halo de inibição dos filmes para <i>E. coli</i> (A) PEBD e (B) PEBD+NPAg e para <i>S. aureus</i> (C) PEBD e (D) PEBD+NPAg; os discos indicados pela seta verde são os discos dos filmes.....	39
Figura 26. Imagens dos resultados com crescimento em PEBD e crescimento reduzido em PEBD+NPAg para <i>E. coli</i>	40
Figura 27. Perda de massa fresca (%) de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5°C ($y = -2E-05x^3 - 0,001x^2 + 0,024x$) e 25°C ($y = -0,001x^3 + 0,018x^2 + 0,142x$) por nove dias.....	42
Figura 28. Firmeza da epiderme de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações: PEBD 5°C ($y = 0,106x + 2,142$); PEBD+NPAg 5°C ($y = 0,035x^3 - 0,517x^2 + 1,873x + 2,211$); PEBD 25°C ($y = -0,013x^2 + 0,039x + 2,21$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = -0,005x^3 + 0,078x^2 - 0,381x + 2,211$)......	43
Figura 29. Valores de pH de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 ($y = 0,003x^3 - 0,052x^2 + 0,194x + 3,576$) e 25°C ($y = 0,001x^3 - 0,029x^2 + 0,145x + 3,576$) por nove dias.	44
Figura 30. Teor de sólidos solúveis em morangos armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações: PEBD 5°C ($y = 0,003x^3 - 0,067x^2 + 0,261x + 7,32$); PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,003x^3 + 0,029x^2 - 0,060x + 7,32$); PEBD 25°C ($y = -0,002x^3 + 0,053x^2 - 0,602x + 7,32$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = 0,002x^3 - 0,021x^2 - 0,356x + 7,32$).	45
Figura 31. Teor de ácido ascórbico em morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equação: $y = 0,025x^3 + 0,383x^2 - 10,12x + 104,9$	46
Figura 32. Coloração de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações gráfico Cromaticidade: 5°C ($y = -0,003x^3 + 0,017x^2 + 0,725x + 42,61$) e 25°C ($y = -0,039x^2 - 0,957x + 43,31$); Luminosidade 5°C ($y = -0,024x^3 + 0,246x^2 - 0,04x + 35,78$) e 25°C ($y = 0,024x^3 - 0,374x^2 + 0,725x + 35,78$); Ângulo Hue PEBD 5°C ($y = 0,014x^3 - 0,181x^2 + 0,762x + 33,47$), PEBD+NPAg 5°C ($y = 0,074x^3 - 1,039x^2 + 3,646x + 33,47$), PEBD 25°C ($y = 0,065x^3 - 0,790x^2 + 0,965x + 33,47$), PEBD+NPAg 25°C ($y = 0,141x^3 - 1,719x^2 + 3,751x + 33,47$)......	47
Figura 33. Contagem de coliformes, mesófilos e bolores e leveduras (Log UFC mL^{-1}) presente em morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações dos gráficos: Coliformes PEBD 5°C ($y = 0,003x^3 - 0,079x^2 + 0,381x + 4,097$), PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,001x^3 + 0,031x^2 - 0,124x + 4,097$), PEBD 25°C ($y = 0,001x^3 - 0,097x^2 + 0,737x + 4,097$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = -0,028x^3 + 0,366x^2 - 0,955x + 4,097$); Mesófilos PEBD 5°C ($y = 0,006x^3 - 0,075x^2 + 0,234x + 4,690$), PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,019x^3 + 0,292x^2 - 0,983x + 4,690$), PEBD 25°C ($y = -0,015x^3 + 0,211x^2 - 0,539x + 4,690$), PEBD+NPAg 25°C ($y =$	

- 0,020x³ + 0,205x² - 0,102x + 4,690), Bolores e Leveduras PEBD 5°C (y = 0,039x³ - 0,700x² + 2,727x + 5,667), PEBD+NPAg 5°C (y = -0,065x³ + 0,679x² - 1,181x + 5,667), PEBD 25°C (y = -0,100x³ + 1,118x² - 2,231x + 5,667) e PEBD+NPAg 25°C (y = -0,114x³ + 1,400x² - 3,683x + 5,667)..... 48
- Figura 34. pH de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equações dos gráficos 5°C (y = -0,001x³ + 0,029x² - 0,103x + 3,43) e 25°C (y = -0,002x³ + 0,039x² - 0,122x + 3,43). 52
- Figura 35. Acidez titulável de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equações do gráfico: PEBD 5°C (y = 0,000x³ - 0,014x² + 0,074x + 0,928), PEBD+NPAg 5°C (y = 0,000x³ - 0,007x² + 0,064x + 0,928), PEBD 20°C (y = 0,001x³ - 0,026x² + 0,139x + 0,928)..... 53
- Figura 36. Sólidos solúveis de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equação do gráfico: 5°C (y = -0,013x³ + 0,198x² - 0,720x + 7,99) e 20°C (y = -0,001x³ + 0,039x² - 0,505x + 7,99). 53
- Figura 37. Coloração de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equações dos gráficos: Luminosidade 5°C (y = -0,029x³ + 0,231x² + 0,379x + 37,19) e 25°C (y = 0,029x³ - 0,464x² + 1,280x + 37,19); Ângulo Hue 5°C (y=0,012x³ - 0,106x² + 0,052x + 29,01) e 25°C (y = 0,002x³ - 0,041x² - 0,169x + 29,01); Cromaticidade PEBD 5°C (y = -0,026x³ + 0,082x² + 1,435x + 37,19), PEBD+NPAg 5°C (y = -0,032x³ + 0,379x² - 0,675x + 37,19), PEBD 20°C (y = -0,040x³ + 0,534x² - 2,089x + 37,19), PEBD+NPAg 20°C (y = 0,099x³ - 1,463x² + 4,649x + 37,19)..... 54
- Figura 38. Contagem de micro-organismos mesófilos e de bolores e leveduras (Log UFC mL⁻¹) presente em morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 20°C por nove dias. Equação dos gráficos: Mesófilos PEBD (y = 0,030x³ - 0,449x² + 1,937x + 2,763) e PEBD+NPAg (y = 0,008x³ - 0,105x² + 0,752x + 2,763); Bolores e Leveduras PEBD (y = 0,000x³ - 0,037x² + 0,952x + 1,669) e PEBD+NPAg (y = 0,016x³ - 0,253x² + 1,593x + 1,669). 56
- Figura 39. Perda de Massa de morangos inoculados com *E. coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equação do gráfico: y = -0,000x³ + 0,007x² - 0,001x + 0,001..... 58
- Figura 40. Firmeza da epiderme e da polpa de morangos inoculados com *E.coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias. Equação dos gráficos: Epiderme (y = -0,002x³ + 0,057x² - 0,358x + 2,044) e Polpa (y = 0,006x³ - 0,106x² + 0,361x + 2,453). 59
- Figura 41. Valores de pH de morangos inoculados com *E.coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equações do gráfico: PEBD+NPAg neg (y = -0,000x³ + 0,001x² + 0,012x + 3,387),PEBD *E. coli* (y = 0,002x³ - 0,036x² + 0,165x + 3,383), PEBD+NPAg *E. coli* (y = 0,001x³ - 0,022x² + 0,119x + 3,380)..... 60
- Figura 42. Acidez titulável de morangos inoculados com *E.coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. 61
- Figura 43. Teor de sólidos solúveis de morangos inoculados com *E. coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C.

Equações do gráfico: Neg ($y = 0,007x^3 - 0,123x^2 + 0,264x + 8,118$) e *E. coli* ($y = 0,008x^3 - 0,124x^2 + 0,344x + 8,168$). 62

Figura 44. Curva ajustada Ratio de morangos inoculados com *E.coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equações do gráfico: PEBD ($y = 0,091x^3 - 1,530x^2 + 6,433x + 9,246$) e PEBD+NPAg ($y = 0,023x^3 - 0,510x^2 + 3,188x + 8,432$). 63

Figura 45. Curva ajustada para o teor de ácido ascórbico de morangos de morangos inoculados com *E. coli* embalados com PEBD e de PEBD com NPAsAg e armazenados a 5°C por 10 dias. Equação do gráfico: ($y = -0,076x^3 - 1,854x^2 + 42,28x + 77,57$). 64

Figura 46. Efeito de embalagens de PEBD e de PEBD com NPAsAg na coloração de morangos inoculados com *E. coli* armazenados a 5°C por 10 dias: Cromaticidade ($y = 0,198x^2 - 1,963x + 30,53$) e Luminosidade ($y = -0,099x^2 + 0,410x + 33,25$). 65

Figura 47. Enterobactérias (UFC mL⁻¹) de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAG a 5°C por 10 dias. Equações dos gráficos: PEBD neg ($y = -0,015x^3 + 0,244x^2 - 1,096x + 5,766$), PBED+NPAG neg ($y = 0,007x^3 - 0,172x^2 + 1,177x + 2,124$), PEBD *E. coli* ($y = 0,032x^3 - 0,576x^2 + 3,241x - 1,703$) e PEBD+NPAG *E. coli* ($y = 0,050x^3 - 0,964x^2 + 5,519x - 4,723$). 66

Figura 48. Enterobactérias (Log UFC mL⁻¹) de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAG a 10°C por 10 dias. Equações do gráfico: PEBD ($y = -0,005x^3 + 0,065x^2 - 0,013x + 3,327$) e PEBD+NPAG ($y = -0,004x^3 + 0,105x^2 - 0,486x + 3,781$). 68

Figura 49. Enterobactérias (Log UFC mL⁻¹) de morangos ‘Albion’ inoculados *E. coli* a 103 UFC mL⁻¹ embalados por filmes de PEBD e de PEBD+NPAG a 10°C por 10 dias. Equações do gráfico: PEBD ($y = 0,024x^3 - 0,391x^2 + 1,699x + 3,378$) e PEBD+NPAG ($y = 0,009x^3 - 0,176x^2 + 1,066x + 3,351$). 69

Lista de tabelas

Tabela 1. Descrição dos tratamentos avaliados no Ensaio I.....	22
Tabela 2. Descrição dos tratamentos avaliados no Experimento II.....	27
Tabela 3. Descrição dos tratamentos avaliados no Experimento III.	30
Tabela 4. Tratamentos avaliados no Ensaio IV.	31
Tabela 5. Dados do DSC nos filmes de PEBD e PEBD+NPAg.	35
Tabela 6. Dados da análise termogravimétrica de filmes de PEBD e de PEBD+NPAg em atmosfera oxidativa.....	36
Tabela 7. Resultados da eficiência antimicrobiana dos filmes de PEBD com NPsAg. .	40

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AA – Ácido ascórbico

AT – Acidez Titulável

BL – Bolores e Leveduras

C* – Croma

CT – Coliformes totais

EDS – Energy Dispersive X-Ray

Fig. – Figura

h° – Ângulo Hue

L* – Luminosidade

MM – Micro-organismos mesófilos

NPs – Nanopartículas

NPAg – Nanopartícula de prata

NPsAg – Nanopartículas de prata

PCA – Plate Count Agar

PEBD – Polietileno de Baixa Densidade

ROS – Reactive Oxidative Species

SCDLP – Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate Broth.

SS – Sólidos solúveis

TSB – Tryptic Soy Broth

UFC – Unidade formadora de colônia

Sumário

RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Morango.....	7
3.2. Qualidade pós-colheita, consumo e comercialização de morangos.....	7
3.3. Nanotecnologia aplicada no desenvolvimento de embalagens.....	9
3.4. Nanopartícula de prata e sua atividade antimicrobiana	13
4. METODOLOGIA	16
4.1. Caracterização de Filmes com nanopartículas.....	16
4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):	16
4.1.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC):	16
4.1.3. Termogravimetria (TGA):	16
4.1.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR):	17
4.1.5. Difração de Raio X (DRX):.....	17
4.2. Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes	17
4.3. Avaliação da qualidade pós-colheita e microbiológica de morangos.....	20
4.3.1. Experimento I: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Oso Grande’ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata em diferentes temperaturas.	20
4.3.2. Experimento II: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Albion’ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata em diferentes temperaturas.	26
4.3.3. Experimento III: Avaliação físico-química e microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com <i>Escherichia coli</i> a 10^8 UFC mL ⁻¹ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata e armazenados a 5°C.	28
4.3.4. Experimento IV: Avaliação microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com <i>Escherichia coli</i> a 10^3 UFC mL ⁻¹ embalado em filmes contendo nanopartículas de prata armazenados a 10°C.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Caracterização de filmes com nanopartículas.....	32
5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
5.1.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC):	34

5.1.3.	Termogravimetria	35
5.1.4.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	37
5.1.5.	Difração de Raio X (DRX):.....	37
5.2.	Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes com nanopartículas de prata .	38
5.3.	Avaliação da qualidade pós-colheita e microbiológica de morangos.....	41
5.3.1.	Experimento I: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Oso Grande’ embalado em filmes contendo nanopartículas de prata armazenados a 5 e 25°C	41
5.3.2.	Experimento II: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Albion’ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata armazenados a 5 e 20°C	50
5.3.3.	Experimento III: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com Escherichia coli embalados em filmes contendo nanopartículas de prata e armazenados a 5°C.....	57
5.3.4.	Experimento IV: Avaliação microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com Escherichia coli embalado em filmes contendo nanopartículas de prata e armazenados a 10°C	68
6.	CONCLUSÃO	71
8.	REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

O avanço no crescimento da cadeia produtiva de frutas e hortaliças depende de ações no setor produtivo e na distribuição do alimento, continuando até o consumidor final (CAMARGO FILHO e CAMARGO, 2009). O morango vem se destacando, não somente por seu valor nutritivo, mas também por ser uma fruta de sabor agradável e de fácil consumo *in natura*. Apesar do valor da produção nacional ter atingido no ano 2006 155,5 milhões de reais, (IBGE, 2014), um fator limitante para o aumento no consumo do morango é sua vida pós-colheita curta. O morango, fruto não-climatérico, possui alta atividade metabólica, sofrendo rápida degradação, tornando-se passível de ataque de patógenos, dificultando ainda mais sua conservação. Desta forma, investir em tecnologias que aprimorem a conservação pós-colheita do morango é uma maneira de minimizar as perdas, apresentar um produto com melhor aparência e ausência de sinais de deterioração, agregando valor à fruta, aumentando assim sua comercialização e consumo.

Uma forma de minimizar as perdas pós-colheita na cadeia produtiva é desenvolver embalagens ativas que ultrapassam suas funções essenciais. As embalagens têm como função intrínseca conter, proteger, transmitir informações úteis e expor visualmente o produto nela acondicionado, preservando ao máximo sua qualidade e criando condições que minimizem alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas que causam sua degradação (AZEVEDO, 2012). Desenvolver embalagens com propriedade antimicrobiana pode prolongar a vida útil dos morangos, assegurando sua qualidade, e diminuindo as perdas pós-colheita.

As nanopartículas de pratas (NPsAg) possuem ação antimicrobiana, intervindo no crescimento microbiano com aplicação na área das ciências médicas, química, biológicas, farmacêuticas, e com potencialidade de aplicação em diversos produtos (DURÁN et al., 2010). Quando aplicadas em um polímero, as NPsAg podem melhorar as propriedades das embalagens, promovendo maior flexibilidade das embalagens, durabilidade e estabilidade à temperatura (AUGUSTIN e SANGUANSRI, 2009; CHAUDHRY e CASTLE, 2011). Devido a sua propriedade antimicrobiana, as NPsAg presentes nas embalagens poliméricas podem inibir a proliferação microbiana presente nos alimentos, que é um importante atributo para a sua preservação (MOURA, MATTOSO e ZUCOLOTTO, 2012).

O uso de embalagens com NPsAg pode ser considerado uma estratégia nanotecnológica, pois potencializa as propriedades e funcionalidades de embalagens

para morango, o que pode ampliar a vida pós-colheita desse fruto. Diante do exposto, este trabalho visa investigar a qualidade pós-colheita utilizando análises físico-químicas e microbiológicas dos morangos embalados por filmes contendo nanopartículas de prata e filmes convencionais, armazenados em diferentes temperaturas.

Para tanto, filmes com NPsAg foram adquiridos por uma empresa especializada e caracterizados pelas seguintes técnicas: imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Difração de Raio X (DRX), além da avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes.

A qualidade pós-colheita de morangos embalados com filmes contendo NPsAg previamente caracterizados, foi avaliada por meio de análises físico-químicas e microbiológicas ao longo de um período de armazenamento em determinada temperatura. Desta forma, diversos experimentos foram realizados variando as condições influentes na qualidade pós-colheita. No Experimento I os morangos embalados foram armazenados por nove dias em duas temperaturas: a 5°C, simulando a temperatura de refrigerador e a 25°C, simulando a temperatura ambiente. Para o Experimento II optou-se por uma temperatura de armazenamento menos agressiva a conservação dos morangos, consistindo no armazenamento de morangos embalados com os filmes em questão a 5 e a 20°C.

Com o propósito de explorar ainda mais a avaliação antimicrobiana dos filmes contendo NPsAg, foram realizados mais dois experimentos (III e IV) emergindo os morangos previamente sanitizados em um inóculo de *Escherichi coli*, em concentrações e temperatura de armazenamento diferentes. No Experimento III, os morangos foram inoculados com *E. coli* a uma concentração 10^8 UFC mL⁻¹, armazenando-os a 5°C por dez dias, e no Experimento IV a concentração do inóculo utilizado foi de 10^3 UFC mL⁻¹, armazenando-os a 10°C também por dez dias, porém sendo avaliados somente com análises microbiológicas. Nos Experimentos III e IV as embalagens contendo morangos foram seladas à vácuo a fim de alcançar maior superfície de contato entre os morangos e as embalagens, potencializando assim a atividade bactericida dos filmes, uma vez que a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata ocorre pelo contato com o micro-organismo (Braga e Peres, 2010).

Este trabalho propõe contribuir para o desenvolvimento de estratégias para uma melhor conservação pós-colheita de morangos, aumentando assim o seu potencial de

comercialização, com diminuição das perdas, proporcionando ganhos para a cadeia produtiva e de consumo.

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar a qualidade pós-colheita e microbiológica de morangos embalados por filmes contendo nanopartículas de prata e por filmes convencionais, armazenados sob diferentes temperaturas.

Objetivos específicos

- (1) Caracterizar filmes de polietileno de baixa densidade com e sem nanopartículas de prata;
- (2) Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes contendo em sua composição nanopartículas de prata;
- (3) Avaliar a qualidade físico-química e microbiológica de morangos embalados com filmes com nanopartículas de prata e filmes convencionais, armazenados sob diferentes temperaturas de refrigeração.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Morango

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) pertence à família Rosáceas e é caracterizado por ser uma planta rasteira, com caule que gera folhas ovaladas e flores com pétalas geralmente brancas. As flores do morangueiro são bissexuais e auto-férteis compostas por pétalas livres, lobuladas, brancas ou avermelhadas ordenadas ao redor do receptáculo floral proeminente (Fig. 1). Após a fecundação o receptáculo se transforma no pseudofruto carnoso (morango) e os pequenos pontos aderidos na superfície dos morangos são os frutos verdadeiros, morfologicamente chamados de aquênios, popularmente assemelhados a sementes (SANTOS, 1993; BORTOLOZZO et al., 2007; PIMO, 2009).

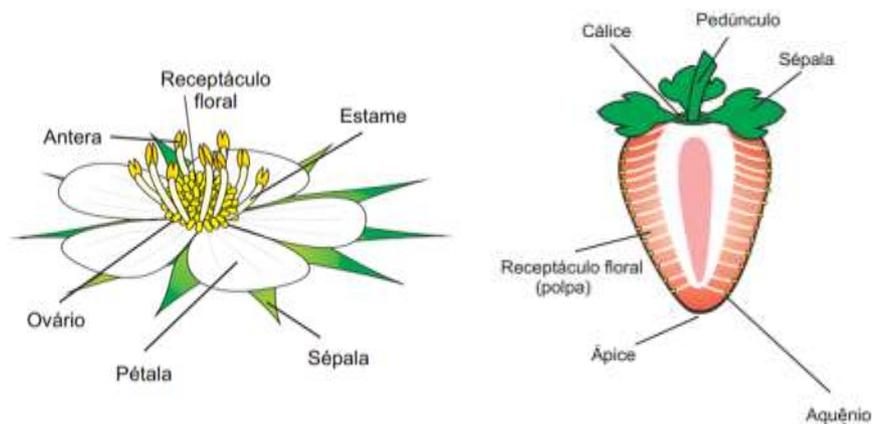


Figura 1. Representação morfológica da flor do morangueiro e do morango (Adaptado de Pimo (2009).

Em 2012, a produção mundial de morangos foi de 4,5 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o maior produtor (1,3 milhões de toneladas), seguido pelo México (360,4 mil toneladas) e Turquia (353,2 mil toneladas) (FAOSTAT, 2014). No Brasil, a produção de morango chegou a 72,2 mil toneladas, de acordo com o Censo Agropecuário de 2006, último dado fornecido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), tendo a Região Sudeste como maior produtora, responsável por 68,8% da produção brasileira (IBGE, 2014). O estado de Minas Gerais é o maior produtor (55,7%), seguido pelos estados do Rio Grande do Sul (13,6%), Paraná (8,7%) e São Paulo (7,0%) (IBGE, 2014).

3.2. Qualidade pós-colheita, consumo e comercialização de morangos

O grande interesse pelos morangos é devido ao seu valor nutricional, por ser uma boa fonte de vitamina C, antocianinas e flavonóides e por apresentar coloração

atrativa vermelha brilhante e odor característico (MORAES et al., 2008; ODRIOZOLA-SERRANO, SOLIVA-FORTUNY e MARTÍN-BELLOSO, 2010). A comercialização dos morangos é limitada principalmente por serem perecíveis e manuseados sob condições ambientais que promovem a perda de qualidade, além de serem sensíveis a danos mecânicos, a perda de água e a deterioração fisiológica (CANER, ADAY e DEMIR, 2008; BRAGA, 2012).

A qualidade de frutas e hortaliças é composta de vários fatores como aparência visual (frescor, cor, defeitos e deterioração), textura (firmeza, resistência e integridade do tecido), sabor e aroma, valor nutricional e segurança do alimento. Fatores envolvidos na cadeia produtiva do morango também contribuem negativamente na qualidade pós-colheita e conseqüentemente na comercialização da fruta. Dentre esses fatores, os que causam maiores impactos sobre a qualidade do morango são: (i) danos mecânicos causados pelo manuseio inadequado; (ii) exposição das frutas a temperaturas elevadas prejudiciais a sua conservação, (iii) contaminações microbiológicas provenientes de fontes de contaminação no cultivo e da falta de higiene e sanitização no manuseio e processamento do produtos (iv) transporte inadequado (BRAGA, 2012).

Por ser um fruto não-climatérico, o morango tem sua respiração diminuída gradualmente e seus atributos sensoriais não se alteram após a colheita, motivo pelo qual é colhido próximo a sua maturação (FLOR-CANTILLANO, BENDER e LUCHSINGER, 2003). Por essa razão, o morango possui vida pós-colheita muito curta, com alta atividade metabólica, tornando-se um dos frutos mais perecíveis (FLOR-CANTILLANO, BENDER e LUCHSINGER, 2003; BRACKMANN, HUNSCHE e BALEM, 2012). Além disso, os danos físicos causados pela colheita, transporte e comercialização, permitem que o morango seja suscetível ao ataque de microorganismos patógenos, causando perdas nutritiva, qualitativa e econômica (VAN DER STEEN et al., 2002; BRACKMANN, HUNSCHE e BALEM, 2012). Devido à elevada carga microbiana do morango e por ser altamente perecível, torna-se necessária à incorporação de métodos que aumentem a estabilidade microbiológica preservando assim as características nutricionais (PATRAS et al., 2009).

As pesquisas em tecnologia de alimentos vêm sendo focadas na conservação de produtos *in natura*, com o propósito de prolongar a sua vida útil tal como manter as qualidades nutricionais e sensoriais do alimento (MORAES et al., 2008; MOURA, MATTOSO E ZUCOLOTTO, 2012). Entretanto, conservar frutos por longos períodos

sem que ocorra a perda das características do alimento fresco ainda é um desafio (VAN BUGGENHOUT et al., 2009). Acredita-se que ao incorporar nanopartículas de prata em matriz polimérica para desenvolver embalagens de alimentos, é possível inibir o crescimento microbiano e assim auxiliar na conservação do produto e prolongar a vida útil.

A embalagem promove a proteção dos frutos quanto a danos físicos, ataques de patógenos e desidratação, além de limitar os danos causados pelo excesso de manipulação até chegar ao consumidor, visto que a senescência é acelerada por danos mecânicos, sendo uma das principais causas de perdas pós-colheita de morango (FERREIRA et al., 2009). Prolongar a vida útil do morango, mesmo que por poucos dias, é muito significativo para a logística de distribuição da produção. O uso de tecnologias para o desenvolvimento de embalagens com propriedades adicionais poderá manter a qualidade dos morangos até chegar ao consumidor. Bender e colaboradores (2010) utilizaram embalagens de polietileno de baixa densidade, aliado a atmosfera modificada, e obtiveram vida útil de até seis dias para morangos ‘Verão’ e ‘Carmosa’, em temperatura de armazenamento de 1 a 4°C. Brackmann, unsche e Balem (2012) concluíram que o aumento da espessura de filmes que envolvem morangos prolonga sua vida útil pela limitação das trocas gasosas com o meio, isto é, com a modificação da atmosfera ao redor do fruto, ocorre diminuição da respiração com acúmulo de CO₂ no interior da embalagem.

3.3. Nanotecnologia aplicada no desenvolvimento de embalagens

As embalagens tem como função conter, proteger e vender o alimento nela acondicionado, preservando a qualidade do produto (SARANTÓPOULOS e MORAES, 2009). Os polímeros estão entre os principais materiais que compõe as embalagens, sendo o segmento com maior representatividade de produção no Brasil (SARANTÓPOULOS e REGO, 2012). Dentre estes polímeros o que se destaca na produção de embagens está o polietileno de baixa densidade (PEBD). O polietileno é um termoplástico parcialmente cristalino com propriedades dependentes da quantidade relativa de fases amorfas e cristalinas, cujas unidades são planares que formam cadeias perpendiculares ao plano da cadeia principal (Fig. 2) (COUTINHO, MELLO e SANTA MARIA, 2003). O PEBD é obtido por técnicas de alta pressão, o que produz muitas ramificações ao longo de sua cadeia (Fig. 2). As ramificações longas permitem que a

estrutura cristalina de PEBD tenha maior desordem quando comparado com outros tipos de polietileno, como por exemplo o polietileno de alta densidade, resultando em um produto flexível (PISTOR, CHEISA e ZATTERA, 2010).

