

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Atividade antimicrobiana em filmes poliméricos
com diferentes concentrações de
nanopartículas de prata**

Sabrina da Costa Brito

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Alimentos e Nutrição
para obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências dos
Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^o. Marcos David
Ferreira.

Co orientadora: Prof^a. Dr^a Kátia Sivieri.

Araraquara

2018

Atividade antimicrobiana em filmes poliméricos com diferentes concentrações de nanopartículas de prata

Sabrina da Costa Brito

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Alimentos e Nutrição
para obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências dos
Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^o. Marcos David
Ferreira.

Co orientadora: Prof^a. Dr^a Kátia Sivieri.

Araraquara

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B862a

Brito, Sabrina da Costa

Atividade antimicrobiana em filmes poliméricos com diferentes concentrações de nanopartículas de prata / Sabrina da Costa Brito. -- Araraquara, 2018.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Marcos David Ferreira.

Coorientadora: Kátia Sivieri.

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas de prata. 3. Antimicrobianas. 4. Embalagens ativas. I. Ferreira, Marcos David, orient. II. Sivieri, Kátia, coorient. III. Título.

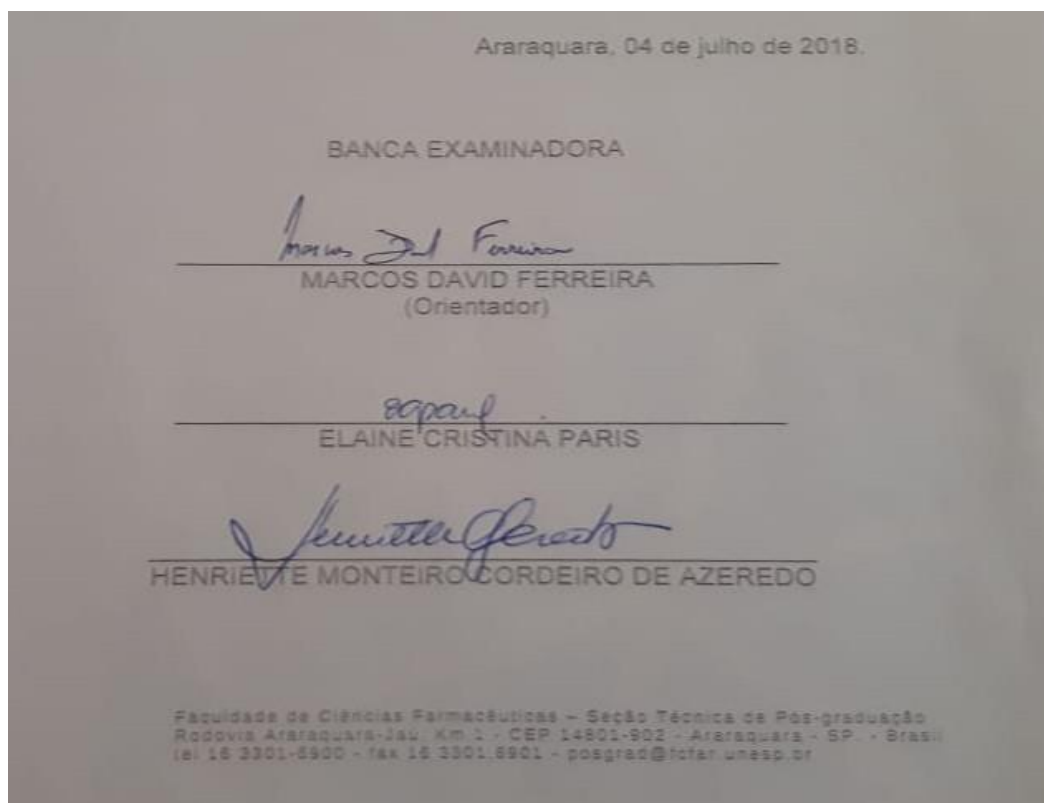
CAPES: 50700006

Sabrina da Costa Brito

**Atividade antimicrobiana em filmes poliméricos
com diferentes concentrações de
nanopartículas de prata**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara como requisito
para a obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição.

Banca examinadora



Dedico este trabalho aos meus pais.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Marcos David Ferreira pela orientação, dedicação e confiança ao longo de todo o mestrado.

À Dra. Kátia Sivieri pela coorientação, apoio e ensinamentos.

Aos analistas, bolsistas e estagiários da Embrapa Instrumentação pelo apoio e companheirismo durante esses anos. Em especial: Joana, Silviane, Viviane, Karla, Edneide, Nayara, Nanda e Marcela.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP.

À Embrapa Instrumentação pela infraestrutura.

À empresa Nanox pelos filmes fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida.

Resumo

Objetivo: Este estudo visou verificar a eficácia antimicrobiana de filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) aditivados com nanopartículas de prata (NPsAg) dispersas no carregador de sílica (SiO₂), em diferentes concentrações de partes por milhão (ppm) por filme polimérico.

Metodologia: Na pesquisa foram estudadas seis concentrações diferentes de NPsAg (ppm) (1,50; 3,75; 7,50; 15,00; 30,00; 60,00 e 75,00) nos filmes nanoestruturados, sendo estes caracterizados por: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Termogravimetria (TGA), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e por Difração de Raio X (DRX). A ação antimicrobiana foi pesquisada contra os seguintes microrganismos, Gram Positivos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*; Gram Negativos: *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e o fungo *Penicillium expansum*; por meio das metodologias de atividade antimicrobiana por contato, teste por agitação de frascos e Imagens Bacterianas por Microscopia Eletrônica de Varredura. **Resultados:** A adição de NPsAg na matriz do PEBD não interferiu nas propriedades físico-químicas e térmicas dos filmes. Pelas análises microbiológicas foi observado, pela atividade antimicrobiana por contato, que os filmes nanoestruturados foram eficazes na inibição de todos os microrganismos estudados, sendo que apresentaram uma maior ação antimicrobiana sobre as bactérias Gram negativas e fungos do que as bactérias Gram positivas. Pelo teste de agitação em frascos foi verificado que os filmes nanoestruturados auxiliaram na redução da taxa de crescimento e na concentração máxima na fase estacionária com aumento da duração da fase lag, verificando-se que quanto maior a adição de NPsAg nos filmes, mais eficaz a inibição ($p \leq 0,05$). Na Microscopia Eletrônica de Varredura foi observado que as bactérias em contato com NPsAg apresentaram alteração na estrutura da parede microbiana. **Conclusão:** Os filmes nanoestruturados apresentaram ação antimicrobiana promissora com os microrganismos estudados, portanto, filmes com nanopartículas de prata possuem potencial de uso em embalagens alimentícias, auxiliando na redução de casos de doenças transmitidas por alimentos além de contribuir na redução do desperdício de alimentos.

Palavras – Chave: nanotecnologia; nanopartículas de prata; antimicrobianas; embalagens ativas.

Abstract

Objective: this study aims to verify the effectiveness of antimicrobial low density polyethylene films (LDPE), with dispersed silver nanoparticles (AgNPs) added in a silicon carrier, in different concentrations of parts per million (ppm) for each polymeric film. **Methodology:** In this research, six different concentrations of AgNPs (ppm) were studied (1,50; 3,75; 7,50; 15,00; 30,00; 60,00 e 75,00) in nanostructured films, which were characterized by: Field-Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEG - SEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TGA), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and X-Ray Diffraction (XRD). The antimicrobial action was tested against different microorganisms, Gram-positives: *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, and Gram-negatives: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and the fungus *Penicillium expansum*. Methodologies employed were antimicrobial activities by contact, shake flasks tests and bacterial images by electronic scanning microscopy (ESM). **Results:** the addition of AgNPs in the matrix of LDPE did not interfere in the physicochemical and the thermal properties of the films. The analysis of antimicrobial activities by contact showed that the nanostructured films were effective in the inhibition of all the studied microorganisms, with greater action on Gram-negative bacteria and fungi than on Gram-positive bacteria. By the shake flasks test it was verified that the nanostructured films help to reduce growth rate and maximum concentration, with increasing in lag stage duration and observing that the bigger the addition of AgNPs, more effective the inhibiting action ($p \leq 0,05$). In electronic scanning microscopy (ESM) it was observed that bacteria in contact with AgNPs presented change in microbial wall structure. **Conclusion:** the nanostructured films presented a promising antimicrobial action with the studied microorganisms. Hence, silver nanoparticles films have a potential use in food packing, helping to reduce cases of food-borne diseases and contributing to reductions in food waste.

Keywords: nanotechnology; silver nanoparticles; antimicrobial; active packs.

Lista De Tabelas

Capítulo 1	Página
Tabela 1. Distribuição dos valores de aditivos SiO ₂ e Ag em porcentagem por Masterbatch (%) para cada concentração de NPsAg (ppm).	23
Tabela 2. Distribuição dos dados de temperatura de início extrapolado de degradação (Tonset) temperatura de 50% de degradação (T50%) e porcentagem residual a 700°C (R(%)) dos corpos de prova controle e nanoestruturados.	37
Tabela 3 Distribuição dos dados de temperatura de fusão (T _m) e de entalpia de fusão (ΔH) dos corpos de prova controle e nanoestruturados (ppm).	39
Tabela 4. Distribuição dos valores relativos à média e $\pm$ desvio padrão de contagens (UFC/ml) de <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.typhimurium</i> e <i>P.expansum</i> em relação ao controle negativo e aos corpos de prova nanoestruturados (ppm).	40
Tabela 5. Distribuição dos valores relativos à média e $\pm$ desvio padrão de taxa de crescimento, concentração máxima na fase estacionária e duração na fase lag (representado em horas) de <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i> em relação ao controle negativo e corpos de prova nanoestruturados (ppm).	42
Tabela 6. Distribuição dos valores relativos à média e $\pm$ desvio padrão de taxa de crescimento, concentração máxima na fase estacionária e duração na fase lag (representado em horas) de <i>E.coli</i> e <i>S.typhimurium</i> em relação ao controle negativo e corpos de prova nanoestruturados (ppm).	43

Lista De Figuras

Capítulo 1	Página
Figura 1. Imagem de superfície (A) e fraturada (B), obtida através do FEG retroespalhado, dos corpos de prova nanoestruturados.	31
Fig. 2. Imagem de superfície, obtida através do FEG retroespalhado, dos aditivos Ag+ SiO ₂ .	32
Figura3. Transmitância em relação ao comprimento de onda/cm-1 dos corpos de prova controle e nanoestruturados.	33
Figura 4. Intensidade em unidade arbitrária (u.a.) em relação ao ângulo de difração 2θ/° dos corpos de prova controle e nanoestruturados.	34
Fig. 5. Análise termogravimétrica (TGA) e curvas de DTG nos corpos de prova controle e nanoestruturados em atmosfera de ar sintético de 10 a 800 °C.	36
Figura 6. <i>S.aureus</i> tratada com filme PEBD controle (A) e com filme PEBD nanoestruturado 75,00 ppm (B).	45
Figura 7. <i>E.coli</i> tratada com filme PEBD controle (A) e com filme PEBD nanoestruturado 75,00 ppm (B).	45

Sumário	Página
Introdução	9
Capítulo 1. Eficiência Antimicrobiana de Filmes de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) contendo Nanopartículas de Prata (NPsAg) para Aplicação em Embalagens Alimentícias	18
Considerações Finais	55
Referência	56

Introdução

Baseando-se no relatório da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1), estima-se que anualmente cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são desperdiçados no mundo, proporcionando prejuízos significativos à sociedade através de perdas econômicas, redução de oferta e aumento dos preços. Além disso, é estimado que as consequências diretas do desperdício de alimentos na economia são de aproximadamente de 750 bilhões de dólares por ano (2).

Entre 1997 e 2000, a perda média dos principais frutos frescos comercializados no Brasil foi de 30%, a qual em valores brutos é de um total de 5,3 milhões de toneladas/ano. Em relação às principais hortaliças frescas as perdas foram de 35%, ou seja, 5,6 milhões de toneladas/ano (3).

Peixoto e Pinto (2) relataram que, no Brasil, as causas do desperdício de alimentos estão associadas às limitações financeiras, deficiências de gestão e de técnicas na colheita dos produtos, nas dificuldades de armazenamento, refrigeração inadequada para as condições climáticas árduas, embalagens ineficientes e nas ineficazes estruturas de comercialização. Além disso, em relação aos pontos da cadeia de produção, o desperdício pode ser ocasionado durante a manipulação, processamento e no decurso da distribuição dos produtos alimentícios (1).

