

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**SHIRLENE SOUZA OLIVEIRA**

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EXTRATO DE AVELOZ  
E SEU EFEITO NA CONSERVAÇÃO E FISIOLOGIA DE MORANGO**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2019**

**SHIRLENE SOUZA OLIVEIRA**

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EXTRATO DE AVELOZ  
E SEU EFEITO NA CONSERVAÇÃO E FISIOLOGIA DE MORANGO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Dr. Gilberto Costa Braga

Linha de Pesquisa: Sistemas de Produção Sustentável

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2019**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Oliveira, Shirlene Souza

Biossíntese de nanopartículas de prata com extrato de aveloz e seu efeito na conservação e fisiologia de morango / Shirlene Souza Oliveira; orientador(a), Gilberto Costa Braga, 2019.

67 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

1. Fragaria x ananassa Duch. 2. Euphorbia tirucalli. 3. Síntese verde. 4. Nanopartículas de prata. I. Braga, Gilberto Costa . II. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

**SHIRLENE SOUZA OLIVEIRA**

Biossíntese de nanopartículas de prata com extrato de aveloz e seu efeito na conservação e fisiologia de morango

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Sistemas de Produção Vegetal Sustentáveis, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Gilberto Costa Braga

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

João Alexandre Lopes Dranski  
Faculdade Assis Gurgacz (FAG)

Marechal Cândido Rondon, 1 de março de 2019

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ser essencial em minha vida.*

*Ao meu pai Valmir Oliveira Lima.*

*Minha mãe Maria de Fátima Baia Souza.*

*Meus irmãos Sislem Souza Oliveira.*

*Marcilene Souza Oliveira.*

*Valmira Souza Lima.*

*Valdenir Souza Lima.*

*Valdirene Souza Lima.*

*Marciele Souza Lima.*

*DEDICO.*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, por cada momento que achei dificuldades no caminho, e Ele me deu forças para continuar a buscar meus sonhos e objetivos, sem fé em um futuro próspero e em que dias melhores virão, não se consegue avançar na estrada da vida.

Agradeço também a Jesus Cristo, meu advogado fiel, no qual recorri em momentos de aflição sempre que um novo desafio batia a porta. Muitas vezes tive medo de não conseguir, porém depois da oração a calma chegava e as forças eram renovadas. Agradeço também por cada amigo que o Senhor colocou em meu caminho e que ajudaram a construir esse trabalho.

Em especial, agradeço a minha família. A meus pais Valmir e Fátima que sempre acreditaram em mim, e que viram em meus esforços motivo para orgulho. Sigo com imensa gratidão por tê-los em minha vida. A cada um dos meus irmãos especialmente a Sislem e a Marcilene por estarem comigo sempre que precisei, e por terem sido meu alicerce, durante essa caminhada.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de Mestrado e Financiamento do projeto de pesquisa e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade concedida.

Quero agradecer também a meu orientador Gilberto Costa Braga, pelos ensinamentos repassados, por cada palavra de apoio e também pelas críticas, sem dúvidas foram de grande valia para mim, e me ajudaram a concluir essa fase. Agradeço aos professores José Renato Stangarlin, Vandeir Guimarães e Odair Kuhn pelo apoio, e também pela disponibilidade de ajudar, sempre que preciso no decorrer da pesquisa (uso de laboratório, indicação de profissionais para auxílio em análises, e também para coleta do material para pesquisa).

Agradeço também ao Jeferson Carvalho por todos os esclarecimentos e também por sempre se mostrar proativo durante as várias etapas de realização desse trabalho.

Agradeço também a meus amigos mais próximos, que por diversos momentos foram motivo para alegrias, mesmo estando longe de casa. Pode-se dizer que nós nos apoiamos mesmo diante das dificuldades, sem dúvidas sou grata a vocês Soraia Fortado, Noéle Cordeiro, Bruna Penha e Carlos Rego.

Agradeço também as minhas colegas de Laboratório Camila Podkoua e a Jessica Laureth por todo apoio e ajuda em vários momentos das atividades de laboratório. Agradeço ainda a Cleiton Hansel, Leila Werlang, Viviane Ruppenthal e Neusa Michelin.

E a todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente na construção e conclusão dessa fase, e na obtenção do título de mestra.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“A persistência é o caminho do êxito”.*  
*Charles Chaplin.*

*“Às vezes os milagres de Deus estão disfarçados, só precisamos enxergá-los”.*  
*Shirlene Oliveira.*

## RESUMO

OLIVEIRA, Shirlene Oliveira. Mestre em Agronomia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Março - 2019. **Biossíntese de nanopartículas de prata com extrato de aveloz e seu efeito na conservação e fisiologia de morango.** Orientador: Gilberto Costa Braga.

Fitomoléculas presentes no extrato de *Euphorbia tirucalli* (aveloz) podem reduzir íons de prata a nanopartículas em um processo denominado síntese verde. Nanopartículas de prata (AgNPs) tem eficiente ação antimicrobiana contra bactérias e fungos, mas pouco tem sido estudado sobre sua aplicação na agricultura, em especial contra fitopatógenos pós-colheita, e isso pode ser vantajoso para a conservação e extensão da vida útil de morangos armazenados. O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese verde de AgNPs com extrato de aveloz (Av), e avaliar seu efeito na conservação e fisiologia pós-colheita de morangos. Na síntese verde o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi reduzido com Av para produzir Av-AgNPs. A morfologia e o tamanho das Av-AgNPs foram analisados por microscópio eletrônico de varredura. A composição química foi determinada por *Energy Dispersive X-ray Spectrometry*, e a dispersão percentual dos tamanhos foi realizada através da difratometria a laser. A atividade antifúngica *in vitro* das Av-AgNPs foi testada contra *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato de aveloz e das Av-AgNPs foram analisados. Morangos foram tratados com Av-AgNPs (imersão) e armazenados (5 °C) por 12 dias. Taxa respiratória, índice de degradação, perda de massa fresca, firmeza, coloração, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos frutos foram avaliados. De acordo com os resultados, a síntese de Av-AgNPs foi confirmada com absorção máxima a 449 nm e apresentaram tamanhos entre 40 e 90 nm. Av-AgNPs mostraram inibição do crescimento de *B. cinerea*, mas foram menos efetivos para *R. stolonifer*. O conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante da solução de Av-AgNPs foram menores do que o extrato vegetal de aveloz. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, perda de massa fresca, coloração e firmeza dos morangos não foram influenciados por Av-AgNPs. Morangos tratados mostraram menor taxa respiratória do que o controle, e não mostraram sinais de degradação microbiológica até 9 dias de armazenamento. Este estudo mostrou que a síntese verde de AgNPs com extrato de aveloz produziu nanopartículas com tamanhos inferiores a 100 nm, e que as Av-AgNPs foram eficazes contra a degradação microbiológica dos morangos durante o armazenamento, que foi decisivo para sua melhor conservação.

Palavras chave: *Fragaria x ananassa* Duch. *Euphorbia tirucalli*. Síntese verde. Pós-colheita.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Shirlene Oliveira. Master in Agronomy. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February - 2019. **Post-harvest physiology and conservation of strawberry treated with biosynthesis of silver nanoparticles using aveloz extract.** Advisor: Gilberto Costa Braga

Phytomolecules in *Euphorbia tirucalli* (hazel) extract can reduce silver ions to nanoparticles in a process called green synthesis. Silver nanoparticles (AgNPs) have efficient antimicrobial action against bacteria and fungi, but little has been studied about their application in agriculture, especially against postharvest phytopathogens, and this may be beneficial for the conservation and extension of shelf life of stored strawberries. The objective of this work was to perform green synthesis of AgNPs with hazelnut extract (Av), and to evaluate their effect on conservation and postharvest physiology of strawberries. In green synthesis silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) was reduced with Av to produce Av-AgNPs. The morphology and size of Av-AgNPs were analyzed by scanning electron microscope. The chemical composition was determined by *Energy Dispersive X-ray Spectrometry*, and percentage size dispersion was performed by laser diffraction. The in vitro antifungal activity of Av-AgNPs was tested against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. Total phenolic compounds and antioxidant activity of hazelnut extract and Av-AgNPs were analyzed. Strawberries were treated with Av-AgNPs (dipping) and stored ( $5^\circ\text{C}$ ) for 12 days. Respiratory rate, degradation index, fresh mass loss, firmness, color, total phenolic compounds and antioxidant activity of the fruits were evaluated. According to the results, the synthesis of Av-AgNPs was confirmed with maximum absorption at 449 nm and presented sizes between 40 and 90 nm. Av-AgNPs showed inhibition of *B. cinerea* growth, but were less effective for *R. stolonifer*. The total phenolic content and antioxidant activity of the Av-AgNPs solution were lower than the hazelnut plant extract. Total phenolic compounds, antioxidant activity, fresh weight loss, color and firmness of strawberries were not influenced by Av-AgNPs. Treated strawberries showed lower respiratory rate than control, and showed no signs of microbiological degradation until 9 days of storage. This study showed that the green synthesis of AgNPs with hazelnut extract produced nanoparticles smaller than 100 nm, and that Av-AgNPs were effective against microbiological degradation of strawberries during storage, which was decisive for their better conservation.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch. *Euphorbia tirucalli*. Green synthesis. Postharvest.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AA	Atividade Antioxidante
AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
Ag	Prata
Ag <sup>+</sup>	Íons Prata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata
Av-AgNPs	Nanopartículas de Prata Biossintetizada por Extrato de Aveloz
C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	Isômeros de Triterpenos
CAM	<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CFT	Compostos Fenólicos Totais
EDS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FT	Fenóis Totais
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NP/NPs	Nanopartícula (s)
P-AgNPs	Nanopartículas de Prata Biossintetizadas por <i>Psidium guajava</i>
PEBD	Polietileno de alta densidade
PMF	Perda de Massa Fresca
RPS	Ressonância Plasmônica de Superfície
SD	Severidade de Degradação
SST	Sólidos Solúveis Totais
TR	Taxa Respiratória
ZnO	Óxido de Zinco
ZnONPs	Nanopartículas de Óxido de Zinco

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Plantas da família Euphorbiaceae usadas na biossíntese de AgNPs.....	8
Figura 2- Curva de calibração do ácido gálico para cálculo do teor de compostos fenólicos..	22
Figura 3 - Curva de calibração do Trolox para cálculo da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	23
Figura 4- Mudança de cor da reação de síntese de Av-AgNPs, a partir da mistura de extrato de aveloz com AgNO <sub>3</sub> , após 15 minutos (amarela claro) (a); após 30 minutos (vermelha púrpura) (b); após 60 minutos de reação (verde-escuro) (c). ....	24
Figura 5- Espectroscopia UV-vis de formação de Av-AgNPs na concentração de 3 mM de sal AgNO <sub>3</sub> , volume de 5 mL de extrato de aveloz em diferentes intervalos de tempo (15 – 60 minutos) a 50 °C no escuro.....	25
Figura 6- Micrografias de superfície (MEV-EC TESCAN, VEGA3) da amostra contendo nanopartículas de prata (AgNPs) após síntese verde com extrato de aveloz (Av).....	26
Figura 7- Distribuição granulométrica das Av-AgNPs (difração de laser). ....	27
Figura 8- Atividade antifúngica de Av-AgNPs no crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> em diferentes doses [(a) controle; (b) 1 mL (307,8 µg); (c) 2 mL (615,6 µg); (d) 3 mL (923,4 µg) ]. <i>R. stolonifer</i> [ (a) controle; (b) 1 mL (307,8 µg); (c) 2 mL (615,6 µg); (d) 3 mL (923,4 µg) ]. ....	31
Figura 9- Índice de degradação dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento.....	33
Figura 10- Taxa respiratória dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento.....	35
Figura 11- Perda de massa fresca (a) firmeza (b) e sólidos solúveis totais (c) dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizados com extrato de aveloz, durante armazenamento. ....	37
Figura 12 - Parâmetros CIELAB a* (a) e L* (b) dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento. ....	39
Figura 13- Compostos fenólicos totais (a) e atividade antioxidante (b) dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento. ....	41

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Plantas utilizadas na biossíntese de AgNPs. ....	7
Tabela 2- Composição química percentual das microrregiões da solução de Av-AgNPs biossintetizadas com extrato de aveloz (Av). ....	27
Tabela 3- Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais do extrato de aveloz e da solução de Av-AgNPs.....	29
Tabela 4- Atividade antifúngica <i>in vitro</i> das Av-AgNPs contra <i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i> . ....	31

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1	NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	3
2.2	SÍNTESE VERDE E CARACTERIZAÇÃO DE AgNPs .....	6
2.3	EXTRATO DE <i>Euphorbia tirucalli</i> (AVELOZ).....	8
2.4	MORANGO .....	10
2.5	COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTOXIDANTE.....	11
2.6	DEGRADAÇÃO PÓS-COLHEITA DO MORANGO .....	13
2.7	ATRIBUTOS DE QUALIDADE DO MORANGO .....	14
2.8	PERDA DE MASSA FRESCA, FIRMEZA, COR, SÓLIDOS SOLÚVEIS E TAXA RESPIRATÓRIA EM MORANGOS.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL .....	17
3.2	PREPARO DO EXTRATO DE AVELOZ .....	17
3.3	SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	17
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS Av-AgNPs.....	18
3.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DAS Av-AgNPs.....	18
3.6	ENSAIO Av-AgNPs NO ARMAZENAMENTO PÓS-COLHEITA DE MORANGO ...	19
3.7	PERDA DE MASSA FRESCA, FIRMEZA, COR, ÍNDICE DE DEGRADAÇÃO E SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS DOS MORANGOS NO ARMAZENAMENTO .....	20
3.8	TAXA DE RESPIRAÇÃO .....	21
3.9	COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	21
<b>3.9.1</b>	<b>Preparo do extrato.....</b>	<b>21</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Compostos fenólicos totais (CFT) .....</b>	<b>21</b>
<b>3.9.3</b>	<b>Atividade antioxidante (AA).....</b>	<b>22</b>
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	24
4.2	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DPPH DO EXTRATO DE AVELOZ E DAS Av-AgNPs.....	29
4.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE Av-AgNPs CONTRA <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	30
4.4	ENSAIO Av-AgNPs NO ARMAZENAMENTO PÓS-COLHEITA DE MORANGO ....	32
<b>4.4.1</b>	<b>Índice de degradação e taxa respiratória dos morangos no armazenamento.....</b>	<b>32</b>

<b>4.4.2 Perda de massa fresca, firmeza e sólidos solúveis totais dos morangos durante o armazenamento.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.3 Cor dos morangos durante o armazenamento.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.4 Compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (AA) dos morangos tratados com Av-AgNPs.....</b>	<b>40</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria × ananassa* Duch.) é uma das frutas mais apreciadas e consumidas no mundo. Por ser um órgão não climatérico, o morango é colhido em plena maturidade a fim de garantir seus atributos sensoriais (aparência visual, firmeza, sabor e cor) e sua qualidade nutricional (polifenóis, vitaminas e minerais) (DHITAL et al., 2017). Entretanto, devido a elevada taxa respiratória, textura macia, alta sensibilidade à choques e vibrações mecânicas o morango se mostra altamente perecível e com uma curta vida útil pós-colheita (SOGVAR et al., 2016). Deterioração por fungos como *Botrytis cinerea*, perda de massa fresca, lesões físicas e perda de firmeza durante a etapa pós-colheita estão entre os principais problemas para a comercialização e consumo do morango que, além de resultar em várias mudanças nas suas propriedades físico-químicas, pode conduzir a perdas pós-colheita significativas (LIU et al., 2018).

Embora os fungicidas sintéticos ainda sejam utilizados no manejo de patógenos do morango, a preocupação com o meio ambiente e os riscos associados à saúde leva à busca de abordagens alternativas (AHMED et al., 2016). Atualmente, a nanotecnologia tem potencial para se tornar uma das abordagens inovadoras para o controle de fitopatógenos devido às suas características, como elevada reatividade química e alta condutividade elétrica (GE et al., 2014).

Entre todas as nanopartículas metálicas, a prata tem sido usada em inúmeras aplicações, pois apresenta elevada atividade antimicrobiana e é seguro ao consumo humano, apesar de serem utilizadas na forma de metal livre puro ou como um composto (HUANG et al., 2015). Os processos de síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido amplamente pesquisados, uma vez que sua aplicação é amplamente demandada pelas indústrias de cosmética, terapêutica e farmacêutica (YIN et al., 2019). Comumente, as AgNPs são sintetizadas por uma variedade de métodos químicos e físicos, algumas vezes levando à produção de subprodutos não ecologicamente corretos (GE et al., 2014). Microrganismos (fungos e bactérias) também têm sido utilizados como sendo um método de biossíntese de AgNPs, entretanto apresenta desvantagem, pois depende da etapa de manutenção de culturas microbianas (RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017).