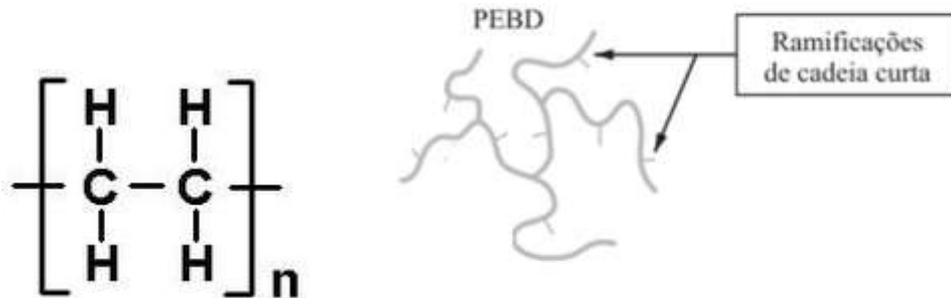


Figura 2. Estrutura molecular do polietileno e ilustração da ramificação de PEBD (modificado de COUTINHO, MELLO e SANTA MARIA, 2003).

As embalagens ativas apresentam funções além das tradicionais apresentadas pelas embalagens alimentícias. Esta inovação permite prolongar a vida útil dos alimentos além de manter sua qualidade e sua segurança contra micro-organismos deteriorizantes (REALINI e MARCOS, 2014). Muitas inovações na indústria das embalagens alimentícias devem-se ao uso de nanotecnologias que permitem melhorar e/ou adicionar propriedades das embalagens.

A nanotecnologia está relacionada à aplicação de partículas ou interfaces com ao menos uma dimensão na escala de 1 a 100 nm (1 nm é correspondente a 10^{-9} m), contemplada nas ciências dos materiais (SAHOO, PARVEEN e PANDA, 2007). A faixa correspondente aos nanomateriais é a mesma em que se encontram algumas moléculas, como a hemoglobina, e estão a uma escala inferior as dimensões celulares, como por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* que mede em média 5 μm (Fig. 3). A nanotecnologia vem sendo aplicada em diferentes produtos em todo o mundo e em diversas áreas. O Brasil, assim como outros países de economia de base agropecuária, tem desenvolvido programas específicos em nanotecnologia com aplicação no setor agroindustrial, de meio ambiente, farmacêutico e alimentício (ASSIS, 2012).

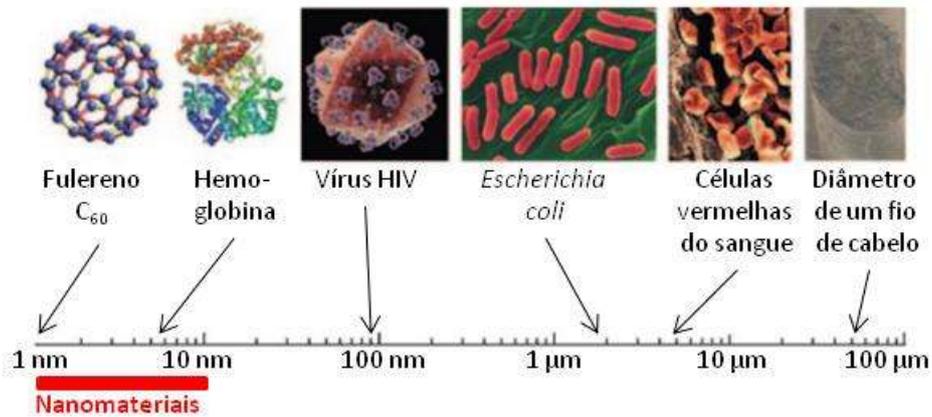


Figura 3. Escala de comprimento para contextualização das nanopartículas (Modificado de: GOESMANN e FELDMANN, 2010).

As propriedades de diversos elementos se alteram com a diminuição do tamanho, podendo adquirir novas características. A mudança nas propriedades, derivada do tamanho dos elementos, é a singularidade proporcionada pela nanotecnologia (CUSHEN et al., 2012). As propriedades das nanopartículas deve-se ao aumento da relação da área superficial e volume (ANNAMALAI et al., 2013) como ilustrado na Fig. 4. Por apresentar maior área superficial, as propriedades ópticas, mecânicas, químicas e biológicas de nanopartículas são diferentes quando comparadas com materiais de mesma composição química na escala macro. Este fato permite a aplicação de nanomateriais em diversos produtos, explorando as diferentes propriedades intrínsecas (AUGUSTIN e SANGUANSRI, 2009).

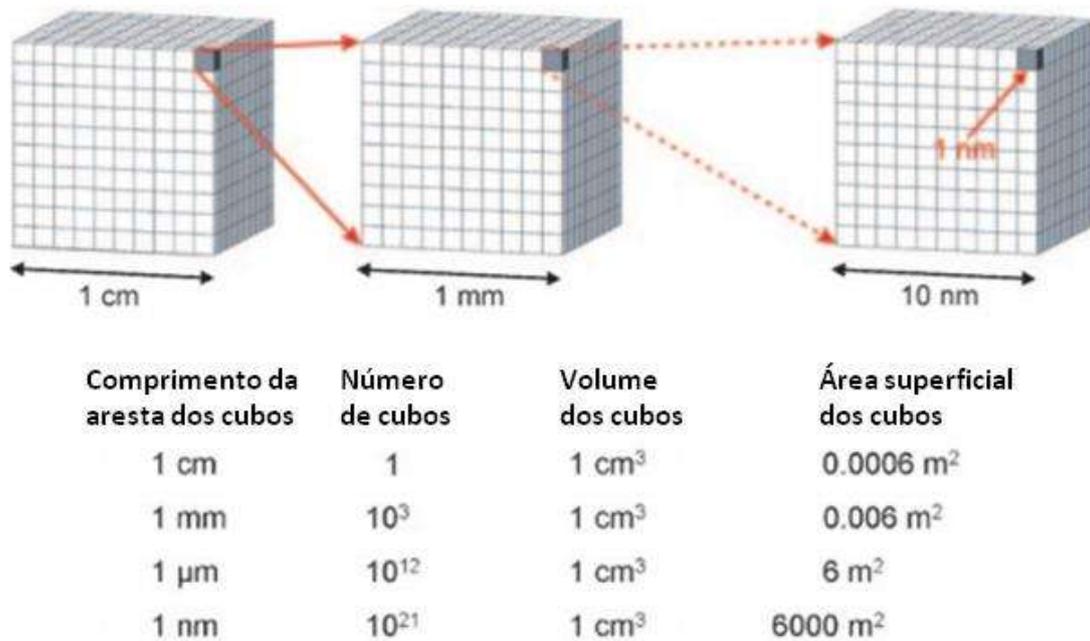


Figura 4. Modelo ilustrando a área superficial dos nanomateriais (Modificado de: GOESMAN e FELDMANN, 2010).

A nanotecnologia está presente em toda a cadeia produtiva dos alimentos, desde a sua produção até seu processamento e embalagem (FAO/ WHO, 2012). A literatura explora as características e aplicações da nanotecnologia no setor alimentício (CHAUDHRY et al., 2008; BRADLEY, CASTLE e CHAUDHRY, 2011; CHAUDHRY e CASTLE, 2011; DUNCAN, 2011; ASSIS, 2012), com atenção maior ao setor de embalagens, explorando suas potencialidades, a interação com os alimentos (LLORENS et al., 2012), potencial toxicidade (YANG et al., 2009) e até impactos sociais do uso da nanotecnologia em alimentos (SILVA, PREMEBIDA E CALAZANS, 2012). Longano e colaboradores (2012) desenvolveram embalagens para alimentos com base no nanocompósito de ácido polilático (PLA) contendo NPs de cobre combinando a atividade antimicrobiana das NPs de cobre com a biodegradabilidade da matriz utilizada. Moura, Mattoso e Zucolotto (2012) incorporaram NPs_{Ag} em matriz de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) para aplicação em embalagens alimentícias. Costa e colaboradores (2011) avaliaram o uso de NPs antimicrobianas de prata-montmorillonita (Ag-MMT) no melhoramento da vida útil de salada de frutas frescas. (KANMANI e RHIM, 2014) exploraram as propriedade físico-químicas de filmes antimicrobianos composto por gelatina com NP_{Ag} para uso como embalagens para alimentos. Zhou e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de embalagens de PEBD

com prata nanoestruturada na qualidade de maçãs minimamente processadas. Li e colaboradores (2009) avaliaram a utilização de embalagem de polietileno contendo NPAg e NPTiO₂ na conservação de jujubas chinesas.

As NPsAg têm uma ampla aplicação comercial devido a sua atividade bactericida, sendo incorporadas em materiais da área médica (implantes, tecidos utilizados em hospitais e curativos), sapatos, roupas, aparelhos de ar condicionados e recipientes para o armazenamento de alimentos (FAO e WHO, 2009; PASCHOALINO, MARCONE e JARDIM, 2010; DALLAS, SHARMA e ZBORIL, 2011). O mecanismo de ação das NPsAg se baseia no contato com a superfície do alimento e, conseqüentemente, com a superfície dos micro-organismos. Sabe-se de alguns possíveis mecanismos de ação das NPsAg e de outras NPs face aos micro-organismos, descritos a seguir, porém ainda é necessário mais esforços para compreender e explorar ainda mais as potencialidades dessas NPs.

3.4. Nanopartícula de prata e sua atividade antimicrobiana

Vários estudos têm sido desenvolvidos para compreender o mecanismo de ação das NPsAg, suas interações com os micro-organismos tal como o grau de toxicidade para diferentes cepas bacterianas (DALLAS, SHARMA e ZBORIL, 2011; POTARA et al., 2011). Há diversas hipóteses quanto ao mecanismo de ação das NPsAg (Fig. 5). Morones e colaboradores (2005) detectaram a presença de NPsAg por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da membrana celular, bem como do interior da bactéria. Segundo os autores (SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004; MORONES et al., 2005; KIM et al., 2007; EGGER et al., 2009; KIM et al., 2011), o mecanismo de entrada das NPs na bactéria ocorre pela alta afinidade da prata com os compostos de fósforo e enxofre presentes nas proteínas de membrana das bactérias. As NPsAg podem também se acumular na membrana plasmática, alterando sua permeabilidade e morfologia, causando a morte celular (SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004; RAFFI et al., 2008). No interior da bactéria, as NPsAg também tendem a interagir com proteínas e com o DNA, que contem fósforo e enxofre em sua composição. Essas possíveis interações podem provocar mudanças morfológicas na membrana e no DNA das bactérias, afetando a cadeia respiratória e a divisão celular até provocar a morte celular (MORONES et al., 2005).

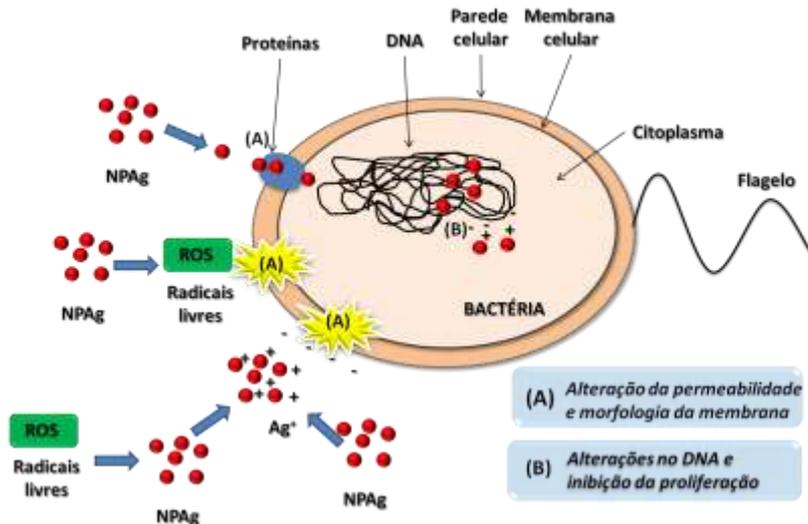


Figura 5. Ilustração dos possíveis mecanismos de ação das NPsAg contra as bactérias.

Outro possível motivo do efeito antimicrobiano das NPsAg é a liberação de íons de prata (Ag^+) a partir de sua superfície quando em meio aquoso (MORONES et al., 2005; RAFFI et al., 2008; EGGER et al., 2009; CHERNOUSOVA e EPPLE, 2013). O efeito potencializado e singular das NPs ocorre em consequência de seu tamanho e elevada superfície de contato, que potencializa a liberação de Ag^+ (EGGER et al., 2009). A carga positiva dos íons de prata é atraída eletrostaticamente pelas cargas negativas presentes na membrana celular das bactérias (DIBROV et al., 2002; KIM et al., 2007). Ag^+ também interagem com os grupos tiol de enzimas vitais para o bom funcionamento da célula bacteriana, podendo inativá-la. Da mesma forma, as interações dos Ag^+ com o DNA podem influenciar na sua capacidade de replicação, agindo assim como agente antimicrobiano (SINGH et al., 2008). Feng e colaboradores (2000) observaram que a membrana celular se destacou da parede celular bacteriana e formou lacunas em sua extensão quando colocou cepas de *E. coli* e *S. aureus* em contato com íons de prata.

A presença de radicais livres ROS (Reactive Oxidative Species – espécies reativas de oxigênio) em tecidos biológicos e meios aquosos, como o ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH^\cdot), podem intervir na reação de oxidação das NPsAg resultando em íons de prata (Ag^+), os quais podem inibir o crescimento microbiano, como descrito anteriormente (DOIRON, PELLETIER e LEMARCHAND, 2012). As NPsAg são potenciais geradores de ROS que também podem causar danos na membrana das bactérias. Kim e colaboradores (2011) reportaram a presença de radicais livres gerados das NPsAg que induziu danos na membrana celular bacteriana e também

alterou a conformação das proteínas de membrana, danificou o DNA e alterou sistemas intracelulares, como a cadeia respiratória.

4. METODOLOGIA

4.1. Caracterização de Filmes com nanopartículas

Neste trabalho, foram utilizados filmes planos de polietileno de baixa densidade (PEBD) e filmes de PEBD aditivados com nanopartículas de prata no formato de sacos. Ambos os filmes foram produzidos e cedidos por uma empresa especializada em soluções nanotecnológicas. Estes filmes foram caracterizados quanto a seguintes técnicas:

4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

As características morfológicas dos filmes contendo nanopartículas de prata foram analisadas a partir de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Os filmes foram cortados e fixados nos porta-amostras (*stub*) para adquirir imagens de superfície. Para as imagens do corte transversal (fratura), os filmes sofreram fratura criogênica para depois serem fixados nos porta-amostras. Após esses procedimentos, as amostras foram recobertas com carbono numa evaporadora e analisadas no MEV, a fim de investigar sua morfologia, e no microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FEG-SEM), para possível visualização das nanopartículas de prata. O mapeamento por EDS (Energy Dispersive X-Ray) foi realizado para investigar a distribuição das nanopartículas de prata sobre o filme.

4.1.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC):

A identificação de eventos endotérmicos e exotérmicos durante o aquecimento das amostras de filmes contendo nanopartículas, bem como a temperatura de fusão (T_f) e entalpia de fusão (ΔH_f) foram avaliadas por meio de análises de calorimetria diferencial de varredura, no equipamento DSC Q100 (TA - Instruments). Os ensaios foram realizados no intervalo de temperatura de 10 a 200°C, com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e fluxo de nitrogênio mantido a 60 mL min⁻¹, utilizando 10 mg da amostra em um porta amostra de alumínio selado.

4.1.3. Termogravimetria (TGA):

As análises de termogravimetria foram realizadas para quantificar a perda de massa sofrida com o aumento da temperatura, verificando a estabilidade térmica dos

filmes nanoparticulados. Foi utilizada 10 mg da amostra em uma termobalança TGA-Q500 (TA Instruments), com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e faixa de aquecimento de 10 a 800°C . O fluxo de ar sintético e de nitrogênio foi mantido a 60 mL min^{-1} .

4.1.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR):

Para analisar os grupos funcionais presentes nos filmes adquiridos foi utilizada a técnica de FTIR. Amostras de cada tratamento foram analisadas em espectrômetro Paragon 1000 Perkin–Elmer. As medições foram obtidas com 64 varreduras, com leitura na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.1.5. Difração de Raio X (DRX):

As técnicas de DRX foram utilizadas para obtenção dos difratogramas de Raio X do filme contendo NPsAg, a fim de conhecer os arranjos atômicos. Foi utilizado o equipamento XRD Shimadzu–6000. As amostras dos filmes foram colocadas em um suporte de vidro padrão para serem introduzidos na câmara de geração de Raio X sob tensão de aceleração de 30 kV , com corrente de 30 mA e a velocidade de $0,5^{\circ}$ por minuto. Cada amostra foi varrida com 2θ entre 3 e 90° .

4.2. Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes com NPsAg foram realizados testes de difusão em ágar e análise de eficiência antimicrobiana de acordo com a norma JIS Z 2801: 2000, descritas a seguir. Todas as análises microbiológicas deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação.

4.2.1. Teste de sensibilidade de antimicrobiano por disco-difusão:

Para avaliar a capacidade dos filmes antimicrobianos em inibir o crescimento de micro-organismos foi empregada a norma NCCLS – Documento M2-A8). Foram utilizadas cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os inóculos desses micro-organismos foram preparados por meio de isolamento e incubação a 37°C e 32°C , respectivamente, por 24 horas. As placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton foram inoculadas com $100\text{ }\mu\text{L}$ de uma cultura inóculo a 1 a $5 \times 10^8\text{ UFC mL}^{-1}$ previamente ajustado comparando com a

turbidez da escala McFarland. Sobre a superfície do ágar o inóculo foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada, inoculado e em seguida foram colocados discos dos filmes estudados, com diâmetro de 1,5 cm, previamente esterilizados com álcool 70% por 15 minutos. As placas foram incubadas a 37°C para *E. coli* e 32°C para *S. aureus* por 24 horas e os halos de inibição formados foram medidos, incluindo o diâmetro do disco (NCCLS, 2003)

○ ***Teste bactericida segundo norma JIS Z 2801: 2000***

Para avaliar quantitativamente a atividade antimicrobiana dos filmes, foram utilizados testes *in vitro* baseados na norma JIS Z 2801:2000 “*Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy*” (JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD, 2000). No ensaio foram utilizadas cepas de bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli* - ATCC 25922) e de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923). Todos os meios de cultura, soluções e instrumentos utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os testes foram realizados com um micro-organismo de cada vez seguindo os passos a seguir:

• *Pré-cultura de bactérias:*

Com uma alça de inoculação, cada micro-organismo teste foi repicado, em triplicata, a partir de uma cultura estoque para tubos contendo Caldo Nutriente (Apendice I) e incubados em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 h.

• *Preparação das amostras testes:*

Os filmes de PEBD com NPAg foram cortados em três quadrados de 50 x 50 mm², compondo os corpos-de-prova teste, e seis quadrados de 50 x 50 mm² de filmes de PEBD, compondo os corpos-de-prova controle. Para os filmes de cobertura foram cortados nove quadrados dos filmes de PEBD na dimensão 40 x 40 mm². Os filmes foram embebidos em etanol 70% em uma placa de Petri, dentro de um fluxo laminar, por um período de aproximadamente 15 minutos. Em seguida, todos os filmes foram secos em placas de Petri individuais.

• *Inoculação e incubação*

Para cada micro-organismo, foi preparada uma suspensão bacteriana com aproximadamente 6×10^5 UFC mL⁻¹, diluindo o inóculo reativado em meio de suspensão composto por 1:500 Caldo Nutriente. Para alcançar essa concentração microbiana foi utilizado um espectrômetro de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), no comprimento de onda

625 nm, comparando a turvação do inóculo com a escala Mc Farland 0,5 (estimada a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

Com o auxílio de uma micropipeta, 400 µL do inóculo foi adicionado em cada corpo-de-prova, o qual na sequência foi coberto com o filme de cobertura, pressionando-o cuidadosamente para que o inóculo se espalhasse uniformemente na área do filme de cobertura (Fig. 6). Foram inoculados seis corpos-de-prova controle e três corpos-de-provas teste. Três corpos-de-prova foram usados para estimar a população inicial considerando as células viáveis logo após a inoculação (T_0). Três placas com corpo-de-prova controle e três com os corpos-de-prova dos filmes PEBD+NPAg foram incubadas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. A incubação foi feita dentro de um recipiente de plástico com tampa e dentro foram colocados papéis toalhas umedecidos com água destilada para manter a umidade do meio.

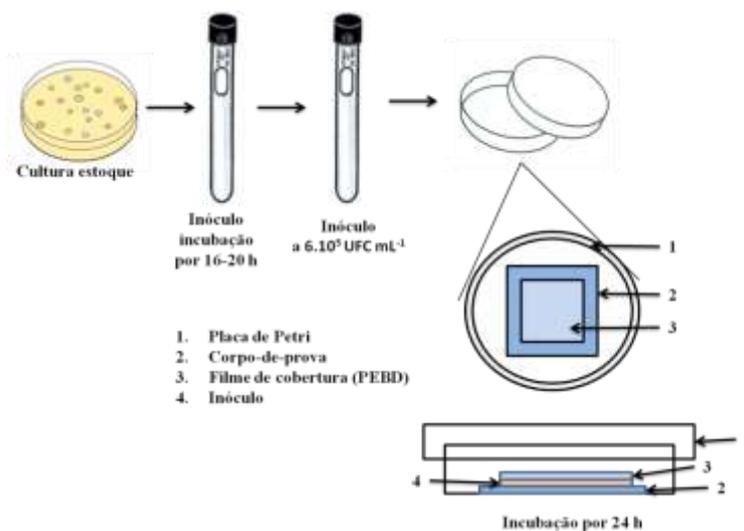


Figura 6. Fluxograma ilustrativo do teste antimicrobiano segundo norma JIS Z 2801: 2000.

- *Recuperação e contagem dos micro-organismos viáveis (T_0):*

Imediatamente após a inoculação dos corpos-de-prova, adicionou-se 10 mL de Caldo SCDLP (Apendice I) em cada uma das três placas com corpos-de-prova controle. Os filmes foram lavados repetidamente com o Caldo SCDLP com o auxílio de pipetas de Pasteur, para a homogeneização das bactérias. Em seguida, diluiu-se o Caldo SCDLP após a lavagem em Solução Salina Tamponada com Fosfato (Apendice I) até a diluição decimal 10^{-2} . Para a contagem de micro-organismos recuperados foi utilizada a técnica de *pour-plate*, adicionando-se, em triplicata, uma alíquota de 100 µL de cada diluição em placas de Petri, vertendo o meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) (Apendice I)

sobre o inóculo e homogeneizando adequadamente. As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A contagem feita após o tempo de incubação, expressa em UFC mL^{-1} , foi realizada nas placas que apresentaram de 30 a 300 $\text{UFC } \mu\text{L}^{-1}$ e esse valor foi multiplicado pelo inverso da diluição.

- *Recuperação e contagem de micro-organismos com 24 h de contato (T_{24}):*

Após 24 h de incubação, foram adicionados 10 mL de Caldo SCDLP nas três placas com corpo-de-prova controle e nas três placas com os corpos-de-prova teste. Estes filmes foram lavados e foi realizada diluição seriada em Solução Salina Tamponada com Fosfato até 10^{-4} . Para cada diluição foi transferido 100 μL para a placa de Petri, em triplicata, vertendo em seguida o meio de cultura PCA e homogeneizando adequadamente. As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. A contagem ocorreu da mesma forma em que no T_0 .

4.3. Avaliação da qualidade pós-colheita e microbiológica de morangos

Avaliar a qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças é necessário para verificar as condições dos alimentos, visando garantir um produto com qualidade para o consumidor final. A qualidade pós-colheita de morangos embalados nos filmes estudados foi avaliada quanto a análises físico-químicas e microbiológicas ao longo de um período de armazenamento em determinada temperatura. Para essa finalidade, foram realizados diversos experimentos variando as condições influentes na qualidade pós-colheita, a seguir descritos:

4.3.1. Experimento I: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Oso Grande’ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata em diferentes temperaturas.

No primeiro experimento os morangos utilizados foram da cultivar ‘*Oso Grande*’, os quais foram colhidos manualmente na cidade de Valinhos – SP, no ponto de colheita $\frac{1}{2}$ maduro a $\frac{3}{4}$ maduro, tendo de 70 a 75% de cor vermelha brilhante na superfície dos frutos. Após a colheita, os morangos foram transportados imediatamente sob refrigeração para a Embrapa Instrumentação, em São Carlos – SP. Os morangos foram selecionados quanto à cor, dimensão e condições fitossanitárias, buscando padronização da matéria-prima (Fig. 7).



Figura 7. Fluxograma ilustrando a colheita e seleção dos morangos utilizados no experimento.

Aproximadamente 170 g de frutos foram acondicionados em sacos ($\pm 10 \times 14$ cm) confeccionados com filmes PEBD com e sem nanopartículas de prata, os quais na sequência foram selados e o produto final armazenado em câmara fria a 5°C (temperatura de geladeira doméstica) e a 25°C (temperatura ambiente) por nove dias de armazenamento (Fig. 8 e 9). O experimento foi conduzido com quatro tratamentos como listado na Tab. 1. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas a cada três dias durante o período de armazenamento.



Figura 8. Fluxograma ilustrando a embalagem e armazenamento de morangos.



Figura 9. Produto final do Experimento I: morangos embalados em filmes convencionais (PEBD) e com filmes contendo NPsAg (PEBD+NPAg).

Tabela 1. Descrição dos tratamentos avaliados no Ensaio I.

Temperatura	Tratamentos	Descrição
5°C	PE 5°C	Morangos embalados em filmes de PEBD sem NPAg armazenado a 5°C
	NP 5°C	Morangos embalados em filmes de PEBD com NPAg armazenado a 5°C
25°C	PE 25°C	Morangos embalados em filmes de PEBD sem NPAg armazenado a 25°C
	NP 25°C	Morangos embalados em filmes de PEBD com NPAg armazenado a 25°C

- **Análises físico-químicas:**

As análises físico-químicas realizadas neste experimento foram:

- ***Perda de massa fresca:***

A perda de massa fresca foi determinada através da balança digital AS 2000C, acompanhando as mesmas embalagens ao longo dos dias de armazenamento, sempre em triplicata. Os valores de perda de massa, expressos em porcentagem, foram determinados seguindo a equação a seguir:

$$PM(\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100$$

Em que:

PM(%) corresponde a perda de massa fresca expresso em porcentagem;

*m*₀ corresponde a massa inicial do produto no dia 0 de armazenamento e

*m*_t corresponde a massa correspondente ao dia de análise realizado.