Os microrganismos também são considerados uma das causas que proporciona o desperdício de alimentos, pois além de reduzir a periodicidade destes auxiliam na viabilização de transmissão de doenças, sendo esta uma das grandes preocupações da indústria alimentícia (4). Em um levantamento

realizado pelo CDC (Centers for disease and prevention) (5) em 2014 nos Estado Unidos, foram reportados 864 casos de surtos por doenças (intoxicação e infecções) por alimentos, resultando em 13.246 casos de doença, 712 hospitalizações, 21 mortes e 21 “recalls” de produtos alimentícios.

Dentre as consequências das interações entre microrganismos com alimentos estão às alterações químicas prejudiciais, as quais resultam na deterioração do alimento, ou seja, promovem mudanças na qualidade e nos atributos nutricionais e sensoriais, tais como o sabor e odor desagradáveis. Estas mudanças são resultantes da atividade metabólica dos microrganismos, os quais fazem uso dos alimentos como fonte de energia; porém esta situação além de reduzir a qualidade dos alimentos, pode apresentar um risco ao consumidor, através de doenças transmitidas por alimentos (4,5).

O contato dos microrganismos, deteriorantes e/ou patogênicos, com os alimentos pode ser proporcionado por várias vias, as quais geralmente são ocasionadas por más condições de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição ou manuseio doméstico (4,6).

Microrganismos ou produtos resultantes do seu metabolismo, como toxinas e aminas biogênicas, podem ser veiculados por meio dos alimentos ao consumidor, causando as conhecidas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) ou Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's) (5,7).

As DTA's se manifestam com o desenvolvimento de distúrbios gastrointestinais agudos como diarreia, vômito ou ambos, acompanhados de

dor abdominal e desconforto (7,8,9,10), como pode ser observado nas manifestações clínicas das bactérias Gram positivas *Staphylococcus coagulase positiva*, que podem causar um variado espectro de infecções, desde as superficiais da pele até as mais severas e, potencialmente, fatais (11,8) e a *Enterococcus faecalis*, que promove infecções do trato urinário e intra abdominais (12). Em relação às Gram negativas temos a *Escherichia coli*, a qual algumas cepas são produtoras de Shiga toxina (STEC) (13) que propiciam os sintomas clínicos de diarreia com cólicas abdominais a diarreias com sangue (10), e a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium que causa síndromes clínicas como a febre tifoide e colite/diarreia (9).

Quanto aos fungos, menciona-se o *Penicillium expansum*, que por meio da doença pós colheita, denominada como o bolor azul, produzirá quantidades significativas de patulina, que além de ocasionar perdas consideráveis nos frutos pode proporcionar sérios problemas de saúde, já que a micotoxina patulina é conhecida pelos seus potentes efeitos citotóxicos, genotóxicos e imunotóxicos (14)

Vale ressaltar que os microrganismos são classificados e identificados de acordo com os principais grupos, sendo alguns deles as bactérias e os fungos. As bactérias podem ser classificadas de acordo com sua estrutura celular, ou seja, como Gram positivas ou Gram negativas (15), que podem ser diferenciadas por meio da consistência da camada de peptidoglicana, onde nas Gram positivas apresentam mais camadas deste componente formando uma estrutura espessa e rígida, enquanto as Gram negativas consistem em uma ou poucas camadas e uma membrana externa

caracterizadas por sua vez tornando-as mais susceptíveis ao rompimento mecânico (15-18).

Em relação aos fungos, estes são denominados eucariotos, ou seja, possuem um núcleo definido que contém material genético (DNA), envolto por envelope denominado como membrana nuclear. A forma pluricelular e unicelular dos fungos e leveduras respectivamente são de microrganismos ovais e de tamanho maior que as bactérias; já os fungos mais típicos, denominados como bolores, são caracterizados pela formação de massas visíveis, micélios, compostas por longos filamentos, hifas, que se ramificam e se entrelaçam (15).

Espitia e Batista (4) relatam que a perda de alimentos por contaminação microbiológica pode ocorrer durante a fase pós-colheita ou no decorrer do processamento, resultando em alterações da qualidade dos alimentos, incluindo características nutricionais e sensoriais (oxidação, sabor e odor desagradável e alterações indesejáveis na textura e cor).

As inovações tecnológicas em embalagens eficientes com o propósito de prevenir contaminações físicas, químicas e biológicas, esta última proporcionada por microrganismos, é uma das opções para reduzir o desperdício de alimentos (2,19).

Segundo Marsh e Bugusu (20) o uso de embalagens é indispensável para a conservação de alimentos, pois tem como propósito retardar a sua deterioração, estendendo a sua vida de prateleira e mantendo a qualidade e a segurança. A utilização de embalagens visa proteger os alimentos contra qualquer tipo de perecimento desde o acondicionamento até o consumo

final, visando à manutenção das características por um período prolongado, após o seu processamento (21,22). Os atributos que as embalagens devem apresentar são a compatibilidade com o produto alimentício, ser atóxico; oferecer proteção sanitária; proteger contra a passagem de umidade, gases, luz, gorduras e aromas, proteger de impactos físicos; ter boa aparência; ser de fácil eliminação; ter viabilidade econômica (21-24).

Dentre os materiais utilizados para embalagens, o plástico apresenta várias vantagens que proporcionam função de proteção e leveza, ideal para embalagens, como boa resistência mecânica, baixa densidade, baixa permeabilidade à água e baixa reatividade química (21-24). Os termoplásticos, dentre os diferentes tipos de materiais poliméricos, são caracterizados pela sua diversidade de resinas, das quais muitas embalagens de alimentos são fabricadas (25,26), e pela sua presença em vários setores econômicos que vão desde os interligados a embalagens como o de papel e celulose até os setores de alimentos e bebidas (26,27). Segundo a Abiplast (26), dentre as principais resinas termoplásticas utilizadas no Brasil, o polietileno de baixa densidade (PEBD) apresenta um consumo de 10,6%, sendo utilizados principalmente em produtos coextrudados, laminados, películas retráteis, filmes para a indústria de construção e para fins agrícolas, sacos de compras, sacos de lixo e filmes domésticos (21, 24, 28). Além disso, são utilizados para produtos alimentícios comercializados na forma de filmes laminados e plastificados para alimentos líquidos e sólidos (29).

A aplicação e a pesquisa na área de nanotecnologia estão intimamente relacionadas com as embalagens destinadas à indústria de alimentos, sendo as embalagens ativas contendo nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas, um dos campos mais estudados (30). A inclusão da nanotecnologia em embalagens para alimentos pode fornecer soluções onde até então eram considerados um obstáculo, como o curto tempo de prateleira (31,32).

Os nanomateriais apresentam propriedades diferenciadas em relação aos materiais convencionais de micro e macro escalas, e isso se deve a elevada razão área superficial/volume, que fornece a estes insumos alta reatividade química e propriedades elétricas e ópticas, as quais proporcionam a investigação de novos atributos físicos, biológicos e químicos de sistemas nanométricos. Esta melhora de características é relevante para aumento das atividades antimicrobianas das nanopartículas metálicas (33-40).

As nanopartículas de prata (NPsAg) destacam-se entre aquelas de origem metálica, sendo a mais utilizada como agente antimicrobiano quando aplicada em produtos plásticos, têxteis e em revestimentos (41,42), por exemplo, quando incorporadas em filmes PEBD, observou-se eficaz agente antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (43). Resultados similares foram encontrados no trabalho de Dehnavi e colaboradores (44), ao adicionar NPsAg em PEBD visando ação antimicrobiana contra bactérias gram positivas.

As NPsAg são substâncias mais utilizadas em formulações em conjunto com materiais poliméricos, devido as suas propriedades únicas que as diferenciam de outros agentes antimicrobianos, como a sua alta estabilidade térmica e atividade antimicrobiana a longo prazo (45,43).

O mecanismo de ação das NPsAg como agente antimicrobiano, ainda não foi totalmente elucidado, entretanto há várias suposições da sua forma de atuação (46). Sondi e Salopek-Sondi (47), verificaram por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), que as NPsAg têm propensão em ancorar na parede celular bacteriana onde em seguida a penetra, causando alterações estruturais na membrana celular, como a permeabilidade e a morte da célula. Esta ação resulta na formação de “poços” na superfície celular (46). Por sua vez, Danilcauk e colaboradores (48) observaram, por meio da espectroscopia de ressonância de spin eletrônico, que as NPsAg formam radicais livres ao entrar em contato com a bactéria, o que também pode ser considerado um mecanismo de ação, e estes têm a habilidade de danificar a membrana celular, tornando poroso e conseqüentemente levando à morte celular (49). Os íons de Ag liberados pelas nanopartículas podem interagir com o grupo tiol de várias enzimas vitais inativando-as, além disso, as células bacterianas ao entrar em contato com a Ag absorvem os íons, a qual inibe várias funções celulares (46,50).

A Ag é um ácido mole, o qual naturalmente irá reagir com uma base mole, de acordo com a teoria *hard and soft acid and bases*, sendo as células em sua grande maioria constituídas de enxofre e fósforo, que são bases moles, permitindo a reação com a Ag das nanopartículas, causando nas

células reações a qual pode levar a morte desta. Além disso, o DNA tem como principais componentes enxofre e fósforo, portanto é possível a atuação da NPsAg, que conseqüentemente destruirá o DNA levando à morte celular (51,52).

A nanotecnologia e sua implementação em embalagens ativas/inteligentes vem sendo aceita devido a sua natureza facilitadora, e além disso, trata-se de uma tecnologia capaz de inovar a agricultura e os sistemas alimentares (53) e portanto, é de interesse desenvolver trabalhos que relacionem a NPsAg empregada em embalagens poliméricas.

Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo investigar a eficácia antimicrobiana dos filmes PEBD contendo NPsAg com carregador de sílica (SiO_2), em diferentes concentrações de partes por milhão (ppm) por filme, avaliando o potencial de utilização de embalagens poliméricas aditivadas com NPsAg que visa melhorar a qualidade físico-química e microbiológica dos alimentos, e auxiliar na redução de desperdícios de alimentos por agentes biológicos, justificando a relevância deste trabalho. Para tanto foi realizado a caracterização de filmes PEBD sem e com NPsAg em diferentes concentrações, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, Difração de Raios X Termogravimetria e Calorimetria Diferencial de Varredura, e análises de eficácia antimicrobiana desses filmes por meio das metodologias de difusão em ágar, atividade microbiana por contato e por teste por agitação de frascos, em bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* e

Enterococcus faecalis, Gram negativas: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Escherichia coli* e o fungo *Penicillium expansum*.

Capítulo 1.

Eficiência Antimicrobiana de Filmes de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) contendo Nanopartículas de Prata (NPsAg) para Aplicação em Embalagens Alimentícias

Artigo enviado para publicação para a revista Food Microbiology

Eficácia Antimicrobiana de Filmes de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) contendo Nanopartículas de Prata (NPsAg) para Aplicação em Embalagens Alimentícias

Sabrina da Costa Brito^{ab*}, Joana D. Bresolin^b, Kátia Sivieri^a, Marcos David Ferreira^b

^a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rodovia Araraquara Jaú, Km 01, Araraquara, SP, 14800-903, Brasil

^b EMBRAPA Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, Caixa Postal 741, São Carlos, SP, 13560-970, Brasil

^{ab} E-mail: scbrito@yahoo.com.br

^b E-mail: joana.bresolin@embrapa.br

^a E-mail: sivierik@fcar.unesp.br

^b E-mail: marcos.david@embrapa.br

***Autor Correspondente:** Tel +55 (16) 2107-2800, Fax: +55 (16) 2107-5754,
E-mail: scbrito@yahoo.com.br

Resumo:

Inovações tecnológicas em embalagens têm como objetivo a otimização na prevenção de contaminações microbiológicas, visando a conservação e a segurança dos alimentos. Desta forma neste trabalho foi realizado a caracterização e a avaliação do efeito antimicrobiano de filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporados com nanopartículas de prata (NPsAg) em diferentes concentrações, sendo elas 1.50, 3.75, 7.50, 15.00, 30.00, 60.00 e 75.00 partes por milhão (ppm). Os filmes foram caracterizados por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, Difração de Raios X, Termogravimetria e Calorimetria Diferencial de Varredura. Foi observado, por meio destas análises, que a adição de NPsAg no PEBD não interferiu nas propriedades físico-químicas e térmicas dos filmes. A análise da eficácia antimicrobiana dos filmes foi realizada por meio da Atividade Antimicrobiana por Contato, Teste de Agitação em Frasco e Imagens Bacterinas por Microscopia Eletrônica de Varredura. De acordo com os resultados, a adição de NPsAg ao PEBD promove propriedades antimicrobianas frente aos microrganismos estudados, sendo que inibição microbiana foi maior sobre bactérias Gram negativas e sobre o fungo *Penicillium expansum* do que nas Gram positivas. Estes resultados sugerem que os filmes extrusados de PEBD aditivados com NPsAg, podem oferecer contribuição significativa na qualidade e na segurança dos alimentos.