Outro método denominado “síntese verde” de AgNPs tem como base o uso de extrato de plantas ou biomassa de plantas como doadores de compostos redutores para a síntese das AgNPs, e tem sido uma alternativa ecológica contra métodos químicos e físicos (AHMED et al., 2016). Estudos com síntese verde de AgNPs mostraram resultados bem-sucedidos com o uso de extratos plantas, como *Jatropha curcas* (BAR et al., 2009),

*Euphorbia nivulia* (VALODKAR et al., 2011), *Hevea brasiliensis* (GUIDELLI et al., 2011), *E. antiquorum* (RAJKUBERAN et al., 2017), *E. confinalis* (MUKARATIRWA-MUCHANYEREYI et al., 2017) e *E. tirucalli* (KALAISELVI et al., 2019), sendo neste último estudo utilizado o látex puro da planta como extrato. Tais estudos confirmaram as propriedades antimicrobianas das AgNPs sintetizadas.

Neste estudo, a síntese verde de AgNPs com extrato integral de partes aéreas de *E. tirucalli* foi proposta. A planta *E. tirucalli*, comumente conhecida como aveloz, pertence à família *Euphorbiaceae* e é capaz de armazenar quantidades abundantes de látex que possui numerosas propriedades farmacológicas (KUSTER et al., 2015). Esse látex tem sido usado como alternativa a medicina tradicional em muitos países, incluindo Índia, Brasil, Indonésia e Malásia (GUPTA et al., 2013; ORLANDA; VALE, 2015) para o tratamento do câncer de próstata, asma, lepra, icterícia entre outros (MITTAL, CHISTI; BANERJEE, 2013). Este látex também tem atividades antibacterianas, inseticidas e nematicidas (MWINE et al., 2013; KALAISELVI et al. 2019).

Estudos anteriores comprovaram que os principais componentes ativos em *E. tirucalli* são conhecidos isômeros de triterpenos ( $C_{30}H_{50}O$ ), como euphol, tirucallol, glut-5-en-3-b-ol, cicloeupordenol, euphoringol, lanosterol, cicloartenol e outros (KALAISELVI et al., 2019). O látex de *E. tirucalli* é composto de hidrocarbonetos, em grande parte de triterpenóides  $C_{30}$  (MALI; PANCHAL, 2017). O extrato bruto desta planta tem potencial adequado para aplicações biológicas, mas nenhum relato foi encontrado sobre sua utilização como matriz para a síntese de AgNPs. Assim, o presente trabalho objetivou a síntese verde de AgNPs utilizando extrato de *E. tirucalli* e avaliar sua atividade antimicrobiana e seu efeito fisiológico em morangos armazenados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar com foco em várias áreas tecnológicas, como cosmética, têxteis, óptica, mecânica, eletrônica, medicina, energia, engenharia, agricultura e mais recentemente indústria de alimentos. O prefixo nano (do grego anão) é usado para indicar a ordem de grandeza de  $10^{-9}$  ou bilionésimo (SUH et al., 2009; FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018).

A nanotecnologia tem como objetivo a manipulação de átomos, moléculas e demais partículas, de ordem de grandeza nanométrica, para criar novos materiais com estruturas com diferentes propriedades (CARBONE et al., 2016). A principal característica que confere propriedades específicas aos nanomateriais é o seu pequeno tamanho, o que aumenta sua área de superfície para atingir maior reatividade (YIN et al., 2019).

Essas características são observadas devido aos efeitos quânticos, ou seja, os elétrons que se movem dentro de uma nanopartícula (NP) só podem possuir certas energias (níveis permitidos de energia). À medida que o tamanho é reduzido, esses níveis de energia mudam, resultando em mudanças de suas propriedades catalíticas, elétricas, magnéticas ou ópticas, quando comparadas às formulações convencionais do mesmo material de origem (YIN et al., 2019; FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018).

Tais propriedades conferem maior flexibilidade, maleabilidade e condutividade térmica e elétrica às NPs (GE et al., 2014), o que lhes permite transportar diferentes ingredientes e reagir contra condições ambientais, orgânica e inorgânica (SINGH et al., 2019). Atualmente, pesquisas tem avançado na área de nanotecnologia para encontrar soluções para os problemas relacionados ao meio ambiente, saúde humana, energia, patógenos, medicamentos e mais recentemente a indústria de alimentos (SINGH et al., 2019).

Nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido largamente estudadas no campo da nanotecnologia devido às suas propriedades antimicrobianas, tais como antibacteriano, antiviral e antifúngico, com grande estabilidade e baixo custo de obtenção, o que as torna amplamente utilizadas em produtos de consumo, incluindo plásticos, sabonetes, adesivos, metais e têxteis (CARBONE et al., 2016).

A prata (Ag) possui atividade biocida contra mais de 650 organismos patogênicos (bactérias, fungos e vírus) e o avanço da ciência moderna e da nanotecnologia ajudou a renovar

a sua importância. As aplicações das AgNPs continuam a ser amplamente estudadas, devido às suas notáveis características antimicrobianas, que estão associadas com a oxidação e liberação lenta de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) para o ambiente, tornando-as um agente antimicrobiano ideal (ARVIZO et al., 2012).

Os íons  $\text{Ag}^+$  apresentam amplo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, protozoários e certos vírus. Seus efeitos podem ser notados na desestruturação da parede e membrana celular, em organelas como ribossomos e mitocôndrias, na desnaturação de proteínas, destruição da bomba de prótons, bloqueio de processos metabólicos, respiração, e por causar danos ao DNA e na sua capacidade de replicação, de forma a ocasionar a morte de microrganismos (XIA et al., 2016; MARCHIORE et al., 2017).

Segundo Shinde, Lokhande e Lokhande (2014) as propriedades antimicrobianas dependem da dimensão, forma e suas interações com estabilizadores, que diferem por forma de preparação. Os métodos convencionais de síntese de AgNPs têm muitas limitações. Tais processos são geralmente lentos, têm custo elevado e envolvem a utilização de agentes redutores químicos, que representam perigo ao ambiente (RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017).

Além disso, nos processos de redução química, há dificuldade de separar impurezas na solução, como o ânion do precursor, agente redutor residual e seu produto de oxidação. Destaca-se ainda que AgNPs contendo impurezas não podem ser utilizadas na indústria alimentar (XU et al., 2013). Dessa forma métodos alternativos de obtenção de AgNPs como o de síntese verde tem se tornado motivo de pesquisa entre a comunidade científica.

Emamifar et al. (2010), utilizaram uma matriz polimérica de polietileno de baixa densidade (LDPE) contendo NPs de Ag e óxido de zinco (ZnO), para preservar e estender o prazo de validade de suco de laranja, e observaram que essa combinação de NPs combinada com o tratamento térmico (55-65 °C) foi eficaz contra fungos (leveduras e bolores). Esses autores ainda verificaram que a atividade antimicrobiana de AgNPs permitiu diminuir acentuadamente a temperatura de pasteurização do suco de laranja em 10 °C.

AgNPs podem agir como catalisadora da absorção e decomposição do etileno emitido a partir do metabolismo dos frutos, que tem sido postulado como um bloqueador de etileno. O amadurecimento de frutas e vegetais causado pelo gás pode ser portanto, retardado com a extensão da vida útil do produto (HUANG et al., 2015).

Em estudo com embalagem plástica polimérica de polietileno de baixa densidade a preservação da aparência e qualidade sensorial de amoras armazenadas (MOTLAGH;

MOSAVIAN; MORTAZAVI, 2013) e para a manutenção da qualidade de morangos durante o armazenamento prolongado (YANG et al., 2010), foi observado em nano-embalagens, obtidas com PEBD (polietileno de alta densidade) combinado com AgNPs, manutenção das qualidades sensoriais, físico-químicas e fisiológicas dos frutos de amoras e morangos em um nível mais alto em comparação com as embalagens normais realizadas com sacos de polietileno.

Mahdi, Vadood e Nourdahr (2012) avaliaram o efeito antimicrobiano de embalagens plásticas de PVC com AgNPs em carne picada, durante o armazenamento à temperatura de refrigeração (4 °C) e, após 7 dias de estudo, os autores observaram efeito inibitório do crescimento microbiano na carne, constatando também maior controle contra o crescimento de *Escherichia coli* em relação a *Staphylococcus aureus*.

Outros estudos com melão minimamente processado, realizado por Fernandez, Picouet e Lloret, (2010), mostrou que absorventes carregados com Ag reduziram a carga microbiana do fruto durante armazenamento. Em estudo realizado por Khalaf et al. (2013) com filmes de revestimento comestíveis incorporados com AgNPs e NPs de óxido de zinco (ZnONPs) na conservação de carne de peru, os autores constataram que amostras de carne revestidas com filme baseado em AgNPs demonstraram diminuição significativa na população de bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* durante 7 semanas de armazenamento.

Com o avanço da utilização e comercialização de nanotecnologias, cresce também a preocupação com a segurança para o consumidor, uma vez que poucos estudam o risco de seu uso (HUANG et al., 2011). Devido ao tamanho reduzido, as propriedades dos nanomateriais são diferentes das suas formas convencionais, sugerindo que sua toxicidade ainda não seja completamente compreendida (CARBONE et al., 2016). É importante quantificar as exposições humanas a nanometais como um procedimento importante para determinar riscos potenciais futuros (CUSHEN et al., 2014).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) declarou que é necessária uma avaliação de risco prudente, caso a caso, para substâncias deliberadamente projetadas no tamanho das partículas que exibem propriedades funcionais, físicas e químicas que diferem significativamente daquelas em maior escala até disponível sobre nanociência e nanotecnologias (HUANG et al., 2015).

A AESA também forneceu um documento de orientação sobre a avaliação potencial dos riscos dos nanomateriais para fins relacionados com os alimentos, que apresenta requisitos para a detecção, identificação e caracterização de nanomateriais. As recomendações não devem exceder 0,05 mg L<sup>-1</sup> em água e 0,05 mg Kg<sup>-1</sup> em alimentos. Isto implica que as avaliações dos perfis de migração de Ag são necessárias para garantir a eficácia antimicrobiana, respeitando a

legislação atual. A AESA publicou no ano de 2011 um documento (CARBONE et al., 2016), onde são indicados testes de genotoxicidade, absorção, distribuição, metabolismo e excreção requeridos aos fabricantes de produtos com AgNPs.

## 2.2 SINTESE VERDE E CARACTERIZAÇÃO DE AgNPs

Os métodos físicos de produção de AgNPs requerem alto consumo de energia e o método químico pode apresentar resíduos tóxicos nas partículas geradas e a sua não utilização em aplicações biológicas. A síntese verde de AgNPs tem ganhado forças no meio científico devido as suas características, tais como o uso de recursos naturais, rapidez, baixo impacto ambiental, utilização em larga escala e formação controlada e definida do tamanho das partículas (BEHRAVAN et al., 2019). A biossíntese de AgNPs ocorre devido a várias moléculas presentes no extrato vegetal, como enzimas, proteínas, flavonoides e terpenóides que atuam como agentes redutores de Ag na reação (RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017).

Extratos de plantas podem atuar tanto como agentes redutores, quanto como agentes estabilizadores na síntese de NPs (RASAE; GHANNADNIAA; BAGHSHAHIB, 2018).

Sabe-se que a matriz do extrato vegetal influencia as características das NPs, pois diferentes plantas contêm diferentes concentrações e combinações de agentes redutores orgânicos (SABRE, MIRTAJANI; KARIMZADEH, 2018).

Tipicamente, uma biorredução mediada por extrato de planta envolve o extrato aquoso com uma solução aquosa de sal de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). A reação ocorre à temperatura ambiente e geralmente é concluída em poucos minutos. A reação ocorre à temperatura ambiente e geralmente é concluída em poucos minutos, mas devido ao número de substâncias químicas envolvidas, o processo de biorredução é relativamente complexo (KALAISELVI et al., 2019). É válido ressaltar ainda que a natureza do extrato vegetal, sua concentração, a concentração do sal metálico, o pH, temperatura e tempo de contato são conhecidos por afetar a taxa de produção das NPs, sua quantidade e outras características (RASAE; GHANNADNIAA; BAGHSHAHIB, 2018).

A síntese verde de AgNPs produzem grandes quantidades de NPs que são livres de contaminação e têm tamanho e morfologia bem definidos (CHAHARDOLI; KARIMI; FATTAHI, 2018). De acordo com Mittal, Chisti e Banerjee (2013), AgNPs produzidas com extratos vegetais apresentam íons de 5 a 60 nm com formatos esféricos.

A banda de absorção plasmônica de superfície de AgNPs é diretamente afetada pelo tamanho e pela forma das NPs. Durante a reação de redução da Ag ocorre mudança de coloração

da solução, de incolor (solução de AgNO<sub>3</sub>), para amarelo (solução de AgNPs) (RASAE; GHANNADNIAA; BAGHSHAHIB, 2018). O estado de agregação das NPs pode ser determinado pela análise da coloração da solução de AgNPs. Pequenos agregados produzem mudanças na coloração que podem variar de amarelo, passando por laranja, violáceo e até elevados estados de agregação, com coloração acinzentada (RASHEED et al., 2017).

Várias plantas vêm sendo estudadas como matéria prima para a síntese verde de AgNPs, devido à importância crescente da utilização das NPs para uso antimicrobiano. Na Tabela 1 são listados alguns artigos, com as plantas que exibiram atividade de redução da Ag em AgNPs.

Tabela 1 - Plantas utilizadas na biossíntese de AgNPs.

<b>Planta</b>	<b>Tipo de AgNPs</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Referência</b>
<i>Acalypha indica</i>	Ag	20 a 30 nm	Krishnaraj et al. (2010)
<i>Allium sativum</i>	Ag	4 a 22 nm	Ahamed et al. (2011)
<i>Boswellia ovalifoliolata</i>	Ag	30 a 40 nm	Ankamwar et al. (2010)
<i>Camellia sinensis</i>	Ag	30 a 40 nm	Vilchis-Nestor et al. (2008)
<i>Catharanthus roseus</i>	Ag	48 a 67 nm	Ponarulselvam et al. (2012)
<i>Coleus aromático</i>	Ag	44 nm	Vanaja e Annadurai (2013)
<i>Garcinia mangostana</i>	Ag	35 nm	Veerasamy et al. (2011)
<i>Gelidiella actrosa</i>	Ag	22 nm	Vivek et al. (2011)
<i>Moringa olefera</i>	Ag	57 nm	Prasad e Elumalai (2011)

Fonte: Adaptado de Mittal, Chisti e Banerjee (2013).

Recentemente, tem surgido um interesse pela família Euphorbiaceae devido ao seu grande potencial terapêutico e antimicrobiano. Isso se deve ao fato de que diversos metabólitos secundários com caráter redutor estão presentes nas espécies vegetais pertencentes a essa família, de sorte que vários estudos têm sido relatados sobre a utilização das espécies desta família para a biossíntese de AgNPs. Até o momento se encontram na literatura estudos com *J. curcas* (BAR et al., 2009), *E. nivulia* (VALODKAR et al., 2011), *H. brasiliensis* (GUIDELLI et al., 2011), *E. antiquorum* (RAJKUBERAN et al., 2017), *E. confinalis* (MUKARATIRWA-MUCHANYEREYI et al., 2017), e mais recentemente com o uso do látex de *E. tirucalli* (KALAISELVI et al., 2019). A Figura 1 mostra exemplos de plantas da família Euphorbiaceae, descritas na literatura e que já foram usadas para síntese de AgNPs.

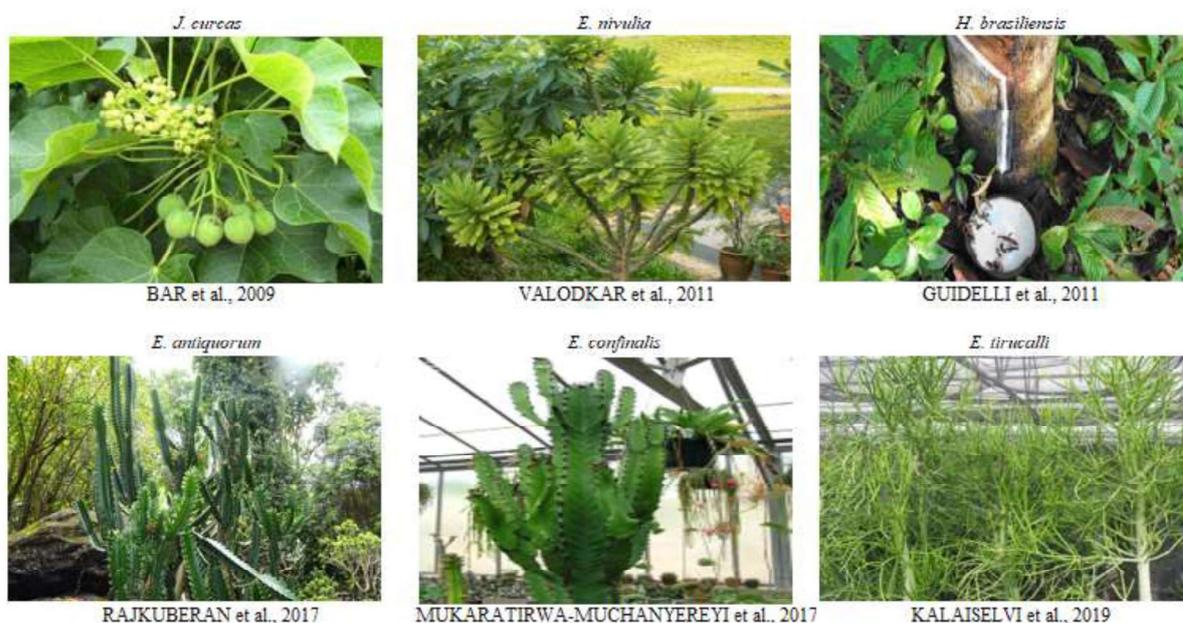


Figura 1- Plantas da família Euphorbiaceae usadas na biossíntese de AgNPs.