- ***Firmeza:***

A firmeza dos morangos foi avaliada utilizando-se o texturômetro digital de bancada TA.XT.Plus Texture Analyser® e os resultados foram expressos em Newton (N). A força de compressão aplicada usando um probe de 4 mm de diâmetro, velocidade de 10 mm s⁻¹, distância de penetração de 2 mm e área de contato de 12 mm². Foram realizadas duas medidas para firmeza, uma na epiderme dos frutos (região externa) e outra na região central de um corte transversal dos frutos (região interna) como representado na Fig. 10.

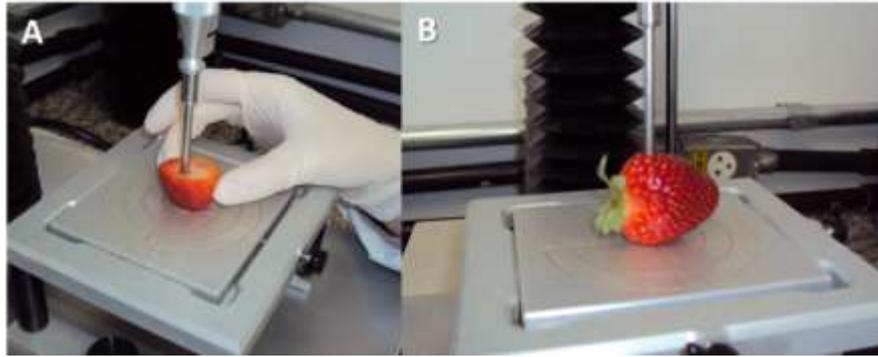


Figura 10. Determinação da firmeza de morangos: (A) região central do corte transversal e (B) epiderme (região externa) dos morangos.

○ **pH:**

Os valores de pH dos morangos foram obtidos em potenciômetro de bancada Quimis Q400A a partir da homogeneização do morango (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

○ **Acidez titulável (AT):**

A AT foi determinada a partir da titulação de 10 mL do extrato, obtido da homogeneização de 10 g de morango com 50 mL de água destilada, com NaOH 0,1 M até que a amostra alcançasse pH 8.1 (GOULAS e MANGANARIS, 2011) (Fig. 11). Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 mL (AOAC, 1997-método 942.15).



Figura 11. Determinação da Acidez Titulável de morangos.

○ **Teor de sólidos solúveis (SS):**

Os SS foi quantificado inserindo-se porções do morango homogeneizado em refratômetro de bancada Atago RX-5000cx. Os resultados foram expressos em °Brix (AOAC, 1997 - método 932.12) (Fig. 12).



Figura 12. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis em refratômetro.

○ **Ratio:**

Foi obtido por meio da relação entre o teor de sólido solúvel e acidez titulável.

○ **Ácido ascórbico (AA):**

O teor de AA foi determinado em amostra homogeneizada de morango com ácido oxálico 0,5%, a 5 °C, titulada com reativo de Tillmans (2,6-diclorofenolindofenol de sódio a 0,1%). Os resultados foram expressos em mg por 100 mL de suco (RANGANA, 1977).

○ **Coloração:**

As colorações dos morangos foram determinadas através do colorímetro HunterLab MiniScan XE Plus, com amostras avaliadas no sistema L, a* e b* (*color space*) proposto pela *Comission Internationale de l'Éclairage* (CIE), uma vez que os valores L, a* e b* são dada pelo equipamento ao realizar a leitura (Fig.13 e 14). Os resultados foram expressos em luminosidade (L), ângulo *hue* ($^{\circ}h$) e cromaticidade (C*), conforme fórmula a seguir:

$$h^\circ = \tan^{-1}(b/a)$$
$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$



Figura 13. Determinação da Coloração da superfície dos morangos embalados com filmes de PEBD e de PEBD com NPsAg.

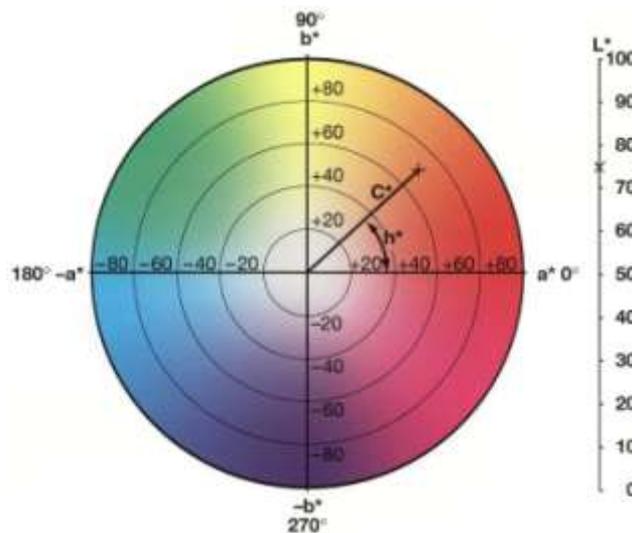


Figura 14. Espaço de cores CIE.

- **Análises Microbiológicas:**

As análises foram efetuadas em porções de 20 g de frutos, lavados em água peptonada 1% estéril com volume proporcional, constituindo a diluição 10^{-1} . A diluição 10^{-2} foi obtida pipetando-se 1 mL da solução em 9 mL de água peptonada esterilizada (1%) e a partir desta, a diluição 10^{-3} . Decorrido o tempo de incubação para cada micro-organismo, foi feita a contagem das colônias. A média aritmética da triplicata foi multiplicada pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos UFC mL^{-1}

de produto (DOWNES; ITO, 2001). Este procedimento foi utilizado para as análises dos seguintes micro-organismos:

Contagem total de bolores e leveduras: placas Petrifilm™ 3M, aprovado e oficializado pela AOAC (método 997.02), foram inoculadas com 1 mL de cada diluição em duplicata. As placas foram incubadas a 25°C durante 3 a 5 dias para leitura dos resultados.

Micro-organismos aeróbios mesófilos: placas Petrifilm™ 3M, AOAC (método 990.12), foram inoculadas com 1 mL de cada diluição em triplicata. Após plaqueamento, as placas para contagem total de aeróbios mesófilos foram incubadas a 35 °C, durante 48 h, conforme instruções do fabricante.

Micro-organismos do grupo dos coliformes totais: foram utilizadas placas Petrifilm™ 3M, aprovado e oficializado pela AOAC (método 991.14). Foram inoculadas com 1 mL de cada diluição em triplicata. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h para posterior leitura dos resultados.

Para verificar a presença de *Salmonella* sp nas amostras foi utilizado o kit Tecra™ 3M. Em frascos autoclaváveis com tampa, foi feito o pré-enriquecimento de cada amostra utilizando-se a água peptonada de lavagem (HUGHES et al., 2003) . Os frascos foram incubados em estufa, a 35°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, foi feito um tratamento térmico a 100°C por 15 min e, após, inoculados 200 µg da amostra nos kits. Os kits foram incubados a 35°C por 24 horas, de acordo com instruções do fabricante. Após a incubação, foi feita a leitura dos resultados. A presença de *Salmonella* foi caracterizada pela mudança de coloração nos poços do kit.

4.3.2. Experimento II: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Albion’ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata em diferentes temperaturas.

No segundo experimento os morangos cv. ‘Albion’ foram colhidos na cidade de Estiva – MG e transportados sob refrigeração para Embrapa, São Carlos – SP onde foi selecionado quanto a cor, tamanho e condições fitossanitárias. Para padronizar a carga microbiana intrínseca do morango, esses foram sanitizados em solução de 200 mg L⁻¹

de Sumaveg[®] (dicloroisocianurato de sódio dihidratado e coadjuvante) e drenados em gazes estéreis (PONCE et al., 2010) (Fig. 15).



Figura 15. Sanitização dos morangos antes de serem embalados.

Os morangos foram embalados em sacos ($\pm 10 \times 14$ cm) de PEBD com e sem nanopartículas de prata, selados e armazenados em câmara-fria a 5°C e 20°C por nove dias (Tab. 2). Os morangos foram analisados por meio de análises físico-químicas (perda de massa fresca, pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, *ratio*, teor de ácido ascórbico, textura, coloração) conforme descrito para o Experimento I.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos avaliados no Experimento II.

Tratamentos	Descrição
5°C	PE 5°C Morangos embalados em filmes de PEBD sem NPAg armazenado a 5°C.
	NP 5°C Morangos embalados em filmes de PEBD com NPAg armazenado a 5°C.
20°C	PE 20°C Morangos embalados em filmes de PEBD sem NPAg armazenado a 20°C.
	NP 20°C Morangos embalados em filmes de PEBD com NPAg armazenado a 20°C.

As amostras foram analisadas a cada dois dias quanto a contagem de micro-organismos mesófilos, bolores e leveduras. Foram retirados dois morangos de cada triplicata compondo uma amostra mista, na qual foi adicionado o proporcional em água peptonada estéril e realizada diluição seriada. Para cada diluição foi plaqueado 1 mL e vertido o meio de cultura, utilizando a técnica pour-plate, em que o meio de cultura é arrefecido até 45°C e ainda no estado líquido é vertido na placa de Petri contendo o inóculo. Para cada micro-organismo o ensaio foi realizado em triplicata para cada diluição. Os micro-organismos investigados foram:

○ Contagem de Micro-organismos Aeróbios Mesófilos: utilizando o meio de cultura Caldo de Triptona de soja (TSB - *Tryptic Soy Broth*) (Apendice I) , incubando a 35°C por 24 h.

○ Contagem de Bolores e Leveduras: utilizou-se o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Apendice I) incubando a 25°C por 2 a 3 dias.

○ Determinação da presença/ausência *Salmonella* sp: Para esta análise foi utilizado o kit Tecra™ 3M. Em frascos autoclaváveis com tampa, foi feito o pré-enriquecimento de cada amostra utilizando-se a água peptonada de lavagem (HUGHES et al., 2003) . Os frascos foram incubados em estufa, a 35°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, foi feito um tratamento térmico a 100°C por 15 min e, após, inoculados 200 µg da amostra nos kits. Os kits foram incubados a 35°C por 24 horas, de acordo com instruções do fabricante. Após a incubação, foi feita a leitura dos resultados. A presença de *Salmonella* foi caracterizada pela mudança de coloração do kit inoculado.

4.3.3. Experimento III: Avaliação físico-química e microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com *Escherichia coli* a 10⁸ UFC mL⁻¹ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata e armazenados a 5°C.

O Experimento III teve o enfoque de investigar com maior intensidade a atividade antimicrobiana dos filmes contendo nanopartículas de prata, emergindo os morangos previamente sanitizados em uma suspensão de bactérias para depois embalar os morangos com os filmes estudados. O objetivo deste experimento foi avaliar a atividade dos filmes na conservação de morangos contaminados com uma carga microbiana pré-determinada.

Para tanto, morangos ‘*Albion*’ foram colhidos na cidade de Estiva – MG e transportados para a Embrapa Instrumentação, em São Carlos – SP. Os morangos foram padronizados quanto à cor, dimensão e condições fitossanitárias. Uma solução de 200 mg L⁻¹ de Sumaveg® (dicloroisocianurato de sódio dihidratado e coadjuvante) foi utilizada para sanitizar os morangos que foram drenados em gazes estéreis (Fig. 16 A e B) (PONCE et al., 2010).

- **Preparação da cultura de *Escherichia coli***

A preparação da suspensão bacteriana foi iniciada com 24 h antecedente ao experimento por meio da reativação da *Escherichia coli* (ATCC 25922) a partir de uma

cultura estoque armazenada sob refrigeração. Uma unidade formadora de colônia foi propagada em meio TSB líquido, incubada a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação foi preparado 2 L de suspensão microbiana, obtendo cultura viável de aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹ utilizando água salina estéril (8,5 g NaCl L⁻¹).

- **Inoculação dos morangos**

Os morangos, previamente sanitizados, foram imersos na suspensão de *E. coli*, em condições estéreis, sendo agitada suavemente por 5 min, sendo então drenados sob papel alumínio estéril por 30 min, segundo metodologia adaptada de Takala et al. (2012) (Fig. 16 C e D).

- **Embalagem e armazenamento**

Após a etapa de inoculação, os morangos foram embalados em sacos de PEBD com NPsAg (NP-E.coli) e em sacos de PEBD (PE-E.coli), compondo os tratamentos positivos. Para compor os tratamentos negativos, morangos sanitizados e não inoculados foram armazenados em sacos de PEBD com NPsAg (PE- neg) e em sacos PEBD (PE-neg) (Tabela 3). Foram colocados quatro frutos em cada embalagem, em triplicata, de cada tratamento e esta foi selada à vácuo para que o contato filme-morango fosse alcançado. As amostras foram armazenadas em câmara-fria a 10°C por 10 dias (Fig. 16 E e F).



Figura 16. Etapas do ensaio com inoculação de *E. coli*: (A) sanitização dos morangos selecionados, (B) drenagem dos morangos em gaze estéril, (C) inoculação dos morangos, (D) drenagem dos morangos em papel alumínio estéril, (E) embalagem e selagem a vácuo e (F).

Tabela 3. Descrição dos tratamentos avaliados no Experimento III.

Tratamentos		Descrição
Trat. Positivos (inoculados)	NP-E.coli	Morangos inoculados com <i>E. coli</i> embalados em filmes de PEBD com NPAg.
	PE-E.coli	Morangos inoculados com <i>E. coli</i> embalados em filmes de PEBD sem NPAg.
Trat. Negativos (não inoculados)	NP-Neg	Morangos não inoculados com <i>E. coli</i> embalados em filmes de PEBD com NPAg.
	PE-Neg	Morangos não inoculados com <i>E. coli</i> embalados em filmes de PEBD sem NPAg.

Os morangos foram avaliados a cada dois dias por meio das análises físico-químicas e microbiológica. As análises físico-químicas contempladas foram: perda de massa fresca, textura, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, *ratio*, teor de ácido ascórbico e coloração, conforme metodologia descrita no Experimento I (item 4.3.1).

As análises microbiológicas foram feitas para a contagem de Enterobactérias a partir da lavagem dos morangos em água peptonada 0,1% estéril por 1 minuto, formando uma amostra composta a partir da triplicata, sendo essa a diluição 10^{-1} . Para cada diluição, fez-se em tubo falcon com 9 mL de água peptonada 0,1% e 1 mL da diluição anterior. Depois de realizada a diluição da amostra composta, foi transferido 1 mL de cada diluição para placas de Petri estéreis, e em seguida foi vertido meio de cultura MacConkey Agar (Acumedia[®]) (Apendice I).

4.3.4. Experimento IV: Avaliação microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com *Escherichia coli* a 10^3 UFC mL⁻¹ embalado em filmes contendo nanopartículas de prata armazenados a 10°C

O Experimento IV teve por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano dos filmes com NPAg em morangos inoculados com uma suspensão microbiana com menor concentração de bactérias. Para alcançar esse objetivo, morangos do cultivar ‘Albion’ foram colhidos na cidade de Estiva – MG e transportados até a Embrapa Instrumentação em São Carlos – SP. Os morangos foram sanitizados e inoculados com *E. coli* na concentração 10^3 , seguindo a metodologia descrita no Experimento III.

Após a inoculação, os morangos foram embalados com filmes de PEBD com NPAg (NP-E.coli) e com filmes de PEBD sem NPs (PE-E.coli), compondo os tratamentos positivos. Morangos sanitizados e não inoculados foram embalados também com filmes de PEBD com NPAg (NP-neg) e com filmes de PEBD sem NPs (PE-neg) compondo os tratamentos negativos (Tab.4). Todas as embalagens foram seladas a vácuo e armazenados em câmara fria a 10°C por 10 dias. A cada dois dias, os morangos foram analisados quanto a contagem de Enterobactérias, utilizando o meio de cultura MacConkey (Apendice I) seguindo o procedimento descrito no Experimento III.

Tabela 4. Tratamentos avaliados no Ensaio IV.

Tratamentos		Descrição
Trat. Positivos (<i>inoculados</i>)	NP-E.coli	Morangos inoculados com <i>E. coli</i> e embalados com filmes de PEBD com NPAg.
	PE-E.coli	Morangos inoculados com <i>E. coli</i> e embalados com filmes de PEBD sem NPAg.
Trat. Negativos (<i>não inoculados</i>)	NP-Neg	Morangos não inoculados com <i>E. coli</i> e embalados com filmes de PEBD com NPAg.
	PE-Neg	Morangos não inoculados com <i>E. coli</i> e embalados com filmes de PEBD sem NPAg.

- **Análise estatística**

A análise dos dados, referentes às análises físico-químicas e microbiológicas dos experimentos descritos acima, foi realizada através da análise de variância com medidas repetidas no tempo, utilizando o software é o IBM SPSS Statistics versão 19. Nos casos em que a condição de esfericidade da matriz de covariâncias não foi satisfeita, utilizou-se a correção de Geisser e Greenhouse para os graus de liberdade (LITTELL, HENRY e AMMERMAN, 1998; PEREIRA et al., 2013). Regressões foram ajustadas a partir dos resultados da análise de variância. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização de filmes com nanopartículas

Os filmes contendo nanopartículas de prata utilizados como embalagem apresentavam espessura de 6 μm e apresentavam algumas imperfeições ao longo dos filmes, como pode-se observar na imagem de microscopia óptica, com aumento de 400x (Microscópio marca Nova 107, objetiva 40) (Fig. 17).

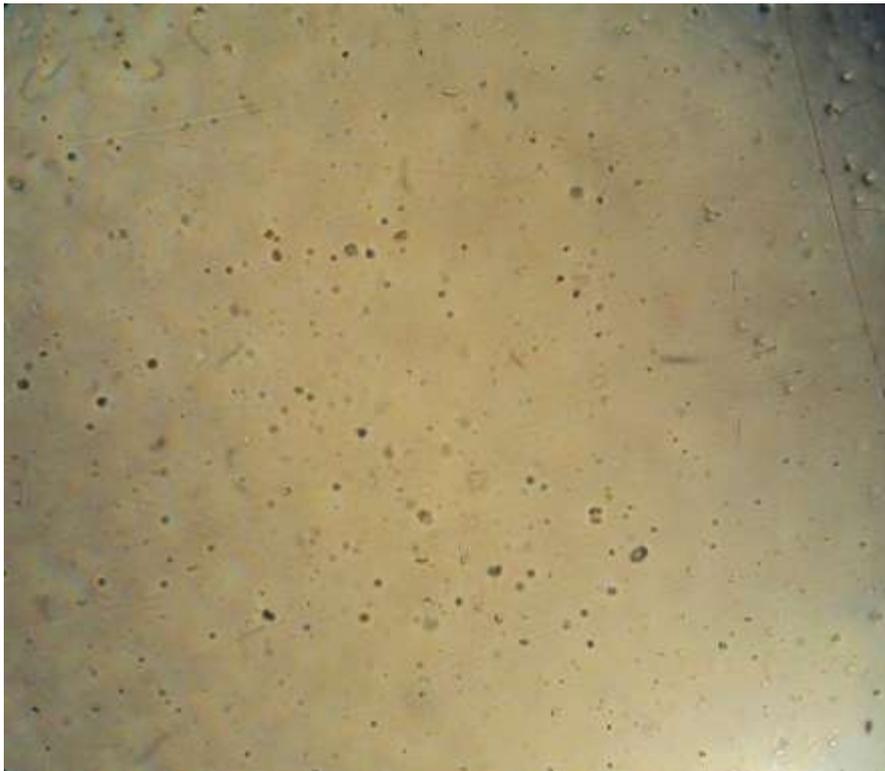


Figura 17. Imagem de microscopia óptica (Objetiva.40, aumento de 400x) de filme de PEBD aditivado com prata.

5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para caracterizar morfologicamente os filmes com nanopartículas de prata. A Fig. 18 mostra a imagem de MEV da amostra obtida de filme fraturado de PEBD com NPsAg e a análise de EDS (Energy Dispersive X-Ray) correspondente. O mapeamento dos principais elementos químicos que compõe a amostra está ilustrado na Fig. 19. Nota-se que há a presença de silício, compondo 17,35% da composição da amostra, evidenciando a presença do carreador, na forma de sílica (SiO_2), das NPsAg na matriz

polimérica. A sílica mesoporosa pode ser utilizada como suporte para nanopartículas metálicas, devido a sua estrutura estável, elevada superfície de contato, tamanho e volume ajustável dos poros, permitindo maior aproveitamento das propriedades específicas das nanopartículas (ESPINOSA et al., 2004). Com a capacidade de controlar o tamanho e a morfologia dos poros de sílica mesoporosa (MA et al., 2003), há a possibilidade das NPsAg serem imobilizadas nos limites dos poros da estrutura mesoporosa e, assim, serem dispersas pelo filme polimérico sem agregar em partículas maiores (EGGER et al., 2009). Nota-se, contudo, que o mapeamento por EDS não detectou a presença de prata devido à baixa concentração desta nos filmes, a qual deve estar abaixo do limite de detecção do equipamento.

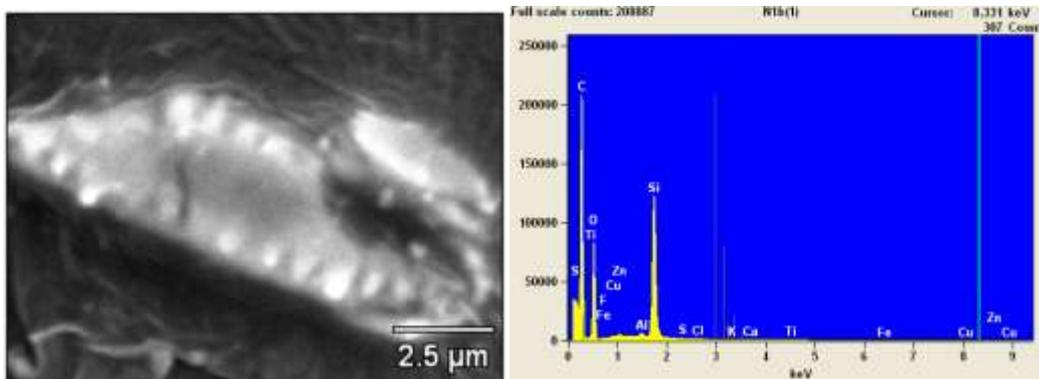


Figura 18. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do filme de PEBD contendo NPsAg (imagem esquerda) e o mapeamento por EDS (Energy Dispersive X-Ray) (imagem direita).

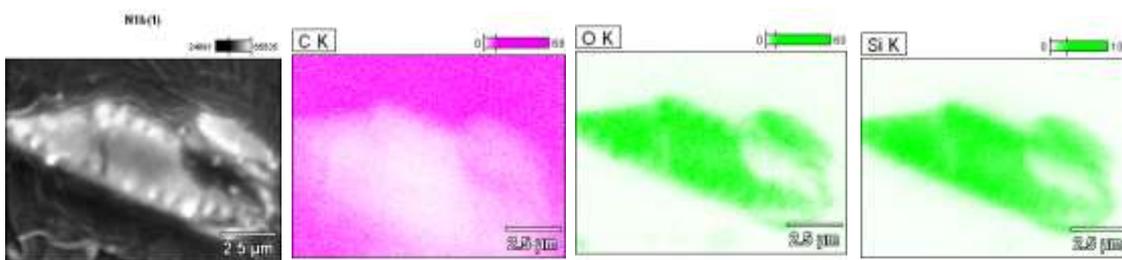


Figura 19. Mapeamento dos principais elementos que compõem os filmes de PEBD contendo NPsAg.

Com o objetivo de obter imagens com maior magnificação, foram coletadas imagens com o microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo (FEG). A Fig. 20 ilustra os aglomerados de SiO₂ dispersos no filme tanto no interior, visto por meio da fratura criogênica, quanto na superfície do filme. O fato do SiO₂ estar disperso na superfície, acarreta a possibilidade das NPsAg estarem também dispersas na

superfície do filmes, o que é de interesse na utilização como embalagem de alimentos, uma vez que a atividade antimicrobiana só poderá ser eficiente se as NPsAg estiverem em contato com a superfície dos micro-organismos presentes na superfície do alimento. A Fig. 20 revela a morfologia da fratura do filme, no qual a incorporação de *masterbatches* (concentrado de aditivo), contendo NPsAg na matriz de PEBD não causou grandes diferenças morfológicas nos filmes.

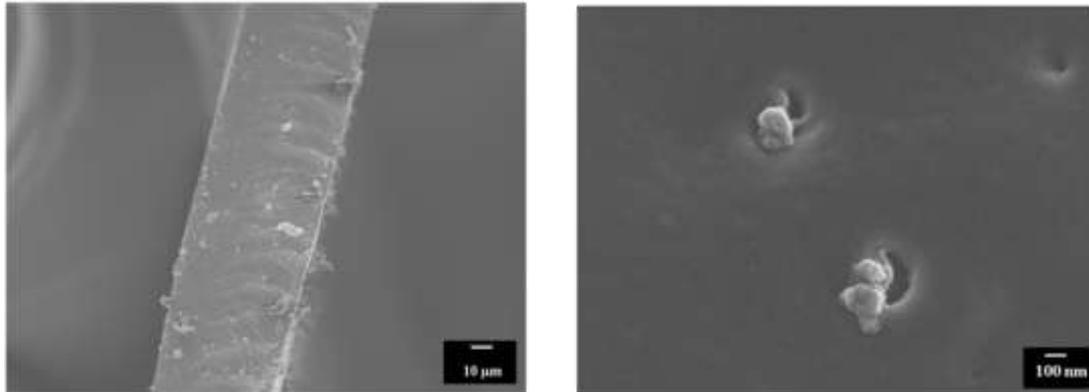


Figura 20. Imagem de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG-SEM) dos filmes PEBD+NPAg: imagem da espessura do filme por meio da fratura criogênica (imagem esquerda) e imagem das estruturas de SiO₂ nos filmes (imagem direita).

5.1.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC):

As curvas de DSC dos filmes estudados estão representadas na Fig. 21. Observa-se que as duas amostras, PEBD e PEBD+NPAg apresentaram picos (variação positiva de entalpia) referentes à fusão dos PEBD (CANEVAROLO, 2002). As duas amostras apresentaram semelhanças entre as curvas, com a presença de pequenos picos endotérmicos que antecedem o pico de fusão principal (122°C). Esta característica pode evidenciar a presença de cristalitos de diferentes morfologias, pertencentes ao PEBD, o que sugere a sua dispersão não homogênea.