Palavras chave: Polietileno, Nanopartículas de Prata, Antimicrobiano, Embalagem Alimentícia.

1.Introdução

As embalagens têm como principal propósito proteger os alimentos contra qualquer ação de deterioração, sendo esta proporcionada por contaminações químicas, físicas ou biológicas, desde seu acondicionamento até o consumo final, visando à manutenção de suas características por um período prologado após o seu processamento (Gava et al., 2008; Piringer and Baner, 2000).

Desta forma, inovações tecnológicas em embalagens funcionais com recursos avançados têm como objetivo a otimização na prevenção de contaminações, em especial aquelas proporcionadas por microrganismos, e assim aprimorando a conservação dos alimentos e melhorando a segurança destes (Brody et al., 2008; Marsh and Bugusu, 2007; Mihindukulasuriya and Lim, 2014).

A aplicação da nanotecnologia nas embalagens destinadas à indústria de alimentos tem contribuído para buscar soluções anteriormente consideradas um obstáculo, como o curto tempo de prateleira (Chaudhry et al., 2008). Devido a isso, vem sendo apresentada uma nova geração de embalagens ativas para alimentos, como as embalagens nanoestruturadas à base de nanopartículas metálicas, que tem como objetivo a inibição microbiana dos produtos alimentícios (Greiner, 2009).

As nanopartículas metálicas apresentam um ótimo desempenho em suas atividades antimicrobianas e isso se dá devido a sua elevada proporção de área superficial e volume (Damm et al., 2005). Dentre as nanopartículas metálicas estão as nanopartículas de prata (NPsAg), que

além de apresentarem intensa ação antimicrobiana (Kim et al., 2007; Ruparelia et al., 2008; Sondi and Salopek-Sondi, 2004), é uma das substâncias mais utilizadas em conjunto com materiais poliméricos (Becaro et al., 2015; Dehnavi et al., 2012; Jokar et al., 2012), devido as suas propriedades únicas que a diferenciam de outros agentes antimicrobianos, como a alta estabilidade térmica e a compatibilidade química com a matriz polimérica do PEBD (Chen and Schluesener, 2008; Duncan, 2011; Jokar et al., 2012).

O polietileno de baixa densidade (PEBD) é um material polimérico presente em vários setores econômicos da área de alimentos, devido à sua flexibilidade, transparência, fácil processabilidade e estabilidade térmica (Del Nobile et al., 2009; Marsh and Bugusu, 2007). A incorporação de nanopartículas de prata neste polímero pode ser efetuada por meio do processo térmico de extrusão; como realizado por Becaro et al., 2015 e Jokar et al., 2012 com o objetivo de realizar análises *in vitro* de atividade antimicrobiana ou como realizado por Emamifar et al., 2011, 2010, ao investigar a eficácia destes filmes na inativação de *Lactobacillus plantarum* e no aumento da vida de prateleira em suco de laranja, respectivamente; entretanto, poucos estudos da eficácia antimicrobiana de PEBD incorporados com NPsAg por meio de processamento industrial térmico são realizados.

Desta forma, este artigo tem como objetivo avaliar o potencial de utilização de embalagens poliméricas aditivadas com NPsAg por extrusão

em relação a propriedades antimicrobianas por meio de análises *in vitro*, visando melhorar a qualidade físico-química e microbiológica dos alimentos.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

Masterbach a base de PEBD foi utilizado, contendo em sua formulação NPsAg dispersas no carregador de sílica (SiO_2) nas concentrações de 1.50, 3.75, 7.50, 15.00, 30.00, 60.00 e 75.00 partes por milhão (ppm) (tabela 1) e como controle foi utilizado o filme de PEBD sem a adição de NPsAg. Os filmes foram adquiridos comercialmente.

Tabela 1

Distribuição dos valores de aditivos Ag + SiO_2 em porcentagem para cada concentração de NPsAg (ppm).

Concentrações de NPsAg (ppm)	Ag + SiO_2 (%)
1.50	2
3.75	5
7.50	10
15.00	20
30.00	40
60.00	80
75.00	100

2.2. Caracterização dos Filmes

2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG-SEM)

As características morfológicas dos filmes contendo NPsAg foram analisadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG-SEM) (JSM-6701F/JEOL) na detecção de elétrons retroespalhados. Os filmes foram cortados e fixados nos porta-amostras (*stubs*) para adquirir imagens de superfície. Para as imagens do corte

transversal, os filmes sofreram uma fratura criogênica em nitrogênio líquido para depois serem fixados nos *stubs*. Posteriormente as amostras foram recobertas com carbono em evaporadora e foram feitas as análises, além disso, também foi realizado análise no aditivo em pó de Ag+ SiO₂.

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

Para a detecção das frequências vibracionais foi utilizado o Espectrômetro no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Perkin Elmer modelo Spectrum 1000, onde os corpos de prova controle e nanoestruturados tiveram as medições obtidas com 64 varreduras lidas na faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Os corpos de prova foram diretamente fixados em um suporte sem prévia preparação e os espectros de FTIR foram gravados usando o método de transmitância.

2.2.3. Difração de Raios X (DRX)

A determinação das estruturas cristalinas dos filmes e do aditivo em pó de Ag+ SiO₂, foi analisada por meio do o equipamento XRD Shimadzu – 6000, onde os corpos de prova, controle e nanoestruturados, foram colocados em suporte de vidro padrão, sem prévia preparação, para serem introduzidos no porta amostra da câmara de geração de Raios X sob, com tensão de aceleração de 30 kV, corrente de 30 mA e a velocidade de 0.5° por minuto, cada amostra foi varrida com 2θ entre 4 e 90°.

2.2.4. Análises Térmicas

Visando investigar a estabilidade térmica dos filmes, foi realizado Termogravimetria (TGA), onde foram utilizados 10 mg dos corpos de prova, controle e nanoestruturados, para serem analisados em termobalança TGA Q 500 (TA Instruments), com a taxa de aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e faixa de aquecimento entre 10 e 800°C . O fluxo do nitrogênio e de ar sintético foi mantido em 40 mL min^{-1} e 60 mL min^{-1} , respectivamente.

Para identificação dos eventos endotérmicos e exotérmicos durante o aquecimento, foi realizada a análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) DSC Q 100 (TA – Instruments). Os ensaios foram efetuados na temperatura entre 10 e 200°C , com taxa de aquecimento de 10 min^{-1} e fluxo de nitrogênio mantido a 60 mL min^{-1} , utilizando 10 mg dos corpos de prova, controle e nanoestruturados, em um porta amostra.

2.3. Análises Microbiológicas

As análises microbianas realizadas neste trabalho foram: Atividade Antimicrobiana por Contato; Teste de Agitação em Frasco; e Imagens Bacterianas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), descritas a seguir. Estes procedimentos foram realizados em bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (CCCD-E002) e em Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* (CCCD-S004), assim como, em fungo *Penicillium expansum* (PEN001), isolado da maçã. Em todas as análises o controle negativa foi o filme PEBD sem NPsAg e para o teste de agitação em frasco o controle positivo para as bactérias *Staphylococcus aureus*,

Salmonella enterica Serovar *Typhimurium* e *Escherichia coli* foi o antibiótico sulfato de estreptomicina (Sigma-aldrich) (3000 µg/ml) e para *Enterococcus faecalis* o levofloxacino (Novartis) (0.25 µg/ml) e para o *Penicillium expansum* antifúngico itraconazol (EMS) (16 µg/ml).

2.3.1. Atividade Antimicrobiana por Contato

Para o teste de atividade antimicrobiana por contato, as colônias das bactérias, cultivadas em meio (TSA), foram inoculadas em 10 mL de caldo de soja tripcaseína (TSB) (Kasvi) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as bactérias foram centrifugadas (Hettich zentrifugen Rotina-390) durante 5 minutos, 10°C e 2000 rpm, o sobrenadante foi descartado para em seguida as células serem ressuspensas em solução salina (0.9%). Cada inóculo de microrganismo foi ajustado, por meio de leitura de absorbância a 600 nm pelo Espectrômetro de Ultravioleta–Visível (UV-VIS), na concentração de UFC/mL de 10^5 (Pagno et al., 2015).

Os filmes com NPsAg e controle foram cortados em quadrados de dimensões de (4 cm x 4 cm) 16 cm^2 , desinfetados por imersão em álcool etílico 70% por 15 minutos, e acomodados na parede interna dos tubos Eppendorf, para em seguida serem adicionados 500 µL de suspensão microbiana e incubados em agitação suave na incubadora rotativa (150 rpm) por 24 horas a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) (Pagno et al., 2015).

Em relação ao fungo *Penicillium expansum*, a partir da cultura crescida em meio potato dextrose ágar (PDA), por 7 dias, delas foram preparadas suspensões adicionando solução esterilizada de Tween 80 (0.1% v/v) e realizando uma raspagem com a alça de drigalski com objetivo

de remover uma maior quantidade de esporos, para posteriormente ser estabelecida sua concentração 10^4 pela câmara de Neubauer e em seguida ajustado em solução salina (0.9%) (Avila-Sosa et al., 2010).

Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 100 μ L da suspensão microbiana de cada tubo e transferida para um eppendorf contendo 900 μ L de solução salina (0.9%), para em seguida obter diluições seriadas, onde cada diluição foi, vigorosamente, homogeneizada com o auxílio de um vortex (Pagno et al., 2015).

De cada diluição, 10 μ L da solução microbiana foram semeados no meio ágar triptona de soja (TSA) e PDA (no caso *Penicillium expansum*); as bactérias Gram negativas foram incubadas a 37°C em 24 h, as Gram positivas a 37°C por 48 h e o fungo *Penicillium expansum* 25 °C durante 72 h (Avila-Sosa et al., 2010; Pagno et al., 2015).

As células viáveis em cada uma das placas, inoculadas com microrganismos, foram contadas para quantificação da formação de colônias.

2.3.2. Teste de Agitação em Frasco

No teste de agitação em frasco, os filmes com NPsAg e controle foram cortados em 8 unidades de retângulo na dimensão de (2 cm x 1.5 cm) 3 cm², desinfetados por imersão em álcool etílico 70% por 15 minutos, e posteriormente imersos em 100 mL de TSB (Jokar et al., 2012).

Em um erlenmeyer de 200 mL contendo TSB com os corpos de prova e 0.4 g de tween 80 foi inoculado 1 mL de cada bactéria, ajustados na concentração de formação de colônias (UFC/mL) de 10^5 . Na sequência

foram incubados sob agitação (150 rpm) a 37°C, sendo que a cada duas horas uma quantidade de 2.5 mL da amostra foi retirada para acompanhamento do crescimento microbiano por meio da leitura de absorbância a 600 nm pelo espectrômetro de Ultravioleta – Visível (UV-Vis) (Jokar et al., 2012).

2.3.3. Imagens Bacterianas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação da ação antimicrobiana dos filmes nanoestruturados contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (10^7) e Gram negativa *Escherichia coli* (10^6), foi usado a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) JSM-6510/JEOL, onde as bactérias inicialmente foram submetidas ao procedimento de atividade antimicrobiana por contato, sem sofrerem diluições seriadas. Em seguida 10 µL da solução bacteriana foram posicionadas no centro de laminas previamente tratadas com dispersão de solução de poly-L-lysine 0.1%. As lâminas foram acomodadas dentro de tubos Eppendorfs e preenchidas com solução Karnawesk por 4 horas, após este período as amostras foram lavadas com tampão cacodilato e água destilada, e desidratadas com acetona 30% (10 min), 50% (10 min), 70% (10 min), 90% (10 min) e 100% (três vezes por 10 min). As amostras foram liofilizadas (Liotop L 101), seguindo as instruções do fabricante, durante 24 horas e posteriormente mantidas em um dessecador até serem fixadas em *stubs* e recobertas com ouro (Spricigo et al., 2015).

2.4. Análise Estatística

Para avaliar o número de colônias, nas diferentes concentrações de NPsAg, testadas na análise da atividade antimicrobiana por contato foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Games-Howell, pois de acordo com o teste de Bartlett houve heterogeneidade entre as variâncias.

Para avaliar as variáveis na análise microbiológica para o teste de agitação em frasco foi utilizada a análise de variância (ANOVA), além do teste de amplitudes múltiplas de Duncan e teste de Kruskal-Wallis, para amostras homogêneas e heterogêneas respectivamente entre as variâncias de acordo com o teste de Bartlett.