As NPs são geralmente caracterizadas por seu tamanho, forma, área de superfície e dispersividade (BEHRAVAN et al., 2019). A homogeneidade dessas propriedades é importante em muitas aplicações. As técnicas comuns de caracterização de NPs são: espectrofotometria UV-visível, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, difração de raios X e espectroscopia de energia dispersiva (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

A espectroscopia UV-visível é uma técnica comumente usada nos comprimentos de onda de luz de 300-800 nm para confirmar a formação de NPs de metal na faixa de tamanho de 2 a 100 nm (RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017). Medidas espectrofotométricas de absorção nas faixas de comprimentos de onda de 400 a 450 nm são utilizadas na confirmação de formação das AgNPs (KALAISELVI et al., 2019). A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para verificação morfológica das AgNPs em escala nanométrica a micrométrica (RAJKUBERAN et al., 2017).

### 2.3 EXTRATO DE *Euphorbia tirucalli* (AVELOZ)

A espécie de *E. tirucalli* é uma planta nativa de regiões temperadas, originária da África e América, foi trazida para países tropicais, incluindo o Brasil, onde é encontrado no estado do Amazonas, na região nordeste, e também no litoral do Estado de São Paulo (ALVES;

NEPUMOCENO, 2012). Esta planta possui uma grande capacidade de aclimação, tendo em vista sua ampla distribuição geográfica em países tropicais. No Brasil é encontrado principalmente na região Nordeste, porém pode ocorrer também nos demais estados (ALVES; NEPUMOCENO, 2012; TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

A mesma é conhecida popularmente como “aveloz”. Sua classificação taxonômica consiste em domínio: Eukaryota, reino: Plantae, sub-reino: Tracheobionta, divisão: Magnoliophyta, super-divisão: Spermatophyta, classe: Magnoliopsida, subclasse: Rosidae, ordem: Malpighiales, gênero: Euphorbia, família: Euphorbiaceae, espécie: *E. tirucalli* (MALI; PANCHAL, 2017). Representada por 334 gêneros e aproximadamente 8000 espécies (TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

Botanicamente, *E. tirucalli* é um arbusto, ou pequena árvore que pode crescer até 12 metros de altura. As folhas são pequenas oblongo-lineares, pontiagudas e oblanceoladas, 1,3 a 2,5 cm de comprimento e 2 cm de largura. O látex é uma seiva cáustica branca e leitosa. (MALI; PANCHAL, 2017). Apresenta tronco e ramos lenhosos de cor marrom-claro ou acinzentado, do qual surgem os ramos jovens que são verdes e cilíndricos (ORLANDA; VALE, 2015). Plantas da família Euphorbiaceae armazenam quantidades abundantes de látex em um órgão laticíferos, por isso são classificadas como plantas suculentas (KUSTER et al., 2015).

Na literatura, em diversas culturas é descrito o uso popular do aveloz medicinalmente como analgésico, anti-inflamatório, emético, laxativo, impotência, estimulante do sistema imune, tratamento de câncer, antiescorpiônica, ofídica, purgativo, antirreumático, antiasmático, antiespasmódico, antibiótico, antivirótico, expectorante, fungicida, antissifilítico, tratamento de carcinomas - epitelomas benignos e cauterizante de verrugas (ORLANDA; VALE, 2015). Sendo realmente eficazes como agentes terapêuticos, devido aos seus constituintes químicos ativos.

Orlanda e Vale (2015) realizaram uma triagem fitoquímica do extrato da parte aérea do aveloz, e na fração etanólica das partes aéreas da espécie vegetal, através de reações químicas cromogênicas ou de precipitação, foram indicados a presença de açúcares redutores, alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides e triterpenóides. Mali e Panchal (2017) confirmaram que essa planta contém flavonóides, diterpenos, esteróides, alcalóides e taninos como importantes fitoconstituintes.

Composições diferentes vêm sendo estudadas de *E. tirucalli*, a planta inteira apresenta cerca de 7,4% de ácido cítrico, succínico e malônico (VUONG et al., 2015). Em trabalhos realizados por Kuster et al. (2015) foi observado que os principais constituintes ativos encontrados em *E. tirucalli* são conhecidos como  $C_{30}H_{50}O$ , tais como euphol e tirucalol

(KALAISELVI et al., 2019). O látex fresco contém álcool terpênico, taraxasterol e tirucallol (MALI; PANCHAL, 2017). Os principais constituintes do látex da haste de *E. tirucalli* são a água (53,8-79,9%), tiglane (ésteres de forbol) e ingenane (ésteres de ingenol). Látex fresco contém álcool terpênico, taraxasterol e tirucallol (VUONG et al., 2015).

Os constituintes ativos encontrados em *E. tirucalli* são responsáveis pelos seus efeitos antimicrobianos, antifúngicos e antibacterianos relatados em várias pesquisas com essa planta. Estudos têm comprovado que o látex de *E. tirucalli* compreende características contra pragas como *Brevicoryne brassicae* (Aphids) (MWINE et al., 2013), *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Mosquitos) (RAHUMAN et al., 2008). Também contra microrganismos *Staphylococcus aureus* (Bacteria) (MALI; PANCHAL, 2017), e *Lymnaea natalensis* (Mollusks) e *Biomphalaria glabrata* (TIWARI; SINGH, 2006). A toxicidade do látex é dependente da dosagem para nematoides parasitas como *Hoplolaimus indicus*, *Helicotylenchus indicus* e *Tylenchus filiformis* (MALI; PANCHAL, 2017).

A atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *E. tirucalli* foi testada por Ibrahim et al. (2018), quando observaram que os efeitos antimicrobianos do extrato vegetal são altos contra bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* e *Shigella dysenteriae*) e moderados a baixos contra bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp.*) e *Candida albicans*. Esses autores relataram que a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais contra os microrganismos testados sugere a presença de compostos antibióticos de amplo espectro na planta.

Vários estudos demonstram que o látex de *E. tirucalli* é adequado para várias aplicações biológicas. Kalaiselvi et al. (2019) utilizaram o látex da planta para a síntese de AgNPs e também avaliaram a atividade nematicida sobre nematoide *Meloidogyne incognita*, os autores observaram que a concentração de 3% do extrato de látex foi eficiente na redução dos Ag<sup>+</sup> e na formação de AgNPs, que apresentou efeito nematicida forte em cultivo de tomate pela redução da infecção por nematoides sem causar toxicidade as plantas.

## 2.4 MORANGO

O morango é uma espécie herbácea pertencente à família Rosaceae com mais de 20 espécies, possuindo folhas trifolioladas e flores brancas. A porção vermelha comestível do morango não é botanicamente um fruto, mas sim um receptáculo carnoso, sendo os frutos verdadeiros, os aquênios individuais localizados na parte externa (VERGAUWEN; SMET, 2019).

O mesmo é classificado como pseudofruto, pertencente ao grupo de cultivo de pequenas frutas, é considerado um produto de elevado retorno financeiro ao produtor (ANTUNES, 2018). A espécie *Fragaria ananassa*, conhecida como morango de jardim, é um híbrido entre as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana*, combinando o tamanho dos frutos da primeira com o sabor adocicado da segunda espécie (VERGAUWEN; SMET, 2019).

De acordo com as Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, a produção de morango na indústria global foi de 11 milhões de toneladas no ano de 2014. Os Estados Unidos são o maior produtor mundial com 12,2% da produção mundial, seguidos pelo México, Turquia e Espanha (RODRÍGUEZ-GUITIÉRREZ et al., 2019).

Com a maior produção de morangos do mundo nos Estados Unidos cerca de 80 % da produção vão para o mercado de produtos frescos (DHITAL et al., 2018). A produção brasileira de morango é a maior da América do Sul, respondendo por 155 mil toneladas, em 4.300 hectares de cultivo em 2017, e está entre os 20 maiores produtores mundiais, sendo os Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo as principais regiões produtoras, em termos de comercialização o mercado de morangos fresco também é o principal destino da produção brasileira, estima-se que cerca de 90% da produção tem esse destino de mercado (ANTUNES, 2018).

## 2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Compostos fenólicos são antioxidantes abundantes caracterizados pela presença dos grupos hidroxila em anéis aromáticos e podem ser classificados como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, xantonas, estilbenos e lignanas, sendo cada um dotado de diferentes mecanismos de ação, de acordo com sua particularidade estrutural, conferindo propriedades antioxidantes aos compostos (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JÚNIOR, 2019).

Antioxidantes são substâncias que combatem a oxidação promovida por oxigênios ou peróxidos (radicais livres), ou seja, previnem reações de oxidação causadas pelos radicais livres, que são conhecidos também como espécies reativas do oxigênio (EROs). EROs são moléculas com um ou mais elétrons não pareados formados durante o processo normal do metabolismo aeróbico em constante busca por um elétron livre para emparelhar, causando oxidação em outras moléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, espalhando cadeias de oxidação (VALERO; SERRANO, 2010).

O consumo de frutas de modo geral, está associada a prevenção de doenças crônicas e do envelhecimento precoce, e o morango tem sido considerado como uma excelente fonte de

antioxidantes, como compostos fenólicos, principalmente antocianinas, e ácido ascórbico (AVALOS-LLANO; MARTÍN-BELLOSO; SOLIVA-FORTUNY, 2018).

Os efeitos a saúde humana como alimento funcional do morango se devem a combinação entre nutrientes fitoquímicos e as fibras. Possuem vitaminas do grupo B, vitamina C, vitamina E, potássio, ácido fólico, carotenóides e flavonóides e específicos como a pelargonodina, quercetina e catequina ou o tilirósico que é um flavanoide glicosídico e possui atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênico e hepatoprotetoras (GIAMPIERI et al., 2012; GOTO et al., 2012 ).

Os fitoquímicos de morangos são representados principalmente pela extensa classe de compostos fenólicos. A classe principal de compostos fenólicos é representada pelos flavonóides (principalmente antocianinas, como flavonóis e ácidos fenólicos. A alta capacidade antioxidante dos morangos é devida principalmente a presença de ácido ascórbico, elagitaninos e antocianinas (LAFARGA et al., 2019).

Compostos fenólicos são substâncias aromáticas hidroxiladas, variando de polímeros à pequenas moléculas, sendo classificados geralmente em fenóis e polifenóis. Inserido no termo fenol, encontra-se os fenóis simples, fenóis ácidos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos e lignanas. Dentre os compostos fenólicos, o principal composto encontrado em órgãos vegetais são as antocianinas, sendo a malvidina, a antocianina mais abundante em frutos de morango com 150 a 750 mg Kg<sup>-1</sup> de peso fresco (ARAÚJO, 2011).

Sabe-se que as antocianinas são os compostos fenólicos de maior representatividade nos morangos, e estudos determinaram seu conteúdo em torno de 150 a 600 mg de antocianinas por Kg de morangos frescos, já tendo sido relatado valores até 800 mg Kg<sup>-1</sup> por peso fresco. Dentre os mais de 25 tipos de antocianinas presentes nas diversas variedades de morango, a pelargonidina-3-glicosídeo é a principal quanto a quantidade, enquanto a cianidina-3-glicosídeo é a mais constante, embora esteja presente em menores proporções (GIAMPIERI et al., 2012).

Os frutos de morango também possuem pequenas quantidades de outros compostos fenólicos, sendo os flavonóis derivados da quercetina, os mais abundantes. Os flavonóis podem ser encontrados na forma de catequinas, taninos ou procianidinas, de acordo com sua estrutura, as quais são dotadas de propriedades antioxidante, antimicrobianas, antialérgicas, além de inibir a atividade de algumas enzimas (GIAMPIERI et al., 2012).

Estudos apontam que o morango apresenta níveis de compostos fenólicos 2 a 11 vezes superior a outros frutos, como maçã, pêssego e tomate (GIAMPIERI et al., 2012). Na literatura é descrito que o ácido ascórbico é responsável por cerca de 30% da atividade antioxidante (AA)

de diferentes cultivares de morango e as antocianinas por 25% a 40%, confirmando que estes compostos são, de fato, responsáveis pela alta AA dos frutos (TULIPANI et al., 2008).

A composição dos morangos varia ao longo de seu crescimento e estágio de desenvolvimento e, na maioria dos casos, a polpa verde apresenta níveis mais altos de compostos fenólicos e capacidade antioxidante do que a polpa madura (PILJAC-ŽEGARAC; ŠAMEC, 2011). A quantidade de antocianinas também muda, mas com tendência oposta, ou seja, as antocianinas acumulam-se no estágio vermelho (JIN et al., 2011).

A atividade antioxidante também varia com a mesma tendência de compostos fenólicos no fruto, a atividade antioxidante total diminui gradualmente durante a pós-colheita e esta diminuição está estritamente associada a uma forte diminuição nos taninos, enquanto os antioxidantes não fenólicos polares, como a vitamina C, aumentam ligeiramente após a colheita, sem afetar a tendência decrescente (JIN et al., 2011).

O armazenamento afeta positivamente a capacidade antioxidante dos morangos, porque as reações complexas que ocorrem dentro deles durante o período pós-colheita podem facilitar a formação de compostos com maior capacidade antioxidante, mesmo quando atributos como paladar e olfato já se deterioraram significativamente (PILJAC-ŽEGARAC; ŠAMEC, 2011). Em geral, a atividade antioxidante total aumenta durante o armazenamento, ou permanece estável, mas um tempo de exposição mais longo e uma temperatura mais alta de armazenamento aumentam a capacidade antioxidante (GIAMPIERI et al., 2012).

## 2.6 DEGRADAÇÃO PÓS-COLHEITA DO MORANGO

O fruto de morango é altamente perecível e suscetível a ataques de fungos e bactérias durante o armazenamento à temperatura ambiente, as perdas por deterioração de morango podem chegar a 40% (SOGVAR et al., 2016). O mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* é uma das principais doenças pós-colheita que limita o tempo de armazenamento de morangos (LAFARGA et al., 2019).

Tradicionalmente, fungicidas tem sido amplamente utilizados para prevenir o decaimento pós-colheita de frutos de morango. No entanto, os consumidores preocupam-se com os efeitos potencialmente nocivos dos resíduos químicos, além do impacto ambiental causado pelos fungicidas sintéticos. Assim, é necessário buscar novas estratégias para controlar a degradação pós-colheita em frutos de morango (JIN et al., 2017).

Considerados principais organismos que ocasionam a deterioração dos morangos, algumas espécies de fungos e bactérias frequentemente são identificadas sobre a superfície do

morango. O mofo cinzento causado por *B. cinerea* é o principal responsável pela decomposição fúngica em morangos e o principal contribuinte para as perdas pós-colheita gerais (LAFARGA et al., 2019).

Tournas e Katsoudas (2015) identificaram ambos, *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, como principais microrganismos de deterioração em morangos responsável pela podridão negra pós-colheita (ZHANG et al., 2015). Várias leveduras e bactérias também foram relatadas em superfície de morangos. Estudos realizados por Jensen et al. (2013) identificaram 9 gêneros dos quais espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorulaform* eram dominantes. No mesmo estudo, os autores isolaram grande número de bactérias incluindo as do gênero *Curtobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Rahnella*.

## 2.7 ATRIBUTOS DE QUALIDADE DO MORANGO

O morango é considerado um fruto de clima temperado e muito atrativo por sua coloração vermelha-brilhante, odor característico, textura macia e o sabor levemente acidificado. O sabor característico é resultado da relação entre seus teores de acidez e açúcares, dentre os quais predominam a glicose, a frutose e a sacarose. Possui elevado teor de ácido ascórbico, 60-70 mg 100 g<sup>-1</sup> (NIZIOL; MISIOREK; RUMAN, 2019).

O morango é classificado como fruto não climatérico, porém apresenta alta taxa respiratória e baixa produção de etileno ( $< 0,1 \mu\text{L Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), ou seja, a estimulação para o amadurecimento não corre por aplicação de etileno (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Contudo, possui grande suscetibilidade a lesões mecânicas e doenças, e elevada taxa de perda de água. Esse conjunto de fatores contribui para a rápida deterioração, o que resulta em menor período de conservação pós-colheita (FLORES-CANTILLANO, 2003).