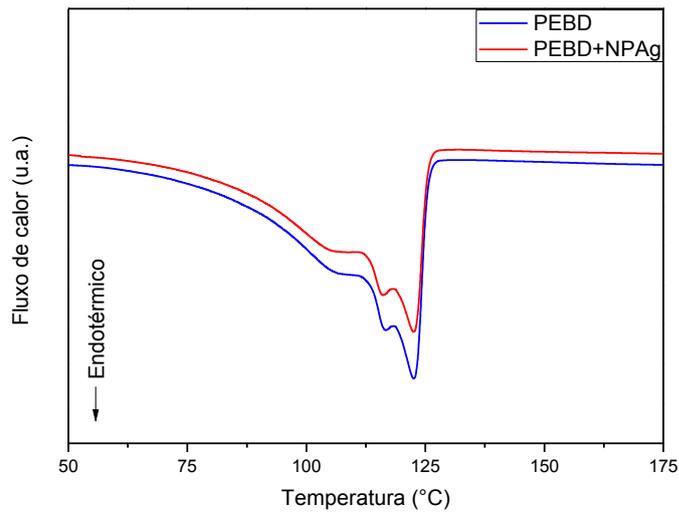


Figura 21. Curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos filmes de PEBD e de PEBD+NPAg.

A temperatura de fusão (T_m) e a entalpia de fusão (ΔH) calculados a partir das curvas de DSC estão expressos na Tab. 5. Observa-se que adição de NPsAg não interferiu na temperatura de fusão, temperatura correspondente aos picos endotérmicos apresentados pelas amostras, uma vez que os dois filmes apresentaram $T_m=122^\circ\text{C}$. Os ΔH s, calor necessário para fundir os cristais dos filmes, calculado por meio da área dos picos endotérmicos, também foi semelhante para os dois filmes, com valores de 100 e 103 J g^{-1} para PEBD e PEBD+NPAg, respectivamente.

Tabela 5. Dados do DSC nos filmes de PEBD e PEBD+NPAg.

Filmes	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔH (J g^{-1})
PEBD	122	100
PEBD+NPAg	122	103

5.1.3. Termogravimetria

A Fig. 22 mostra as curvas termogravimétricas dos filmes de PEBD e de PEBD com NPsAg, no qual expressa a perda de massa em relação à temperatura para os dois filmes e os dados gerados estão listados na Tab. 5.

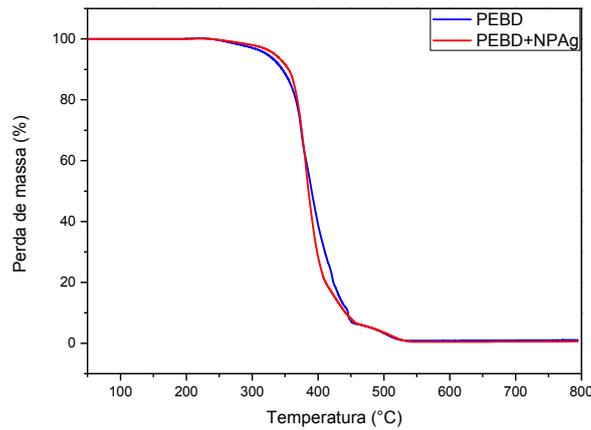


Figura 22. Análise termogravimétrica nos filmes convencionais (PE) e filmes com nanopartículas de prata (NP) em atmosfera oxidativa.

O processo de decomposição térmica dos dois filmes ocorreu em uma única etapa de perda de massa, assim como ocorreu com os compósitos de PEBD estudados por Deng e colaboradores (2014). Pode-se observar que os filmes analisados apresentaram estabilidade térmica semelhantes, com temperatura de início extrapolado de degradação (T_{onset}) de 350°C para PEBD e 358°C para PEBD+NPAg. O ligeiro aumento nos valores da T_{onset} para PEBD+NPAg pode corroborar com a não homogeneidade apresentada pelos cristalitos referentes ao PEBD, retardando o início da degradação do filme (MUNARO, 2007). A temperatura de degradação em 50% de perda de massa foi de 390 e 384°C para PEBD e PEBD+NPAg, respectivamente (Tab. 6). Os valores encontrados para os filmes PEBD estão próximos ao encontrado por Basfar e Ali (2011) ($T_{50\%}$ 409°C).

Tabela 6. Dados da análise termogravimétrica de filmes de PEBD e de PEBD+NPAg em atmosfera oxidativa.

Filmes	T_{onset} (°C)	$T_{50\%}$ (°C)	r (%) a 700°C
PEBD	350	390	0,99
PEBD+NPAg	358	384	0,57

A massa residual obtida após o tratamento térmico, mensurado a 700°C nos dois filmes, foi em torno de 0,99% para PEBD e 0,57% para PEBD+NPAg. A baixa homogeneidade dos filmes pode ter resultado a diferença na composição residual.

5.1.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica analítica que permite analisar materiais e coletar a impressão digital da amostra na região do infravermelho, bem como verificar alterações na estrutura química dos filmes estudados (MOEZ, ALY e ELSHAER, 2012). Os espectros na região do infravermelho estão representados na Fig. 23. Foi observado que a adição de NPsAg não causou alterações significativas nos espectros incluindo a largura e na intensidade das bandas. As bandas evidentes em 719, 1465 e 2920 cm^{-1} (estiramento C-H) são referentes ao PEBD, presente nos dois espectros (ZEFERINO, 2013).

Além disso, A banda em 464 cm^{-1} é característica da absorbância do SiO_2 , evidenciando absorção da ligação Si-O tetragonal, provavelmente devido a presença de SiO_2 presente nos filmes PEBD+NPAg, como já detectado na análise EDS (item 5.1.1) (WANG et al., 2011; LACERDA JÚNIOR et al., 2013). A interação das nanopartículas de prata com a matriz polimérica poderia ser evidenciada nas análises de FTIR. Porém, provavelmente devido a sua baixa concentração de nanopartículas não foi possível ser detectada pelo equipamento.

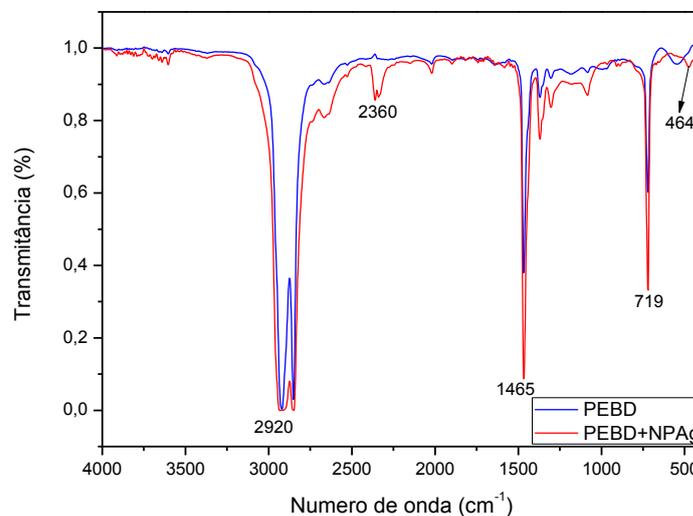


Figura 23. Espectro de FTIR de filmes convencionais PEBD e filmes PEBD+NPAg.

5.1.5. Difração de Raio X (DRX):

A análise de Difração de Raio X (DRX) foi utilizada para indicar as possíveis interações entre o polímero e a NPAg. A Fig 24 mostra o Difratoograma de Raio X dos

filmes, no qual observa-se no espectro apenas os típicos picos de difração em torno de $2\theta = 21^\circ$, 24° e 36° correspondente aos picos de PEBD (MIRANDA e CARVALHO, 2011; DENG et al., 2014).

Os picos de difração correspondente aos planos cristalográficos da prata metálica (Ag^0), são correspondente a $2\theta = 38,2^\circ$ (111), $44,4^\circ$ (200), $64,6^\circ$ (220) e $77,6^\circ$ (311) (LIU et al., 2012; ABDEL-MOHSEN et al., 2014). Como se pode observar no difratograma da Fig.24 não foi possível detectar a presença de NPsAg possivelmente devido ao fato que a concentração presente no filmes está abaixo do detectável pelo equipamento.

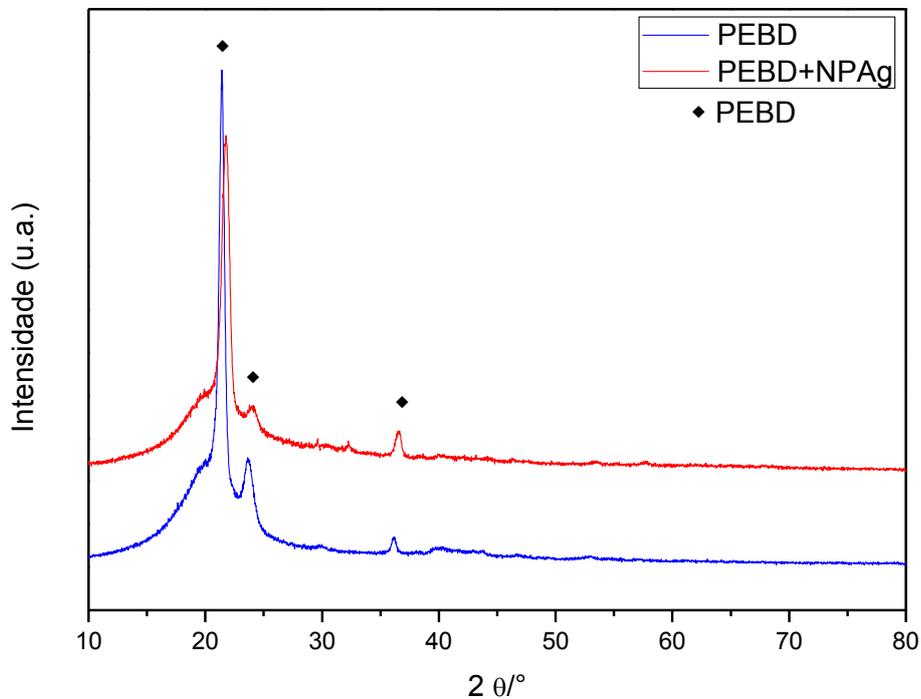


Figura 24. Difratograma de Raio X de filme de PEBD e PEBD+NPAg.

5.2.Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes com nanopartículas de prata

5.2.1. Teste de sensibilidade de antimicrobiano por disco-difusão:

Os resultados obtidos do teste de avaliação do halo de inibição mostraram que os filmes PEBD+NPAg não apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli* utilizando esta metodologia. Observa-se na Fig. 25 que não houve formação de halo em volta do

círculo correspondente ao filme. Este fato pode ser explicado devido a não migração das NPsAg para o meio de cultura, o que deve-se, provavelmente, a baixa viscosidade apresentada pelos polímeros (SIMON, CHAUDHRY e BAKOS, 2008). É desejável que não haja migração de NPs quando estas estão em contato com alimentos, para não comprometer a segurança e a qualidade dos mesmos, e preservar a saúde do consumidor (CHAUDHRY et al., 2008; BRADLEY, CASTLE e CHAUDHRY, 2011; LLORENS et al., 2012). Por exemplo, Kanmani e Rhim (2014) chamam a atenção para a necessidade de que estudos sejam realizados para avaliar a possível migração de NPsAg presentes em filmes com aplicação como embalagens de alimentos.

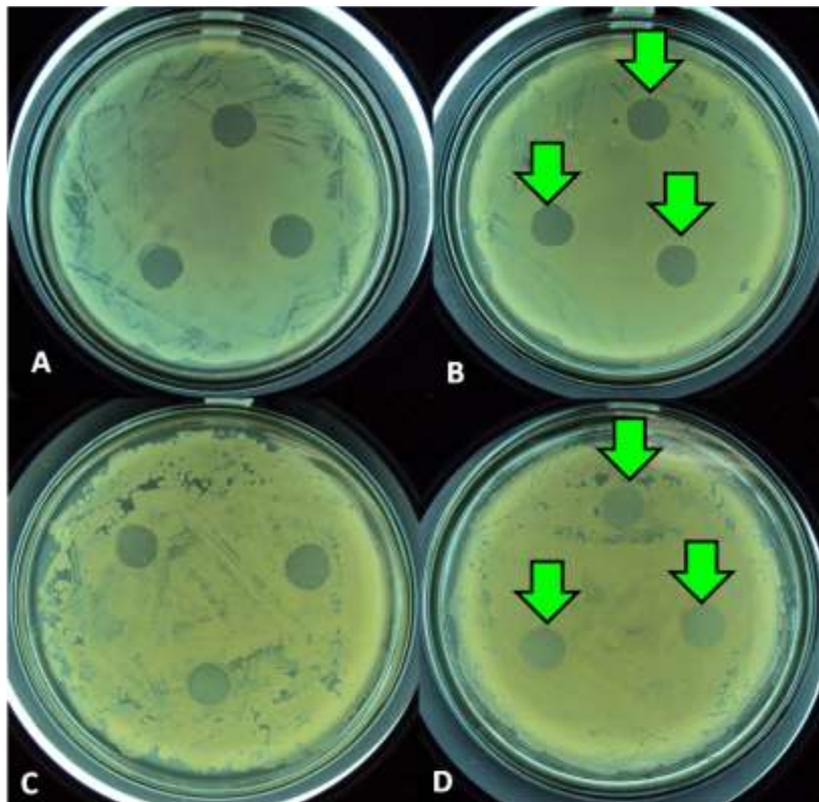


Figura 25. Teste do halo de inibição dos filmes para *E. coli* (A) PEBD e (B) PEBD+NPAg e para *S. aureus* (C) PEBD e (D) PEBD+NPAg; os discos indicados pela seta verde são os discos dos filmes.

5.2.2. Teste bactericida segundo norma JIS Z 2801

A Norma JIS Z 2801 foi utilizada para medir quantitativamente a capacidade dos filmes com NPsAg em diminuir e/ou inibir o crescimento de micro-organismos. Para o micro-organismo teste Gram-negativo *Echerichia coli*, os filmes com NPsAg apresentaram 90,92% de redução na população microbiana (Tab. 7 e Fig. 26), valor este próximo ao encontrado por Becaro e colaboradores (2015) em filmes com

nanopartículas de prata. Para o micro-organismo *Staphylococcus aureus* a redução na população microbiana apresentada pelos filmes contendo NPsAg foi de 44,58% (Tab.7). Os filmes de polietileno puro (PEBD) não apresentaram atividade microbiana.

Tabela 7. Resultados da eficiência antimicrobiana dos filmes de PEBD com NPsAg.

	Redução (%)	
	PEBD	PEBD+NPAg
<i>Echerichia coli</i>	0	90,92
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	44,58

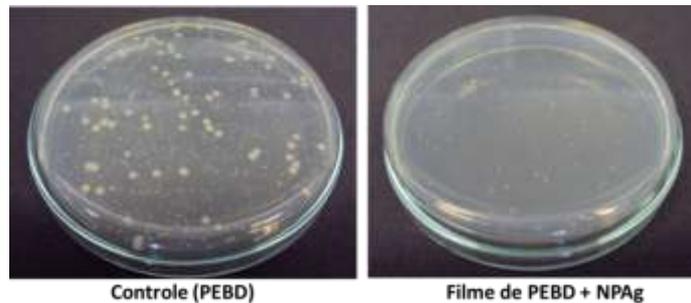


Figura 26. Imagens dos resultados com crescimento em PEBD e crescimento reduzido em PEBD+NPAg para *E. coli*.

Os resultados mostraram que os filmes com NPsAg apresentaram maior eficácia antimicrobiana em bactérias Gram-negativa (*E. coli*) do que em bactérias Gram-positiva (*S. aureus*). A superfície negativa da parede celular das bactérias podem atrair as NPsAg que possuem carga positiva, quando na forma iônica, o que permite uma maior concentração de NPsAg na superfície desses micro-organismos formando “buracos” na parede celular bacteriana aumentando sua permeabilidade e permitindo a maior entrada dessas NPs causando a morte celular (KIM et al., 2007). A maior afinidade da prata com o enxofre e o fósforo encontrados em abundância ao longo da membrana bacteriana, interage com proteínas que possuem esses elementos interferindo em sua funcionalidade (GUZMAN, DILLE e GODET, 2012).

A fina camada de peptideoglicano das bactérias Gram-negativas pode ter permitido a maior adesão das NPsAg, causando maiores danos à parede e à membrana celular o que pode ter alterado tanto a morfologia quanto a permeabilidade para as NPsAg. A espessa camada de cadeias lineares de peptídeosglicana das bactérias Gram-positivas forma uma estrutura rígida tridimensional dificultando a penetração (FAYAZ et al., 2010) o que pode explicar a menor atividade antimicrobiana dos filmes estudados.

Feng et al. (2000) observaram que a morfologia da membrana de *S. aureus* submetida à exposição de Ag^+ permaneceu intacta com poucos grânulos no interior da célula procariota em comparação a *E. coli* submetida ao mesmo tratamento, em que apresentou grandes lacunas entre a membrana e a parede celular. Outros estudos também indicaram a menor toxicidade de NPsAg para *S. aureus* (KIM et al., 2007).

Os resultados indicam também que a incorporação das NPsAg em filmes poliméricos não prejudicou a atividade antimicrobiana das NPs, como também foi relatado por Travan et al. (2011). Devido a atividade antimicrobiana apresentada pelos filmes PEBD+NPAg, há a evidência da presença de NPsAg na composição dos filmes, como também é percebido nos resultados dos experimentos da aplicação dos filmes na conservação de morangos, discutidos a seguir. A eficácia antimicrobiana apresentada no contato superficial dos filmes PEBD+NPAg contra micro-organismos representantes de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa indicam a possibilidade de serem utilizados como embalagens para alimentos, com a finalidade de reduzir a contaminação microbiana presente na superfície de frutas e hortaliças.

5.3. Avaliação da qualidade pós-colheita e microbiológica de morangos

5.3.1. Experimento I: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Oso Grande’ embalado em filmes contendo nanopartículas de prata armazenados a 5 e 25°C

- *Análises Físico-Químicas*

Perda de massa

A perda de massa dos morangos foi influenciada significativamente pelo tempo de armazenamento ($p=0,002$), pela temperatura ($p<0,001$) e pela interação entre esses fatores ($p=0,003$). Pode-se observar na Fig. 27 que a média de perda de massa, do último dia de armazenamento em relação à massa inicial dos morangos, para os tratamentos a 5°C foi de 0,06% enquanto a média para os tratamentos a 25°C foi de 2,16%. Esta maior perda de massa deve-se provavelmente a elevada temperatura, o que pode ter aumentado o metabolismo dos morangos, permitindo maior transpiração dos

frutos e conseqüente maior permeação de gases através das embalagens (KADER, 2002).

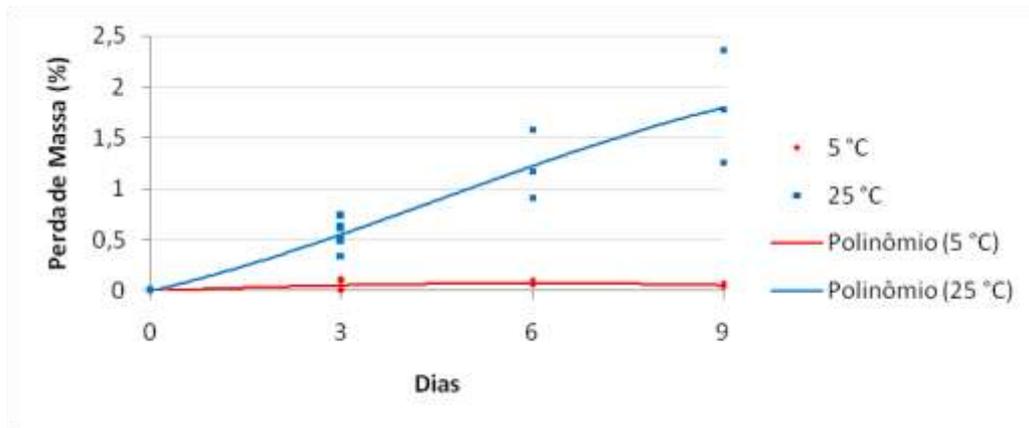


Figura 27. Perda de massa fresca (%) de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5°C ($y = -2E-05x^3 - 0,001x^2 + 0,024x$) e 25°C ($y = -0,001x^3 + 0,018x^2 + 0,142x$) por nove dias.

A perda de massa dos tratamentos a 25°C pode ter sido uma das causas da perda da qualidade dos morangos (GOULAS e MANGANARIS, 2011), corroborada também por outras análises. Pode-se observar que para todos os tratamentos (PEBD 5°C, PEBD+NPAg 5°C, PEBD 25°C e PEBD+NPAg 25°C) os filmes utilizados podem ter apresentado boa barreira contra a perda de vapor de água, produzida pela transpiração dos frutos, uma vez que a perda de massa em todos os tratamentos não chegou a 2,5%. Segundo Ronque (1998) a perda de vapor de água máxima aceitável para a comercialização de morangos é de 6%.

Firmeza

A perda de firmeza é um dos principais responsáveis pela diminuição do tempo de vida dos morangos (NEVES, 2012). Apenas a temperatura exerceu efeito significativo sobre a firmeza da polpa ($p=0,012$), com valor médio de 2,5 N para os morangos armazenados a 5°C e 1,8 N para morangos armazenados a 25°C. A perda de firmeza dos morangos com o aumento da temperatura de armazenamento pode ser explicada pelas alterações na estrutura da parede celular e sua degradação (JIMÉNEZ-BERMÚDEZ et al., 2002). Quanto a firmeza da epiderme (Fig. 28), apesar da diferença estatística apresentada entre todos os tratamentos ($p=0,037$), as alterações na textura da epiderme dos morangos embalados por PEBD e PEBD+NPAg no último dia de

armazenamento foi desprezível na prática, uma vez que essa diferença pode não ser percebida sensorialmente. Porém, o limiar de aceitação, usualmente determinada por análises sensoriais (não realizadas nesse experimento), poderia prever a aceitabilidade por parte do consumidor (LIMA FILHO et al., 2014).

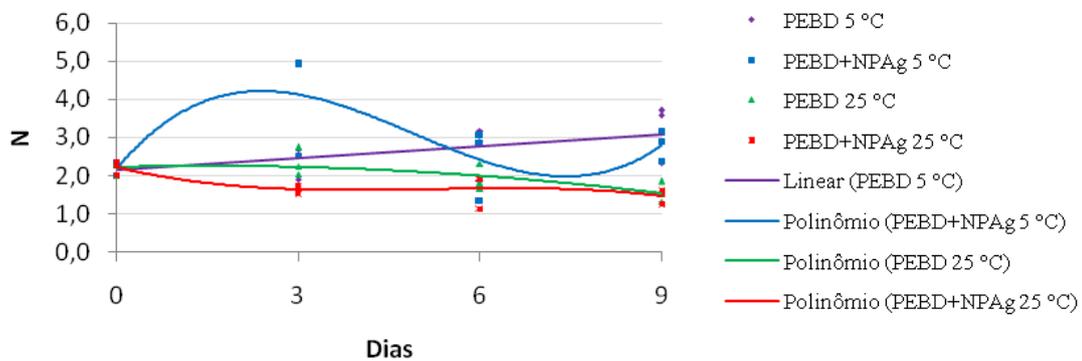


Figura 28. Firmeza da epiderme de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações: PEBD 5°C ($y = 0,106x + 2,142$); PEBD+NPAg 5°C ($y = 0,035x^3 - 0,517x^2 + 1,873x + 2,211$); PEBD 25°C ($y = -0,013x^2 + 0,039x + 2,21$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = -0,005x^3 + 0,078x^2 - 0,381x + 2,211$).

pH

Os valores de pH estão expressos na Fig. 29 e foram influenciados estatisticamente pelo tempo de armazenamento ($p < 0,001$) e pela interação deste fator com a temperatura ($p = 0,036$). Em ambas as temperaturas houve o aumento no pH com valor final para os morangos armazenados a 5°C maior que os armazenados a 25°C. O aumento do pH ao longo dos dias de armazenamento pode ser explicado pela utilização de ácidos orgânicos pelos morangos durante a respiração dos frutos (ADAY e CANER, 2014). Assim como confirmado pela análise de perda de massa, a temperatura ambiente (25°C) pode ter influenciado no aumento da respiração dos morangos armazenados a essa temperatura, uma vez que o pH desses frutos foi superior aos valores apresentados pelos morangos armazenados a 5°C. Braga (2012) observou o mesmo resultados para morangos ‘Oso Grande’ armazenados a 5 e 25°C.

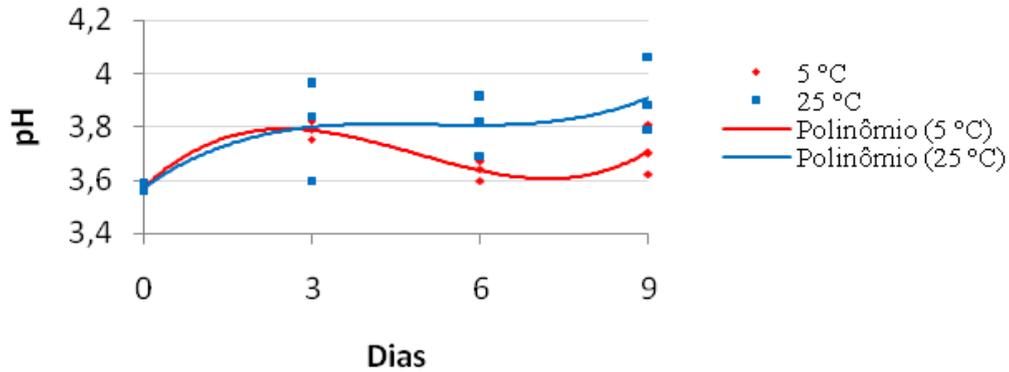


Figura 29. Valores de pH de morangos 'Oso Grande' armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 ($y = 0,003x^3 - 0,052x^2 + 0,194x + 3,576$) e 25°C ($y = 0,001x^3 - 0,029x^2 + 0,145x + 3,576$) por nove dias.