O software utilizado nas análises foi o R versão 3.3.3. e o nível de significância de todas as análises foi de 5%.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicada.

3.Resultados e Discussão

3.1.Caracterização dos Filmes

3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG-SEM)

As imagens obtidas pelo FEG retroespalhado (Fig. 1) capturaram aglomerados claros de Ag e cinza de SiO₂ dispersos nos filmes tanto na superfície quanto no interior, obtidos por meio da fratura criogênica, corroborando com as imagens de FEG retroespalhado dos aditivos Ag+ SiO₂ (Fig.2), comprovando forma nanoestruturada dos filmes.

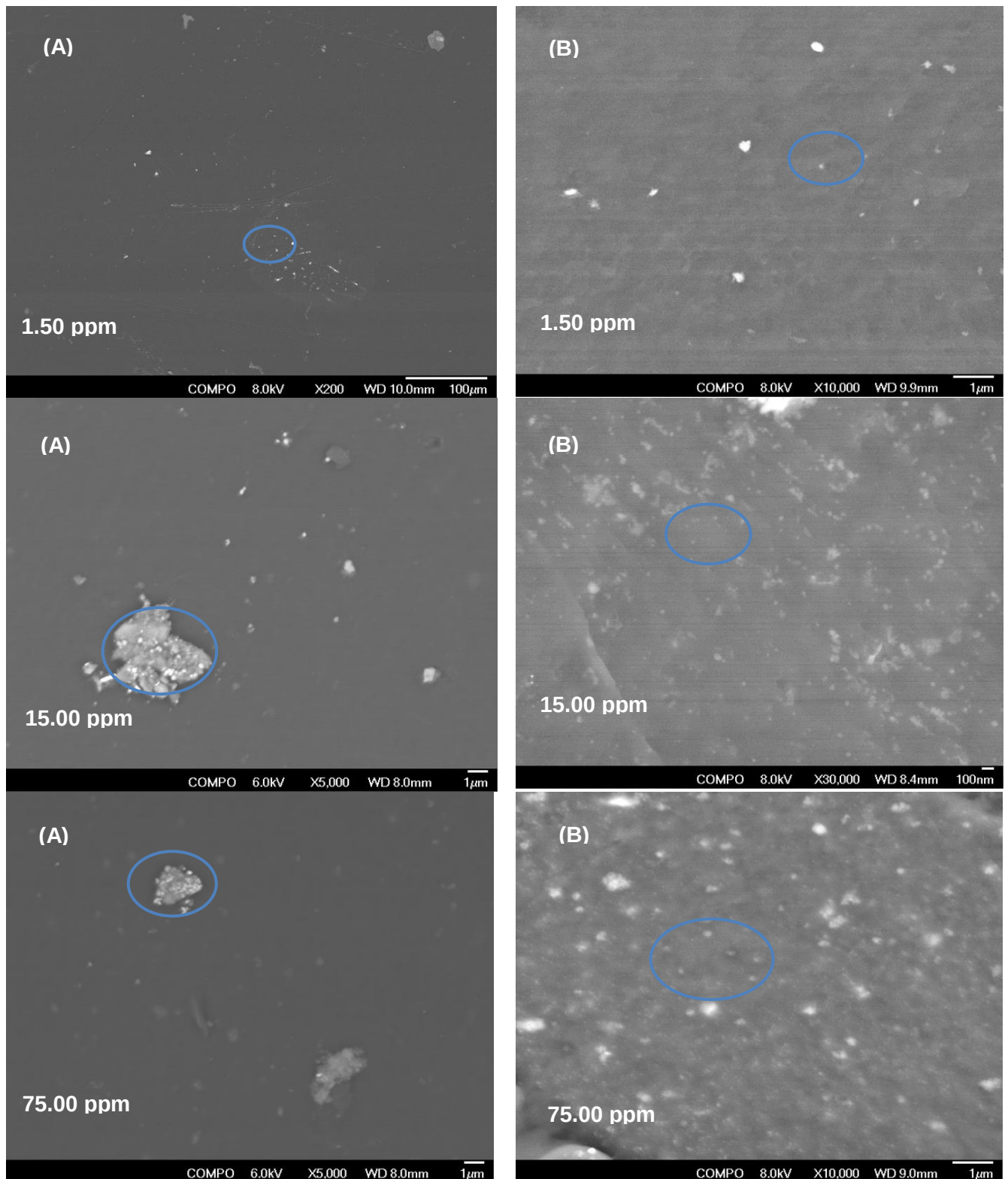


Fig. 1. Imagem de superfície (A) e fraturada (B), obtida através do FEG retroespalhado, dos corpos de prova nanoestruturados.

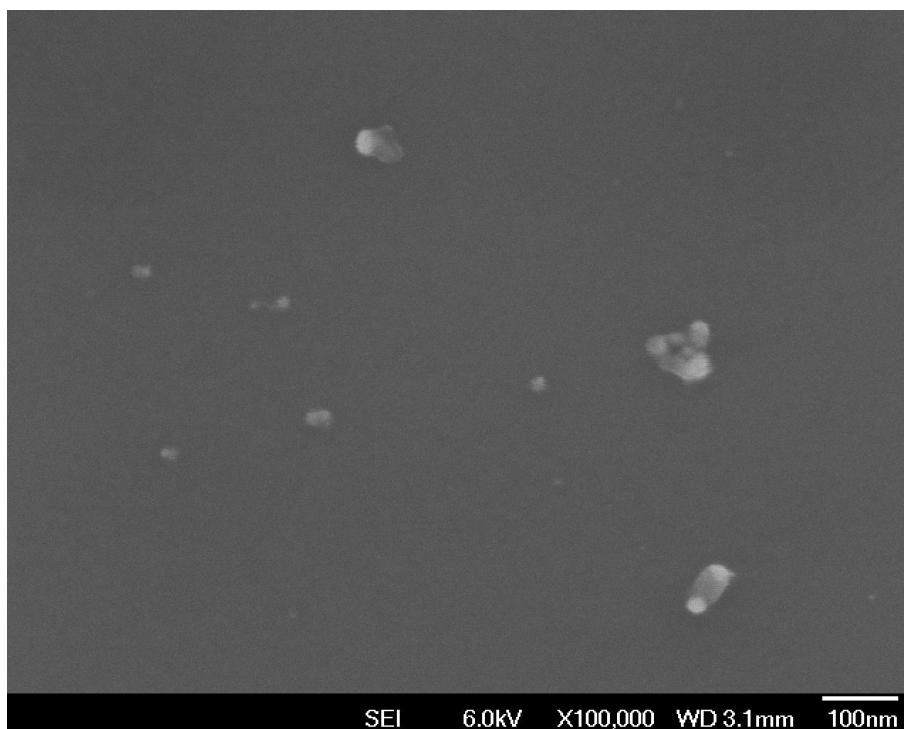


Fig. 2. Imagem de superfície, obtida através do FEG retroespalhado, dos aditivos Ag+ SiO₂.

No FEG retroespalhado as imagens obtidas contém informações sobre as camadas mais profundas das amostras, sendo que estas dependem da sua composição atômica, ou seja, nos filmes PEBD nanoestruturados, a SiO₂ por apresentar um número atômico maior que os demais componentes do filme, apresentou um contraste maior nas imagens (Canevarolo Jr., 2017).

A presença da sílica mesoporosa como carregador das NPsAg é de grande importância, já que este tipo de substrato inorgânico reconhecido pela sua biocompatibilidade, dispersabilidade e estabilidade química como transportadora de agentes antimicrobianos (Huang et al., 2015; Qasim et al., 2015).

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

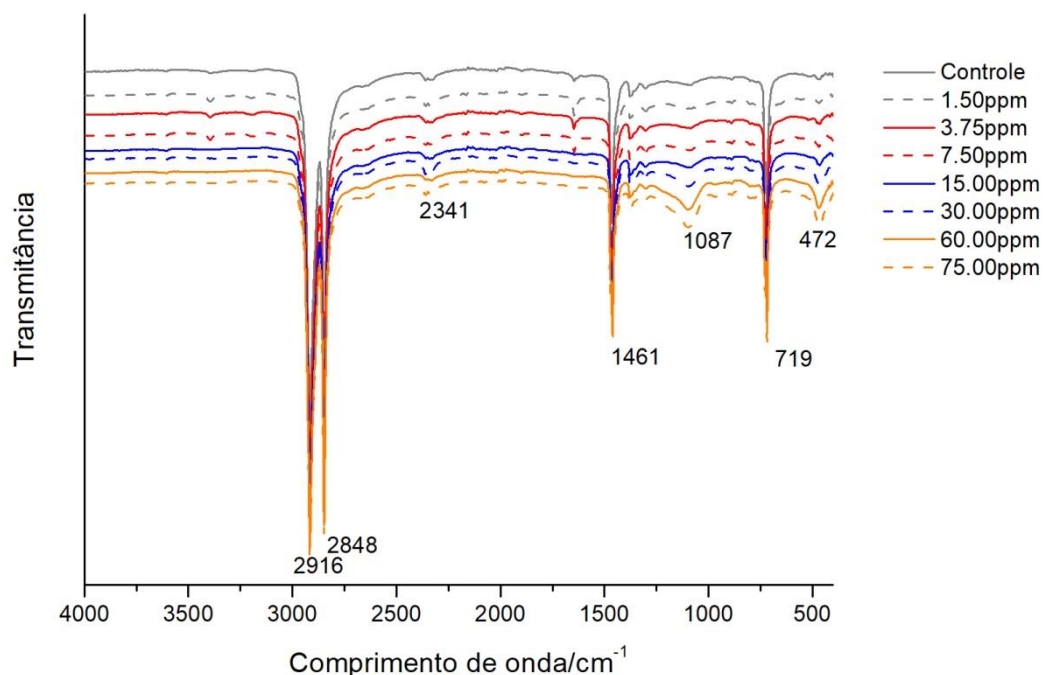


Fig. 3. Transmittância em relação ao comprimento de onda/ cm^{-1} dos corpos de prova controle e nanoestruturados.

Os espectros na região infravermelho estão representadas na Fig. 2, onde pode ser verificado que os corpos de prova nanoestruturados apresentaram bandas características de PEBD puro. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos envolvendo a comparação de PEBD puro e PEBD com NPsAg (Becaro et al., 2015; Puti et al., 2014).

As bandas 719 cm^{-1} , balanço das sequências dos grupos de metileno, 1369 cm^{-1} , flexão C-H do grupo metil, 1461 cm^{-1} , dobramento C-H do grupo metileno, 2848 cm^{-1} , estiramento CH e 2916 cm^{-1} , correspondendo ao estiramento do metileno, corroboram com os picos característicos de PEBD (Mishra and Luyt, 2008; Olmos et al., 2012; Rajandas et al., 2012).[

Na Fig. 2 também foram observadas bandas 472 cm^{-1} e 1087 cm^{-1} , picos característicos de SiO_2 , correspondendo à absorção da ligação Si-O

tetragonal e ao grupo Si-O-Si, respectivamente (Gowri et al., 2011; Lacerda Júnior et al., 2013), além disso, foi verificado que com o aumento da concentração de SiO₂ há o aumento das bandas correspondentes.

3.1.3. Difração de Raio X (DRX)

O Difratoograma de Raios X (Fig. 3) dos filmes, apresentaram picos típicos de difração em torno de $2\theta = 21.56^\circ$, 24.08° e 36.50° , os quais correspondem aos picos da estrutura cristalina ortorrômbica de polietileno, semelhantes ao encontrado em outros estudos com PEBD (Miranda and Carvalho, 2011; Motaung et al., 2017; Xia et al., 2006).