O ponto de colheita do morango para fins industriais é quando o fruto apresenta 90-100% da superfície vermelha, e até 75% para a comercialização *in natura* (FLORES-CASTILHO, 2003). Injúrias mecânicas tornam o morango mais suscetível ao ataque de patógenos, além de causar avanços na deterioração fisiológica e na perda de massa fresca, conduzindo a rápidas perdas pós-colheita (SOGVAR et al., 2016; BARIKLOO; AHMADI, 2018; YAN et al., 2019). Nesse aspecto a temperatura durante o armazenamento é fator de grande importância para conservação de morangos. Temperaturas baixas são mais adequadas para a retenção da qualidade do fruto, uma vez que há redução da atividade microbiana e respiratória (ANDRADE JÚNIOR et al., 2016).

O morango conserva boa qualidade por até dois dias quando armazenado sem refrigeração, e essa curta vida útil é devido à degradação nas suas propriedades de brilho, sabor e aroma característicos. Desta forma, são exigidos métodos de conservação pós-colheita para prolongar a vida de prateleira desses frutos, e com isso manter os atributos sensoriais e nutricionais por mais tempo. (BARIKLOO; AHMADI, 2018; MATAR et al., 2018).

O intenso metabolismo do morango é responsável pela alta perecibilidade, e indica a recomendação do uso de armazenamento refrigerado. A refrigeração tem por objetivo reduzir a taxa respiratória, de forma a reter textura, cor, brilho e aroma do morango, além de prevenir a degradação por patógenos, cuja temperatura recomendada para o armazenamento é de 0 °C e 90-95% de umidade relativa do ar (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

## 2.8 PERDA DE MASSA FRESCA, FIRMEZA, COR, SÓLIDOS SOLÚVEIS E TAXA RESPIRATÓRIA EM MORANGOS

A qualidade de morangos é dependente de atributos, como coloração, firmeza e compostos químicos, sendo a coloração, uma das mais importantes características visuais para a aceitação do consumidor, a qual é resultado da acumulação de antocianinas, um composto fenólico com propriedades antioxidantes. (ORNELAS-PAZ et al., 2013). O sabor e o aroma são definidos pelo balanço entre sólidos solúveis e acidez titulável, porém, frutos mais adocicados são, de forma geral, mais aceitos pelo consumidor, e tal característica é graças aos sólidos solúveis presentes, os quais podem variar em quantidade entre as diferentes cultivares de morango (CAO et al., 2015).

Frutos são órgãos vegetais metabolicamente ativos e não cessam o processo respiratório após a colheita, isso ocorre devido ao consumo de componentes como açúcares e ácidos orgânicos, que servem de substrato respiratório (KERBAUY, 2012; KESHRI et al., 2019). A respiração corresponde as reações oxidação de compostos orgânicos (ácidos orgânicos e carboidratos) que são transformados em água e dióxido de carbono com produção de energia química utilizada para a biossíntese de novos compostos necessários à sobrevivência dos frutos (CHITARRA, 2005).

De acordo com a intensidade das reações bioquímicas, os tecidos podem atingir rapidamente a senescência, tornando-se mais susceptíveis a perda de umidade e ao desenvolvimento de microrganismos (CHITARRA, 2005). Portanto o controle da respiração é condição primordial para a manutenção da qualidade e para o prolongamento da vida útil do morango. Frutos não climatéricos, como morango apresentam atividade respiratória baixa e

constante após a colheita (CHITARRA et al., 2005). Diretamente relacionado a taxa respiratória dos frutos está a temperatura, onde baixas temperaturas são capazes de manter baixas taxas de respiração pelos frutos de modo geral (KERBAUY, 2012; KESHRI et al., 2019).

A firmeza é um importante atributo de qualidade que auxilia a avaliar a qualidade e maturação do fruto, e esta, quando em níveis adequados, pode reduzir injúrias mecânicas causadas durante o transporte do fruto em sua pós-colheita. É realizada por equipamento denominado penetrômetro/texturômetro, com valores expressos em Newton (JANTRA et al., 2018).

O tempo em que um fruto leva para iniciar o processo de perda de firmeza depende da espécie e de fatores pré e pós-colheita, porém, durante o armazenamento este processo tende a ser retardado (GOLDBERG; AGRA; BEN-ARIE, 2019).

A coloração dos alimentos, de forma geral, é um dos atributos de maior importância para atrair a atenção do consumidor. Em morangos, a cor vermelha brilhante é graças a presença de antocianinas, a qual faz parte do grupo dos compostos fenólicos, porém trata-se de um composto de fácil degradação durante armazenamento (BERMEJO-PRADA; OTERO, 2016).

A perda de coloração está associada, principalmente, a oxidações catalisadas por enzimas, como polifenoloxidase, peroxidase e demais, que agem na degradação de compostos fenólicos, as quais também sofrem influência de fatores ambientais como temperatura, luz, O<sub>2</sub> e pH (WANG; ZHANG; WU, 2015; BERMEJO-PRADA; OTERO, 2016).

A perda de massa em produtos frescos é mensurada pela quantidade de água ou de massa perdida por unidade de tempo, ou seja, ocorre devido à perda de água através da respiração e transpiração, gerando danos econômicos quantitativos e qualitativos na comercialização do produto (SANCHES et al., 2016; BOVI et al., 2018).

A transpiração é um processo físico no qual a água permeia para o ambiente através dos estômatos e epiderme, ou até mesmo por lenticelas, dependendo do fruto. Está relacionada com o déficit de pressão do vapor entre a atmosfera e o fruto. Órgãos vegetais com epidermes injuriadas tendem a perder mais água, devido a maior produção de etileno, e conseqüentemente, a maior taxa de respiração (VALERO; SERRANO, 2010).

Segundo os mesmos autores, durante o período pós-colheita, a turgidez é uma das principais condições responsáveis pela aparência de frescor dos frutos, condição esta que pode ser mantida por maior tempo quando o fruto é armazenado sob temperatura e umidade relativa adequada, quando associada à coloração, desempenha importante papel na escolha do consumidor no momento da compra destes produtos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

A espécie vegetal foi coletada no município de Santa Helena, estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil, com coordenadas geográficas latitude de 24°51'68" S e longitude 54°20'26" W no período de novembro de 2017. A identificação botânica da espécie em estudo foi realizada pelo Herbário UNOP, Unioeste-Campus Cascavel, e confirmada como pertencente à família Euphorbiaceae, cujo nome científico é *Euphorbia tirucalli* Linneau (aveloz) conforme característica das folhas e galhos do material vegetal contido na exsicata. A exsicata encontra-se depositada no herbário dessa instituição, sob registro 02/2019.

#### 3.2 PREPARO DO EXTRATO DE AVELOZ

Partes aéreas de aveloz recém coletadas da planta foram secas em estufa de ar circulante a 60 °C por 48 horas. Depois, o material seco foi moído em moinho de facas (Tecnal, 680) e, em seguida, foi peneirado em peneira granulométrica (350  $\mu$ m). Foi preparado extrato aquoso adicionando 5 g de aveloz seco e moído em 100 mL de água destilada, que depois foi aquecida a 80 °C e mantida por 10 minutos sob agitação constante em agitador magnético (Fisaton, 735 a). Depois, o extrato foi centrifugado a 1,600 g (Excelsa Baby II, 206 R) por 20 minutos e então foi filtrado através de papel filtro qualitativo (porosidade de 3  $\mu$ m) e imediatamente utilizado como agente redutor e estabilizante na síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) (SABRE, MIRTAJANI; KARIMZADEH, 2018; KALAISELVI et al., 2019).

#### 3.3 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese verde de AgNPs foi baseada na metodologia de Sabre, Mirtajani; Karimzadeh (2018), utilizando o extrato de aveloz. O volume de 5 mL do extrato aquoso de aveloz foi adicionado a 95 mL de solução aquosa de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) 3,0 mM e submetido a agitação constante (agitador magnético) a 50 °C no escuro durante 1 hora. Esta proporção de mistura de  $\text{AgNO}_3$  foi fixada por confirmação da reação de biossíntese através de testes preliminares com espectroscopia de varredura UV-Vis (Shimadzu, UV 1800). Devido à excitação da ressonância plasmônica de superfície (RPS) das AgNPs, a cor da solução foi

inicialmente alterada de amarela para vermelho castanho e finalmente em marrom, indicando a formação de Av-AgNPs.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS Av-AgNPs

A biorredução de íons Ag (I) para Ag (0) e formação de AgNPs foi indicada por espectroscopia. O espectro de absorção da mistura foi determinado no espectrofotômetro UV-VIS no modo varredura em intervalo de 300 a 700 nm e resolução de 1 nm. As leituras de varredura foram realizadas durante 60 minutos, com intervalos de 15 minutos desde o início do tempo de reação, ou seja, a cada 15 minutos uma amostra era recolhida do béquer e realizada a leitura. A solução de Av-AgNPs foi filtrada através de filtro de papel Whatman (0,45 µm) e posteriormente foi acondicionada em frasco âmbar morfológica e de tamanho.

A morfologia e o tamanho das Av-AgNPs foram caracterizados através de micrografias de superfície da amostra seca, que foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Tescan, Vega3) no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, UFPR, setor Palotina. Após agitação em banho de ultrassom por 30 minutos e à temperatura ambiente, uma alíquota da solução de Av-AgNPs foi espalhada em um suporte de amostra em uma fita de carbono dupla face, sendo posteriormente seco e metalizado com uma fina camada de ouro na superfície (pulverização catódica). As micrografias foram obtidas no módulo de elétrons secundários (SE) com detector de elétrons secundários.

A composição química das microrregiões das amostras foi analisada por EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) com o detector de raios X (Oxford Instruments, X-act). A distribuição de tamanhos (%) das partículas de Av-AgNPs foi determinada usando um analisador de tamanho de partículas Nanoptic 90 Nano Laser (Dandong Bettersize Instruments Ltd., China) (RAJKUBERAN et al., 2017; RASAE; GHANNADNIAA; BAGHSHAHIB, 2018; SABRE, MIRTAJANI; KARIMZADEH, 2018). Ambas as análises também foram realizadas no Laboratório de Microscopia da UFPR (ELLENDERSEN et al., 2018).

### 3.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DAS Av-AgNPs

Estruturas fúngicas dos patógenos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* foram isoladas diretamente da superfície lesionada de morangos doentes. Os isolados foram repicados e multiplicados isoladamente em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-agar (BDA) previamente autoclavadas a 120 °C durante 15 minutos. Após repicagem em fluxo laminar, as

placas foram encaminhadas para câmaras BOD reguladas a  $25 \pm 0,5$  °C e 12 horas de fotoperíodo, onde permaneceram durante 7 dias para crescimento e esporulação dos fungos.

Para se avaliar o efeito de Av-AgNPs sobre o desenvolvimento de *B. cinerea* e *R. stolonifer*, três volumes de Av-AgNPs (1 mL; 2 mL e 3 mL) foram testados. Estes foram adicionados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) fundente, de modo a se obter as respectivas concentrações (307,8 µg; 615,6 µg e 923,4 µg) conforme metodologia descrita por Nascimento et al. (2013). Como controle foram utilizadas placas contendo apenas meio de cultura BDA, vertidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e depois de sua solidificação, os discos de micélio do patógeno, de 5 mm de diâmetro e 7 dias de idade, foram transferidos para o centro das placas. Essas foram vedadas com filme plástico, e incubadas a uma temperatura de 25 °C. Observações foram realizadas diariamente até o final do ensaio, quando  $\frac{3}{4}$  da superfície da placa no controle foram colonizadas pelos patógenos (STANGARLIN et al., 1999). Medidas de diâmetro radial das colônias de cada placa foram consideradas na avaliação do crescimento dos micélios (NASCIMENTO et al., 2013).

### 3.6 ENSAIO DE Av-AgNPs NO ARMAZENAMENTO PÓS-COLHEITA DE MORANGO

Amostras de morango ‘Albion’ foram adquiridas diretamente com o produtor, no município de Marechal Cândido Rondon, localizada na Região Oeste do Paraná (altitude de 420 m, latitude de 24°33’ 24’’ S e longitude 54°3’ 24’’ W). Os frutos de morango foram colhidos em estágio de maturação comercial (80% de cor vermelha) e rigorosamente selecionados para obtenção de amostras experimentais uniformes no tamanho, forma e cor, sem sinais de danos mecânicos ou sintomas de doença (SOGVAR et al., 2016).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas no tempo. Os morangos foram tratados com Av-AgNPs por imersão (1 minuto), sendo posteriormente secos ao ar à temperatura ambiente por 1 hora. Um grupo controle constituído de frutos imersos em água destilada também foi considerado. Em seguida, os frutos foram acondicionados em bandejas de isopor (6 frutos por bandeja) e embalados com filme PVC flexível. Cada bandeja constituiu uma unidade experimental. Posteriormente, as unidades experimentais foram armazenadas a 5 °C e 70 % de UR em câmara climática por 12 dias. Avaliações foram realizadas em intervalos de 3 dias para perda de massa fresca, cor e degradação, ou em intervalos de 4 dias para firmeza, sólidos solúveis totais, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e taxa respiratória. Para cada período de avaliação foram

consideradas 4 repetições (unidades experimentais). Um total de 288 morangos foi utilizado no ensaio.

### 3.7 PERDA DE MASSA FRESCA, FIRMEZA, COR, ÍNDICE DE DEGRADAÇÃO E SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS DOS MORANGOS NO ARMAZENAMENTO

A PMF (%) foi determinada por meio de pesagem em balança semi-analítica das bandejas contendo os frutos de morango, considerando-se a massa inicial dos frutos e as massas de cada período de avaliação conforme Sogvar et al. (2016).

A firmeza dos frutos foi determinada em analisador de textura digital de bancada (Brookfield, CT3), utilizando haste metálica dotada de placa de deformação (30 mm de diâmetro), com deslocamento e velocidade de deformação de 10 mm e 3,0 mm s<sup>-1</sup>. A firmeza foi expressa em Newton (N) (LIU et al., 2018).

A coloração da epiderme dos frutos foi determinada utilizando analisador de cores (Instrutherm, ACR – 1023). Os dados analíticos obtidos de R, G e B referem-se a: R (red - vermelho), G (green - verde), B (blue - azul), sendo então os dados transformados para valores da Comissão Internacional de Luminosidade (CIELAB) L\*, a\* e b\* que foram determinados para cada morango. As medições de cor foram realizadas à temperatura ambiente em duplicata. O parâmetro L\* indica luminosidade (100 = branco, 0 = preto) com referência ao escurecimento dos frutos, o parâmetro a\*, indica vermelho quando positivo e verde quando negativo e o b\* indica amarelo quando positivo e azul quando negativo.

Na determinação do índice de degradação dos frutos foi utilizada uma escala empírica com seis notas para estimar a severidade de infecção, sendo: 0) fruta sadia; 1) 1% a 20% da superfície da fruta infectada; 2) 21% a 40% da superfície da fruta infectada; 3) 41% a 60% da superfície da fruta infectada; 4) 61% a 80% da superfície da fruta infectada; e 5) ≥ 81% da superfície da fruta infectada e mostrando esporulação. O índice de degradação (DI) foi baseado no índice de McKinney de acordo com Feliziani; Romanazzi (2015) que considerou a incidência e severidade de degradação e foi expressa como a média ponderada de degradação através da porcentagem do nível máximo de dano observado, calculado através da equação abaixo:

$$DI = \left[ \sum \frac{dx_f}{NxD} \right] x 100 \quad (1)$$

Onde  $d$  significa nota de intensidade de degradação da escala empírica pontuada do fruto e  $f$  a sua frequência;  $N$  significa o número total de frutos examinados (saudáveis e/ou infectados); e  $D$  é a nota mais alta de intensidade de degradação que ocorreu na escala empírica.

Uma amostra combinada de três morangos frescos foi utilizada para medições de SST, que foi analisado do suco extraído dos frutos e mensurado com o auxílio de refratômetro digital (Atago, PAL-1), com leituras em triplicata e resultados expressos em °Brix (POZZAN; BRAGA; SALIBE, 2012).

### 3.8 TAXA DE RESPIRAÇÃO

A taxa respiratória ( $\text{mL de CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi analisada em cromatógrafo gasoso (Finnigan, 9001) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Restek RT-QPlot (30 m, 0,53 mm id). A temperatura do forno, injetor (splitless), detector e metanador foram 120, 100, 250 e 350 °C, respectivamente. O portador de  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  e os fluxos de ar foram 30, 40 e 175  $\text{mL min}^{-1}$ , respectivamente. Morangos (6 frutos), foram colocados em frasco de plástico hermético (500 mL e tampa com septo de silicone). Após 60 minutos uma amostra de 100  $\mu\text{L}$  do headspace do frasco foi coletada através de uma seringa *gastight* (Hamilton, EUA), que foi imediatamente injetada no cromatógrafo (DE FRANÇA et al., 2018).

### 3.9 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.9.1 Preparo do extrato

Os extratos foram preparados na proporção 1:10 (amostra: solvente; m: v), onde 1 g de cada amostra de morango fresca (macerada com  $\text{N}_2$  até ficar com aspecto de pó) e de aveloz previamente seco e moído foi submetida a extração em 10 mL de solução de etanol 80% (etanol: água; 80:20), seguidos de homogeneização em Vortex (Labnet International, VX 200) por 1 minuto. Posteriormente as amostras foram transferidas para um banho ultrassônico (Unique, USC-2850 a) por 20 minutos. Depois, os extratos foram centrifugados a 20.000 g (MPW 350-350R), (4 °C) durante 20 minutos e, em seguida, filtrados em filtro de papel qualitativo (porosidade de 3  $\mu\text{m}$ ) e armazenados a -18 °C. As extrações foram realizadas em triplicata.