Sólidos Solúveis, Acidez Titulável e *Ratio*

Nas análises de sólidos solúveis (SS) houve diferenças estatística quanto ao fator tempo de armazenamento e temperatura, ambos com $p < 0,001$, e também na interação destes dois fatores com o mesmo valor de significância. Nota-se que os tratamentos armazenados a 25°C obtiveram valores inferiores para SS durante todo o período de armazenamento quando comparado com os morangos armazenados a 5°C (Fig. 30). Esse resultado pode ser um indício que o maior teor de SS é relacionado com o armazenamento dos frutos a baixas temperaturas no qual o amido é convertido em SS (BURDON et al., 2007). A literatura indica que a temperatura pode afetar significativamente nos conteúdos de SS (ZHU et al., 2013) e o aumento no metabolismo dos morangos armazenados a temperatura ambiente pode ter aumentado o consumo de açúcares na respiração, como explicado anteriormente pelas variáveis perda de massa, firmeza e pH.

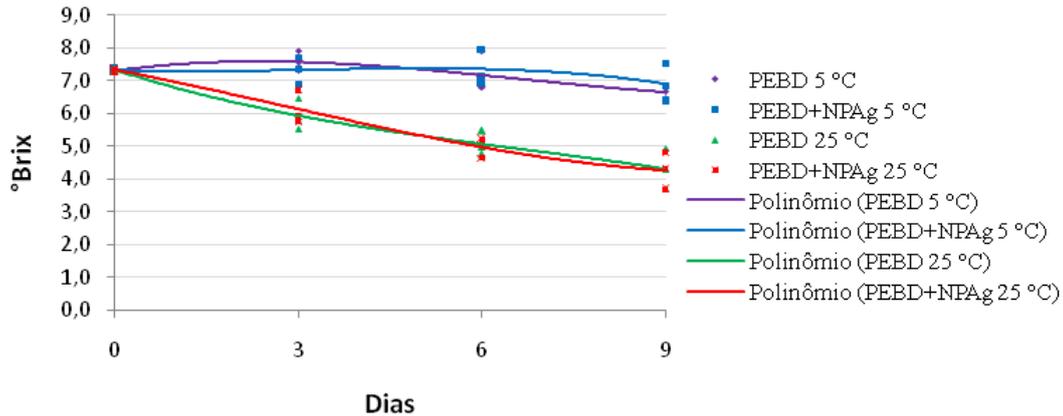


Figura 30. Teor de sólidos solúveis em morangos armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações: PEBD 5°C ($y = 0,003x^3 - 0,067x^2 + 0,261x + 7,32$); PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,003x^3 + 0,029x^2 - 0,060x + 7,32$); PEBD 25°C ($y = -0,002x^3 + 0,053x^2 - 0,602x + 7,32$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = 0,002x^3 - 0,021x^2 - 0,356x + 7,32$).

A acidez titulável (AT) apresentou média geral para todos os tratamentos ao longo dos dias de armazenamentos, não apresentando diferenças entre eles, com valor de 0,68 mg de ácido cítrico $\times 100 \text{ mL}^{-1}$ de suco, assim como encontrado na literatura (MALGARIM et al., 2006). Devido a distinção nos valores de SS, causada pelas duas temperaturas de armazenamento, a razão SS/AT, conhecida como *Ratio*, apresentou diferenças significativas durante os tempo de armazenamento ($p < 0,001$), quanto a temperatura ($p = 0,007$) e quanto a interação do tempo e temperatura ($p = 0,026$). A relação SS/AT dos morangos armazenados a 5°C foi de 9,8 e a 25°C de 9,2. Os ácidos orgânicos geralmente são encontrados em menor concentração em morangos, mas que em combinação com o teor de açúcares tem um importante impacto na qualidade sensorial, podendo determinar a decisão de compra pelo consumidor (GUNDUZ e OZDEMIR, 2014).

Ácido Ascórbico

O teor de ácido ascórbico (AA) sofreu diferenças significativas apenas no fator tempo de armazenamento ($p < 0,001$). Houve ao longo dos dias de armazenamento degradação do AA (Fig. 31), da mesma forma como observado na literatura para outros frutos recobertos com embalagens com NP_sAg (LI et al., 2009; YANG et al., 2010). Vicent et al. (2006) defendem que mesmo com o armazenamento a baixas temperaturas ocorre a degradação de AA.

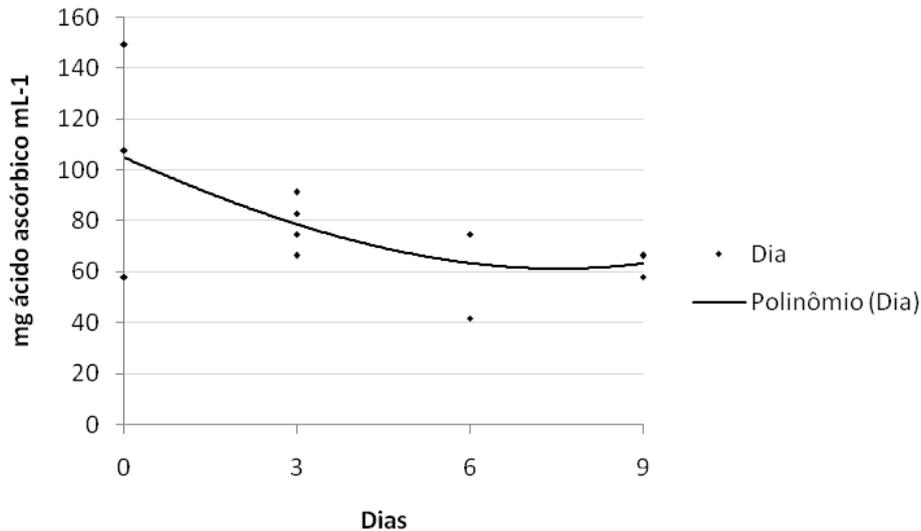


Figura 31. Teor de ácido ascórbico em morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equação: $y = 0,025x^3 + 0,383x^2 - 10,12x + 104,9$.

Coloração

A coloração é uma das principais características de morangos que indicam a qualidade dos frutos e pode ser perceptível pelo consumidor (CRECENTE-CAMPO et al., 2012). Os parâmetros de coloração utilizados foram Luminosidade (L^*), Cromaticidade (C^*) e Ângulo Hue (h°) e todos eles sofreram interação entre o tempo de armazenamento e a temperatura, com $p=0,022$, $p=0,003$ e $p=0,001$, respectivamente. Apenas o Ângulo Hue apresentou diferenças estatísticas provocada pela embalagem contendo NPsAg ($p=0,012$). Os gráficos com as diferenças significativas encontradas em cada parâmetro de cor estão expressos na Fig. 32.

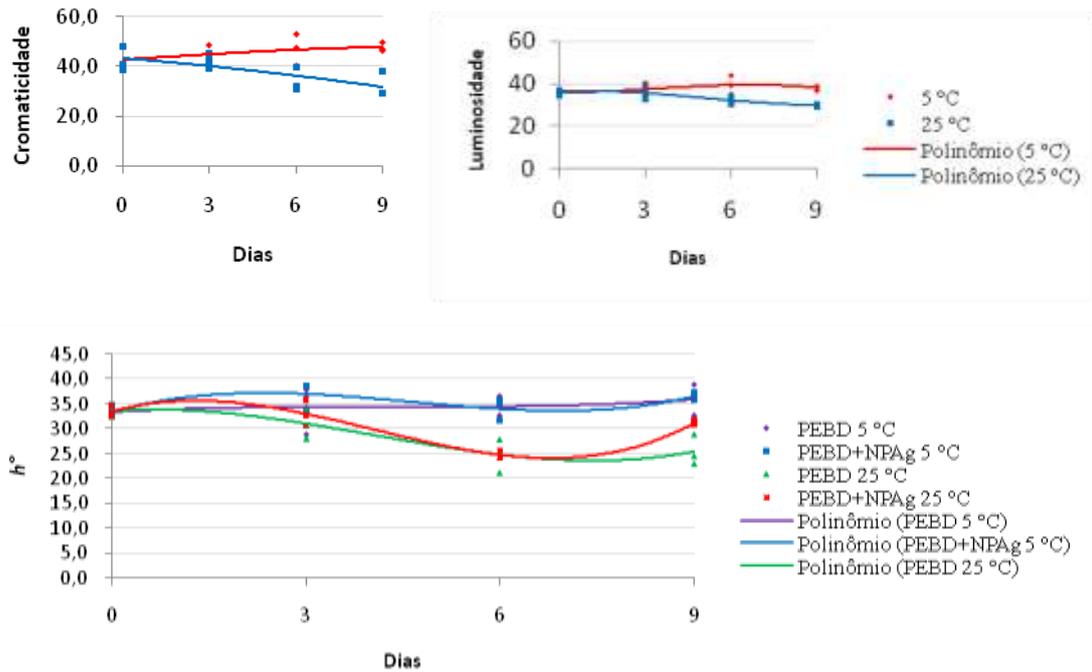


Figura 32. Coloração de morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações gráfico Cromaticidade: 5°C ($y = -0,003x^3 + 0,017x^2 + 0,725x + 42,61$) e 25°C ($y = -0,039x^2 - 0,957x + 43,31$); Luminosidade 5°C ($y = -0,024x^3 + 0,246x^2 - 0,04x + 35,78$) e 25°C ($y = 0,024x^3 - 0,374x^2 + 0,725x + 35,78$); Ângulo Hue PEBD 5°C ($y = 0,014x^3 - 0,181x^2 + 0,762x + 33,47$), PEBD+NPAg 5°C ($y = 0,074x^3 - 1,039x^2 + 3,646x + 33,47$), PEBD 25°C ($y = 0,065x^3 - 0,790x^2 + 0,965x + 33,47$), PEBD+NPAg 25°C ($y = 0,141x^3 - 1,719x^2 + 3,751x + 33,47$).

Observa-se que em todos os parâmetros, os morangos armazenados na temperatura 5°C apresentou valores superiores quando comparado com os frutos armazenados a 25°C indicando que o armazenamento a menores temperaturas manteve a coloração dos frutos mais intensa (Croma mais elevado) e mais clara (Luminosidade mais elevada), com a tonalidade dos frutos menos vermelhos, devido provavelmente ao aumento da luminosidade. Esse cenário pode indicar que o armazenamento a baixas temperaturas mantém a coloração dos frutos com a aparência mais vistosa, característica de frutos frescos, com menor escurecimento causado pelas reações oxidativas que comumente ocorre na superfície de morangos (NUNES et al., 2005).

- **Análises microbiológicas**

Para avaliar o efeito antimicrobiano da embalagem de PEBD com NPsAg na conservação de morangos foram realizadas contagem de coliformes totais (CT), micro-organismos mesófilos (MM) e bolores e leveduras (BL). Em todas as análises ocorreu interação entre os fatores tempo de armazenamento, temperatura e NPAg, com

significância de $p < 0,001$ para MM e CT e $p = 0,031$ para BL. A contagem microbiológica está expressa nos gráficos presentes na Fig. 33.

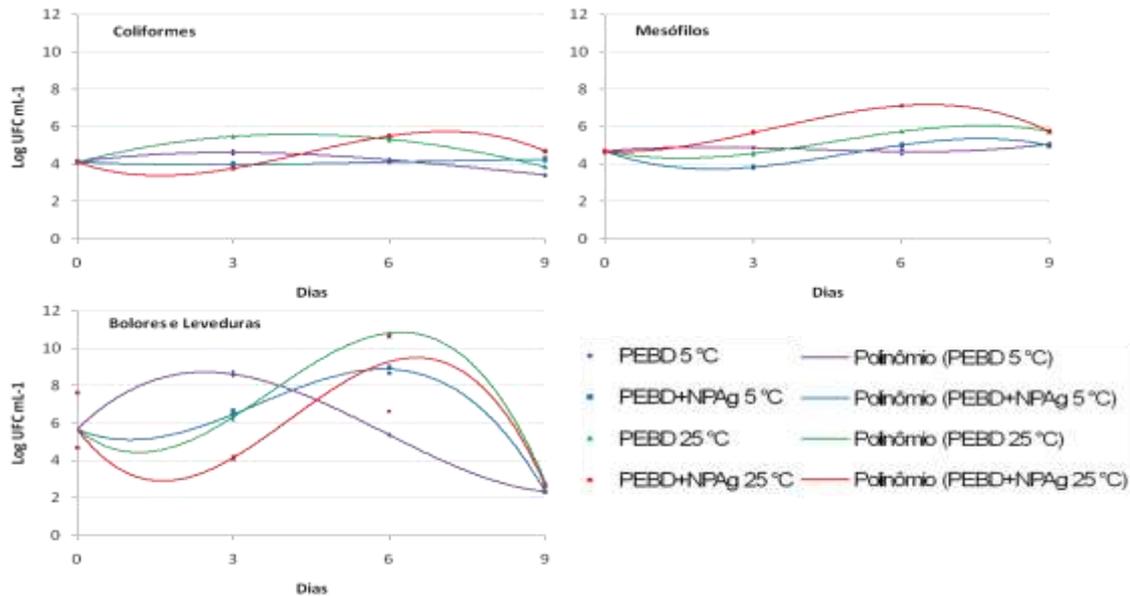


Figura 33. Contagem de coliformes, mesófilos e bolores e leveduras (Log UFC mL^{-1}) presente em morangos ‘Oso Grande’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 25°C por nove dias. Equações dos gráficos: Coliformes PEBD 5°C ($y = 0,003x^3 - 0,079x^2 + 0,381x + 4,097$), PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,001x^3 + 0,031x^2 - 0,124x + 4,097$), PEBD 25°C ($y = 0,001x^3 - 0,097x^2 + 0,737x + 4,097$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = -0,028x^3 + 0,366x^2 - 0,955x + 4,097$); Mesófilos PEBD 5°C ($y = 0,006x^3 - 0,075x^2 + 0,234x + 4,690$), PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,019x^3 + 0,292x^2 - 0,983x + 4,690$), PEBD 25°C ($y = -0,015x^3 + 0,211x^2 - 0,539x + 4,690$), PEBD+NPAg 25°C ($y = -0,020x^3 + 0,205x^2 - 0,102x + 4,690$), Bolores e Leveduras PEBD 5°C ($y = 0,039x^3 - 0,700x^2 + 2,727x + 5,667$), PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,065x^3 + 0,679x^2 - 1,181x + 5,667$), PEBD 25°C ($y = -0,100x^3 + 1,118x^2 - 2,231x + 5,667$) e PEBD+NPAg 25°C ($y = -0,114x^3 + 1,400x^2 - 3,683x + 5,667$).

Para os microrganismos mesófilos, na temperatura a 5°C, a embalagem com NP mostrou-se eficiente nos primeiros dias de armazenamento. A 25°C os morangos embalados com PEBD+NPAg mostrou contagem superior a PEBD indicando que o crescimento microbiano a essa temperatura foi bem maior que o crescimento a 5°C, limitando a ação das NPs. Apesar desses resultados, o último dia de armazenamento a contagem entre os tratamentos PEBD e PEBD+NPAg foi praticamente a mesma, diferindo apenas entre as temperaturas.

Para a contagem de coliformes (CC) foi constatada a ação antimicrobiana das NPAg quando aplicadas em embalagem de PEBD. Até o sexto dia de armazenamento, em ambas temperaturas, a CC nos morangos armazenados em PEBD+NPAg foi inferior aquela dos morangos embalados por PEBD. Porém, também pode ser um indicativo que a sua eficácia pode ser limitada pela alta concentração de micro-organismos, assim

como constatado em MM. Para BL observa-se que a 25°C a embalagem com NPAG mostrou-se eficiente na redução na contagem de BL em morangos. Não foi detectado a presença de *Salmonella* sp nas amostras analisadas.

- ***Conclusão do Experimento I***

Neste experimento, foi avaliado o efeito das embalagens de PEBD e PEBD+NPAG na conservação de morangos ‘Oso Grande’ armazenados a 5 e 25°C por nove dias. Os resultados mostraram que as embalagens utilizadas apresentaram boa barreira contra a perda de vapor de água, reflexo da pequena perda de massa apresentada pelos morangos. A firmeza dos morangos foi afetada negativamente pelo aumento da temperatura. Apesar da firmeza da epiderme apresentar diferenças estatísticas entre as embalagens, essa diferença pode não ser percebida pelo consumidor considerando o último dia de armazenamento, em que os valores apresentados por todos os tratamentos foram semelhantes. A temperatura e o tempo de armazenamento também foram os fatores que influenciaram no comportamento do pH dos morangos, o qual foi mais ácido para os frutos armazenados a 5°C.

Os morangos armazenados a 25°C apresentaram menores valores para SS o que pode ser um indicativo do maior metabolismo apresentado por esses frutos ao longo dos dias de armazenamento, corroborado pelo maior valor para *Ratio* (SS/AT). O teor de ácido ascórbico foi reduzido ao longo do tempo de armazenamento em todos os tratamentos, uma vez que as embalagens não interferiram estatisticamente nos níveis de AA. A coloração dos morangos indicou que frutos armazenados a 5°C mantiveram a aparência de produtos frescos.

As análises microbiológicas mostraram a ação antimicrobiana das NPAG quando aplicadas em embalagens para alimentos, porém esta ação é limitada provavelmente pelo aumento no crescimento microbiano nos morangos. Pode-se concluir que a utilização de embalagens de PEBD contendo NPAG pode ser um aliado na conservação de frutas e hortaliças uma vez que, nas condições testadas, a embalagem manteve a qualidade físico-química dos morangos e ainda apresentou atividade antimicrobiana, reduzindo a carga microbiana dos frutos ao longo dos dias de armazenamento.

5.3.2. Experimento II: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Albion’ embalados em filmes contendo nanopartículas de prata armazenados a 5 e 20°C

No Experimento II os morangos foram armazenados em duas temperaturas: 5 e 20°C. Com vista no experimento anterior (I) observou que a utilização da temperatura 25°C foi um fator agressivo aos morangos, cuja qualidade e aparência foram prejudicadas ao longo do tempo de armazenamento. Assim, a temperatura de armazenamento de 20°C foi a condição empregada para simular a temperatura ambiente em que o produto final seria submetido comercialmente, considerando a não aplicação da cadeia de frio na produção e comercialização dos morangos.

Além da alteração na temperatura, neste experimento optou-se por sanitizar os morangos com Sumaveg anteriormente a etapa de embalagem. Com esse procedimento, descrito no item 4.3.2. da metodologia, buscou-se padronizar a carga microbiana intrínseca dos morangos proveniente do campo, para assim verificar com mais precisão a ação antimicrobiana nos filmes. No Experimento I os morangos não foram sanitizados, simulando o que ocorre comercialmente, uma vez que os morangos não passam por algum processo de sanitização antes de chegar no consumidor final.

- **Análises Físico-química**

Perda de massa

A perda de massa dos morangos não apresentou diferenças significativas por nenhum fator considerado. A média geral da perda de massa fresca de todos os tratamentos ao longo dos dias de armazenamento foi de 0,61% em relação à massa inicial. Esse resultado é um indicativo que as embalagens utilizadas apresentaram boa propriedade de barreira, impedindo a perda de gases gerada com a respiração dos frutos. Embalagens feitas de filmes poliméricos podem ser usadas para modificar a atmosfera dentro da embalagem reduzindo a taxa de perda de umidade de morangos (SOUSA-GALLAGHER, MAHAJAN e MEZDAD, 2013).

Firmeza

A firmeza dos morangos sofreu influência da temperatura tanto para a epiderme quanto para polpa, com $p=0,008$ e $p<0,001$, respectivamente. A firmeza da epiderme também sofreu diferenças significativas do tempo de armazenamento isoladamente ($p=0,022$) enquanto na firmeza da polpa as diferenças causadas pela temperatura induziram a interação com o tempo de armazenamento com $p=0,002$. Pode-se observar que os dois parâmetros de medida tiveram o mesmo comportamento ao longo dos dias de armazenamento com os morangos armazenados a 5°C apresentando valores superiores aos morangos armazenados a 20°C (Fig. 33).

O sutil aumento da firmeza de morangos armazenados a 5°C pode ser explicado pela menor taxa respiratória apresentada pelos frutos nessa temperatura e pelo confinamento de CO_2 presente no interior da embalagem (JOUKI e KHAZAEI, 2014), produzido pela respiração dos frutos e devido pela provável boa propriedade de barreira, indicada pela baixa perda de massa apresentada pelos filmes. A literatura indica que a composição gasosa presente no interior das embalagens pode influenciar na firmeza dos morangos (ADAY, CANER e RAHVALLI, 2011).

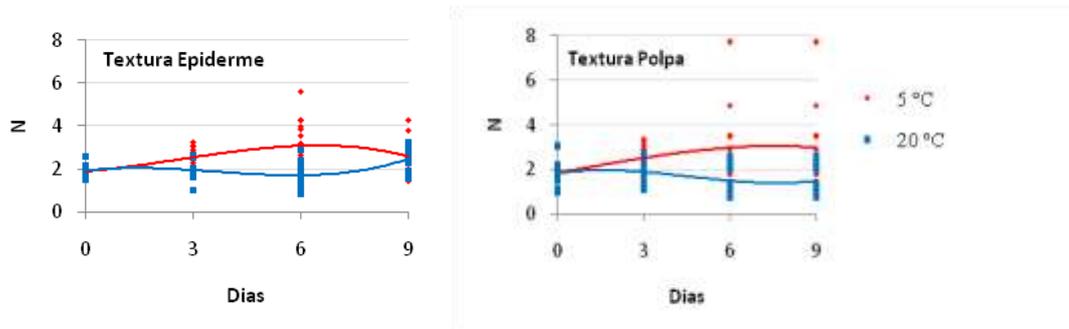


Figura 33. Firmeza de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equação dos gráficos: Epiderme 5°C ($y = -0,005x^3 + 0,043x^2 + 0,131x + 1,919$) e 25°C ($y = 0,007x^3 - 0,085x^2 + 0,195x + 1,919$); Polpa 5°C ($y = -0,001x^3 + 0,004x^2 + 0,228x + 1,831$) e 25°C ($y = 0,005x^3 - 0,075x^2 + 0,201x + 1,831$).

pH

Os valores de pH dos morangos sofreram interação entre os fatores tempo de armazenamento e temperatura ($p=0,013$) o que permitiu um ajuste polinomial de ordem 3 (Fig 34). Observa-se que houve um aumento nos valores de pH com os morangos armazenados a 20°C mais alcalino. Estes resultados estão de acordo com os valores de

acidez titulável (discutidos em seguida), em que morangos armazenados a 20°C sofreram ligeira perda nos teores de ácidos orgânicos quando comparados com os morangos armazenados a 5°C.

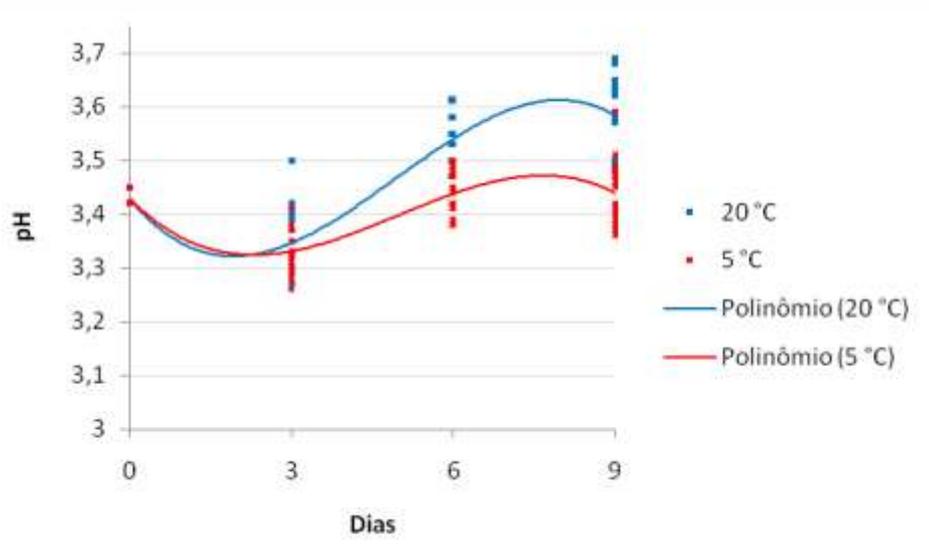


Figura 34. pH de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equações dos gráficos 5°C ($y = -0,001x^3 + 0,029x^2 - 0,103x + 3,43$) e 25°C ($y = -0,002x^3 + 0,039x^2 - 0,122x + 3,43$).

Acidez Titulável

A acidez titulável dos morangos foi influenciada por meio da interação entre os fatores tempo de armazenamento, temperatura e presença de NPAg ($p=0,007$). Observa-se na Fig. 35 que, exceto no último dia de armazenamento, os morangos embalados por filmes de PEBD contendo NPAg nas duas temperaturas apresentaram AT superior aos embalados com filmes de PEBD puro. A manutenção dos teores de AT pode indicar que houve uma manutenção da taxa respiratória dos frutos, uma vez que a redução da acidez decorre da utilização dos ácidos orgânicos durante a respiração (GOL, PATEL e RAO, 2013).

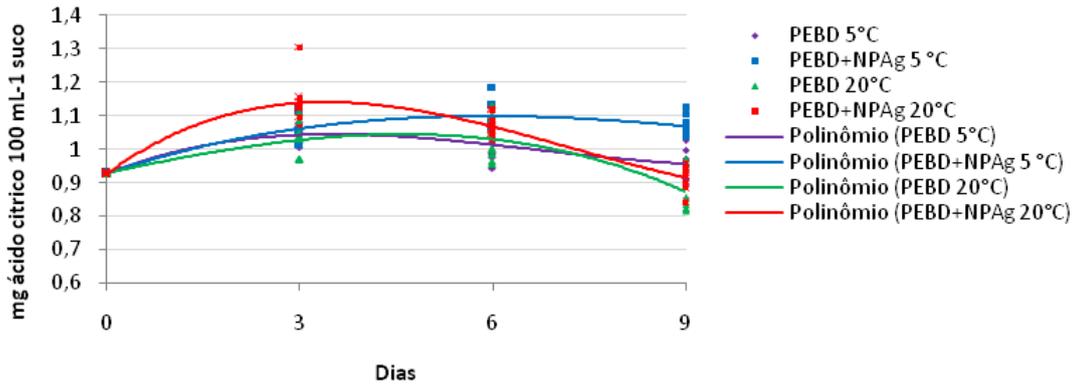


Figura 35. Acidez titulável de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equações do gráfico: PEBD 5°C ($y = 0,000x^3 - 0,014x^2 + 0,074x + 0,928$), PEBD+NPAg 5°C ($y = 0,000x^3 - 0,007x^2 + 0,064x + 0,928$), PEBD 20°C ($y = 0,001x^3 - 0,026x^2 + 0,139x + 0,928$).