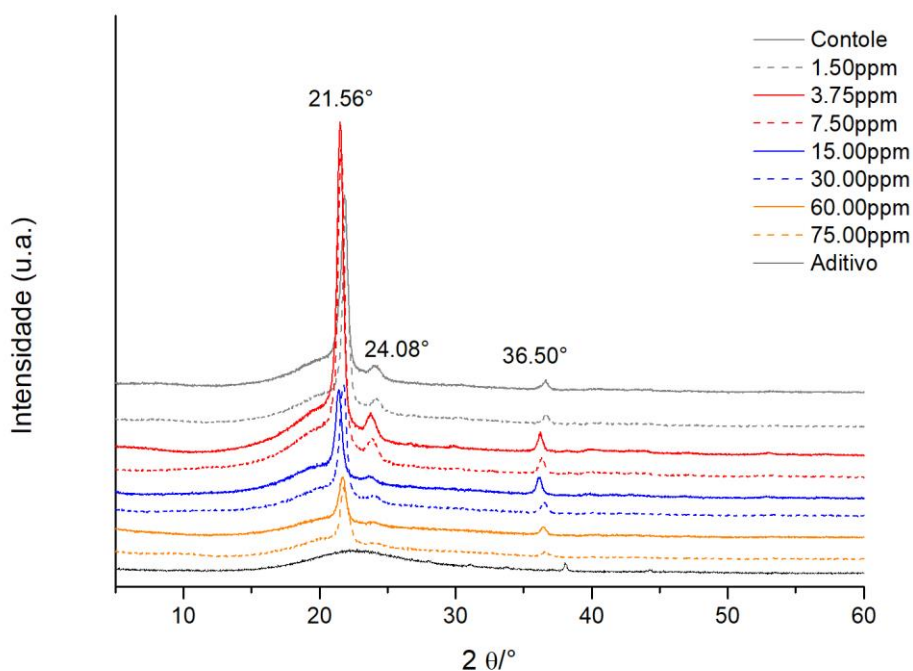


Fig. 4. Intensidade em unidade arbitrária (u.a.) em relação ao ângulo de difração $2\theta/^\circ$ dos corpos de prova controle e nanoestruturados.

Pela análise de difração de raios X, podem ser verificados dois picos cristalinos, o mais intenso na faixa angular, pelo índice de Miller [(110) – 22°] e menos intenso [(200) – 37°], estes dados corroboram a semicristalinidade

do polietileno, além disso, os picos caracterizam o PEBD e condizem aos planos cristalográficos específicos (Madani, 2011; Motaung et al., 2017).

Como pode ser verificado pela Fig. 3 apenas os picos de difração do polietileno estão presentes em todas as amostras analisadas, indicando que a sílica, presente como carregador da NPsAg, está na sua forma amorfa, corroborando com a ausência de picos de sílica no aditivo de $\text{Ag} + \text{SiO}_2$, enquanto a ausência da Ag nas análises pode ser devido a sua concentração nas amostras estar abaixo do detectável pelo equipamento. Estes resultados corroboram com os de Becaro et al.(2015), que ao analisar a difração de raios X em filmes PEBD com NPsAg, também não detectou a Ag.

Os picos de difração correspondentes aos planos cristalográficos da Ag° são a $2\theta = [(111) 38.2^\circ - 39.4^\circ]$, $[(200) 44.4^\circ - 44.6^\circ]$, $[(220) 63.5^\circ - 64.6^\circ]$ e $[(311) 77.6^\circ - 78.1^\circ]$ (Abdel-Mohsen et al., 2014; Liu et al., 2012).

3.1.4. Análises Térmicas

3.1.4.1. Termogravimetria (TGA)

Os filmes nanoestruturados apresentaram estabilidade térmica semelhante ao filme controle (Fig.5), que foi mais bem determinado na curva TGA do que na DTG, como também observado na temperatura de início extrapolado de degradação (T_{onset}) (Tabela 2), corroborando com dados equivalentes em Boschetto et al., 2012, onde a adição de Ag com carregador de zeólita em PEBD, não apresentou diferença significativa na temperatura de degradação quando comparados com o PEBD puro.

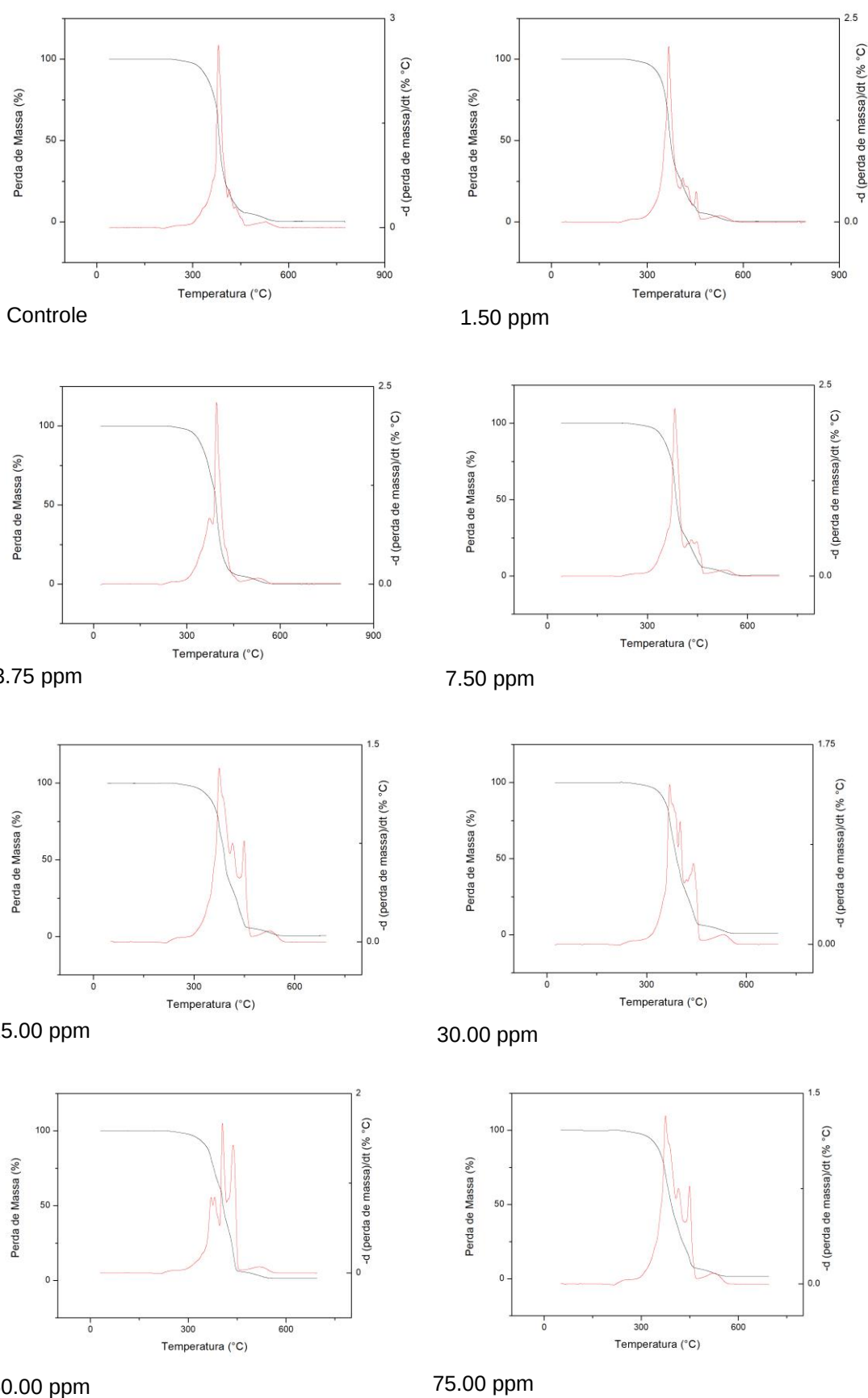


Fig. 5. Análise termogravimétrica (TGA) e curvas de DTG nos corpos de prova controle e nanoestruturados em atmosfera de ar sintético de 10 a 800 °C.

Os corpos de prova nanoestruturados apresentaram uma temperatura de 50% de degradação ($T_{50\%}$) semelhantes ao filme PEBD sem nanopartículas e também foi verificado uma porcentagem residual a 700°C (Tabela 2) equivalente com a do PEBD controle, sugerindo uma adequada homogeneização do sistema polimérico (Becaro et al., 2015).

Tabela 2

Distribuição dos dados de temperatura de início extrapolado de degradação (T_{onset}), temperatura de 50% de degradação ($T_{50\%}$) e porcentagem residual a 700°C ($R(\%)$) dos corpos de prova controle e nanoestruturados.

Concentrações (ppm)	T_{onset} (°C)	$T_{50\%}$ (°C)	$R/700^{\circ}C$ (%)
Controle	365.70	383.65	99.61
1.50	349.53	372.27	99.56
3.75	374.33	386.40	99.74
7.50	364.14	386.40	99.60
15.00	362.45	391.79	99.40
30.00	351.64	389.94	99.20
60.00	375.27	406.65	98.56
75.00	354.55	393.02	98.22

3.1.4.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Pela DSC foi observada uma temperatura de fusão (T_m) do PEBD semelhante à de outras pesquisas, onde variam de 107.7, 114 e 124.5°C (Boschetto et al., 2012; Motaung et al., 2017; Pérez et al., 2014). Além disso, pode ser observado que a adição de NPsAg não promoveu grandes variações na T_m , todos os filmes analisados apresentaram picos endotérmicos precisamente relacionado à fusão da matriz do polímero, já que a temperatura de degradação das amostras inicia-se apenas nas temperaturas mais altas (Fig.06), o mesmo pode ser verificado por Becaro et al. (2015) ao comparar T_m de filmes PEBD puro com PEBD acrescido de NPsAg de diferentes concentrações por ppm, indicando que não houve

alteração significativa com relação a temperatura de fusão do material polimérico com a adição de NPsAg (Boschetto et al., 2012).

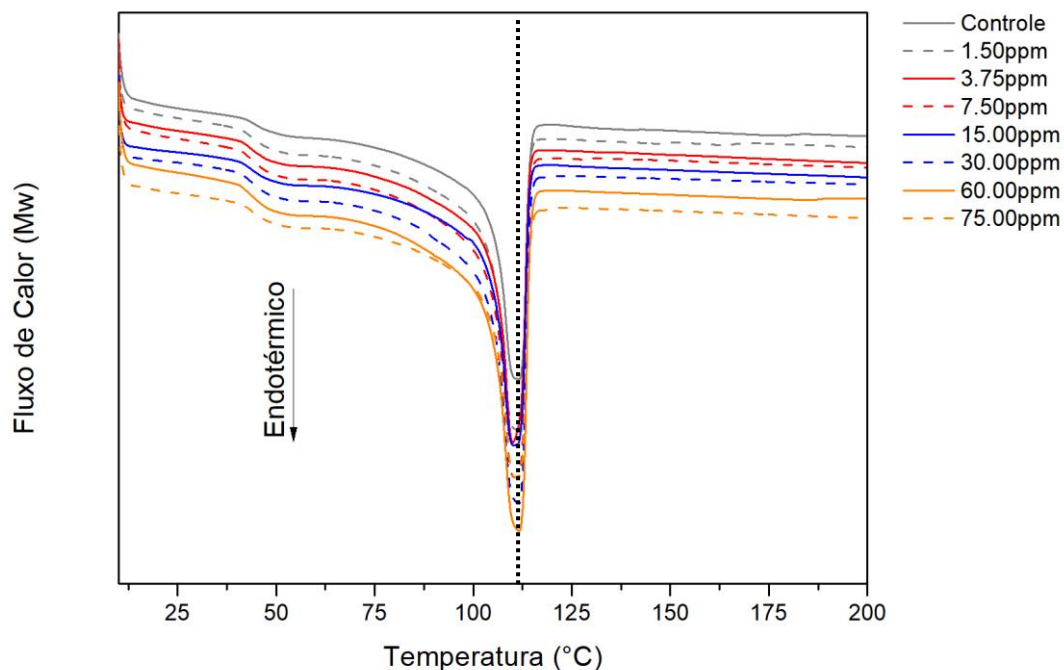


Fig. 6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) nos corpos de prova controle e nanoestruturados.

Em relação à entalpia de fusão (ΔH), observa-se que houve uma variação dos corpos de prova nanoestruturados quando comparados com o controle (Tabela 3). Onde a diminuição da entalpia nas amostras 1.50; 3.75; 30.00; 60.00 e 75.00 pode ser devido a uma forte interação do máster e o polímero para formar uma distribuição homogênea promovendo uma diminuição da agitação das moléculas ao ser aquecido e assim diminuindo a energia absorvida durante o processo (Becaro et al., 2015).

Tabela 3

Distribuição dos dados de temperatura de fusão (T_m) e de entalpia de fusão (ΔH) dos corpos de prova controle e nanoestruturados (ppm).