#### 3.9.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos de morango, aveloz e da solução de Av-AgNPs foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999) com adaptações de Rotili et al. (2018). Aliquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada a 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu: água (1:10 v/v) e permaneceu em repouso durante 3 minutos. Em seguida foram adicionados 2,0 mL da solução de carbonato de sódio, sódio: água (m: v) e deixado em repouso por 15 minutos de incubação no escuro a 50 °C. Depois as amostras foram retiradas e colocadas em banho de gelo e procedeu-se a leitura de absorbância a 760 nm em espectrofotômetro. Uma curva de calibração foi construída utilizando como padrão o ácido gálico ( $y = 0,0995x - 0,0035$ ;  $R^2 = 0,997$ ) e os resultados foram expressos em equivalente ácido gálico (mg EAG mL<sup>-1</sup> amostra) (Figura 2). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

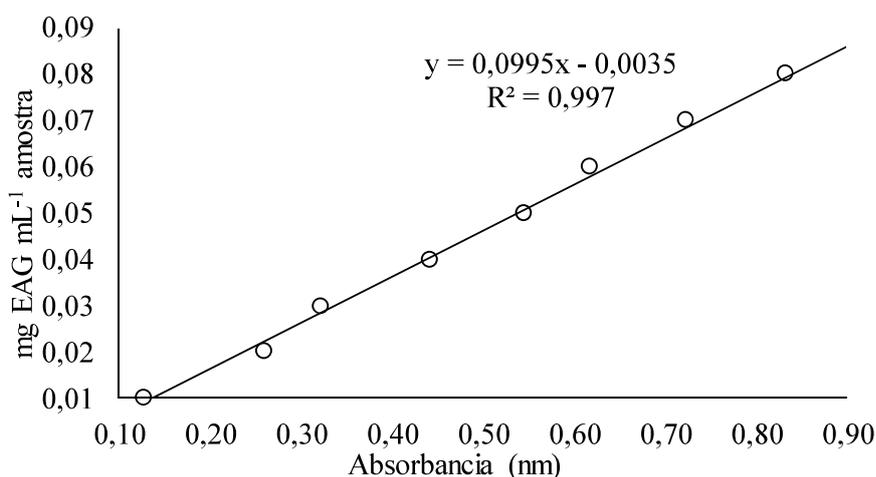


Figura 2- Curva de calibração do ácido gálico para cálculo do teor de compostos fenólicos.

### 3.9.3 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante (AA) dos extratos de morango, aveloz e da solução de Av-AgNPs foram medidas por meio das suas capacidades de sequestro de radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), sendo determinado conforme George et al. (2005). Em 3,0 mL de etanol 80% foram adicionados 0,5 mL do extrato e 0,3 mL da solução de DPPH (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) e deixados em repouso por 60 minutos no escuro. Após as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-visível Shimadzu (UV-1800) em absorbância de 517 nm. O controle contendo 3,5 mL de etanol e 0,3 mL da solução DPPH, foi utilizado. A Equação da curva de calibração do DPPH foi  $y = -101,34x + 53,149$ ; onde y corresponde à concentração de DPPH no meio, x é a absorbância medida no comprimento de onda de 517 nm das amostras de extratos

em nm e o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,999$ . Os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  do peso seco, em equivalente Trolox (ET), calculados por meio do ajuste da curva de calibração para Trolox nas concentrações que variaram de 20,0 a 200,0  $\text{mg EqTrolox mL}^{-1}$  (Figura 3). As análises foram realizadas em triplicata.

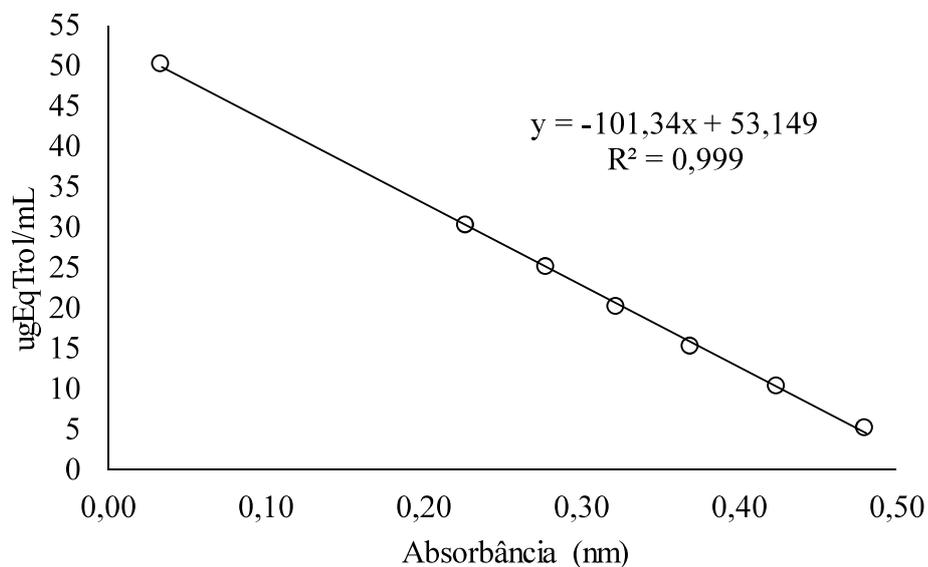


Figura 3 - Curva de calibração do Trolox para cálculo da atividade antioxidante pelo método DPPH.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos parâmetros, cujo teste F foi considerado significativo, foi aplicado teste de Tukey em nível de significância de 5% de probabilidade de erro ( $P < 0,05$ ), com o auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2014). Os resultados foram apresentados como média e seus desvios padrões, e seus contrastes estimados pela diferença mínima significativa (DMS).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nesse estudo a adição do volume de 5 mL extrato de aveloz ao frasco contendo 95 mL da solução de  $\text{AgNO}_3$  na concentração de 3 mM, no escuro, sob agitação constante a 50 °C durante 60 minutos, conduziu a uma alteração na cor da solução de amarela claro para vermelho púrpura e finalmente marrom escuro, o que indicou a formação de Av-AgNPs na mistura da reação (Figura 4) (RASHEED et al., 2017).

Essa mudança de cor observada ocorre devido a um fenômeno conhecido como excitação de ressonância plasmônica de superfície (RPS). Nesse processo as NPs metálicas como a prata exibem propriedades ópticas que se modificam proporcionalmente ao tamanho e forma das NPs. A oscilação coletiva de elétrons livres nas AgNPs, devido ao seu potencial elétrico é então absorvido pela luz visível e transmitidos a um nível de energia mais alto, porém o elétron é instável em um estado excitado e retorna ao nível de energia base, quando isso acontece simultaneamente um fóton é emitido (BEHRAMAN et al., 2019). Dessa forma a espectroscopia UV-vis é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a confirmação de formação de AgNPs na faixa de tamanho de 2-100 nm (SABRE, MIRTAJANI; KARIMZADEH, 2018).

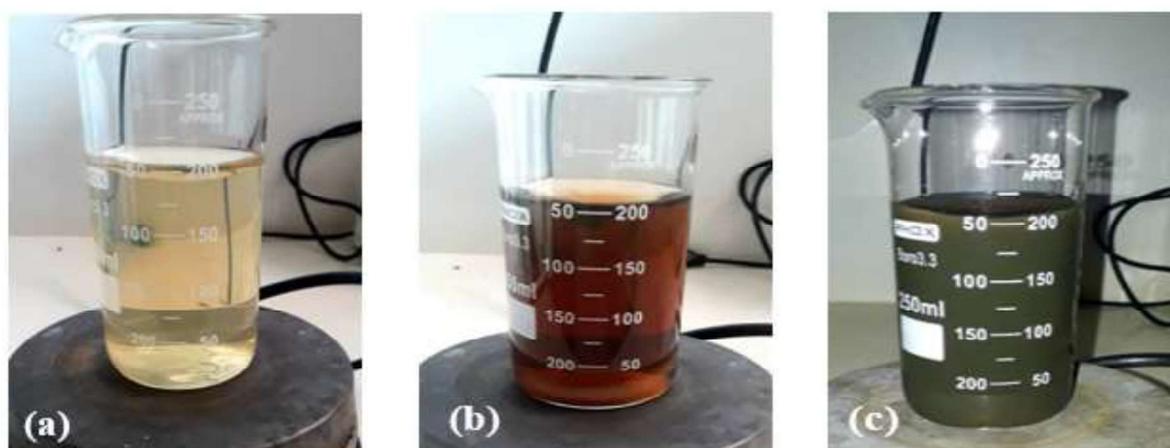


Figura 4 - Mudança de cor da reação de síntese de Av-AgNPs, a partir da mistura de extrato de aveloz com  $\text{AgNO}_3$ , após 15 minutos (amarela claro) (a); após 30 minutos (vermelha púrpura) (b); após 60 minutos de reação (verde-escuro) (c).

Fonte: OLIVEIRA, S. S.; Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon 2019.

A síntese de AgNPs é confirmada quando a solução exibe pico máximo de absorção na faixa de 420-500 nm devido a RPS na superfície da prata. Essas características de RPS na síntese verde de AgNPs através do extrato de aveloz foram detectadas no comprimento de onda de 449 nm (Figura 5). O que está de acordo com os espectros relatados na literatura para AgNPs (RAJ; MALI; TRIVEDI, 2018; PIRTARIGHAT; CHANNADNIA; BAGHSHAHI, 2019).

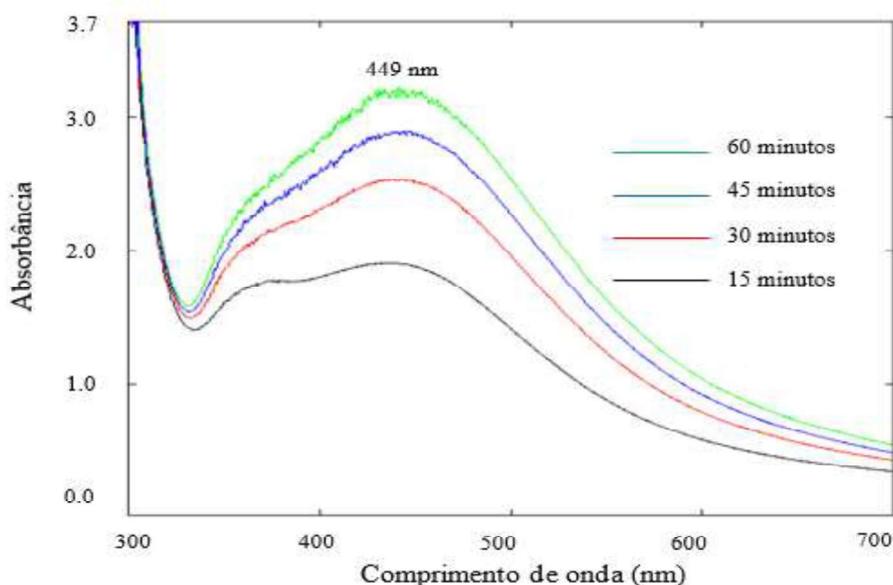


Figura 5- Espectroscopia UV-vis de formação de Av-AgNPs na concentração de 3 mM de sal  $\text{AgNO}_3$ , volume de 5 mL de extrato de aveloz em diferentes intervalos de tempo (15 – 60 minutos) a 50 °C no escuro.

Os resultados revelaram que o aumento do tempo de incubação do  $\text{AgNO}_3$  com o extrato vegetal de aveloz resultou em aumento da intensidade dos picos de absorção (Figura 5), o que indicou aumento da redução  $\text{AgNO}_3$  pela solução do extrato de aveloz e, com isso, aumento da concentração de AgNPs na mistura reacional (RASAEI; GHANNADNIA; BAGHSHAHIB, 2018). A biossíntese de Av-AgNPs foi iniciada aos 15 minutos e concluída após 60 minutos. Esses resultados corroboram com Behravan et al. (2019) que ao investigarem o efeito de parâmetros como concentração de  $\text{AgNO}_3$  (0,5; 1; 3 e 10 mM), extrato aquoso de *Berberis vulgaris* (3; 5; 10; 15; 30 mL) e tempo de contato da reação (1; 2; 6; 12 e 24 h) na síntese de AgNPs, os autores constataram que as condições ótimas para a preparação dessas AgNPs foram de 3 mM de  $\text{AgNO}_3$ , 5 mL de extrato aquoso, a temperatura ambiente e tempo de 1 h, nessas condições a biossíntese exibiu absorção máxima com pico eletrônico de RPS na banda de 450 nm.

Apesar das vantagens da síntese verde, o controle do tamanho e forma das NPs é um desafio importante. Para superar este problema, as condições de reação podem ser melhoradas

alterando o pH, temperatura, período de incubação, irradiação, concentração de  $\text{AgNO}_3$  por meio da variação de fitoquímicos, o que afeta a redução e a ligação do Ag durante o processo de síntese (POURMORTAZAVI et al., 2015).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada para identificar a morfologia e tamanho das AgNPs bioreduzidas (AHAMED et al., 2011). A micrografia de superfície obtida através do MEV mostrou que as Av-AgNPs sintetizadas eram uniformes e esféricas (Figura 6), o que está de acordo com a literatura para AgNPs obtidas a partir de síntese verde. Estudos demonstram que bandas de absorção na faixa 400-450 nm correspondem a NPs metálicas esféricas. A presença de um único pico (Figura 5) corrobora com a forma esférica das Av-AgNPs formadas (RASAE; GHANNADNIAA; BAGHSHAHIB, 2018).

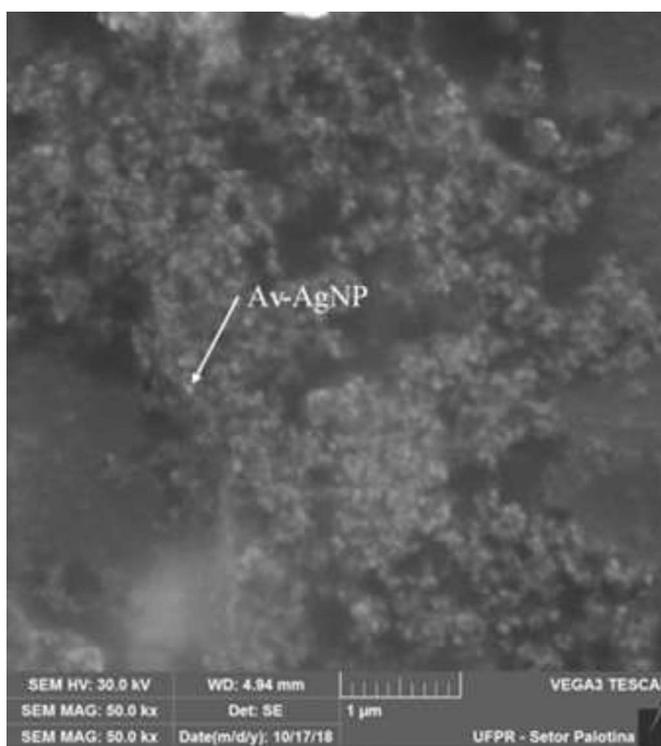


Figura 6- Micrografias de superfície (MEV-EC TESCANA, VEGA3) da amostra contendo nanopartículas de prata (AgNPs) após síntese verde com extrato de aveloz (Av).  
Fonte: OLIVEIRA, S. S.; Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon 2019.

O formato das AgNPs sintetizadas por extratos de plantas vegetais exibe diferentes formas, como esféricas, hexagonais e triangulares, e são dependentes das composições químicas do extrato da planta (RASAE; GHANNADNIAA; BAGHSHAHIB, 2018).

Os tamanhos médios das AgNPs foram em torno de 44,50 e 88,90 nm, mas majoritária (84, 60%) tinham tamanhos entre 56,00 e 76,20 nm (Figura 7). Na imagem também pode ser

observado que NPs maiores de AgNPs são formadas devido a agregação de AgNPs durante a preparação da amostra (KALAISELVI et al., 2019). As micrografias de MEV-EC foram tomadas com 1  $\mu\text{m}$  (baixa resolução) e 100 nm (alta resolução), como mostrado na Figura 6.