Sólidos Solúveis

Os teores de sólidos solúveis (SS) dos morangos apresentaram diferenças estatísticas causadas pela interação entre os fatores tempo de armazenamento e temperatura ($p < 0,001$). Pode-se observar que os frutos armazenados a 5°C mantiveram os níveis de SS enquanto os tratamentos armazenados a 20 ° tiveram uma redução de aproximadamente 30% no teor de SS (Fig. 36). A redução dos níveis de SS pode ser explicada pelo aumento do metabolismo e consumo dos açúcares que compõem os SS durante a respiração.

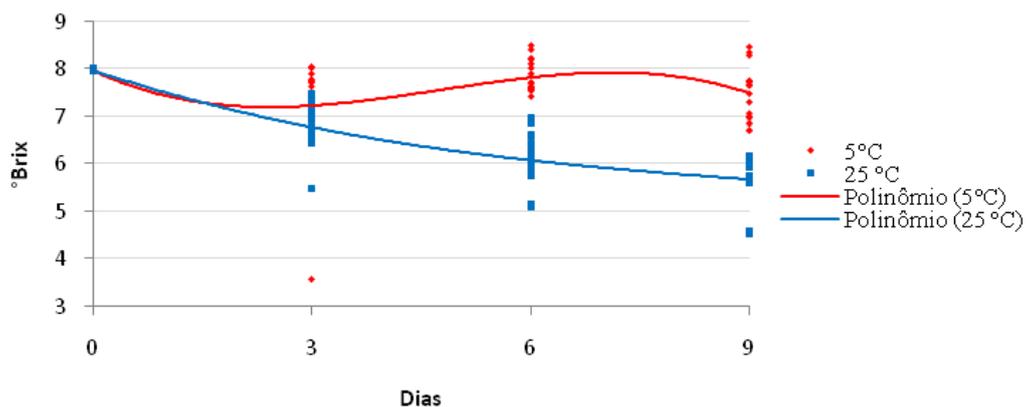


Figura 36. Sólidos solúveis de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equação do gráfico: 5°C ($y = -0,013x^3 + 0,198x^2 - 0,720x + 7,99$) e 20°C ($y = -0,001x^3 + 0,039x^2 - 0,505x + 7,99$).

Ácido Ascórbico

O teor de ácido ascórbico dos morangos não apresentou diferenças significativas por nenhum fator considerado, tendo como valor médio para todos os tratamentos ao longo do período de armazenamento de 0,721 mg de AA mL⁻¹ de suco.

Coloração

Os parâmetros h° e L^* tiveram seus valores influenciados pela interação do tempo de armazenamento e a temperatura, com $p=0,033$ e $p=0,004$, respectivamente. Os tratamentos armazenados a 5°C apresentaram melhores propriedades colorimétricas com morangos mais vermelhos, mais claros e com a cor mais intensa, expressos pelo aumento dos valores de h° , L^* e C^* , respectivamente (SHIN et al., 2007) (Fig. 37). Apenas a cromaticidade apresentou interação entre o tempo de armazenamento, a temperatura e a presença de NPsAg nas embalagens ($p=0,030$).

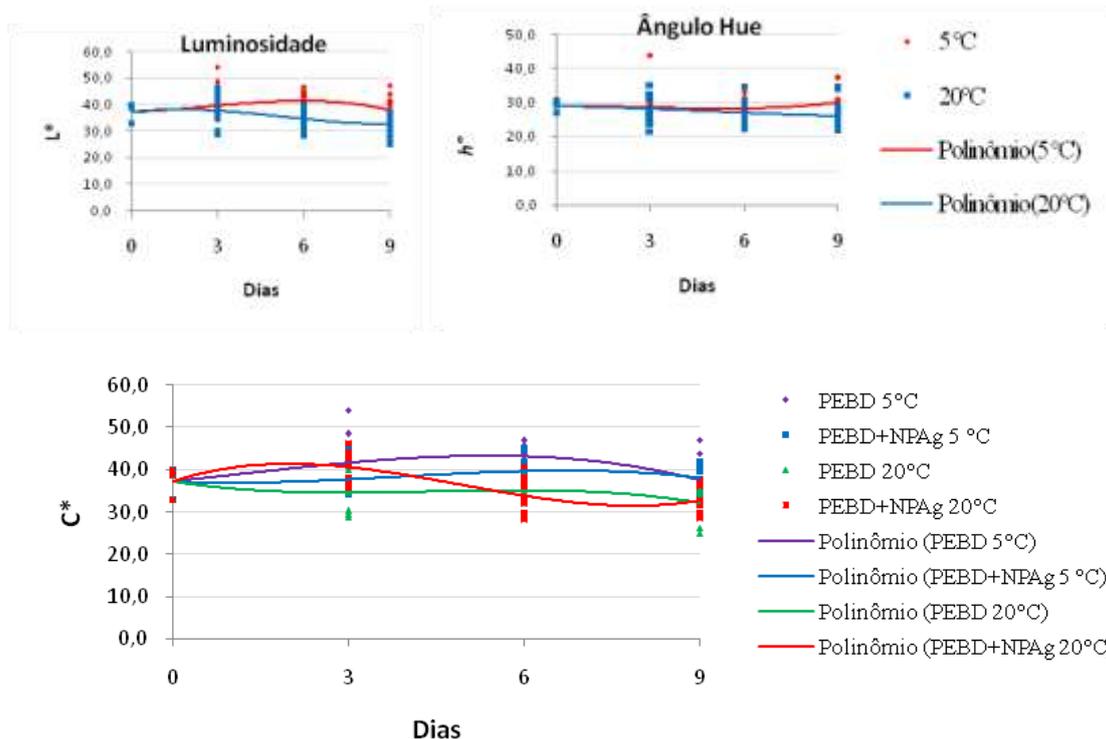
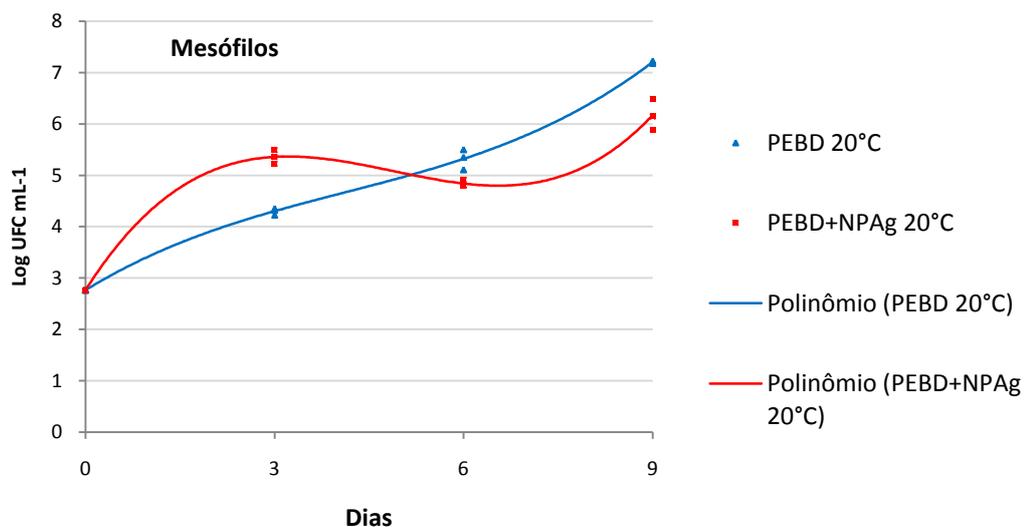


Figura 37. Coloração de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5 e 20°C por nove dias. Equações dos gráficos: Luminosidade 5°C ($y = -0,029x^3 + 0,231x^2 + 0,379x + 37,19$) e 25°C ($y = 0,029x^3 - 0,464x^2 + 1,280x + 37,19$); Ângulo Hue 5°C ($y=0,012x^3 - 0,106x^2 + 0,052x + 29,01$) e 25°C ($y = 0,002x^3 - 0,041x^2 - 0,169x + 29,01$); Cromaticidade PEBD 5°C ($y = -0,026x^3 + 0,082x^2 + 1,435x + 37,19$), PEBD+NPAg 5°C ($y = -0,032x^3 + 0,379x^2 - 0,675x + 37,19$), PEBD 20°C ($y = -0,040x^3 + 0,534x^2 - 2,089x + 37,19$), PEBD+NPAg 20°C ($y = 0,099x^3 - 1,463x^2 + 4,649x + 37,19$).

- **Microbiologia**

A contagem da população de micro-organismos mesófilos e de bolores e leveduras estão expressas na Fig. 38. Pode-se observar que o comportamento nos dois grupos de micro-organismos foi semelhante: nos primeiros dias de armazenamento a concentração de micro-organismos presente nos morangos embalados com PEBD+NPAg foi superior ao controle (PEBD). Porém, próximo ao sexto dia de armazenamento ocorre uma inversão nos dois casos, com a população de micro-organismos presentes nas embalagens PEBD+NPAg inferior ao controle. Esta observação pode ser uma evidencia da ação antimicrobiana das nanopartículas de prata, o que pode ter sido a promotora da redução da contaminação microbiana em até 1,03 e 0,02 Log UFC mL⁻¹, no caso dos micro-organismos mesófilos e bolores e leveduras, respectivamente. Não foi detectado a presença de *Salmonella* sp nas amostras encontradas, o que pode indicar a boa condição fitossanitária que se encontravam os morangos.



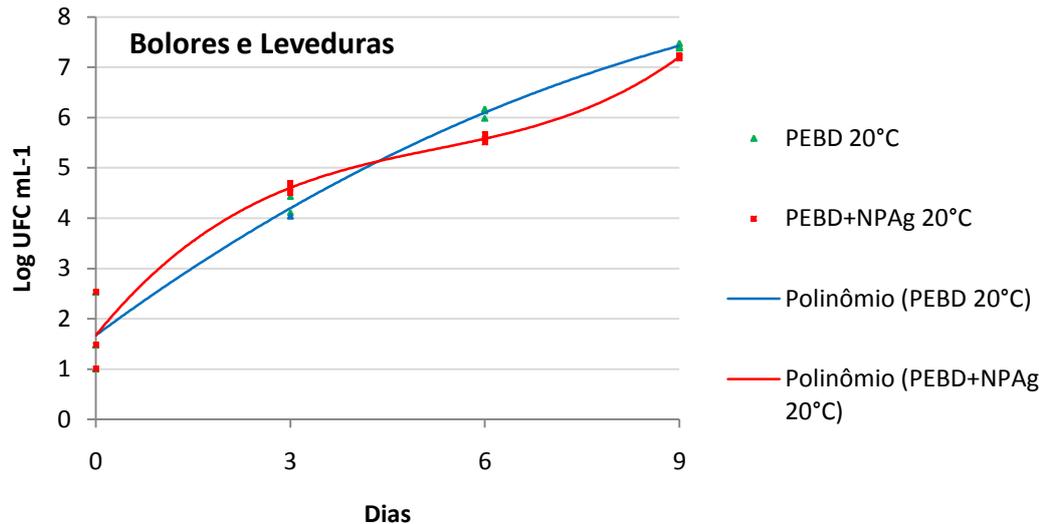


Figura 38. Contagem de micro-organismos mesófilos e de bolores e leveduras (Log UFC mL-1) presente em morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 20°C por nove dias. Equação dos gráficos: Mesófilos PEBD ($y = 0,030x^3 - 0,449x^2 + 1,937x + 2,763$) e PEBD+NPAg ($y = 0,008x^3 - 0,105x^2 + 0,752x + 2,763$); Bolores e Leveduras PEBD ($y = 0,000x^3 - 0,037x^2 + 0,952x + 1,669$) e PEBD+NPAg ($y = 0,016x^3 - 0,253x^2 + 1,593x + 1,669$).

- **Conclusão do Experimento II**

Neste experimento, morangos ‘Albion’ foram embalados em filmes de PEBD contendo NPsAg por nove dias a 5 e 20°C. Nestas condições de armazenamento, houve perda média de 0,24% de massa fresca nos morangos, indicando que as embalagens utilizadas apresentaram boa propriedade de barreira contra perda de vapor de água. O armazenamento a temperaturas baixas também foi decisiva na manutenção da coloração e da firmeza dos morangos, mostrando melhor aparência, fator decisivo na escolha pelo consumidor. Os morangos embalados com filmes PEBD+NPAg apresentaram níveis de AT superiores aos apresentados pelos morangos embalados pelos filmes PEBD o que pode ser um indicativo de que as embalagens contendo NPsAg podem ter contribuído para a manutenção da qualidade pós-colheita dos morangos. As análises microbiológicas mostraram que as NPsAg presentes nos filmes poliméricos apresentaram atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados neste experimento, com eficácia evidente depois de alguns dias de armazenamento.

5.3.3. Experimento III: Avaliação pós-colheita e microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com *Escherichia coli* embalados em filmes contendo nanopartículas de prata e armazenados a 5°C.

Para explorar mais o efeito antimicrobiana das embalagens de PEBD contendo NPsAg e verificar sua ação ao longo dos dias de armazenamento do morango, optou-se por inocular os morangos sanitizados com *Echerichia coli*, micro-organismos representante das bactérias Gram-negativas e por ser uma bactéria de interesse na saúde pública. A maior redução microbiana contra *E. coli* apresentada pelos filmes contendo NPsAg, seguindo a norma JIS (item 5.2.2), também influenciou na escolha deste micro-organismo. A concentração do inoculo de *E. coli* utilizado foi de aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹, simulando uma contaminação excessiva nos morangos. Como controle negativo, morangos sanitizados e não inoculados foram também embalados nos filmes e armazenados na mesma temperatura. Todos os tratamentos foram armazenados em câmara-fria a 5°C, temperatura ideal na conservação pós-colheita de morangos.

- **Análises Físico-Químicas**

Perda de Massa

Os resultados de Perda de Massa (PM), expresso em porcentagem, foram mostrados na Fig. 39 e apenas o tempo de armazenamento teve influência significativa ($p < 0,001$). Observa-se pela linha de tendência polinomial que em todos os tratamentos ocorreu um aumento progressivo na perda de massa até o oitavo dia de armazenamento alcançando uma perda de massa de 0,41% no último dia de armazenamento em relação à massa inicial. Este valor é menor do que o encontrado na literatura por Nielsen (2008) que obteve valor de 0,5% ao embalar morangos em embalagens de polipropileno a 5°C por 10 dias. Já Zhou et al. (2011) ao utilizar embalagens de PEBD com NPsAg para armazenar maçã minimamente processada, também a 5°C, encontrou valor de perda de massa média menor que 2,0%. Li et al. (2009) embalou jujubas chinesas em embalagens de PEBD com NPAg em sua composição e observou perda de massa menor que 0,8%.

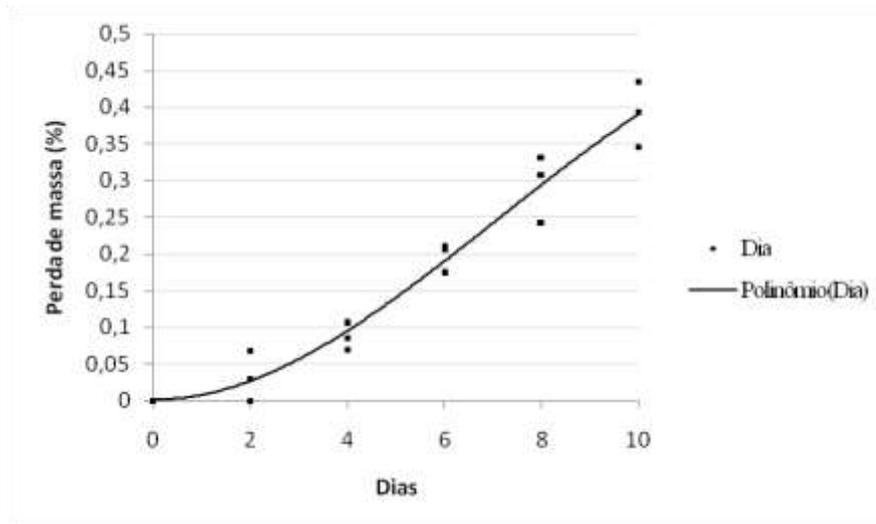


Figura 39. Perda de Massa de morangos inoculados com *E. coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equação do gráfico: $y = -0,000x^3 + 0,007x^2 - 0,001x + 0,001$.

A pequena perda de massa pode ser explicada pela barreira, apresentada pelas embalagens de polietileno, contra vapor de água produzido pela respiração dos morangos (ZANDI et al., 2013). As embalagens utilizadas mostraram influenciar positivamente na conservação dos morangos uma vez que a alta perda de massa é um dos fatores mais importantes na deterioração dos frutos (ALMENAR et al., 2008).

Firmeza

A firmeza dos morangos foi avaliada por dois parâmetros diferentes, por meio da firmeza da epiderme dos morangos e por meio da firmeza da polpa e estão expressos nos gráficos presentes na Fig. 40. A firmeza dos morangos durante o período de armazenamento pós-colheita pode ser afetado por mudanças físico-químicas levando ao amolecimento dos frutos, o que pode causar rejeição por parte dos consumidores, sendo um fator decisivo no momento da compra (PERETTO et al., 2014). Os resultados mostraram que houve diferença estatística apenas ao longo do tempo de armazenamento ($p=0,049$ para epiderme e $p=0,040$ para polpa).

Nota-se que houve um aumento nos valores na firmeza da polpa dos morangos até o segundo dia seguido de um leve declínio até o último dia de armazenamento (Fig. 40). Observa-se também que houve redução da firmeza da epiderme de maneira mínima, porém progressiva até o quarto dia, recuperando aos poucos até o último dia de análise. Provavelmente, a perda de firmeza na epiderme nos primeiros dias deve-se ao amolecimento da superfície dos morangos, cuja ocorrência pode ser devido a pressão

exercida pelos filmes ao embalar os frutos à vácuo. A pressão exercida pela embalagem contra o tecido externo dos frutos pode ter causado deformações estruturais, implicando em possíveis danos celulares, (PEREZ-CABRERA et al., 2011).

Li e colaboradores (2009) também observaram a redução da textura em jujuba chinesa (*Ziziphus jujuba Mill*) armazenada em filmes de PEBD com NP_{Ag} em sua composição. Os autores alegam que este fato deve-se provavelmente a degradação dos componentes da parede celular vegetal por enzimas específicas. As transformações na estrutura celular e alterações bioquímicas que podem ter ocorrido nas células que compõe tanto a polpa quanto a epiderme dos morangos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). A inoculação de um microrganismo não interferiu na firmeza dos frutos em questão da mesma forma que a inoculação pelo fungo *Cryptococcus laurentii* não influenciou na firmeza de morangos ‘Toyonoka’ quando estudados por Wei, Mao e Tu (2014).

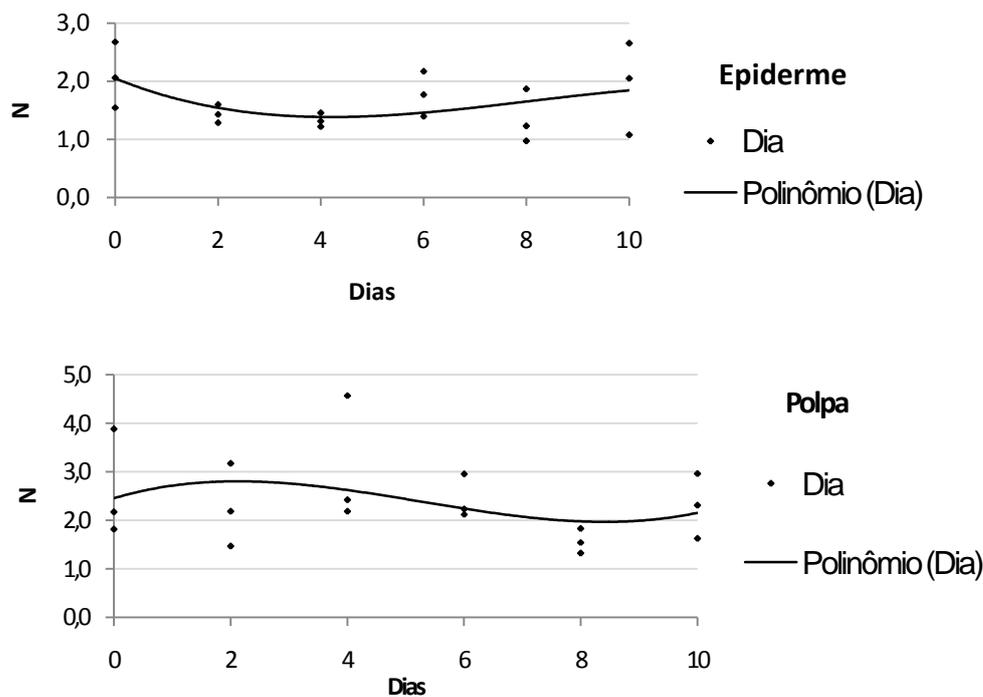


Figura 40. Firmeza da epiderme e da polpa de morangos inoculados com *E.coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NP_{Ag} armazenados por 10 dias. Equação dos gráficos: Epiderme ($y = -0,002x^3 + 0,057x^2 - 0,358x + 2,044$) e Polpa ($y = 0,006x^3 - 0,106x^2 + 0,361x + 2,453$).

pH

Para a variável pH houve interação entre os fatores tempo de armazenamento e a presença de NP_{Ag} nas embalagens ($p=0,014$) e entre o tempo de armazenamento e a inoculação dos morangos com *E. coli* ($p=0,033$). A variação do pH ao longo dos dias de armazenamento para cada um dos tratamentos está expressa na Fig.41. Pode-se observar

que houve aumento nos valores de pH para todos os tratamentos comparando com o valor de pH inicial (3,3), assim como encontrado por Aday, Caner e Rahvali (2011) ao estudar morangos submetidos a embalagem com atmosfera modificada armazenados a 4°C por quatro semanas.

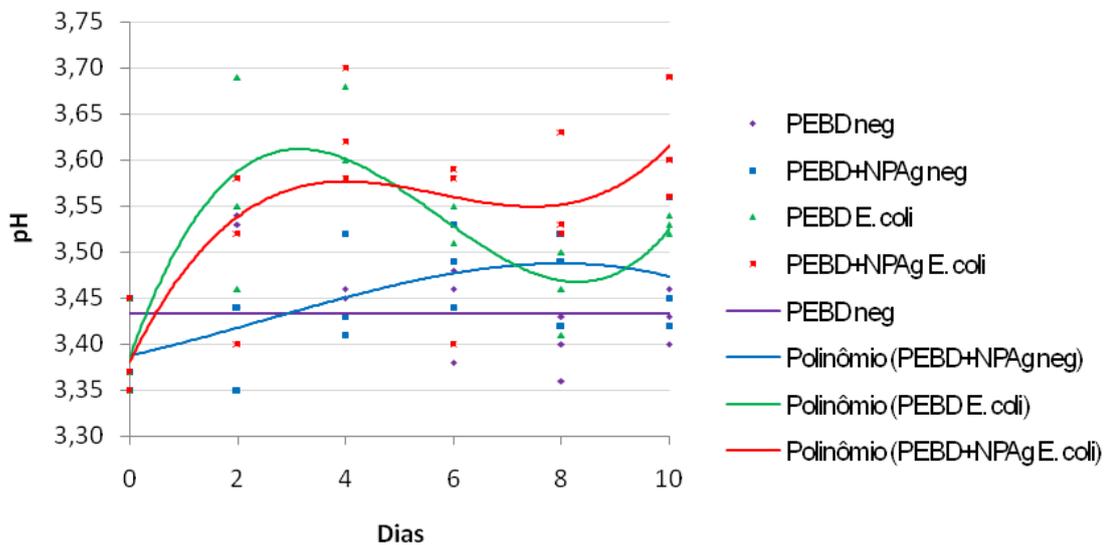


Figura 41. Valores de pH de morangos inoculados com E.coli e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equações do gráfico: PEBD+NPAg neg ($y = -0,000x^3 + 0,001x^2 + 0,012x + 3,387$), PEBD E. coli ($y = 0,002x^3 - 0,036x^2 + 0,165x + 3,383$), PEBD+NPAg E. coli ($y = 0,001x^3 - 0,022x^2 + 0,119x + 3,380$).

Apesar das diferenças estatísticas constatadas, a média dos valores de pH apresentados pelos tratamentos foi de 3,4, mesmo valor encontrado por Nielsen e Leufve (2008) que trabalhou com morangos ‘Korona’ e ‘Honeoye’ armazenados também a 5°C por 10 dias. A variação de pH encontrada dentro dos tratamentos é de aproximadamente 0,3 (3,3-3,6) o que do ponto de vista prático pode não ser significativo para gerar grandes alterações no metabolismo do morango, mantendo o pH praticamente constante ao longo da vida pós-colheita (NIELSENA e LEUFVE, 2008; SANCHEZ et al., 2011). A manutenção constante do pH também foi detectada por Costa e colaboradores (2011), no qual utilizou embalagens de polipropileno com deposição de NP de Ag-montmorilonita para condicionar salada de fruta armazenando a 5°C.

A Fig. 41 também mostra que todos os tratamentos apresentaram um aumento no pH até o quarto dia de armazenamento; exceto o tratamento PEBD-negativo que apresentou declínio no dia quatro. Zheng et al. (2007) também constatou aumento ligeiro nos valores de pH de morangos ‘Allstar’ durante o armazenamento. Nota-se

também que os tratamentos inoculados na suspensão bacteriana apresentaram pH menos ácido que os não inoculados. Esses resultados foram contrários ao encontrado por Menel, Faten e Moktar (2012) que trabalharam com morangos inoculados com a bactéria láctea *Lactobacillus pentosus* (Gram-positiva), embalando-os em sacos de polietileno e armazenando a 4°C. O aumento nos níveis de pH estão de acordo com os resultados de acidez titulável descrita a seguir. Ao observar as curvas ajustadas (Fig. 41), nota-se que os tratamentos PEBD obtiveram o mesmo comportamento ao longo dos dias de armazenamento, sendo o tratamento PEBD-negativo mais ácido.

Acidez Titulável

O tempo de armazenamento apresentou interação com o fator presença de NPAg ($p=0,007$). Houve uma baixa variância entre os dados de AT, cuja representação está expressa em torno de duas constantes (Fig. 42). Apesar de não estar expressa no gráfico, porém com diferenças estatísticas quanto ao fator tempo de armazenamento, houve uma redução nos valores de AT de modo geral para todos os tratamentos, ou seja, diminuiu a acidez dos morangos estando de acordo com os valores de pH encontrados. A diminuição do teor dos ácidos orgânicos pode ter ocorrido devido a sua conversão a açúcares durante a respiração (ADAY e CANER, 2014).