Concentrações (ppm)	T_m (°C)	ΔH (J/g ⁻¹)
Controle	111.49	128.8
1.50	111.29	125.3
3.75	110.07	128.6
7.50	110.60	138.9
15.00	110.29	133.9
30.00	111.57	121.4
60.00	111.67	122.5
75.00	110.93	125.0

3.2. Análises Microbiológicas

3.2.1. Atividade Microbiana por Contato

Os resultados obtidos pela atividade microbiana por contato mostraram que os filmes nanoestruturados exibiram ações antimicrobianas contra os microrganismos estudados (Tabela 4). Pode ser observado que *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. expansum* apresentaram uma redução de UFC/mL a partir da concentração NPsAg 1.50 ppm, porém começaram a surgir diferenças significativas ($p \leq 0.05$) ao controle negativo a partir da concentração 7.50 ppm com exceção do *E. faecalis*. A bactéria *E. faecalis* apresentou redução de UFC/mL, ao ser comparado com o controle negativo, na concentração 7.50 ppm, todavia a diferença significativa ($p \leq 0.05$) foi na concentração de 75.00 ppm, sugerindo que para este microrganismo há a necessidade de concentrações maiores para a sua inibição.

Tabela 4

Distribuição dos valores relativos à média e $\pm$ desvio padrão de contagens (UFC/ml) de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. expansum* em relação ao controle negativo e aos corpos de prova nanoestruturados (ppm).

Concentrações (ppm)	<i>S. aureus</i> (UFC/ml)	<i>E. faecalis</i> (UFC/ml)	<i>E. coli</i> (UFC/ml)	<i>S. typhimurium</i> (UFC/ml)	<i>P. expansum</i> (UFC/ml)
Controle Negativo	162.2 $\pm$ 68.3 ^a	15.7 $\pm$ 2.9 ^b	157.6 $\pm$ 21.0 ^a	64.4 $\pm$ 18.8 ^a	3.7 $\pm$ 1.2 ^a
1.50	108.3 $\pm$ 43.0 ^{ab}	31.1 $\pm$ 9.5 ^a	117.9 $\pm$ 4.2 ^b	42.2 $\pm$ 7.9 ^{ab}	0.6 $\pm$ 0.5 ^b
3.75	108.2 $\pm$ 43.2 ^{ab}	16.8 $\pm$ 7.0 ^{bc}	75.9 $\pm$ 17.5 ^c	34.3 $\pm$ 3.0 ^b	0.7 $\pm$ 0.9 ^b
7.50	67.3 $\pm$ 13.6 ^b	15.4 $\pm$ 5.5 ^{bc}	71.1 $\pm$ 17.9 ^c	18.9 $\pm$ 7.5 ^d	0.7 $\pm$ 0.7 ^b
15.00	65.8 $\pm$ 3.6 ^b	15.1 $\pm$ 3.7 ^b	38.7 $\pm$ 8.2 ^d	4.7 $\pm$ 1.2 ^e	0.6 $\pm$ 0.7 ^b
30.00	65.6 $\pm$ 11.7 ^b	12.7 $\pm$ 3.4 ^{bc}	7.0 $\pm$ 3.3 ^e	5.9 $\pm$ 1.2 ^e	0.6 $\pm$ 0.7 ^b
60.00	60.2 $\pm$ 21.0 ^{bc}	9.9 $\pm$ 7.2 ^{bc}	4.7 $\pm$ 1.3 ^e	5.0 $\pm$ 3.2 ^e	0.2 $\pm$ 0.4 ^b
75.00	48.1 $\pm$ 2.5 ^c	8.6 $\pm$ 2.4 ^c	1.9 $\pm$ 1.1 ^f	0.6 $\pm$ 0.7 ^f	0.1 $\pm$ 0.3 ^b

*Médias seguidas da mesma letra, entre as linhas, não são significativamente diferentes pelo teste de Games-Howell ($p > 0.05$).

A inibição das bactérias Gram negativas e do fungo *Penicillium expansum* foi significativamente maior que das bactérias Gram positivas, resultado semelhante ao encontrado por Kim et al. (2007), sobre a ação antimicrobiana de NPsAg sobre fungo e *E. coli*. Além disso, foi verificado que quanto maior a concentração de NPsAg nos corpos de prova há um aumento na inibição, sugerindo uma maior eficácia de agente antimicrobiano dos filmes PEBD com o acréscimo de NPsAg; similares aos resultados observados por Ruparelia et al. (2008) em um estudo de efeito bactericida de NPsAg em *E. coli* e *S. aureus*.

A concentração de NPsAg pode estar relacionada com a maior formação de “poços” ou rupturas na parede celular dos microrganismos que promovem um aumento da permeabilidade da membrana, resultando na morte celular (Kim et al., 2007, 2011; Mirzajani et al., 2011; Ruparelia et al., 2008).

Os resultados encontrados também sugerem que o efeito antimicrobiano das NPsAg pode estar associado com as características de certas espécies de bactérias. Bactérias Gram positivas e Gram negativas

apresentam diferenças na estrutura da membrana, sendo a mais distinta a espessura da camada de peptidoglicano, que tem como função essencial proteger a bactéria contra agentes antibacterianos. As Gram positivas por apresentarem uma espessura de peptidoglicano superior as Gram negativas, podem se proteger com maior eficácia da formação de “poços” ou rupturas na sua membrana celular, corroborando com os valores de inibição apresentados nesta pesquisa (Kim et al., 2007, 2011; Ruparelia et al., 2008).

A baixa inibição observada para *E. faecalis*, além de poder estar relacionada com a sua estrutura da membrana, também pode sugerir que a sua capacidade de formar biofilmes tornou-a mais resistente à fagocitose, anticorpos e a agentes antimicrobianos (Alabdulmohsen and Saad, 2017). Entretanto Wu et al. (2014) apontam que um bom desempenho da NPsAg contra a *E. faecalis* dependem da concentração de ambas, mas também do tempo de interação.

3.2.2. Teste de Agitação em Frasco

Os resultados obtidos, por meio do teste de agitação em frasco, mostram que os filmes nanoestruturados influenciaram na cinética de crescimento da *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.coli* e *S. typhimurium*, como pode ser observado na tabela 5 e 6.

Tabela 5

Distribuição dos valores relativos à média e $\pm$ desvio padrão de taxa de crescimento, concentração máxima na fase estacionária e duração na fase lag (representado em horas) de *S. aureus* e *E. faecalis* em relação ao controle negativo e corpos de prova nanoestruturados (ppm).

Microrganismo/Concentração (ppm)	Taxa de Crescimento (abs.)		Fase Estacionária (abs.)		Fase Lag (h)	
<i>S. aureus</i>						
Controle Negativo	0.31	±0.01 ^a	2.51	±0.06 ^a	5:59:20	±0:03:03 ^{cd}
1.50	0.30	±0.01 ^a	2.51	±0.04 ^a	5:56:20	±0:15:32 ^d
3.75	0.31	±0.01 ^a	2.51	±0.03 ^a	6:14:40	±0:10:01 ^{bbc}
7.50	0.32	±0.00 ^a	2.48	±0.03 ^a	6:18:20	±0:08:23 ^{bbc}
15.00	0.31	±0.01 ^a	2.51	±0.02 ^a	6:26:00	±0:08:40 ^{bc}
30.00	0.31	±0.01 ^a	2.49	±0.05 ^a	6:34:40	±0:03:13 ^b
60.00	0.30	±0.02 ^a	2.50	±0.05 ^a	6:34:40	±0:19:01 ^b
75.00	0.31	±0.02 ^a	2.48	±0.02 ^a	6:39:40	±0:28:27 ^b
Controle Positivo	0.01	±0.00 ^b	0.10	±0.00 ^b	8:43:40	±0:22:11 ^a
<i>E. faecalis</i>						
Controle Negativo	0.57	±0.04 ^a	1.57	±0.02 ^a	5:51:40	±0:03:13 ^a
1.50	0.53	±0.06 ^a	1.56	±0.01 ^a	5:53:00	±0:05:34 ^a
3.75	0.54	±0.02 ^a	1.55	±0.01 ^{abc}	5:57:00	±0:02:00 ^a
7.50	0.53	±0.02 ^a	1.53	±0.01 ^{bc}	5:56:00	±0:02:00 ^a
15.00	0.52	±0.03 ^{ab}	1.52	±0.02 ^{bc}	5:58:20	±0:04:02 ^a
30.00	0.51	±0.06 ^{ab}	1.52	±0.01 ^c	5:58:20	±0:01:09 ^a
60.00	0.44	±0.05 ^{bc}	1.52	±0.03 ^{bc}	5:56:00	±0:06:15 ^a
75.00	0.38	±0.04 ^c	1.52	±0.01 ^c	5:57:40	±0:10:58 ^a
Controle Positivo	-0.01	±0.01 ^d	0.30	±0.01 ^d	1:21:40	±2:21:27 ^b

*Médias seguidas da mesma letra, entre as linhas, não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($p > 0.05$).

Tabela 6

Distribuição dos valores relativos à média e $\pm$ desvio padrão de taxa de crescimento, concentração máxima na fase estacionária e duração na fase lag (representado em horas) de *E.coli* e *S.typhimurium* em relação ao controle negativo e corpos de prova nanoestruturados (ppm).

Microrganismo/Concentração (ppm)	Taxa de Crescimento (abs.)		Fase Estacionária (abs.)		Fase Lag (h)	
<i>E.coli</i>						
Controle Negativo	0.32	±0.03 ^{ab}	2.09	±0.02 ^a	5:34:40	±0:14:22 ^b
1.50	0.37	±0.04 ^a	2.01	±0.01 ^{bc}	6:00:20	±0:17:09 ^b
3.75	0.36	±0.09 ^a	2.02	±0.05 ^{abc}	5:57:20	±0:32:08 ^b
7.50	0.32	±0.03 ^a	2.02	±0.05 ^{abc}	5:49:00	±0:18:15 ^b
15.00	0.35	±0.10 ^a	2.01	±0.05 ^{bc}	5:54:40	±0:43:25 ^b
30.00	0.54	±0.38 ^a	1.98	±0.05 ^{bc}	6:42:40	±1:32:05 ^b
60.00	0.45	±0.16 ^a	1.96	±0.06 ^c	6:46:20	±0:47:00 ^b
75.00	0.34	±0.03 ^a	2.06	±0.05 ^{ab}	7:03:40	±0:49:54 ^b
Controle Positivo	0.04	±0.04 ^b	0.09	±0.00 ^d	10:26:00	±0:54:35 ^a
<i>S.typhimurium</i>						
Controle Negativo	0.19	±0.00 ^a	2.50	±0.00 ^a	2:47:00	±0:06:56 ^b
1.50	0.20	±0.00 ^a	2.48	±0.01 ^{ab}	2:52:20	±0:14:11 ^b
3.75	0.19	±0.00 ^a	2.48	±0.01 ^b	2:51:20	±0:03:03 ^b
7.50	0.19	±0.00 ^a	2.47	±0.01 ^b	2:58:00	±0:13:45 ^b
15.00	0.20	±0.00 ^a	2.36	±0.02 ^c	3:02:40	±0:06:30 ^b
30.00	0.20	±0.00 ^a	2.33	±0.10 ^c	3:05:20	±0:11:35 ^b
60.00	0.19	±0.00 ^a	2.32	±0.06 ^c	2:55:40	±0:09:37 ^b
75.00	0.20	±0.01 ^a	2.25	±0.08 ^c	3:27:20	±0:14:34 ^b
Controle Positivo	0.15	±0.02 ^b	2.00	±0.00 ^d	11:42:20	±2:27:33 ^a

*Médias seguidas da mesma letra, entre as linhas, não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan, sendo a variável fase estacionária do *S.typhimurium* pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$).

Em relação à taxa de crescimento, apenas a *E.faecalis* apresentou diferença significativa ($p \leq 0.05$), na concentração 60.00 ppm, ao controle negativo; propondo que a adição de NPsAg nos filmes auxiliou na redução da velocidade de crescimento desta bactéria.

Sobre a concentração máxima na fase estacionária, observa-se que os corpos de prova nanoestruturados promoveram a diminuição da concentração bacteriana dos microrganismos estudados. Porém apenas *E. faecalis*, *E. coli* e *S. typhimurium* apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0.05$), com o controle negativo, a partir das concentrações 7.50 ppm; 1.50 ppm e 3.75 ppm respectivamente, sugerindo que as baixas concentrações foram mais eficazes na redução da concentração das Gram negativas (*E.coli*

e *S. typhimurium*). Semelhante ao observado na pesquisa de Jokar et al. (2012), onde a NpsAg reduziu a concentração bacteriana em 23.3% e 27.3% para *S.aureus* e *E.coli* respectivamente.

Em relação à duração na fase lag, foi verificado que com a adição de NPsAg nos filmes houve permanência maior de tempo nesta fase de crescimento, quando comparado ao controle negativo, corroborando com pesquisas que reportaram resultados semelhantes (Jokar et al., 2012; Kim et al., 2011; Sadeghnejad et al., 2014), sendo que a *S.aureus* foi a que apresentou diferença significativa ($p \leq 0.05$) com o controle negativo em concentrações de 30.00 ppm ou maiores, propondo que uma concentração intermediária pode ser suficiente para proporcionar uma maior duração na fase lag na *S.aureus*.