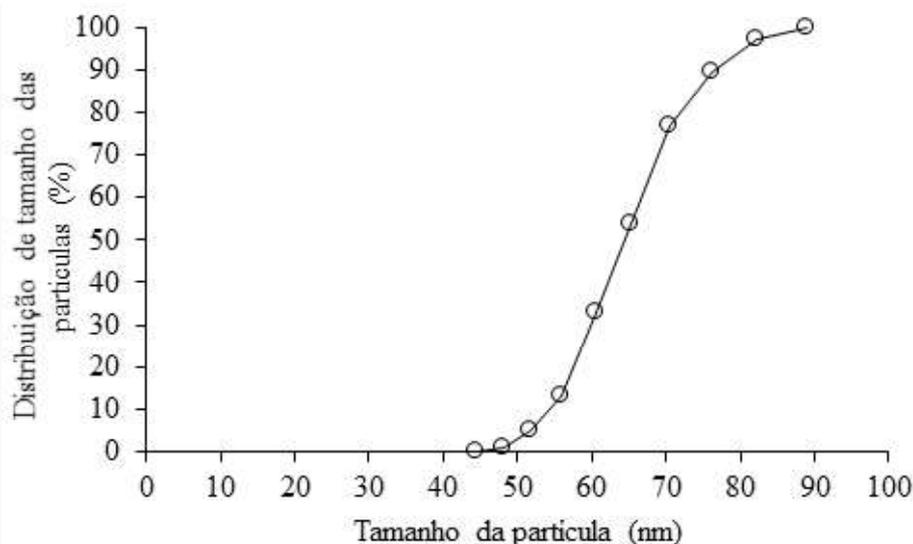


Figura 7- Distribuição granulométrica das Av-AgNPs (difração de laser).

A análise semi-quantitativa da composição química da amostra de Av-AgNPs, que foi realizada por energy dispersive spectroscopy (EDS), mostrou um percentual de 6,41 % para o íon metálico Ag (Tabela 2). Os demais elementos químicos encontrados foram C, O, Mg, Si, Mn e Cu, mas O foi majoritário (36,80 %) entre todos.

Tabela 2- Composição química percentual das microrregiões da solução de Av-AgNPs biossintetizadas com extrato de aveloz (Av).

Elementos químicos	Distribuição (%)
C	27,23 $\pm$ 1,57
O	36,80 $\pm$ 0,69
Cu	12,50 $\pm$ 0,78
Mg	11,91 $\pm$ 0,18
Ag	6,41 $\pm$ 0,39
Si	3,15 $\pm$ 0,36
Mn	2,01 $\pm$ 0,36
Total	100

Em seus estudos, Raj, Mali e Trivedi (2018) também constata a presença de compostos orgânicos associados com Ag, como os átomos de O, C, Cl e Cu em AgNPs biossintetizadas por *Enicostemma axillare*. De acordo com Behravan et al. (2019) uma fina camada de

agregados orgânicos formada é responsável por características como a dispersão das AgNPs em uma solução aquosa bio reduzida, mesmo em escala macroscópica. Os elementos químicos como Ag, C, O, Mg, Si, Mn e Cu estavam presentes em 6,41%; 27,23%; 36,80%; 11,91%; 3,15%; 2,01% e 12,50% respectivamente.

A presença de Ag é certamente devida à formação de AgNPs enquanto a presença de átomos de C, O, Mg, Si, Mn e Cu pode ser atribuída ao extrato da planta de aveloz, como mostrado na Tabela 2. A análise do espectro EDS também revelou que as Av-AgNPs estavam na forma metálica.

Em estudo realizado por Kalaiselvi et al. (2019) sobre síntese de AgNPs mediada por látex de aveloz, os autores identificaram por espectroscopia no infravermelho grupos funcionais potenciais dos grupos metil, éter, cetona, e C=C, os autores sugeriram que esses grupos orgânicos têm contribuição na redução dos íons de Ag e no encapsulamento das Av-AgNPs biossintetizadas.

Orlanda e Vale (2015) realizaram triagem fitoquímica do extrato hidroetanólico de aveloz e constataram a presença de açúcares redutores, alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides, diterpenos e triterpenóides, que também foi confirmado por Mali e Panchal (2017). Kalaiselvi et al. (2019) afirmou que os principais constituintes ativos encontrados em aveloz são conhecidos como grupos orgânicos  $C_{30}H_{50}O$ , com destaque para euphol e tirucallol, que estão presentes em grande parte no látex produzido em laticíferos nessa planta. Neste estudo os metabólitos secundários presentes na planta também desempenham um papel vital nas alterações morfológicas das Av-AgNPs. Entre os metabólitos secundários, euphol e tirucallol foram os principais compostos presentes no extrato de látex de aveloz envolvidos na biorredução das AgNPs (IBRAHIM et al., 2018; KALAISELVI et al., 2019).

Rasae et al. (2018), usando extrato de *Satureja hortensis* cultivadas sob diferentes tratamentos de NaCl, verificaram que a maioria das AgNPs sintetizadas tinha forma esférica, com a presença de algumas NPs com formato triangular, as características das bandas de RPS exibiram pico de absorção em 450 nm após 2 horas de incubação da reação. Esses autores revelaram ainda que a análise fitoquímica do extrato da planta revelou a presença de hidrocarbonetos, fenóis/polifenóis, flavonoides/flavonóis, alcaloides e polipeptídios.

Os flavonoides e outros compostos fenólicos presentes no extrato de folhas são poderosos agentes redutores que podem ser sugestivos para a biossíntese de íons AgNPs. Os extratos vegetais podem desempenhar um duplo papel, como agentes redutores e como estabilizadores de AgNPs biossintetizadas.

#### 4.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DPPH DO EXTRATO DE AVELOZ E DAS Av-AgNPs

Compostos fenólicos são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, que em muitas espécies vegetais são utilizadas como mecanismos de defesa contra patógenos. Tais compostos estão entre os que mais possuem atividade antioxidante no vegetal, onde sua biossíntese é aumentada em situações de estresse fisiológico (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JÚNIOR, 2019).

Uma análise antioxidante comparativa entre extrato de aveloz e solução de Av-AgNPs foi feita. O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) e a atividade antioxidante (AA) do extrato de aveloz e da solução de Av-AgNPs são mostrados na Tabela 3. O conteúdo de CFT do extrato de aveloz ( $0,912 \text{ mg EqAG mL}^{-1}$ ) foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ) quando comparado a solução de Av-AgNPs ( $0,032 \text{ mg EqAG mL}^{-1}$ ). Da mesma forma, a AA do extrato de aveloz ( $2,980 \text{ mg EqTrol mL}^{-1}$ ) foi maior do que das Av-AgNPs ( $0,014 \text{ mg EqTrol mL}^{-1}$ ), indicando que houve reduções maiores do que 90% dos atributos antioxidantes nas amostras. Extratos vegetais contém grande variedade de compostos fenólicos com atividade antioxidante que atuam como agentes redutores e estabilizadores nas reações de síntese verde de AgNPs. De acordo com Rasaee; Ghannadniaa; Baghshahib (2018) diferentes graus de hidroxilação das estruturas químicas de compostos fenólicos são responsáveis por sua alta capacidade sequestradora de radicais que, conseqüentemente, reflete sua elevada capacidade de reduzir  $\text{Ag}^+$  a AgNPs. De fato, neste processo ocorre a transferência de elétrons do composto fenólico para os íons  $\text{Ag}^+$  reduzindo-os a  $\text{Ag}^0$ , conduzindo a uma redução da atividade antioxidante do composto fenólico.

Tabela 3. Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais do extrato de aveloz e da solução de Av-AgNPs.

Amostra	AA** (mg EqTrol <sup>a</sup> mL <sup>-1</sup> )	CFT** (mg EqAG <sup>b</sup> mL <sup>-1</sup> )
Extrato de aveloz <sup>1</sup>	$2,980 \pm 0,282$	$0,912 \pm 0,025$
Av-AgNPs	$0,014 \pm 0,002$	$0,032 \pm 0,001$

<sup>1</sup> Partes aéreas secas de aveloz extraídas com solvente água.

<sup>2</sup> Solução de AgNPs biossintetizadas a partir da mistura de  $\text{AgNO}_3$  3 mMol com o extrato de aveloz.

Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Equivalente Trolox<sup>a</sup>. Equivalente ácido gálico<sup>b</sup>.

\*\* Significativo a  $P < 0,01$ .

Esses resultados diferem do encontrado por Abdel-Aziz et al. (2014) ao avaliar o conteúdo de CFT e AA do extrato de folha de *Chenopodium murale* contra AgNPs sintetizadas pelo mesmo extrato, esses autores encontraram conteúdo de CFT maior em AgNPs sintetizadas ( $80,83 \pm 0,15$  mg EAG  $g^{-1}$ ), quando comparado ao extrato de folhas de *C. murale* isolado ( $74,9 \pm 0,23$  mg EAG  $g^{-1}$ ), além disso, as AgNPs sintetizadas também apresentaram AA maior ( $65,43\% \pm 0,18$ ) do que o extrato de *C. murale* ( $59,43\% \pm 0,15$ ). No entanto, foi ainda observado que AA foi dependente das concentrações de extratos da planta adicionados na síntese de AgNPs, tendo em vista que a AA foi maior nas concentrações maiores de extrato usadas na síntese.

Fafal et al. (2017) ao sintetizar AgNPs usando extrato de partes aéreas de *Asphodelus aestivus* Brot, verificaram que o conteúdo de CFT foi maior na amostra do extrato vegetal isolado ( $72,17 \pm 9,69$  mg EAG  $mL^{-1}$ ) do que nas AgNPs sintetizadas ( $17,33\% \pm 1,29$  mg EAG  $mL^{-1}$ ). Contudo, no extrato isolado de *A. aestivus* a AA foi menor ( $31,82\% \pm 4,04$ ) quando comparada às AgNPs sintetizadas ( $67,54\% \pm 5,49$ ). Wang et al. (2018) também constatou que a AA de AgNPs mediada por extrato vegetal de *Psidium guajava* L. foi mais alta ( $52,53\% \pm 0,31$   $\mu g$   $mL^{-1}$ ) do que o controle positivo com ácido ascórbico ( $25,47\% \pm 0,19$ ) pelo método DPPH. Segundo esses autores, compostos antioxidantes, tais como fenólicos, flavonoides e polissacarídeos, nas superfícies das AgNPs, contribuíram para a sua maior AA.

Nesse estudo, a menor quantidade de CFT e menor AA encontrada nas Av-AgNPs pode estar relacionada a consumo dos fitoquímicos presentes no extrato pela reação de síntese de AgNPs, assim como também pela redução de compostos presentes na solução final de Av-AgNPs após serem filtradas por filtro de papel Whatman ( $0,45$   $\mu m$ ) antes da realização das análises para CFT e AA, o que contribuiu para os menores valores encontrados na solução de Av-AgNPs.

#### 4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE Av-AgNPs CONTRA *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*

A atividade antimicrobiana de AgNPs são conhecidas há vários anos, seu largo espectro antibacteriano vem sendo alvo de intensas pesquisas nas últimas décadas, porém seu efeito antifúngico ainda é pouco estudado. Nesse aspecto, a atividade antifúngica de Av-AgNPs foi testada *in vitro* contra dois fungos, *B. cinerea* e também *R. stolonifer*, pois ambos ocasionam grandes problemas na pós-colheita de morangos, o que acarreta consideráveis perdas econômicas (WANG et al., 2018).

Os resultados demonstraram que o efeito inibitório foi dependente da dose de Av-AgNPs, que mostrou inibição total para *B. cinerea* com 3 mL (923,4  $\mu$ g), embora tenha sido constatada também redução do crescimento das colônias com menores doses de Av-AgNPs, 1,0 e 2,0 mL (307,8 e 615,6  $\mu$ g), respectivamente, quando comparado ao controle (Tabela 4).

Tabela 4- Atividade antifúngica *in vitro* das Av-AgNPs contra *B. cinerea* e *R. stolonifer*.

Av-AgNPs dose	Crescimento micelial (cm)	
	<i>B. cinérea</i> (inibição)	<i>R. stolonifer</i> (inibição)
1,0 mL (307,8 $\mu$ g)	1,9 $\pm$ 0,5 (60,4%)	3,5 $\pm$ 0,1 (49,3%)
2,0 mL (615,6 $\mu$ g)	1,4 $\pm$ 0,1 (70,8%)	3,2 $\pm$ 0,1 (53,6%)
3,0 mL (923,4 $\mu$ g)	0,0 $\pm$ 0,0 (100%)	2,7 $\pm$ 0,0 (60,9%)
Controle	4,8 $\pm$ 0,4	6,9 $\pm$ 0,1

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. DMS *B. cinerea* = 0,34; DMS *R. stolonifer* = 0,20.

*R. stolonifer* foi menos sensível a ação de Av-AgNPs, uma vez que este fungo teve inibição parcial de crescimento do seu micélio (2,7 cm), enquanto *B. cinerea* foi totalmente inibido (Figura 8). Wang et al. (2018) também avaliaram a atividade antifúngica de AgNPs sintetizadas com extrato de *Psidium guajava* contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* e também constataram efeito inibitório contra o crescimento das colônias fúngicas.

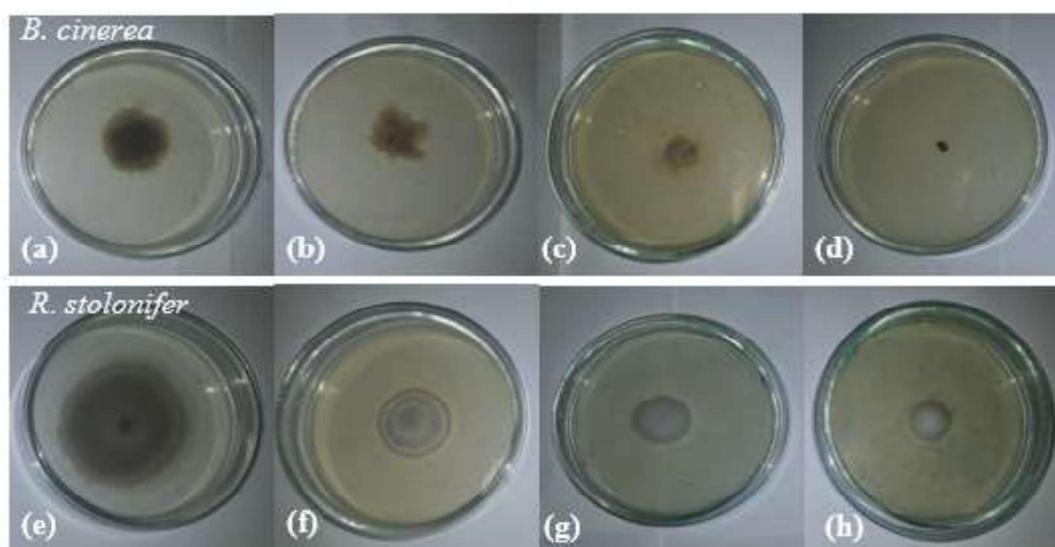


Figura 8- Atividade antifúngica de Av-AgNPs no crescimento micelial de *B. cinerea* em diferentes doses [(a) controle; (b) 1 mL (307,8  $\mu$ g); (c) 2 mL (615,6  $\mu$ g); (d) 3 mL (923,4  $\mu$ g)]. *R. stolonifer* [(a) controle; (b) 1 mL (307,8  $\mu$ g); (c) 2 mL (615,6  $\mu$ g); (d) 3 mL (923,4  $\mu$ g)].

Fonte: OLIVEIRA, S. S.; Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon 2019.

Fernández et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica de AgNPs obtidas pela biossíntese com leveduras de *Rhodotorula glutinis* contra fungos fitopatogênicos causadores de doenças pós-colheitas em frutas de pomo, tais como *B. cinerea*, *Rhizopus sp.*, *A. niger*, *Penicillium expansum* e *Alternaria sp.* Nesse estudo foi usado um controle positivo preparado com fungicida Iprodione na concentração de 500 ppm L<sup>-1</sup> e também um controle negativo com acetona e água. Os resultados mostraram que AgNPs obtidas pela biossíntese na concentração de 3 ppm foram eficazes em inibir o crescimento de colônias de fungos de modo similar ao controle positivo com fungicida, exceção encontrada apenas para *Rhizopus sp.*, porém, resultados nesse mesmo trabalho demonstraram não haver atividade antifúngica do extrato da levedura isolado, bem como do controle negativo de acetona e água.

Wang et al. (2018) também avaliaram a atividade antifúngica de AgNPs sintetizadas por *Psidium guajava* (P-AgNPs) contra três estirpes fúngicas: *Saccharomyces cerevisiae*, *A. niger* e *R. oryzae*. Esses autores verificaram que o extrato aquoso de folhas de *P. guajava* não apresentou efeito inibitório contra nenhuma das cepas selecionadas, enquanto P-AgNPs apresentou efeito inibitório no crescimento das colônias fúngicas confirmando seu efeito antifúngico.

A atividade antimicrobiana de AgNPs se deve pela atração eletrostática entre a membrana celular carregada negativamente dos microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, e as AgNPs carregadas positivamente (KIM et al., 2007). As AgNPs também podem levar à desnaturação da proteína e destruição da bomba de prótons por ligação com proteínas da superfície de fungos, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática e ruptura da membrana celular. Xia et al. (2016) sugeriram que AgNPs danificam o sistema de transporte, causando fluxo de íons intracelulares e acúmulo de Ag<sup>+</sup>, que podem bloquear processos fisiológicos, como a respiração. Além disso, esses autores relataram que as células bacterianas em contato com AgNPs podem absorver esses Ag<sup>+</sup>, o que poderia facilitar a geração de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, causar a morte celular. As AgNPs também podem causar danos ao DNA e danificar a capacidade de replicação dessas células (XIA et al., 2016; WANG et al., 2018).