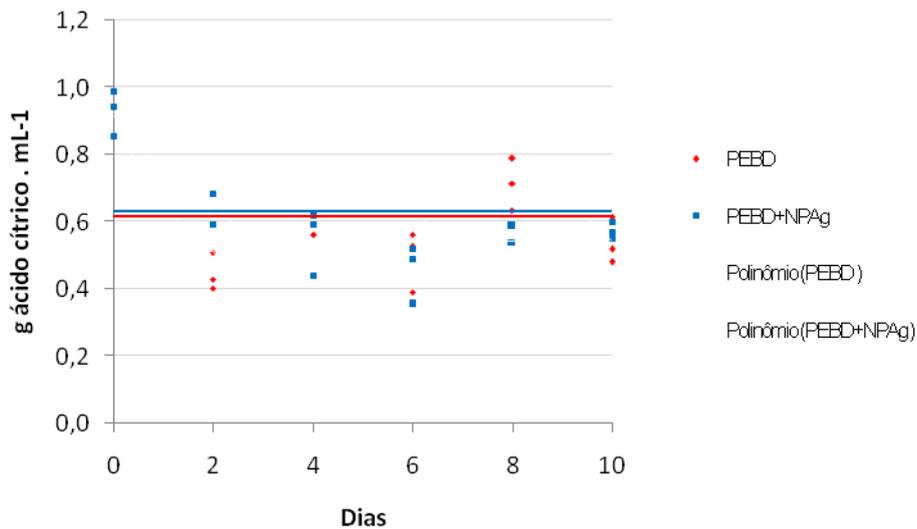


Figura 42. Acidez titulável de morangos inoculados com E.coli e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C.

Observa-se nas curvas ajustadas (Fig 42) que os tratamentos utilizando embalagens PEBD+NPAg obtiveram menor redução nos valores de AT. O mesmo foi detectado por Li et al. (2009) ao avaliar o efeito de embalagens de PE com NPAg em sua composição na qualidade de jujubas chinesas. Os autores também detectaram queda nos valores de AT para todos os tratamentos, porém as embalagens com NP mantiveram melhor os teores de AT quando comparado com o controle.

Sólidos Solúveis

O teor de sólidos solúveis (SS) está diretamente relacionado ao sabor do fruto, fator importante para a aceitabilidade do produto pelo consumidor. Apenas o dia de armazenamento ($p < 0,001$) e o fator inoculação *E. coli* ($p = 0,007$) apresentaram efeito significativo sobre SS. Duas curvas foram ajustadas para representar o comportamento dos tratamentos inoculados e não inoculados durante o período de armazenamento (Fig. 43).

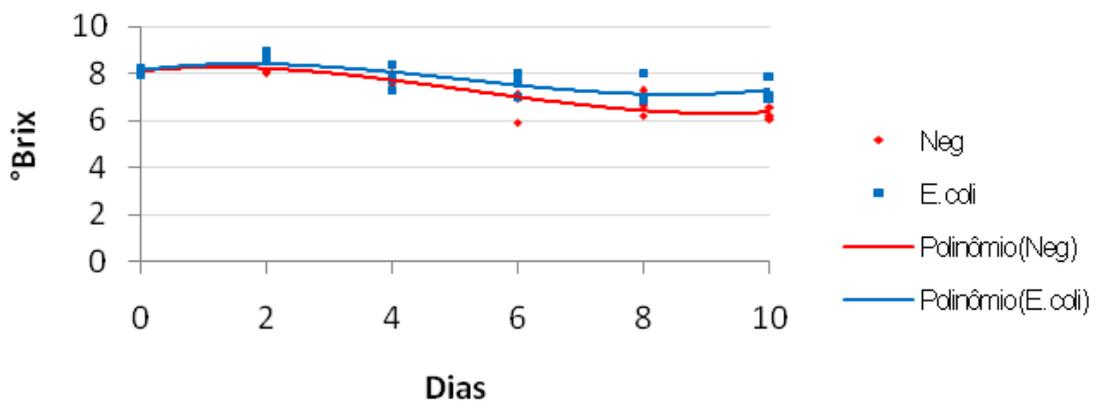


Figura 43. Teor de sólidos solúveis de morangos inoculados com *E. coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equações do gráfico: Neg ($y = 0,007x^3 - 0,123x^2 + 0,264x + 8,118$) e *E. coli* ($y = 0,008x^3 - 0,124x^2 + 0,344x + 8,168$).

Observa-se que para todos os tratamentos houve uma ligeira redução nos valores de SS a partir do segundo dia até o oitavo dia de armazenamento, com um pequeno aumento no último dia de análise (Fig 43). A diminuição do teor de SS pode ser explicada pela utilização da sacarose e dos açúcares redutores durante o processo de respiração do fruto (YANG et al., 2010). O mesmo resultado foi encontrado por Yang et al. (2010) que avaliou o uso de embalagens de PE contendo NPAg na conservação de morangos armazenados a 4°C. Os morangos inoculados com *E. coli* apresentaram valores maiores para SS em todos os dias de análises.

Ratio

O *Ratio*, razão entre SS e TA, é um parâmetro indicador de sabor e grau de maturação em frutas e hortaliças, usualmente utilizado na avaliação da qualidade pós-colheita desses produtos (KAFKAS et al., 2007). Houve interação entre os fatores tempo de armazenamento e NPAg ($p=0,048$), exibindo assim efeito significativo no comportamento dos morangos quanto ao *Ratio*. Para melhor análise dos dados, foram ajustadas duas curvas referente aos tratamentos em que os morangos foram embalados com PEBD e os que foram embalados por PEBD+NPAg (Fig.44).

Observa-se que houve um ligeiro aumento no *Ratio* dos morangos embalados com embalagens de PEBD contendo NPAsAg. Braga (2012) também observou um aumento nos valores de *Ratio* de morangos ‘Oso Grande’ armazenados a 5°C nos primeiros dias seguida de queda com valores inferiores no último dia de armazenamento.

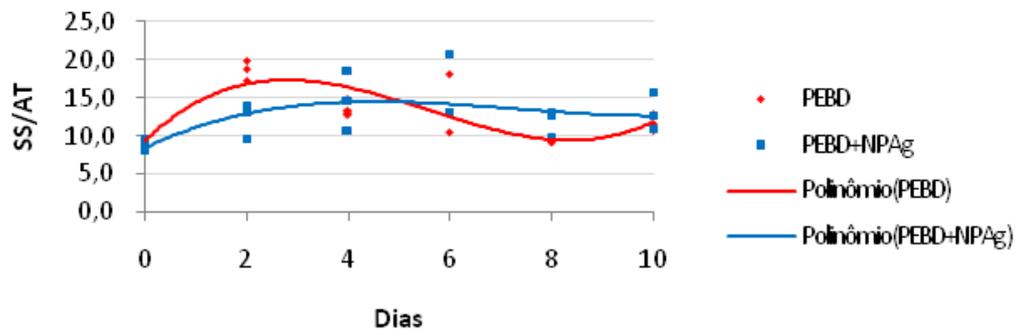


Figura 44. Curva ajustada Ratio de morangos inoculados com *E.coli* e embalados com embalagens de PEBD e de PEBD com NPAsAg armazenados por 10 dias a 5°C. Equações do gráfico: PEBD ($y = 0,091x^3 - 1,530x^2 + 6,433x + 9,246$) e PEBD+NPAg ($y = 0,023x^3 - 0,510x^2 + 3,188x + 8,432$).

Ácido Ascórbico

O teor de ácido ascórbico (AA) analisado nos morangos sofreu influencia significativa apenas do tempo de armazenamento ($p<0,001$). Observa-se que em todos os tratamentos, houve um acréscimo contínuo nos valores de AA até o oitavo dia com suave declínio no último dia de armazenamento. Como pode ser visto na Fig.45 o comportamento entre os tratamentos embalado com e sem PEBD+NPag foi praticamente o mesmo e a inoculação em suspensão de *E. coli* não interferiu no teor de ácido ascórbico dos morangos. Apesar deste experimento não apresentar diferenças

significativas entre os tratamentos, há relatos na literatura que afirmam que o uso de embalagens contendo NPAg preserva o teor de AA de morango (Zandi et al., 2013) e de suco de laranja (EMAMIFAR et al., 2011)

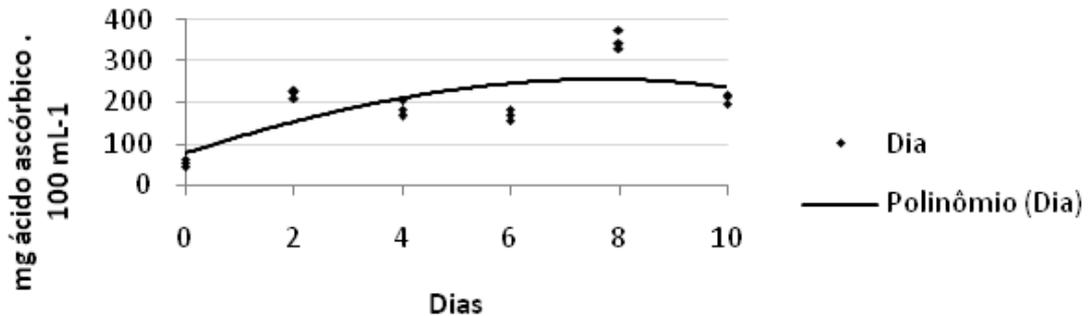


Figura 45. Curva ajustada para o teor de ácido ascórbico de morangos de morangos inoculados com *E. coli* embalados com PEBD e de PEBD com NPAsAg e armazenados a 5°C por 10 dias. Equação do gráfico: $(y = -0,076x^3 - 1,854x^2 + 42,28x + 77,57)$.

Coloração

A manutenção coloração de frutos frescos é um indicador que tem impacto na aceitação pelo consumidor e a perda de cor está relacionada com a degradação de pigmentos, sendo um indício de perda da qualidade pós-colheita (CANNER, 2008).

A coloração dos morangos sofreu diferenças estatísticas apenas pelo fator tempo de armazenamento para os parâmetros luminosidade ($p=0,003$) e cromaticidade ($p=0,001$). A luminosidade (L^*) dos morangos, apesar de apresentar diferenças significativas quanto ao fator tempo de armazenamento, apresenta valores iniciais ($L^*=29,9$) e final ($L^*=30,2$) próximos, o que pode ser um indicativo de que o período de armazenamento não provocou mudanças expressivas no produto final (Fig. 46), como também reportado por Peretto et al. (2014) ao avaliar a qualidade pós-colheita de morangos armazenados a 10°C por 10 dias. Os morangos em todos os tratamentos apresentaram valor médio menor para croma no décimo dia ($C^*=29,1$) quando comparado com o valor médio inicial ($C^*=32,3$), o que pode indicar uma cor menos intensa no último de armazenamento (Fig. 39). O ângulo Hue (h°) não sofreu alteração nenhum, mantendo a média geral de $h^\circ=25,35$.

Com isso, pode-se inferir que a coloração dos morangos não foi alterada estatisticamente por nenhum parâmetro analisado, o que é um indício de que a aparência dos morangos não foi modificada pelo uso de NPAsAg nas embalagens nem pelo tempo

de armazenamento, mantendo a sua aparência por todo o período de estocagem. As embalagens de PEBD e de PEBD com PE/Ag₂O estudadas por Zhou et al. (2011) também retardaram a descoloração de fatias de maçãs quando armazenadas a 5°C. Li et al. (2009) identificou que apesar de ocorrer o escurecimento (diminuição de L*) de jujubas chinesas, as embalagens poliméricas contendo NPAg contribuíram para o menor escurecimento dos frutos quando comparado com o controle.

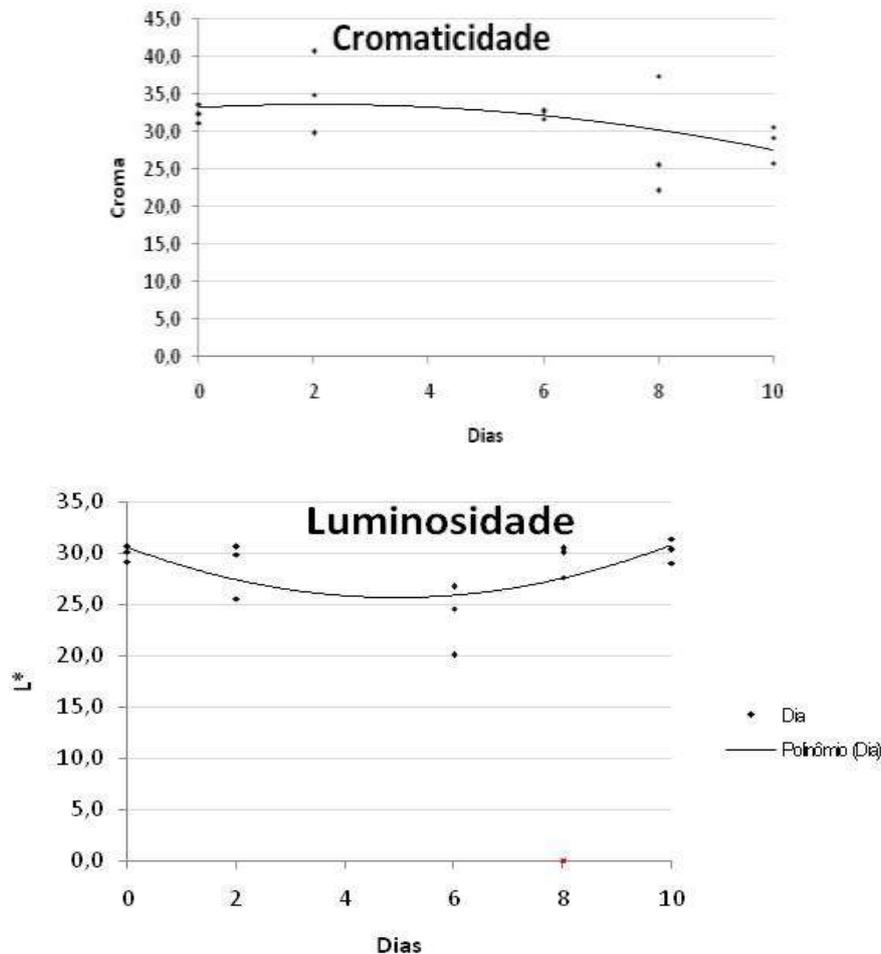


Figura 46. Efeito de embalagens de PEBD e de PEBD com NPsAg na coloração de morangos inoculados com *E. coli* armazenados a 5°C por 10 dias: Cromaticidade ($y = 0,198x^2 - 1,963x + 30,53$) e Luminosidade ($y = -0,099x^2 + 0,410x + 33,25$).

- **Microbiologia**

A evolução da população de enterobactérias em relação ao tempo de armazenamento presente na superfície dos morangos foi graficada na Fig 47. A aplicação de embalagens de PEBD contendo NPsAg influenciou significativamente na contagem de enterobactérias nos morangos ($p=0,26$).

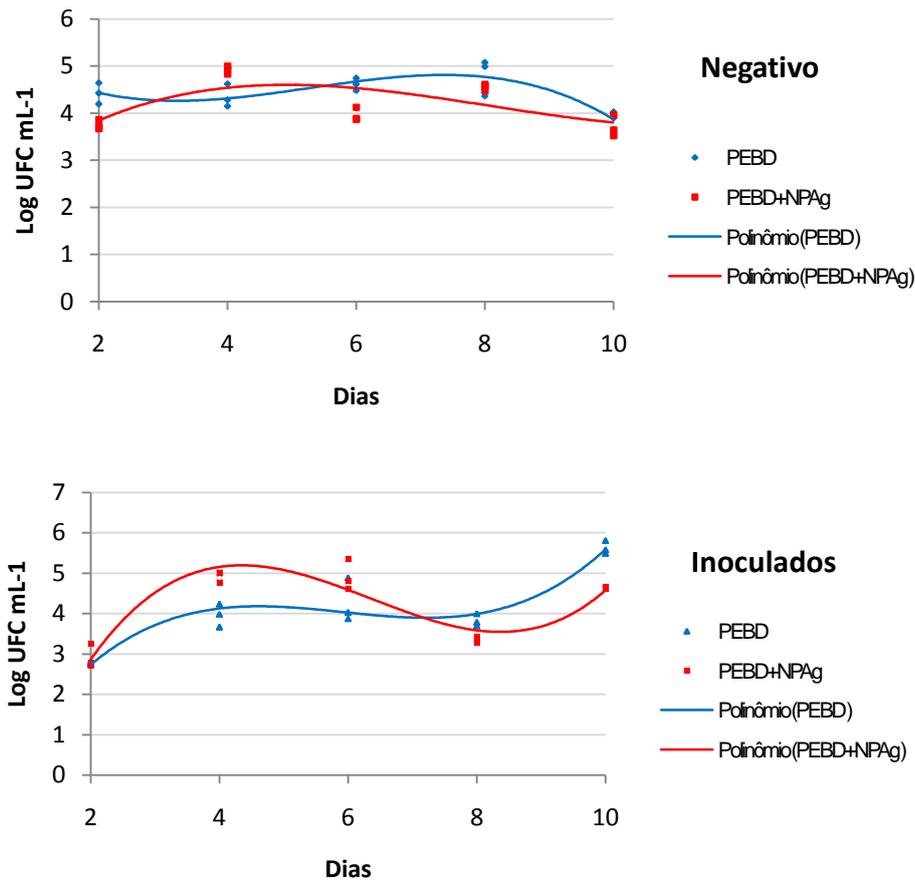


Figura 47. Enterobactérias (UFC mL-1) de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 5°C por 10 dias. Equações dos gráficos: PEBD neg ($y = -0,015x^3 + 0,244x^2 - 1,096x + 5,766$), PEBD+NPAg neg ($y = 0,007x^3 - 0,172x^2 + 1,177x + 2,124$), PEBD *E. coli* ($y = 0,032x^3 - 0,576x^2 + 3,241x - 1,703$) e PEBD+NPAg *E. coli* ($y = 0,050x^3 - 0,964x^2 + 5,519x - 4,723$).

Pode-se observar que nos dois últimos dias de armazenamento, tanto os morangos inoculados quanto os não inoculados apresentaram menor contagem de microorganismos nos filmes com NPsAg. Esse resultado pode ser um indicativo de que a ação antimicrobiana das NPsAg leva um tempo para ter sua ação maximizada na conservação dos morangos

O tempo que levou para se verificar a atividade antimicrobiana das NPsAg (morangos não inoculados – seis dias; morangos inoculados – oito dias) é compatível com o tempo que leva para que o produto final esteja ao alcance do consumidor. A lavagem dos morangos frescos normalmente é adiada até o ponto do consumo, uma vez que a delicada da superfície do morango impede que a lavagem e conseqüente remoção dos micro-organismos sejam feitas (FLESSA, LUSK E HARRIS, 2005). Desse modo, nas condições reais de comercialização os morangos, que já apresentam uma carga microbiana considerável, quando colhidos e logo embalados em filmes contendo

NPsAg, juntamente com o armazenamento em temperatura adequada, podem chegar ao consumidor com a carga microbiana reduzida quando comparada com as embalagens comumente utilizadas.

Apesar de o crescimento microbiano ter causado diferenças significativas ao longo dos dias de armazenamento ($p < 0,001$), observa-se na Fig.47 que o crescimento não passou de 3 ciclos logarítmicos ($2,77-5,64 \log \text{ UFC mL}^{-1}$). Essa observação deve-se provavelmente a estabilização do crescimento microbiano resultante da baixa temperatura de armazenamento dos morangos (5°C). No oitavo dia o tratamento PEBD+NPAg negativo apresentou redução média de $0,3 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ em relação ao controle e PEBD+NPAg inoculado com *E. coli* mostrou redução de $0,48 \log \text{ UFC mL}^{-1}$. Já no décimo dia de armazenamento, o PEBD+NPAg negativo apresentou redução de $0,1 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ e o PEBD+NPAg-*E. coli* de $1,0 \log \text{ UFC mL}^{-1}$. Fernandes, Picouet e Lloret (2010) verificaram uma eficiência notável das NPAg, contidas em sachês absorventes presentes em embalagens, contra microrganismos mesófilos e psicotróficos aeróbios na conservação de melão minimamente processada durante o tempo de armazenamento, com redução geral de $0,8 \log \text{ UFC mL}^{-1}$.

- ***Conclusão do experimento III***

Houve perda de firmeza ao longo dos dias de armazenamento como possível resposta a pressão exercida pelo vácuo aplicado nas embalagens. Houve um pequeno aumento nos valores de pH para todos os tratamentos refletindo na redução da acidez titulável. Houve também redução nos teores de sólidos solúveis para todos os tratamentos e um pequeno aumento nos valores de *ratio* para os morangos embalados com filmes PEBD+NPAg. A coloração dos morangos, de modo geral, não sofreu alterações, mantendo-se sua aparência ao longo do tempo de armazenamento.

A ação antimicrobiana dos filmes contendo NPsAg foi detectada nos últimos dias de armazenamento, indicando que a alta concentração de micro-organismos, resultante da inoculação, nos primeiros dias de armazenamento pode ter impedido que o efeito antimicrobiano fosse percebido. Conclui-se então, a utilização de filmes com NPsAg não interferiu na qualidade físico-química dos morangos porém diminuiu a contaminação microbiana dos morangos nos últimos dias de armazenamento.

5.3.4. Experimento IV: Avaliação microbiológica de morangos ‘Albion’ inoculados com *Escherichia coli* embalado em filmes contendo nanopartículas de prata e armazenados a 10°C

No Experimento IV, morangos cultivar ‘Albion’ foram sanitizados e inoculados com *Echerichia coli* a aproximadamente 10^3 UFC mL⁻¹ e posteriormente embalados com filmes PEBD e PEBD+NPAg. Utilizou-se esta concentração para analisar a ação das NPsAg em uma carga microbiana inferior a utilizada no experimento anterior. Para permitir uma situação em que pudesse ocorrer o crescimento dos micro-organismos inoculados ao longo do tempo de armazenamento, todos os tratamentos foram armazenados a 10°C, mesmo não sendo a temperatura ótima do crescimento para *E. coli* (37°C). Morangos não inoculados também foram embalados pelos filmes contendo NPsAg compondo os tratamentos negativos.

Foram realizadas análises microbiológicas periodicamente para avaliar a contagem de enterobactérias e, assim, determinar a atividade antimicrobiana das embalagens contendo NPsAg. Pode-se observar que, para os tratamentos não inoculados, os morangos embalados por filmes NPAg mostraram considerável atividade antimicrobiana em praticamente todo o período de armazenamento, com redução de até 2,28 ciclos log UFC mL⁻¹. Observa-se que no décimo dia houve inversão desse quadro com menor contagem de enterobactérias nos morangos embalados com filmes controle (PEBD), com diferença de 0,15 log UFC mL⁻¹(Fig.48).

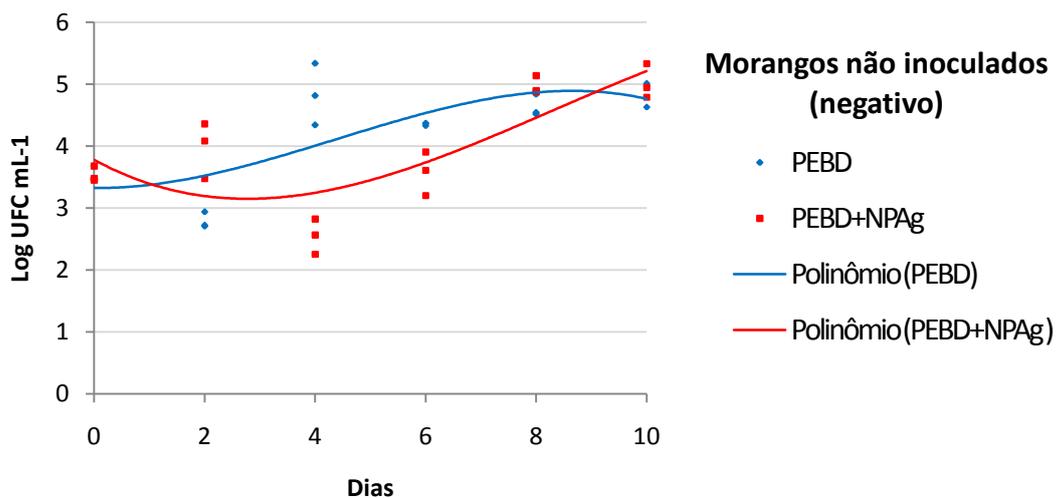


Figura 48. Enterobactérias (Log UFC mL⁻¹) de morangos ‘Albion’ armazenados em embalagens de PEBD e PEBD+NPAg a 10°C por 10 dias. Equações do gráfico: PEBD ($y = -0,005x^3 + 0,065x^2 - 0,013x + 3,327$) e PEBD+NPAg ($y = -0,004x^3 + 0,105x^2 - 0,486x + 3,781$).

Para os morangos sanitizados e posteriormente inoculados com *E. coli* a 10^3 UFC mL⁻¹ pode-se também constatar a atividade antimicrobiana da aplicação de filmes contendo NPAg na conservação pós-colheita desses frutos. Observa-se que a partir do quarto dia de armazenamento até o oitavo dia houve a redução de até 0,4 log UFC mL⁻¹ (Fig. 49).

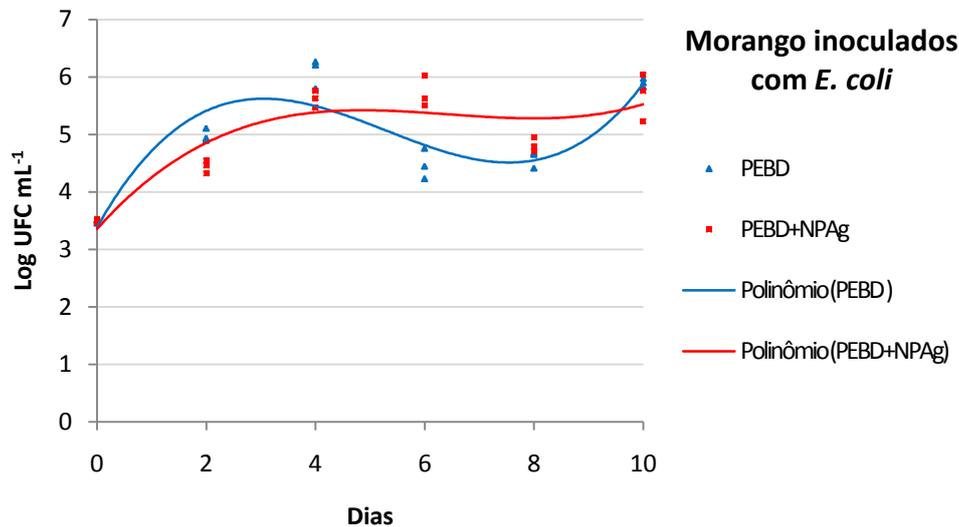


Figura 49. Enterobactérias (Log UFC mL⁻¹) de morangos ‘Albion’ inoculados *E. coli* a 10³ UFC mL⁻¹ embalados por filmes de PEBD e de PEBD+NPAg a 10°C por 10 dias. Equações do gráfico: PEBD ($y = 0,024x^3 - 0,391x^2 + 1,699x + 3,378$) e PEBD+NPAg ($y = 0,009x^3 - 0,176x^2 + 1,066x + 3,351$).