Desta forma, ocorre um claro indicativo que os filmes nanoestruturados promoveram inibição no crescimento e na reprodução de células bacterianas logo nos primeiros estágios. Corroborando ao que foi observado na pesquisa de Sadeghnejad et al. (2014), onde ao testar a ação antimicrobiana de filmes de polietileno com NPsAg contra *S.aureus* e *E.coli* no teste de agitação em frasco, verificou que a NPsAg influenciou nas fases lag e log de ambas bactérias. Também pode ser verificado que quanto maior a concentração (ppm) de NPsAg nos filmes de PEBD maior é a sua influência na cinética de crescimento das bactérias estudadas. O mesmo pode ser constatado na pesquisa de Jokar et al. (2012), no qual ao investigar a ação da NpsAg em filmes PEBD em teste de agitação em frasco, observou que nanocompósitos que contém baixa concentração de NPsAg não

alteraram a cinética da *S.aureus* e *E.coli* em grande magnitude, quando comparado com o controle.

3.2.3. Imagens Bacterianas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de *S.aureus* e de *E.coli*, obtidas após o contato com o filme controle e com o filme nanoestruturados 75.00 ppm, podem ser verificadas na Fig.4 e 5, onde observa-se que ambas as bactérias, ao serem tratadas com PEBD com NPsAg, apresentaram alteração da estrutura da parede microbiana.

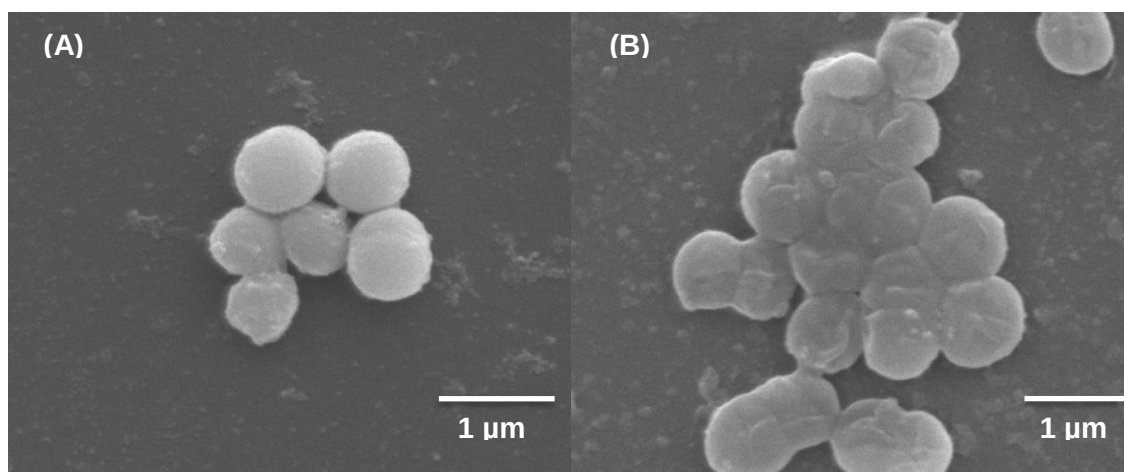


Fig. 6. *S.aureus* tratada com filme PEBD controle (A) e com filme PEBD nanoestruturado 75,00 ppm (B).

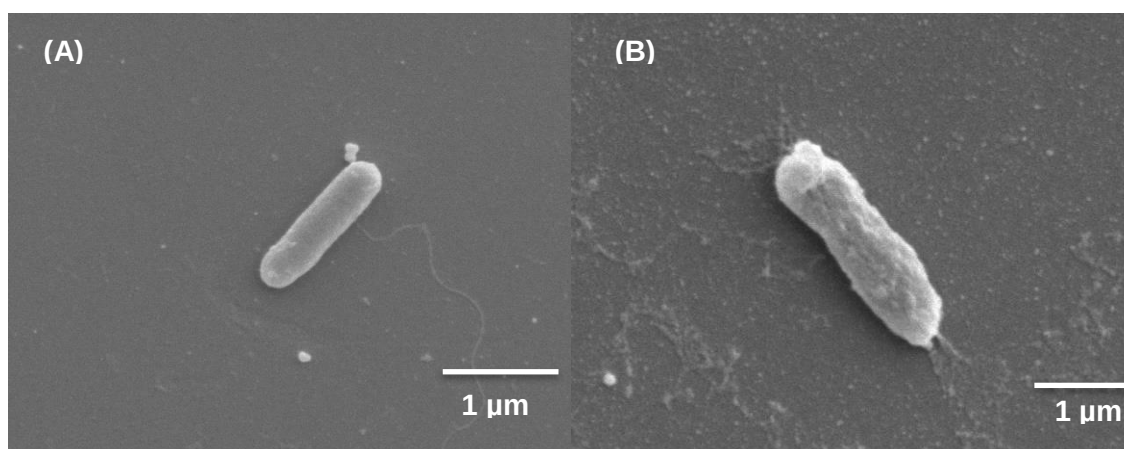


Fig. 7. *E.coli* tratada com filme PEBD controle (A) e com filme PEBD nanoestruturado 75,00 ppm (B).

O mecanismo de ação das NPsAg como agente antimicrobiano não foi totalmente elucidado, entretanto existem suposições de sua forma de atuação (Prabhu and Poullose, 2012). Sondi e Salopek-Sondi (2004), verificou por meio do MEV, que as NPsAg têm propensão em ancorar na parede celular bacteriana onde em seguida a penetra, causando alterações estruturais na membrana celular, como o aumento da sua permeabilidade, deixando as células bacterianas incapazes de regular de forma adequada o transporte através da membrana plasmática, causando consequentemente a morte da celular.

Em relação as alterações críticas e aos danos na estrutura da membrana observados nas bactérias tratadas com NPsAg (Fig. 4 e 5), pode ter sido provocado pela depleção da prata na bactéria formando “poços” de formatos irregulares na membrana externa, que é causada pela liberação progressiva das moléculas de lipoglicano e de proteínas membranares. Além disso, sugere-se que a Ag se liga nos grupos funcionais da proteína, resultando na sua desnaturação (Prabhu and Poullose, 2012; Raffi et al., 2008).

4. Conclusão

A adição de NPsAg em PEBD não interferiu nas propriedades físico-químicas e térmicas das embalagens. Os filmes PEBD + NPsAg, foram eficazes na inibição dos microrganismos estudados, sendo que a NPsAg apresentou uma ação antimicrobiana maior em bactérias Gram negativas e no fungo *Penicillium expansum* do que em bactérias Gram positivas. Os resultados demonstraram o potencial na utilização do polietileno de baixa

densidade incorporado com nanopartículas de prata por meio da extrusão, na ação antimicrobiana em embalagens de alimentos, principalmente em alimentos líquidos, o que pode auxiliar na manutenção da qualidade e redução de riscos de contaminação.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, pelo suporte financeiro e a Unesp e Embrapa pelo suporte técnico.

Referências

- Abdel-Mohsen, A.M., Abdel-Rahman, R.M., Fouda, M.M.G., Vojtova, L., Uhrova, L., Hassan, A.F., Al-Deyab, S.S., El-Shamy, I.E., Jancar, J., 2014. Preparation, characterization and cytotoxicity of schizophyllan/silver nanoparticle composite. *Carbohydr. Polym.* 102, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.040>
- Alabdulmohsen, Z., Saad, A., 2017. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Saudi Endod. J.* 7, 29. <https://doi.org/10.4103/1658-5984.197989>
- Avila-Sosa, R., Hernández-Zamoran, E., López-Mendoza, I., Palou, E., Munguía, M.T.J., Nevárez-Moorillón, G.V., López-Malo, A., 2010. Fungal inactivation by mexican oregano (*lippia berlandieri schauer*) essential oil added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *J. Food Sci.* 75. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01524.x>
- Becaro, A.A., Puti, F.C., Correa, D.S., Paris, E.C., Marconcini, J.M., Ferreira, M.D., 2015. Polyethylene Films Containing Silver Nanoparticles for Applications in Food Packaging: Characterization of Physico-Chemical

- and Anti-Microbial Properties. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 2148–2156.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9721>
- Boschetto, D.L., Lerin, L., Cansian, R., Pergher, S.B.C., Di Luccio, M., 2012.
Preparation and antimicrobial activity of polyethylene composite films
with silver exchanged zeolite-Y. *Chem. Eng. J.* 204–205, 210–216.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.111>
- Brody, A.L., Bugusu, B., Han, J.H., Sand, C.K., McHugh, T.H., 2008.
Innovative food packaging solutions. *J. Food Sci.* 73, 107–116.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x>
- Canevarolo, S. V, 2017. Microscopia Eletrônica da Varredura, in: Artliber
(Ed.), *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo, p. 448.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L.,
Aitken, R., Watkins, R., 2008. Applications and implications of
nanotechnologies for the food sector. *Food Addit. Contam. - Part A*
Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 25, 241–258.
<https://doi.org/10.1080/02652030701744538>
- Chen, X., Schluesener, H.J., 2008. Nanosilver: A nanoparticle in medical
application. *Toxicol. Lett.* 176, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>
- Damm, C., Neumann, M., Münstedt, H., 2005. Properties of nanosilver
coatings on polymethyl methacrylate. *Soft Mater.* 3, 71–88.
<https://doi.org/10.1080/15394450600766819>
- Dehnavi, A., Aroujalian, A., Raisi, A., Fazel, S., 2012. Preparation and
characterization of polyethylene/silver nanocomposite films with

- antibacterial activity. *J. Appl. Polym. Sci.* 127, 1180–1190.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Buonocore, G.G., Incoronato, A.L., Massaro, A., Panza, O., 2009. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *J. Food Eng.* 93, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.022>
- Duncan, T. V., 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *J. Colloid Interface Sci.* 363, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., Soleimani-Zad, S., 2010. Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 742–748.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.06.003>
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., Solimani-Zad, S., 2011. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on reducing pasteurization temperature of orange juice. *J. Food Process. Preserv.* 36, 104–112. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00558.x>
- Gava, A.J., Silva, C.A.B., Frias, J.R.G., 2008. Embalagens para alimentos, in: *Tecnologia de Alimentos: Princípios E Aplicações*. Nobel, São Paulo, p. 512.
- Gowri, L.A.V.S., Amorim, T., Carneiro, N., Souto, A.P., Esteves, M.F., 2011. Novel Copolymer for SiO₂ Nanoparticles Dispersion. *J. Appl. Polym. Sci.* 124, 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/app>
- Greiner, R., 2009. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. *Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 34, 243–260.