#### 4.4 ENSAIO Av-AgNPs NO ARMAZENAMENTO PÓS-COLHEITA DE MORANGO

##### 4.4.1 Índice de degradação e taxa respiratória dos morangos durante o armazenamento

Com ataque de microrganismos, ocorre redução da qualidade e de vida de prateleira das frutas, resultando em defeitos ou doenças superficiais com destruição dos tecidos, o que torna o produto menos atrativo ou não comercializável. Esses danos são indesejáveis em morangos, pois sua forma de comercialização é preferencialmente *in natura*, que se dá ênfase especial à qualidade do produto. Danos mecânicos, aliados as mudanças fisiológicas e físicas predispõem ao ataque de patógenos. O crescimento de fungos produz um número variável de efeitos deteriorativos que incluem descoloração, produção de odores desagradáveis e redução na qualidade do produto (CHITARRA; CHITARRA, 2005). De forma geral a taxa de respiração aumenta em tecidos injuriados por patógenos (DHITAL et al., 2018).

Os resultados do índice de degradação mostrados (Figura 9) sugerem que o tratamento com Av-AgNPs inibiu a degradação dos morangos até 9 dias de armazenamento, enquanto os frutos do controle começaram a mostrar sinais de degradação a partir de 3 dias de armazenamento. Adicionalmente, morangos tratados com Av-AgNPs exibiram sinais de degradação microbiológica somente aos 12 dias de armazenamento (0,83%), que foi muito menor do que nos frutos do controle (13,33%). Estes resultados fornecem uma evidência positiva para as características antimicrobianas das Av-AgNPs contra fungos patogênicos do morango, pois a deterioração nos frutos durante o armazenamento foi inibida.

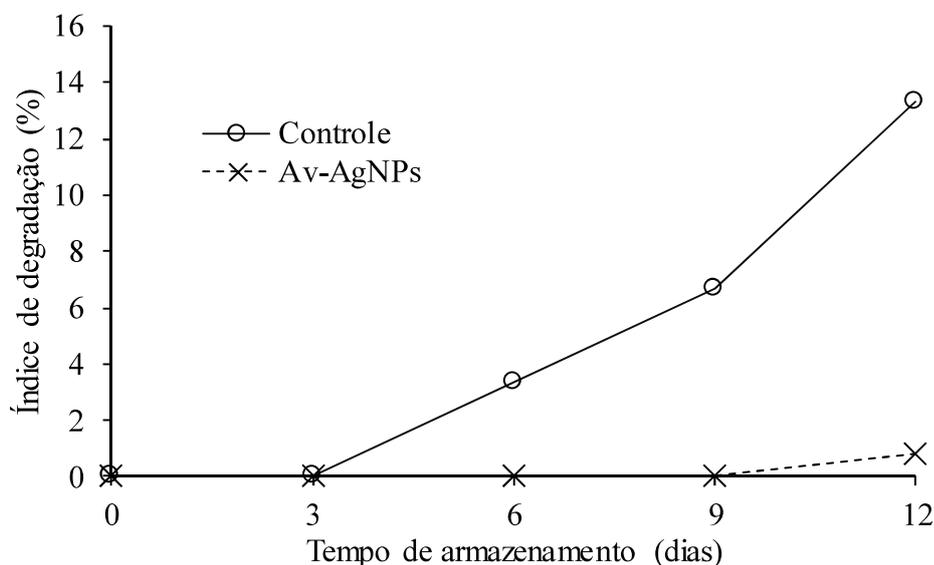


Figura 9- Índice de degradação dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento.

De acordo com Xia et al., (2016) os  $Ag^+$  apresentam amplo espectro antimicrobiano contra fungos. Seus efeitos podem ser notados na desestruturação da parede e membrana

celular, em organelas como ribossomos e mitocôndrias, na desnaturação de proteínas, destruição da bomba de prótons, bloqueio de processos metabólicos, respiração, e por causar danos ao DNA e na sua capacidade de replicação, de forma a ocasionar a morte de microrganismos patogênicos (MARCHIORE et al., 2017).

Emamifar et al. (2010) utilizando uma matriz polimérica de polietileno de baixa densidade (LDPE) contendo AgNPs e óxido de zinco (ZnO), para preservar e estender o prazo de validade de sucos de laranja observou que essa combinação de NPs combinada com o tratamento térmico (55-65 °C) foi eficaz como antimicrobiano contra fungos (leveduras e bolores) em relação às demais matrizes poliméricas ativas contendo NPs de ZnO. A atividade antimicrobiana de AgNPs permitiu diminuir acentuadamente a temperatura de pasteurização do suco de laranja em 10 °C.

Yang et al. (2010) investigaram o uso de embalagens plásticas adicionadas com AgNPs na qualidade de morangos durante o armazenamento e encontraram que esse tratamento manteve a qualidade sensorial, físico-química e fisiológica dos morangos em um nível mais alto em comparação com as embalagens controle. Motlagh, Mosovian e Mortazavi (2013) em estudo similar também encontraram resultados similares para amoras armazenadas. Outro estudo com melão minimamente processado, realizado por Fernandez, Picouet e Lloret, (2010), mostrou que absorventes carregados com Ag reduziram a carga microbiana do fruto durante armazenamento.

Morangos tratados com Av-AgNPs mostraram taxa respiratória significativamente menor do que o controle durante todo período de armazenamento (Figura 10). Neste caso, está menor atividade respiratória exibida pelos frutos tratados evidencia que houve menor estresse fisiológico, e isso esteve fortemente associado ao efeito inibitório da degradação microbiológica devido as Av-AgNPs (Figura 9).

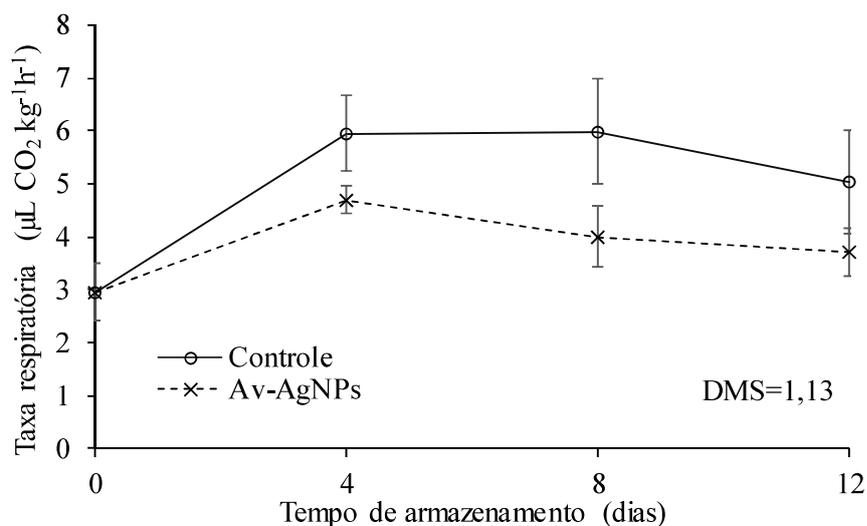


Figura 10- Taxa respiratória dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento.

Além disso, AgNPs podem agir como catalisadora da decomposição do etileno produzido a partir do metabolismo dos frutos, essa característica também pode ter contribuído para redução da atividade respiratória dos frutos tratados com Av-AgNPs (HUANG et al., 2015). De forma geral a taxa de respiração aumenta em tecidos vegetais injuriados por fitopatógenos (DHITAL et al., 2018).

Estes resultados fornecem uma evidência para as características antimicrobianas das Av-AgNPs contra fungos patogênicos pós-colheita de morangos, pois a deterioração nos frutos durante o armazenamento foi reduzida. AgNPs podem agir como catalisadora da absorção e decomposição do etileno emitido a partir do metabolismo dos frutos, que tem sido postulado como um bloqueador de etileno, essa característica também pode ter contribuído para redução da atividade respiratória dos frutos tratados com Av-AgNPs (HUANG et al., 2015). Entretanto, seu potencial uso no controle de fitopatógenos em pós-colheita ainda é pouco estudado. O aumento na composição de CO<sub>2</sub> em morangos não tratadas pode ser atribuído à produção de CO<sub>2</sub>, etanol e ácidos orgânicos produzidos por microrganismos deteriorativos, de forma geral a taxa de respiração aumenta em tecidos vegetais injuriados por fitopatógenos, (DHITAL et al., 2018).

#### 4.4.2 Perda de massa fresca, firmeza e sólidos solúveis totais dos morangos no armazenamento

Os resultados de perda de massa fresca, firmeza e sólidos solúveis totais dos morangos tratados com Av-AgNPs são mostrados na Figura 11. Tanto a perda de massa fresca, como a

firmeza dos morangos não foram influenciados pelo tratamento com Av-AgNPs, pois tiveram seus resultados estatisticamente similares aos controles (Figuras 11a e 11b). A perda de massa fresca média total dos morangos foi de 14%, enquanto a sua firmeza média reduziu de 40,97N para 33,18N no período, ou seja, uma redução de aproximadamente 19%. O morango tem elevada taxa de respiração e de transpiração, que favorece tanto a perda de massa fresca, como a redução da firmeza do morango, que são consequências desfavoráveis para a comercialização deste fruto, pois contribuem para sua rápida senescência (DHITAL et al., 2018). Entretanto, esses resultados não foram influenciados pela atividade respiratória dos frutos, uma vez que morangos tratados com Av-AgNPs mostraram taxa respiratória menor do que o controle (Figura 10). A Figura 11c também mostra que não houve efeito significativo das Av-AgNPs sobre SST dos morangos durante o armazenamento, pois eles não mostraram diferenças significativas em relação ao controle. O conteúdo de SST manteve valores similares entre o início ( $9,68 \text{ }^\circ\text{Brix} \pm 0,21$ ) e o final ( $9,61 \text{ }^\circ\text{Brix} \pm 0,36$ ) do armazenamento.

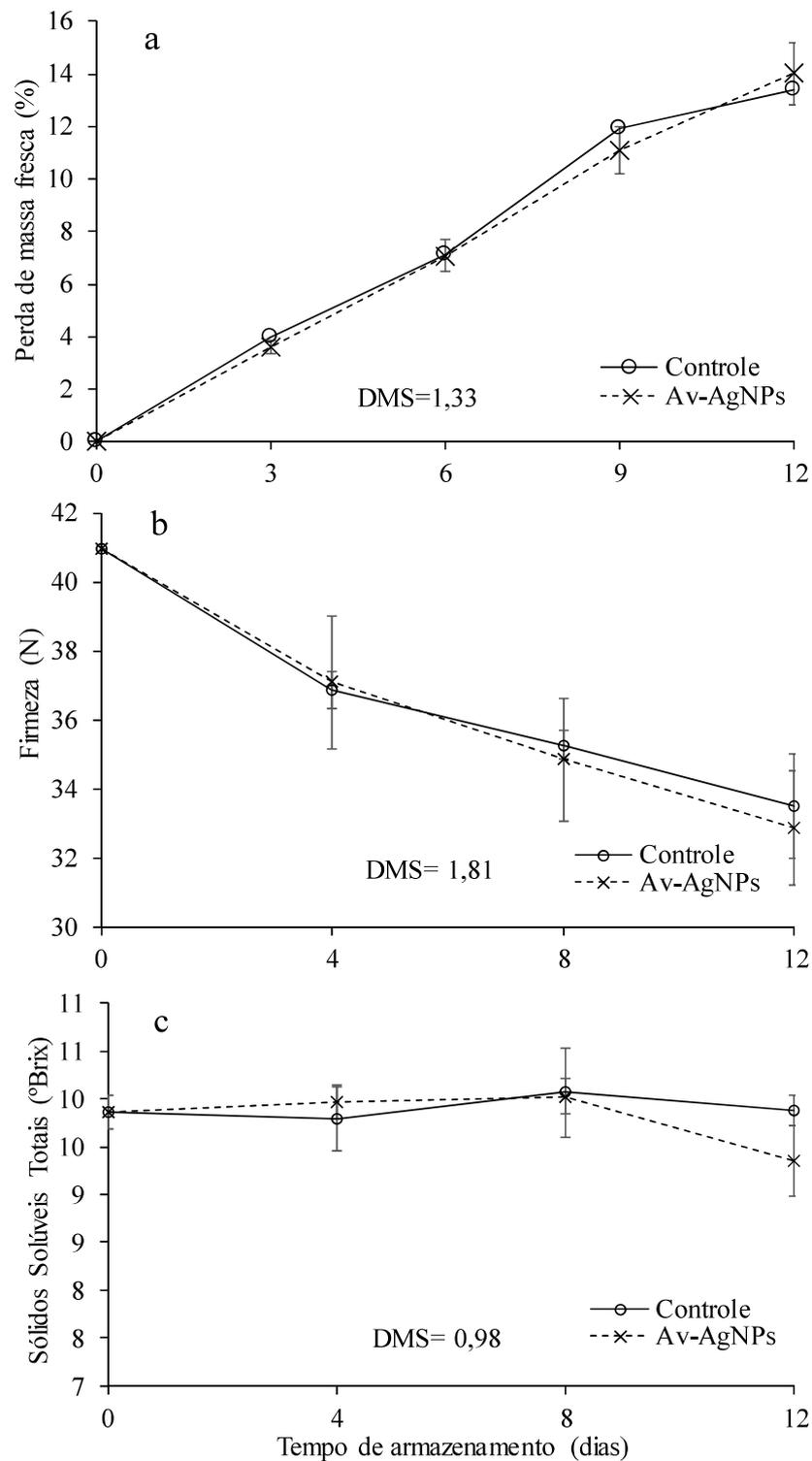


Figura 11- Perda de massa fresca (a) firmeza (b) e sólidos solúveis totais (c) dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizados com extrato de aveloz, durante armazenamento.

A PMF observada nos frutos de morango é um processo inevitável e normal que ocorre durante o armazenamento do produto fresco, e está associado, principalmente, à evaporação da

umidade através do tecido vegetal e, em menor escala, à perda de reservas de carbono através da respiração. A rápida perda de água prejudica a aparência de frescor de frutos, e é um dos principais fatores que contribuem para a perecibilidade do morango (SOGVAR et al., 2016; DHITAL et al., 2018). A perda de firmeza nos morangos ocorre em virtude do aumento da atividade de enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares, como pectinametilesterase e poligalacturonase (WEI et al., 2018). Durante o armazenamento a firmeza diminui o que contribui para o curto período de vida pós-colheita e suscetibilidade a contaminação por fungos no morango além de exercer influência importante sobre a aceitabilidade do consumidor de frutas frescas (SOGVAR et al., 2016). Mudanças no teor de SST são devido à solubilização de poliuronídeos e hemiceluloses da parede celular em morangos maduros, e geralmente são acompanhados de sabor agradável e de maior aceitação por consumidores (DHITAL et al., 2017).

#### **4.4.3 Cor dos morangos durante o armazenamento**

A cor dos morangos foi avaliada através de parâmetros numéricos  $a^*$  e  $L^*$  CIELAB, e os resultados são mostrados na Figura 14. O parâmetro  $a^*$  representa a coordenada de cor entre o vermelho ( $+a^*$ ) e o verde ( $-a^*$ ), ou seja, quanto maior o valor positivo de  $a^*$ , mais vermelha é a amostra. Os resultados mostram que não houve variações significativas do parâmetro  $a^*$  entre frutos tratados e o controle durante o armazenamento dos morangos (Figura 12a), ou seja, a coloração vermelha dos frutos tratados com Av-AgNPs foi similar a coloração de frutos não tratados.