Nota-se que tanto para os morangos inoculados quanto para os não inoculados, nas condições de armazenamento utilizadas neste experimento, houve um limite na concentração microbiana para que as NPAsAg exerçam sua atividade antimicrobiana com eficiência, mesmo havendo maior contato entre a superfície dos frutos com as NPAsAg (devido emprego de embalagem a vácuo). No ensaio em que houve a inoculação dos morangos com a *E. coli* pode-se observar que ocorreu a ação antimicrobiana mais eficiente das NPAsAg, quando a concentração microbiana foi inferior a 10^5 UFC mL⁻¹ (Fig 49). Neste ensaio, a maior concentração de microorganismos presentes nos morangos, proveniente da inoculação dos morangos, e a temperatura de armazenamento empregada, provavelmente permitiram um crescimento microbiano considerável. Contudo, houve a necessidade de quatro dias de armazenamento para que o efeito antimicrobiano das NPAsAg pudesse ser mensurado pelas análises microbiológicas realizadas, reduzindo a concentração de 5,61 log UFC mL⁻¹ no quarto dia para 4,41 log UFC mL⁻¹ no oitavo dia de armazenamento. Quando a concentração de microorganismos é inferior a 10^5 UFC mL⁻¹, a atividade antimicrobiana das NPAsAg tornou-se

mais eficaz tanto para os morangos inoculados quanto para os não inoculados. É o que também se pode observar no ensaio com os morangos não inoculados (Fig. 48), no qual no décimo dia houve uma maior contagem de enterobactérias para os morangos armazenados com PEBD+NPAg uma vez que a contagem chegou a totalizar 10^5 UFC mL⁻¹.

A propriedade antimicrobiana das NPsAg incorporadas na matriz polimérica dependem da tipo de microorganismo e do contato com eles, para que possa ocorrer a liberação de íons de prata (Ag^+), da propriedade de superfície dos filmes e do tipo, tamanho e concentração das NPAg presentes na embalagem (SILE-YUKSEL et al., 2014). A limitação na ação dos filmes empregados pode ter ocorrido devido a disposição e dispersão dos carreadores de NPAg baseados em SiO₂. Outro fator que pode ter reduzido a atividade antimicrobiana dos filmes com a maior concentração de microorganismos é a formação de agregados de NPAg dispersos no filmes limitando a sua atividade ao longo de todo o filme que está em contato com os frutos.

A utilização das embalagens contendo NPAg é um coadjuvante na conservação dos morangos ao diminuir a concentração microbiana apresentada pelos morangos ao longo do período de armazenamento. A utilização de boas práticas pós-colheita, como a conservação a baixas temperaturas, pode auxiliar no processo que limita o crescimento microbiano nos morangos o que permite uma atividade antimicrobiana mais eficiente das NPAg, auxiliand no controle microbiano. Desta maneira, se pode estender a vida útil do produto além de apresentar um produto com maior segurança alimentar para o consumidor.

- ***Conclusão do Experimento IV***

Filmes poliméricos contendo NPsAg podem ser utilizados como embalagens ativas na conservação pós-colheita de morangos e de outras frutas e hortaliças. Nas condições utilizadas neste experimento, pode-se observar que a atividade antimicrobiana destas embalagens é mais eficiente quando a concentração microbiana presente na superfície dos morangos é inferior a 10^5 UFC mL⁻¹.

6. CONCLUSÃO

- A caracterização dos filmes mostrou que a adição de NPsAg nos filmes de PEBD não alterou as propriedades térmicas das embalagens. Foi detectado a presença de SiO₂ como carreador das NPs, através das imagens de MEV-FEG.
- A avaliação antimicrobiana indicou que os filmes contendo NPsAg não formaram halos de inibição, o que pode ser um indício da não migração das NPs para o meio em que está diretamente em contato. Foi verificado o efeito antimicrobiano dos filmes PEBD+NPAg contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, evidenciando a presença das NPsAg na composição dos filmes.
- A qualidade físico-química dos morangos de modo geral foi mais influenciada pelas diferentes temperaturas e tempo de armazenamento. A utilização de embalagens com NPsAg manteve a qualidade pós-colheita dos frutos estudados.
- Os filmes com NPsAg apresentaram atividade antimicrobiana quando aplicadas como embalagens para morangos, contra os diversos microorganismos analisados nas diferentes condições de armazenamento. A percepção da ação antimicrobiana das NPAg pode ter sido limitada quanto a elevada população microbiana presente na superfície dos morangos, mas este fato não indica que a atividade antimicrobiana não foi exercida em alguma extensão.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:

- Avaliar o efeito das nanopartículas de prata na permeabilidade dos filmes;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes contendo nanopartículas de prata em morangos inoculados com *S. aureus*, principal representante das bactérias Gram-positivas;
- Avaliar o efeito antimicrobiana contra *Botrytis* sp, principal micro-organismo deteriorantes de morango;
- Avaliar a aplicação dos filmes contendo nanopartículas de prata como embalagens para outros modelos (frutas e hortaliças).
- Estudar mais a fundo aspectos de migração das NPsAgs para alimentos em diferentes condições (temperatura, humidade e concentração de prata).

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHSEN, A. M. et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of schizophyllan/silver nanoparticle composite. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 0, p. 238-245, 2014.
- ADAY, M. S.; CANER, S. Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorine dioxide on strawberry storage life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 344e351, 2014.
- ADAY, M. S.; CANER, C.; RAHVALI, F. Effect of oxygen and carbon dioxide absorbers on strawberry quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 179–187, 2011.
- ALMENAR, E.; CATALA, R.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; GAVANA, R. Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 587–593, 2009.
- ASSIS, L. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 16 ed. Washington: Ed. PatríciaCunniff, v. 2, cap. 37, método 932.12, 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 16 ed. Washington: Ed. PatríciaCunniff, v. 2, cap. 37, método 942.15, 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC**. 17. ed. Arlington: AOAC International, v.1 método 991.14, 2002a.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC**. 17. ed. Arlington: AOAC International, v.1 método 997.02, 2002b.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 18. ed. Arlington: AOAC International, método 990.12, 2007.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, P. Nanostructured materials in the food industry. **Advances in food and nutrition research**, v. 58, p. 183-213, 2009. ISSN 1043-4526.
- AZEVEDO, H. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2ed. Editora técnica, Brasília, DF: Embrapa, 2012, 326p.
- BASFAR, A.; ALI, Z. Physico-chemical properties of low density polyethylene and ethylene vinyl acetate composites cross-linked by ionizing radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 257-263, 2011. ISSN 0969-806X.
- BECARO, A. A.; PUTI, F. C.; CORREA, D. S.; PARIS, E. C.; MARCONCINI, J. M. FERREIRA, M. D. Polyethylene Films Containing Silver Nanoparticles for Applications in Food Packaging: Characterization of Physico-Chemical and Anti-Microbial Properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15, n. 3, p. 2148-2156, 2015.
- BENDER, R. J. et al. Armazenagem de morangos cv. Camarosa e cv. Verão em atmosfera modificada. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 285-292, 2010. ISSN 1679-9275.
- BORTOLOZZO, A. R. SANHUEZA, R. M. V.; MELO, G. W. B.; KOVALESKI, A.; BERNARDI, J.; HOFFMANN, A.; BOTTON, M.; FREIRE, J. M.; BRAGHINI, L. C.; VARGAS, L.; CALEGARIO, F. F.; FERIA, N. J.; PINENT, S. M. J. Produção de morangos no sistema semi-hidropônico. **Circular Técnico Embrapa Uva e Vinho**, v. 62, 2007.

- BRACKMANN, A.; HUNSCHE, M.; BALEM, T. A. Efeito de filmes de PVC esticável e polietileno no acúmulo de CO₂ e na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos cv. Tangi. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 2, 2012. ISSN 2317-2436.
- BRADLEY, E. L.; CASTLE, L.; CHAUDHRY, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. **Trends in food science & technology**, v. 22, n. 11, p. 604-610, 2011. ISSN 0924-2244.
- BRAGA, D. O. **Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com óleos essenciais na pré-colheita**. 2012, 74 p.. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2012
- BRAGA, L. R.; PERES, L. Novas tendências em embalagens para alimentos: revisão. Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment, p. 69-84, 2010.
- BRAHMI, D. et al. Preparation of amorphous silica gel from Algerian siliceous by-product of kaolin and its physico chemical properties. **Ceramics International**, v. 40, n. 7, p. 10499-10503, 2014. ISSN 0272-8842.
- BURDON, J.; LALLU, N.; FRNACIS, K.; BOLDINGH, H. The susceptibility of kiwifruit to low temperature breakdown is associated with pre-harvest temperatures and at-harvest soluble solids content. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 283–290, 2007.
- CAMARGO FILHO, W.; CAMARGO, F. Análise da produção de morango dos Estados de São Paulo e Minas Gerais e do mercado da Ceagesp. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 5, p. 42-50, 2009.
- CANEVAROLO, S. V. Ciências dos polímeros: um texto básico para tecnólogo e engenheiros. Editora Artliber - São Paulo, 2 ed., 2002.
- CANER, C.; ADAY, M. S.; DEMIR, M. Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified atmosphere packaging. **European food research and technology**, v. 227, n. 6, p. 1575-1583, 2008. ISSN 1438-2377.
- CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 595-603, 2011. ISSN 0924-2244.
- CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food additives and contaminants**, v. 25, n. 3, p. 241-258, 2008. ISSN 1944-0049.
- CHERNOUSOVA, S.; EPPLÉ, M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 6, p. 1636-1653, 2013. ISSN 1521-3773.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- COSTA, C.; CONTEA, A.; BUONOCOREC, G. G.; DEL NOBILEA, M. A.; Antimicrobial silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life of fresh fruit salad. **International Journal Food Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 164-167, 2011.
- COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTA MARI, L. C. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003
- CRESCENTE-CAMPO, J.; NUNES-DAMACENO, M.; ROMERO-RODRIGUES, M. A.; VAZQUEZ-ODERIZA, M. L. Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria ananassa* Duch, cv Selva). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, p. 23–30, 2012.
- CUSHEN, M. et al. Nanotechnologies in the food industry—Recent developments, risks and regulation. **Trends in food science & technology**, v. 24, n. 1, p. 30-46, 2012. ISSN 0924-2244.

- DALLAS, P.; SHARMA, V. K.; ZBORIL, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 1, p. 119-135, 2011. ISSN 0001-8686.
- DENG, C. et al. Effect of two types of iron MMTs on the flame retardation of LDPE composite. **Polymer Degradation and Stability**, v. 103, p. 1-10, 2014. ISSN 0141-3910.
- DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668-2670, 2002. ISSN 0066-4804.
- DOIRON, K.; PELLETIER, E.; LEMARCHAND, K. Impact of polymer-coated silver nanoparticles on marine microbial communities: A microcosm study. **Aquatic Toxicology**, v. 124-125, p. 22-27, 2012.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of colloid and interface science**, v. 363, n. 1, p. 1-24, 2011. ISSN 0021-9797.
- DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010. ISSN 0103-5053.
- EGGER, S. et al. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2973-2976, 2009. ISSN 0099-2240.
- EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, p. 408-413, 2011.
- ESPINOSA, M. et al. Nanoparticles of Pt and Ag supported in meso porous SiO₂: characterization and catalytic applications. **XIV Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN**, 2004.
- FAOSTAT. **Top productions strawberry 2012**. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 21 ago 2014.
- FAYAZ, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 103-109, 2010. ISSN 1549-9634.
- FERNANDES, A.; PICOUET, P.; LLORET, E. Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 222-228, 2010.
- FENG, Q. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of biomedical materials research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000. ISSN 0021-9304.
- FERREIRA, M. D. et al. Strawberry Bruising Sensitivity Depends on the Type of Force Applied, Cooling Method, and Pulp Temperature. **HortScience**, v. 44, n. 7, p. 1953-1956, 2009. ISSN 0018-5345.
- FLESSA, S.; LUSK, D.; HARRIS, L. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 255-262, 2005.
- FLOR-CANTILLANO, R. F.; BENDER, R. J.; LUCHSINGER, L. Fisiologia e manejo pós-colheita de morango. In: FLOR-CANTILLANO, F. (Ed.). **Morango. Pós-Colheita**. Brasília, DF: Embrapa Clima Temperado, 2003. p.28p.
- GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 8, p. 1362-1395, 2010. ISSN 1521-3773.

- GOL, N. B.; PATEL, P. R.; RAO, T. V. R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 185–195, 2013.
- GOULAS, V.; MANGANARIS, G. A. The effect of postharvest ripening on strawberry bioactive composition and antioxidant potential. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, p. 1907–1914, 2011.
- GUNDUZ, K.; OZDEMIR, E. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. **Food Chemistry**, v. 155, p. 298–303, 2014.
- GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37-45, 2012. ISSN 1549-9634.
- IBGE. Censo Agropecuário 2006. Tabela 819 - Produção, Venda e Valor da produção na horticultura por produtos da horticultura, destino da produção, uso de irrigação, uso de agrotóxicos e uso de adubação. 2014. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=819&z=t&o=1&i=P> >.
- JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD. **JIS Z 2801: Antimicrobial products – test for antimicrobial activity and efficacy**. Tokio, 2000. 11p.
- JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; REDONDO-NEVADO, J.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J. L.; LÓPEZ-ARANDA, J. M.; VALPUESTA, V.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. **Plant Physiology**, v. 128, n. 2, p. 751-9, 2002.
- JOUKI, M.; KHAZAEI, N. Effect of low-dose gamma radiation and active equilibrium modified atmosphere packaging on shelf life extension of fresh strawberry fruits. **Food and shelf life I**, p. 49-55, 2014.
- KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops**. UCANR Publications, 2002.
- KAFKAS, E. et al. Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1229–1236, 2007.
- KANMANI, P.; RHIM, J.-W. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. **Food chemistry**, v. 148, p. 162-169, 2014. ISSN 0308-8146.
- KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95-101, 2007. ISSN 1549-9634.
- KIM, S.-H. et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2011.
- LACERDA JÚNIOR, O. D. S. L. et al. Síntese do material mesoporoso mcm-41 usando esponja de água-doce como fonte de sílica. **Quim. Nova**, v. 36, n. 9, p. 1348-1353, 2013.
- LI, H. et al. Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *inermis* (Bunge) Rehd). **Food chemistry**, v. 114, n. 2, p. 547-552, 2009. ISSN 0308-8146.
- LIMA FILHO, T.; LUCIA, S. M. D.; SCOLFORO, C. Z.; LIMA, R. M.; CARNEIRO, J. C. S.; PINHEIRO, C. J. G.; JUNIOR, J. L. P.; MINIM, V. P. R. Consumer rejection threshold for strawberry radiation doses. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 23, p. 194–198, 2014.
- LITTELL, R. C.; HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **J. Anim. Sci., Savoy**, v.76, p.1216-31, 1998.
- LIU, F. et al. Nano-TiO₂@Ag/PVC film with enhanced antibacterial activities and photocatalytic properties. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 10, p. 4667-4671, 2012.
- LLORENS, A. et al. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 1, p. 19-29, 2012. ISSN 0924-2244.

- LONGANO, D. et al. Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 4, p. 1179-1186, 2012. ISSN 1618-2642.
- MA, Y. et al. Large-pore mesoporous silica spheres: synthesis and application in HPLC. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 229, n. 1, p. 1-8, 2003. ISSN 0927-7757.
- MALGARIM, M. B.; CANTILLANO, R. F. F.; COUTINHO, E. F. Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 185-189, 2006.
- MENEL, K.; FATEN, K.; MOKTAR, H. Combining biocontrol agent and high oxygen atmosphere, to reduce postharvest decay of strawberries. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n.24, p. 5179-5187, 2012.
- MIRANDA, V. R.; CARVALHO, A. J. Compatible blends of thermoplastic starch and low density polyethylene compatibilized with citric acid. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 353-360, 2011. ISSN 0104-1428.
- MOEZ, A. A.; ALY, S.; ELSHAER, Y. Effect of gamma radiation on low density polyethylene (LDPE) films: Optical, dielectric and FTIR studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 93, p. 203-207, 2012. ISSN 1386-1425.
- MORAES, I. et al. Características físicas e químicas de morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 274-281, 2008.
- MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005. ISSN 0957-4484.
- MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C.; ZUCOLOTTI, V. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 520-524, 2012.
- MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; ALSOHIM, A. S.; ABDALLAH, R. R. Botryticidal Activity of Nanosized Silver-Chitosan Composite and Its Application for the Control of Gray Mold in Strawberry. **Journal of Food and Science**, v. 78, n. 10, 2013.
- MUNARO, M. **Desenvolvimento de blendas de polietileno com sesempeho aperfeiçoado para utilização no setor elétrico**. 2007. Tese (Doutorado) Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR. 66 p.
- NEVES, J. M. M. G. C. **Efeito de uma pectina metilesterase na firmeza de pedaços de morango**. Universidade de Aveiro, Mestre em Biotecnologia. 2012.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A8. Pennsylvania USA. ISBN 1-56238-485-6 2003.
- NIELSENA, T.; LEUFVE, A. The effect of modified atmosphere packaging on the quality of Honeoye and Korona strawberries. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1053-1063, 2008.
- NUNES M.C.N, BRECHT J.K., MORAIS A. M.M.B., SARGENT S.A. Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (cv. Oso grande) during storage at 1°C. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 79-84, 2005.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Changes in bioactive composition of fresh-cut strawberries stored under superatmospheric oxygen, low-oxygen or passive atmospheres. **Journal of food composition and analysis**, v. 23, n. 1, p. 37-43, 2010. ISSN 0889-1575.
- PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais ea questão ambiental. **Quím. nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

- PATRAS, A. et al. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 3, p. 308-313, 2009. ISSN 1466-8564.
- PEREIRA, M.C. et al. Efeitos do uso de mangas de compressão gradual no desempenho muscular de homens treinados. **Motricidade**, v. 9, n.4, pp. 33-39, 2013.
- PERETTO, G.; DUB, W; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SARREALB, S. B. L.; HUAB, S. S. T.; SAMBOA, P.; MCHUGHB, T. H. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. **Postharvest Biology and Technology**, v. 89, p. 11–18, 2014.
- PEREZ-CABRERA, L.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. Effectiveness of antibrowning agents applied by vacuum impregnation on minimally processed pear. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2273-2280, 2011.
- PIMO, P. A. **Normas de Classificação de Morango**. São Paulo- CEAGESP. 2009
- PISTO, V.; CHIESA, A.; ZATTERA, A. J. Estudo do Reprocessamento de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) Reciclado do Processamento de Extrusão de Filmes Tubulares. **Polímeros**, v. 20, n. 4, p. 269-274, 2010
- POTARA, M. et al. Synergistic antibacterial activity of chitosan–silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. **Nanotechnology**, v. 22, n. 13, p. 135101, 2011. ISSN 0957-4484.
- RAFFI, M. et al. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 192-196, 2008. ISSN 1005-0302.
- REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society; **Meat Science**, v. 98, p. 404-419, 2014.
- RONQUE, E. R. V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba: EMATER-PR, 1998. p. 183-202.
- SAHOO, S.; PARVEEN, S.; PANDA, J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007. ISSN 1549-9634.
- SANCHEZ, A. M. T.; DE LA HABAA, M. J.; BENÍTEZ-LÓPEZA, M.; FERNÁNDEZ-NOVALESA, J.; GARRIFO-VALOB, A.; PÉREZ-MARÍN, B. Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 102–108, 2012.
- SANTOS, A. M. **A cultura do morango**. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1993. 35 p.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; MORAES, B. B. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças. **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2009.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; REGO, R. A. (Ed) **Brasil Pack trends 2020**. 1 ed. Campinas: ITAL, 227 p., 2012.
- SHARMA, A. **Understanding color management**. Ed. Cengage Learning. 2004.
- SILE-YUKSEL, M.; TAS, B.; KOSEGLU-IMER, D. Y.; KOYUNCU, I. Effect of silver nanoparticle (AgNP) location in nanocomposite membrane matrix fabricated with different polymer type on antibacterial mechanism. **Desalination**, v. 347, p. 120–130, 2014.
- SILVA, T. E. M. D.; PREMEBIDA, A.; CALAZANS, D. Nanotecnologia aplicada aos alimentos e biocombustíveis: interações sociotécnicas e impactos sociais| Risk analysis and regulatory frameworks for nanotechnology applied to food and biofuels, new socio-technical interactions and impacts on social life. **Liinc em Revista**, v. 8, n. 1, 2012. ISSN 1808-3536.

- SIMON, P.; CHAUDHRY, Q.; BAKOS, D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food – a physicochemical view. **J. Food Nutr. Res.**, v. 47, p. 105–113, 2008.
- SINGH, M. et al. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 3, n. 3, p. 115-122, 2008.
- SHIN, Y. et al. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 349–357, 2007.
- SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of colloid and interface science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004. ISSN 0021-9797.
- SOUSA-GALLAGHER, M. L.; MAHAJAN, P. V.; MEZDAD, T. Engineering packaging design accounting for transpiration rate: Model development and validation with strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 370–376, 2013.
- TRAVAN, A. et al. Silver–polysaccharide nanocomposite antimicrobial coatings for methacrylic thermosets. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 337-346, 2011. ISSN 1742-7061.
- VAN BUGGENHOUT, S. et al. Pectins in processed fruits and vegetables: Part III—Texture engineering. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 105-117, 2009. ISSN 1541-4337.
- VAN DER STEEN, C. et al. Combining high oxygen atmospheres with low oxygen modified atmosphere packaging to improve the keeping quality of strawberries and raspberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 49-58, 2002. ISSN 0925-5214.
- VICENTE, A. R.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; CIVELLO, P. M. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, p. 116–122, 2006.
- WANG, H. et al. Immobilization of glucose oxidase using $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanoparticles as carrier. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 13, p. 5739-5745, 2011. ISSN 0169-4332.
- WEI, Y.; MAO, S.; TU, K. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry. **Biological Control**, v. 73, p. 68–74, 2014.
- YANG, W. et al. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. **Nanotechnology**, v. 20, n. 8, p. 085102, 2009. ISSN 0957-4484.
- YANG, F. M.; LI, H. M.; XIN, Z. H.; ZHAO, L. Y.; ZHENG, Y. H.; HU, Q. H. Effect of Nano-Packing on Preservation Quality of Fresh Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch. cv Fengxiang) during Storage at 4°C. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, 2010.
- ZANDI, K.; WEISANY, W.; AHMADI, H.; BAZARGAN, I.; NASERI, L. Effect of Nanocomposite-Based Packaging on Postharvest Quality of Strawberry during Storage. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences BEPLS**, v. 2, n. 5, 2013.
- ZEFERINO, R. M. **Avaliação da modificação de PEAD com vinil-trimetóxi-silano (VTMS) por extrusão reativa**. 2013. Dissertação (Mestrado) Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 58 pp.
- ZHENG, Y.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y.; ZHENG, W.; Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. **LWT**, v. 40, p. 49-57, 2007.
- ZHOU, L. et al. Effect of PE/AG2O nano packaging on the quality of apple slices. **Journal of Food Quality**, v. 34, n. 3, p. 171-176, 2011. ISSN 1745-4557.

Aplicação de filmes com nanopartículas de prata na conservação de morangos

ZHU, Z.; LIU, R.; LI, B.; TIAN, S. Characterization of genes encoding key enzymes involved in sugar metabolism of apple fruit in controlled atmosphere storage. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3323–3328, 2013.

Apendice I

Composição dos meios de culturas e soluções:

Ágar Nutriente:

Extrato de carne	1,25	G
Peptona	2,5	G
NaCl	1,25	G
Água destilada	250	mL

Solução Tampão Fosfato(pH 6,8-7,2)

KH ₂ PO ₄	1,7	g
Água destilada	50	mL

Solução Salina Tamponada com Fosfato

Solução Tampão Fosfato	1	mL
NaCl	6,8	mL
Água destilada	800	mL

Meio de Suspensão - 1/500 Caldo Nutriente (1: 500 NB) pH 6,8-7,2

Extrato de carne	0,75	g
Peptona	2,5	g
NaCl	1,25	g
Água destilada	250	mL

Caldo SCDLP (pH 6,8-7,2)

Triptona	8,5	g
Peptona de soja	1,5	g
NaCl	2,5	g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,25	g
C ₆ H ₁₂ O ₆	1,25	g
Água destilada	250	mL

PCA (pH 7,0-7,2)

Extrato de levedura	1,25	g
Triptona	2,5	g
C ₆ H ₁₂ O ₆	0,5	g

Aplicação de filmes com nanopartículas de prata na conservação de morangos

Agar	7,5	g
Água destilada	250	mL

Composição do Caldo Triptona de Soja (TSB) (Himedia®)

Caseína enzimática hidrolisada.....	17,0	g/L
Digestão papaica da soja.....	3,0	g/L
Dextrose	2,5	g/L
Cloreto de sódio.....	5,0	g/L
Fosfato Dipotássio.....	2,5	g/L

Composição do Potato Dextrose Agar (PDA) (Himedia®)

Batata.....	200	g/L
Dextrose	20	g/L
Agar	25	g/L

Composição do Agar MacConkey (Himedia®)

Digestão Péptica de Tecido Animal.....	1,5	g/L
Caseína Enzimática Hidrolisada.....	1,5	g/L
Digestão Pancreática de Gelatina.....	17,0	g/L
Lactose.....	10,0	g/L
Sais biliares.....	1,5	g/L
Cloreto de sódio.....	5,0	g/L
Violeta Cristal.....	0,001	g/L
Vermelho neutro.....	0,03	g/L
Agar.....	15,0	g/L