- Huang, R., Hou, B., Li, H., Fu, X., Xie, C., 2015. RSC Advances Preparation of silver nanoparticles supported mesoporous silica microspheres with perpendicularly aligned mesopore channels and their antibacterial activities. RSC Adv. 5, 61184–61190.
<https://doi.org/10.1039/C5RA06358B>
- Jokar, M., Abdul Rahman, R., Ibrahim, N.A., Abdullah, L.C., Tan, C.P., 2012. Melt Production and Antimicrobial Efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film. Food Bioprocess Technol. 5, 719–728. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0329-1>
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 3, 95–101.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kim, S., Lee, H., Ryu, D., 2011. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Korean J Microbiol ... 39, 77–85.
- Lacerda Júnior, O. da S., Cavalcanti, R.M., Matos, T.M., Venâncio, J. de B., Barros, I.B., Veiga-Júnior, V.F., Barros, I. de C.L., 2013. SÍNTESE DO MATERIAL MESOPOROSO MCM-41 USANDO ESPONJA DE ÁGUA-DOCE COMO FONTE DE SÍLICA. Quim. Nova 36, 1348–1353.
- Liu, F., Liu, H., Li, X., Zhao, H., Zhu, D., Zheng, Y., Li, C., 2012. Nano-TiO₂@Ag/PVC film with enhanced antibacterial activities and photocatalytic properties. Appl. Surf. Sci. 258, 4667–4671.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.01.058>

- Madani, M., 2011. Structure, optical and thermal decomposition characters of LDPE graft copolymers synthesized by gamma irradiation. *Curr. Appl. Phys.* 11, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.06.021>
- Marsh, K., Bugusu, B., 2007. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. *J. Food Sci.* 72, 39–55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- Mihindukulasuriya, S., Lim, L., 2014. Nanotechnology development in food packaging: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 40, 149–167.
- Miranda, V.R., Carvalho, A.J.F., 2011. Blendas compatíveis de amido termoplástico e polietileno de baixa densidade compatibilizadas com ácido cítrico. *Polímeros* 21, 353–360. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000067>
- Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A., Esmaeili, M.A., 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res. Microbiol.* 162, 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009>
- Mishra, A.K., Luyt, A.S., 2008. Effect of sol-gel derived nano-silica and organic peroxide on the thermal and mechanical properties of low-density polyethylene/wood flour composites. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.006>
- Motaung, T., Mochane, M., Makhetha, T., Motloun, S., Mokhothu, T., Mokhena, T., Moji, R., 2017. Effect of mechanical treatment on morphology and thermal and mechanical properties of sugar cane

- bagasse-low-density polyethylene composites. *Polym. Compos.* 38, 1497–1503. <https://doi.org/10.1002/pc.23717>
- Olmos, D., Martínez-Tarifa, J.M., González-Gaitano, G., González-Benito, J., 2012. Uniformly dispersed submicrometre BaTiO₃ particles in PS based composites. Morphology, structure and dielectric properties. *Polym. Test.* 31, 1121–1130. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.08.005>
- Pagno, C.H., Costa, T.M.H., De Menezes, E.W., Benvenuti, E. V., Hertz, P.F., Matte, C.R., Tosati, J. V., Monteiro, A.R., Rios, A.O., Flôres, S.H., 2015. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chem.* 173, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.068>
- Pérez, M.A., Rivas, B.L., Garrido-Miranda, K.A., Campos-Requena, V.H., Martínez, M., Castaño, J., Maldonado, Á., 2014. Low Density Polyethylene (LDPE) nanocomposites with passive and active barrier properties. *J. Chil. Chem. Soc.* 59, 2442–2446. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072014000200009>
- Piringer, O.G., Baner, A.L., 2000. *Plastic Packaging Materials for Food: Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance, and Legislation*, 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Prabhu, S., Poulouse, E.K., 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int. Nano Lett.* 2, 32. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>

- Puti, F.C., Becaro, A.A., Correa, D.S., Ferreira, M.D., 2014. Caracterização Físico-Química e Microbiológica de Filmes de PEBD com Nanopartículas para Aplicação como Embalagens para Alimentos, in: Anais Do SIAGRO. pp. 391–394.
- Qasim, M., Singh, B.R., Naqvi, A.H., Paik, P., Das, D., 2015. Silver nanoparticles embedded mesoporous SiO₂ nanosphere: an effective anticandidal agent against *Candida albicans* 077. *Nanotechnology* 26, 285102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/28/285102>
- Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T.M., Akhter, J.I., Hameed, A., Hasan, M.M., 2008. Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against *E.coli* ATCC-15224. *J. Mater. Sci. Technol.* 24, 192–196.
- Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M., Su Yin, L., 2012. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polym. Test.* 31, 1094–1099. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.07.015>
- Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 4, 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- Sadeghnejad, A., Aroujalian, A., Raisi, A., Fazel, S., 2014. Antibacterial nano silver coating on the surface of polyethylene films using corona discharge. *Surf. Coatings Technol.* 245, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.02.023>
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J.*

Colloid Interface Sci. 275, 177–182.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>

Spicigo, P.C., Trento, J.P., Bresolin, J.D., 2015. Methods of preparing flower stem samples for scanning electron microscopy. *Adv. Ornam. Hortic. an Landscaping* 21, 17–26.

Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J.L., Fan, B., 2014. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J. Endod.* 40, 285–290.

<https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>

Xia, X., Cai, S., Xie, C., 2006. Water absorption characteristics of novel Cu/LDPE nanocomposite for use in intrauterine devices. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 345–352. <https://doi.org/10.1002/jbmb>

Considerações Finais

Este estudo resultou na comprovação de que a adição de NPsAg em materiais poliméricos como o PEBD pode ser eficaz na redução da carga microbiana, e portanto embalagens aditivadas com nanopartículas podem ser uma alternativa benéfica para o controle da qualidade microbiológica de produtos alimentícios.

Nesta pesquisa foi verificado que fatores como as características singulares das bactérias Gram positivas, Gram negativas e dos fungos influenciam na intensidade da ação antimicrobiana das NPsAg, sendo menos eficazes nas Gram positivas. Além disso foi observado que as concentrações mais baixas de NPsAg apresentaram melhores resultados nas Gram negativas e nos fungos e concentrações intermediárias e as mais altas nos demais microrganismos.

A adição de NPsAg na matriz polimérica do PEBD não proporcionou modificações físicas, químicas e térmicas dos filmes quando comparado com o PEBD comercial, sendo conveniente para a possível comercialização deste produto.

REFERÊNCIAS

1. Food and agriculture organization of the united nations. Food wastage footprint: Impacts on natural resources [Internet]. 2013 [Acesso em: 20 de julho de 2016]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3347e/i3347e.pdf>.
2. Peixoto M, Pinto HS. Desperdício de alimentos: Questões socioambientais, econômicas e regulatórias [Internet]. Boletim Legislativo nº41. 2016 [acesso em: Acesso em: 20 de julho de 2016]. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/publicacoes/estudos-legislativos/tipos-de-estudos/boletins-legislativos/bol41>.
3. Soares AG. Desperdício de alimentos no Brasil: um desafio político e social a ser vencido [Internet]. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos. 2014 [Acesso em 21 de julho de 2016.]. Disponível em: <http://atividaderural.com.br/artigos/508fc56454d19.pdf>.
4. Espitia PJP, Batista RA. Non-thermal food preservation: controle f food borne pathogens through active food packaging nanotechnology. In: Ravishankar KV. Advances in Food Biotechnology. Chichester: Wiley blackwell, 2016.
5. Centers for disease control and prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2014, Annual Report In: centers for disease control and prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2014, Annual Report. Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2016.

6. Melo Franco BDG, Landgraf M. Importância dos microrganismos nos alimentos. In: Melo Franco BDG, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. Curitiba: Atheneu, 1996.
7. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. Doenças transmitidas por alimentos. In: Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008.
8. Kadariya J, Smith Tc; Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: na ongoing challenge in public helth. Biomed Res Int. 2014; 2014:1-10.
9. Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(2): 308-341.
10. Addis M, Sisay DA. review on major food borne bacterial illnesses. J Trop Dis. 2015; 3: 1-7.
11. Hennekinne JÁ, Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.FEMS. 2012; 36: 815-836.
12. Anvisa. *Enterococcus spp.* [Internet], [Acesso em: 14 de janeiro de 2018]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/imp_ent.htm.
13. Word Health Organization. E. coli. Media centre/ Fact sheets [Internet], 2016 [Acesso em: 30 de abril de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>.

14. Tannous J, Atoui A, El Khoury A, Francis Z, Oswald IP, Puel O, Lteif R. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. Food Sci Nutr. 2016; 4(4): 611-622.
15. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. O mundo microbiano e você. In: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
16. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2007;3(1):95–101.
17. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 2008;4(3):707–16.
18. Kim S, Lee H, Ryu D. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Korean J Microbiol. 2011;39(1):77–85.
19. Sarantópoulos CIGL. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças In: Sarantópoulos CIGL. Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens. Campinas: CETEA/ITAL, 2009.
20. Marsh K, Bugusu B. Food Packaging - Roles, Materials, and Environmental Issues. JFS. 2007; 72(3): 39-55.
21. Piringier IG, Baner AL. Plastic packaging materials for food. In: Piringier IG, Baner AL. Barrier, mass transport and legislation. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

22. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. Embalagens para alimentos. In: Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008.
23. Brody AL, Bugusu B, Han JH, Sand CL, Mchugh TH. Innovative food packaging solutions. J. Nanosci. Nanotechnol. 2008, 73(8): 107-116.
24. Manrich S. Processamento de termoplásticos In: Manrich S. Processamento de termoplásticos. São Paulo: Artliber, 2005.
25. Callister Jr. WD, Rethwisch DG. Características, aplicações e processamentos dos polímeros . In: Callister Jr. WD, Rethwisch DG. Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.
26. Associação brasileira da indústria do plástico (ABIPLAST). Perfil 2016- Indústria brasileira de transformação e reciclagem de materiais plásticos [Internet]. São Paulo: ABIPLAST, 2017 [Acesso em: 11 de abril de 2017]. Disponível em: http://file.abiplast.org.br/file/noticia/2017/folder_preview_perfil2016_separado.pdf.
27. Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas (FIPE). Setor de transformados de plásticos: caracterização, relevância, e sugestões de medidas de políticas produtiva para estimular a competitividade [Internet]. São Paulo: FIPE, 2008 [Acesso em: 11 de abril de 2017]. Disponível em: <http://www.abief.com.br/palestra.php>.

28. Sperling LH. Introduction to physical polymer Science. In: Sperling LH. Introduction to physical polymer Science. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.
29. Coutinho FMB, Mello IL, Santa Maria LC. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros*. 2003; 13(1): 1-13.
30. Greiner R. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. *Nutrire*. 2009; 34(1): 243.
31. Chaudhry Q, Scotte M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam*. 2008; 25(3): 241–258.
32. Joseph T, Morrison M. Nanoforum Report: Nanotechnology in Agriculture and Food. European Nanotechnology Gateway [Internet]. 2006 [Acesso em: 19 de julho de 2016]. Disponível em: ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanotechnology_in_agriculture_and_food.pdf.
33. Damm C, Neumann M, Münstedt H. Properties of nanosilver coatings on polymethyl methacrylate. *Soft Materials*. 2006; 3: 71-88.
34. Webster TJ. IJN's second year is now a part of nanomedicine history. In: Webster TJ. *J. Nanomed*. 2007; 2(1): 1-2.
35. Cai XJ, Xu YY. Nanomaterials in controlled drug release. *Cytotechnology*. 2011; 63(4): 319-323.
36. Correa DS, Pavinatto A, Mercante LA, Mattoso LHC, Oliveira JE. Chemical sensors based on hybrid nanomaterials for food analysis nanobiosensors. *Academic Press-Elsevier*. 2016; 8: 926.

37. Raj S, Rai A. Review: nanotechnology – the secreto f fifith industrial revolution and the future of next generation. Nusandra Bioscience. 2015; 7(2): 61-66.
38. Rivero PJ, Urrutia A, Goicoechea J, Arregui FJ. Nanomaterials for functional textiles and fibers. Nanoscale research letters. 2015; 10.
39. Sanchez C, Belleville P, Popall M, Nicole L. Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomateriasls: from laboratory to Market. Chemical society reviews. 2011; 40(2): 696-753.
40. Wang J, Vermerris W. Antimicrobial nanomaterials derived from natural products: A review. Materials. 2016; 9(4).
41. Miyazaki CM, Riul Junior AN. Sistemas de baixa dimensionalidade: nanopartículas. In: Da Róz AL, Leite FL, Ferreira M, Oliveira Jr. ON. Nanoestruturas: princípios e aplicações. 1 ed. Rio de Janeiro: elsevier, 2015.
42. Egger S, Lehmann RP, Height MJ, Loessner MJ, Schuppler M. Antimicrobial properties of a novel silver–silica nanocomposite material. Appl Environ Microbiol. 2009; 75:2973-2976.
43. Jokar M, Rahman RA, Ibrahim NA, Abdullah LC, Tan CP. Melt production and antimicrobial efficiency of low- density polyethylene (ldpe)-silver nanocomposite film. Food Bioproc Tech. 2012;.5: 719-728.
44. Dehnavi AS, Aroujalian A, Raisi A, Fazel S. Preparation and characterization of polyethylene/silver nanocomposite films with antibacterial activity. J. Appl. Polym. Sci. 2012; 127(2): 1180-1190.

45. Chen X, Schluesener H. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* 2008; 176(1):1-12.
46. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2012; 2(32):1-10.
47. 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 Science.* 2004;275:177–182.
48. Danilcauk M, Lund A, Saldo J, Yamada H, Michalik J. Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochimica, Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 2006; 63:189–191.
49. Kim JS, Kuk E, Yu K, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007; 3: 95–101.
50. Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki SI, Tsuchido T. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(7): 4278–4281.
51. Hatchett DW, Henry S. Electrochemistry of sulfur adlayers on low-index faces of silver. *J. Phys. Chem.* 1996; 100: 9854–9859.
52. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005; 16: 2346–2353.

53. Imran M, Revol-Junelles AM, Martyn A, Tehrany EA, Jacquot M, Linder M, Desobry S. Active food packaging evolution: transformation from micro- to nanotechnology. *Food Sci Nutr*. 2010; 50(9): 799-821.
54. Ducan TV. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *J. Colloid Interface Sc*. 2011; 363: 1-24.