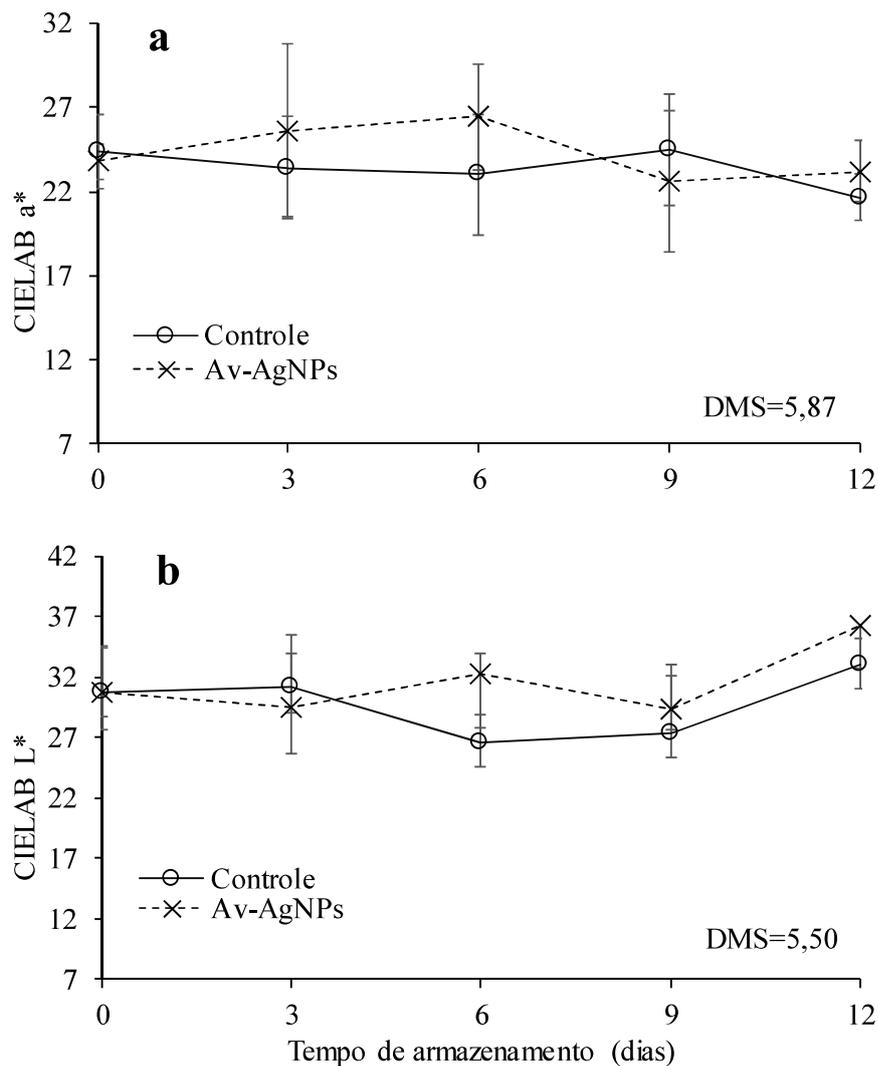


Figura 12 - Parâmetros CIELAB a\* (a) e L\* (b) dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento.

O parâmetro L\* fornece um valor numérico de luminosidade para a amostra, que varia de zero (escuro) a 100 (claro). De acordo com a Figura 12b, no 6º dia de armazenamento morangos tratados com Av-AgNPs mostraram valores L\* ( $32,19 \pm 4,41$ ) significativamente maior do que os morangos do controle ( $26,5 \pm 2,24$ ), indicando que Av-AgNPs inibiram o escurecimento dos frutos. Embora os resultados do 9º e 12º dia tenham mostrado variações não significativas, os valores médios de L\* dos morangos tratados com Av-AgNPs também foram maiores do que seus controles, e isso reforça a hipótese de que Av-AgNPs são importantes para inibir o escurecimento do morango. Os resultados de L\* indicam que Av-AgNPs aplicados em morangos pode ser importante para retardar a deterioração da pigmentação vermelha durante o armazenamento. A cor vermelha atraente de morangos geralmente desaparece durante o armazenamento, prejudicando sua aparência. A cor vermelha é substituída por pigmentos

acastanhados após alguns dias de armazenamento (GOSSINGER et al., 2009). Esse processo comumente é acompanhado por formação de cor marrom ou descoloração resultante da perda de antocianinas causada por oxidação ou outras reações químicas (WANG, et al., 2015).

#### **4.4.4 Compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (AA) dos morangos tratados com Av-AgNPs**

Morangos contêm alta concentração de antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos. Muitos destes compostos exibem uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo antioxidante e antifúngico (DHITAL et al., 2018). A conservação e a extensão desses compostos fitoquímicos durante o armazenamento do morango tem sido um grande desafio para os pesquisadores, pois é objetivo manter e conservar a AA durante o período pós-colheita desse fruto (LIU et al., 2018).

No entanto, os morangos são altamente perecíveis, deteriorações fisiológicas ocorrem em morangos metabolicamente ativos, mesmo na ausência de microrganismos em virtude de processos catabólicos de senescência celular. Os compostos fenólicos são os principais compostos antioxidantes que podem eliminar os radicais de oxigênio, evitando o estresse oxidativo para manter a qualidade dos morangos (LIU et al., 2018). Maiores teores de CFT em pós-colheita podem estar relacionados à estresses abióticos, que induzem o metabolismo secundário do fruto para o aumento da produção desses compostos.

De maneira geral houve redução tanto do conteúdo de CFT quanto da AA dos morangos durante o armazenamento (Figura 13a e 13b). Contudo, no 4º e no 12º dias de armazenamento os frutos tratados com Av-AgNPs mostraram conteúdos de CFT (1,75 e 0,86 mg EqAG g<sup>-1</sup> do peso seco, respectivamente) significativamente menores do que os seus controles (2,06 e 1,14 mg EqAG g<sup>-1</sup> do peso seco, respectivamente). Uma forte associação entre os resultados de CFT e AA foi observada, isto é, morangos tratados com Av-AgNPs mostraram AA (0,40 e 0,22 mg EqTrol g<sup>-1</sup> do peso seco) significativamente menores ( $P < 0,05$ ) do que seus controles (0,46 e 0,26 mg EqTrol g<sup>-1</sup> do peso seco) nos mesmos períodos de armazenamento. Esses resultados indicam que morangos tratados com Av-AgNPs foram menos induzidos à síntese de compostos fenólicos do que aqueles do controle, e conseqüentemente exibiram menor atividade antioxidante, conforme mostrado na Figura 13b.

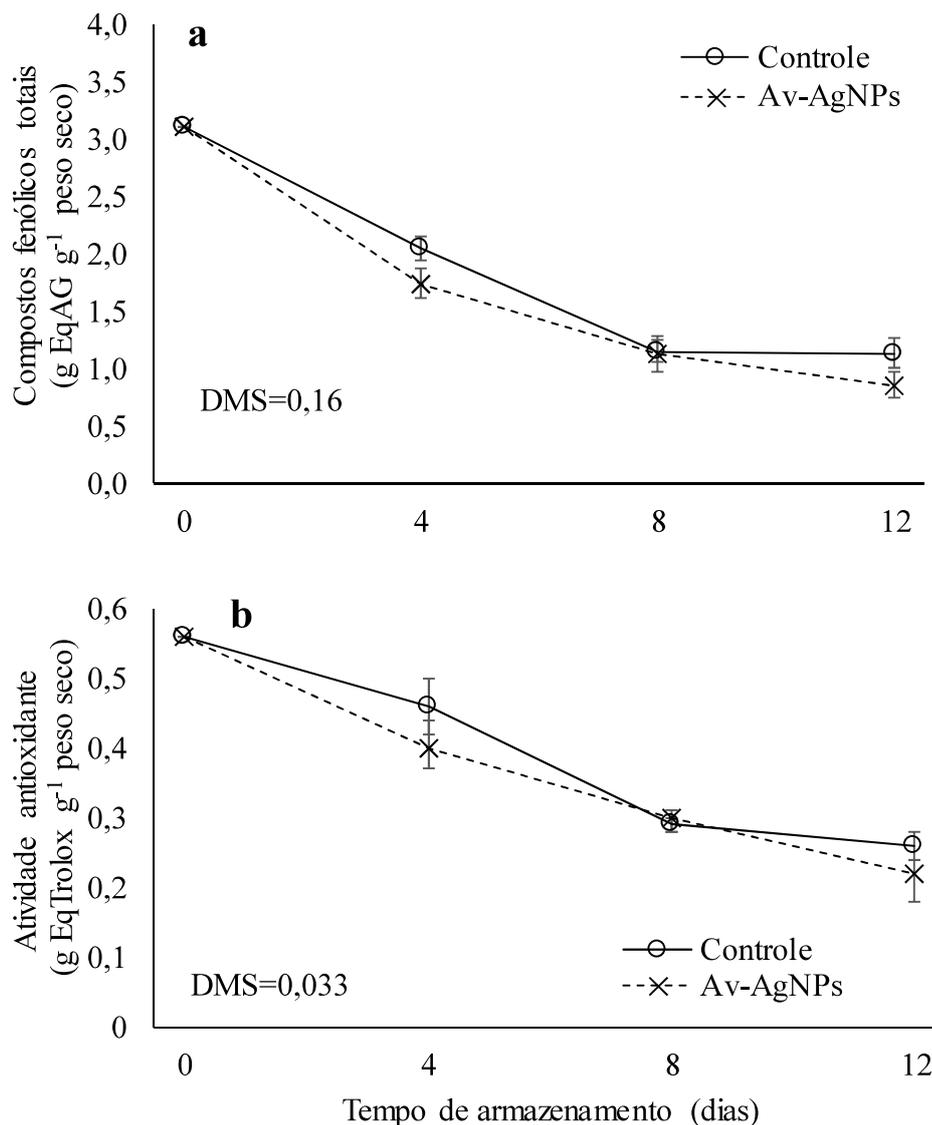


Figura 13- Compostos fenólicos totais (a) e atividade antioxidante (b) dos morangos tratados com Av-AgNPs sintetizadas com extrato de aveloz, durante armazenamento.

Morangos tratados com Av-AgNPs mostraram menor degradação e menor taxa de respiração (Figura 9 e Figura 10), e isso foi determinante para os menores níveis de CFT demandados pelos frutos (Figura 13a), muito provavelmente porque houve menor estresse celular por fitopatógenos. Compostos fenólicos são importantes antioxidantes celulares que agem para o equilíbrio de radicais de oxigênio e controle do estresse oxidativo. De fato, o aumento do conteúdo de compostos fenólicos durante a etapa pós-colheita ocorre quando há estresses abióticos ou bióticos que induzem o metabolismo secundário do fruto para o aumento da produção desses compostos (LIU et al., 2018).

## 5 CONCLUSÃO

A síntese verde de AgNPs com extrato aquoso de aveloz produziu Av-AgNPs com tamanhos inferiores a 100 nm, mas majoritariamente entre 40 e 90 nm. Os resultados mostraram que Av-AgNPs tem ação antifúngica contra *B. cinerea* mais eficaz do que contra *R. stolonifer*. Devido a sua ação antifúngica, Av-AgNPs reduziu a degradação do morango. Av-AgNPs não interferiram na perda de massa fresca, firmeza e SST dos frutos. Porém, manteve a coloração vermelha dos morangos por mais tempo e reduziu seu escurecimento durante o armazenamento. Além de influenciar os menores conteúdos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Este estudo mostrou que o extrato de aveloz pode ser utilizado para a síntese verde de Av-AgNPs. Além disso, as Av-AgNPs sintetizadas se mostraram eficazes contra *B. cinerea* e contra a degradação pós-colheita dos morangos, e podem ser uma alternativa promissora para a sua conservação e extensão de sua vida útil.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AZIZ, M. S.; SHAHEEN, M. S.; EL-NEKEETY, A. A.; WAHHAB- ABDEL, A. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, v. 18, n. 4, p 356-363, set. 2014.
- AHAMED, M.; KHAN, M. A. M.; SIDDIQUI, M. K. J.; ALSALHI, M. S. A.; ALROKAYAN, S. A. Green synthesis, characterization and evaluation of biocompatibility of silver nanoparticles. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, Sendai, v. 43, n. 6, p. 1266-1271, abr. 2011.
- AHMED, S.; AHMED, M.; SWAMI, B. L.; IKRAM, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 7, n. 1, p. 17-28, jan. 2016.
- ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p. 125-140, dez. 2012.
- ANDRADE JÚNIOR, V. C.; GUIMARÃES, A. G.; AZEVEDO, A. M.; PINTO, N. A. V. D.; FERREIRA, M. A. M. Conservação pós-colheita de frutos de morangueiro em diferentes condições de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 34, n. 3, p. 405-411, jul./set. 2016.
- ANKAMWAR, B. Biosynthesis of gold nanoparticles (green-gold) using leaf extract of *Terminalia catappa*. **E-Journal of Chemistry**, Madri, v. 7, n. 4, p. 1334-1339, jan. 2010.
- ANTUNES, LEC. Brasil é o maior produtor de morango da América do Sul. **Campo & Negócio-Hortifruti**, Uberlândia, v. 1, n. 7, p. 91-94, jan. 2018.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 601 p.
- ARVIZO, R.; BHATTACHARYYA, S.; KUDGUS, R.; GIRI, K.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. **Chemical Society Reviews**, Toronto, v. 41, n. 7, p. 2943-2970, mar. 2012.
- AVALOS-LLANO, K. R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effect of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut strawberries. **Food Chemistry**, Norwich, v. 264, n. 1, p. 393-400, out. 2018.
- BAR, H.; BHUI, D. K.; SAHOO, G. P.; SARKAR, P.; DE, S. P.; MISRA, A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Berlim, v. 339, n. 1-3, p. 134-139, mai. 2009.
- BARIKLOO, H.; AHMADI, E. Shelf life extension of strawberry by temperatures conditioning, chitosan coating, modified atmosphere, and clay and silica nanocomposite packaging. **Scientia Horticulturae**, Agassiz, v. 240, n. 1, p. 496-508, out. 2018.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4.ed. St. Paul, Minn.: APS Press, 1998. 218 p.

BEHRAVAN, M.; PANAH, A. H.; NAGHIZADEH, A.; ZIAEE, M.; MAHDAVI, R.; MIRZAPOUR, A. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Greeley, v. 124, n. 1. p. 148-154, mar. 2019.

BERMEJO-PRADA, A.; OTERO, L. Effect of hyperbaric storage at room temperature on color degradation of strawberry juice. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 169, n. 1, p. 141-148, jan. 2016.

BHUTTO, A. A.; KALAY, S.; SHERAZI, S. T. H.; CULHA, M. Quantitative structure–activity relationship between antioxidant capacity of phenolic compounds and the plasmonic properties of silver nanoparticles. **Talanta**, Seattle, v. 189, n. 1, p. 174-181, nov. 2018.

BOVI, G. G.; RUX, G.; CALEB, O. J.; HERPPICH, W. B.; LINKE, M.; RAUH, C.; MAHAJAN, P. Measurement and modelling of transpiration losses in packaged and unpackaged strawberries. **Biosystems Engineering**, Hexham, v. 174, n. 1, p. 1-9, out. 2018.

CAO, F.; GUAN, C.; DAI, H.; LI, X.; ZHANG, Z. Soluble solids content is positively correlated with phosphorus content in ripening strawberry fruits. **Scientia Horticulturae**, Agassiz, v. 195, n. 1, p. 183-187, nov. 2015.

CARBONE, M.; DONIA, D. T.; SABBATELLA, G.; ANTIOCHIA, R. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. **Journal of King Saud University – Science**, Riade, v. 28, n. 4, 273-279, out. 2016.

CHAHARDOLI, A.; KARIMI, N.; FATTAHI, A. Extrato de folhas de *Nigella arvensis* media a síntese verde de nanopartículas de prata: suas propriedades características e eficácia biológica. **Tecnologia Avançada em Pó**, v. 29, n. 1, p. 202-210, 2018.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: FAEPE, 2005. 783 p.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M. C.; CUMMINS, E. Evaluation and simulation of silver and copper nanoparticle migration from polyethylene nanocomposites to food and an associated exposure assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 62, n. 6, p. 1403-1411, fev. 2014.

DE FRANÇA, D. L. B.; BRAGA, G. C.; LAURETH, J. C. U.; DRANSKI, J. A. L.; DE ANDRADE M., C. Physiological response, antioxidant enzyme activities and conservation of banana treated with ethanol vapor. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 56, n. 1, p. 208-216, jan.2019.

DHITAL, R.; JOSHI, P.; MORA, N. B.; UMAGILIYAGE, A.; CHAI, T., KOHLI, P.; CHOUDHARY, R. Integrity of edible nanocoatings and its effects on quality of strawberries subjected to simulate in-transit vibrations. **LWT – Food Science and Technology**, Athens, v. 80, n. 1, p. 257-264, jul. 2017.

DHITAL, R.; MORA, N. B.; WATSON, D. G.; KOHLI, P.; CHOUDHARY, R. Efficacy of limonene nanocoatings on post-harvest shelf life of strawberries. **LWT – Food Science and Technology**, Athens, v. 97, n. 1, p. 124-134, nov. 2018.

ELLENDERSEN, L.S.N.; MILINSK, M.C.; FEROLDI, M.; ZADINELO, I.V.; DOS SANTOS, L. D.; DE MUNIZ, G. I. B.; GASPARRINI, L. J.; ALVES, H. J. (2018). Biopolymer foam for remediation of aquatic environments contaminated with particulates and heavy metals. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 5, p. 6131-6138, out.2018.

EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; ZAD, S. S. Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 11, n. 4, p. 742-748, out. 2010.

FAFAL, T.; TASTAN, P.; TUSUN, B. S.; OZYAZICI, M.; KIVCAK, B. Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Asphodelus aestivus* Brot. aerial part extract. **South African Journal of Botany**, Pietermaritzburg, v. 112, n. 1, p. 346-353, set. 2017.

FELIZIANI, A. L. L.; ROMANAZZI, G. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. **Carbohydrate Polymers**, Worcestershire, v. 132, n. 5, p. 111-117, nov. 2015.

FERNANDEZ, A.; PICOUET, P.; LLORET, E. Reduction of the spoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology during modified atmosphere packaging of beef meat. **Journal of Food Protection**, Las Vegas, v. 73, n. 12, p. 2263-2269, dez. 2010.

FERNÁNDEZ, J. G.; FERNÁNDEZ-BALDO, M. A.; BERNI, E.; CAMÍ, G.; DURÁN, N.; RABA, J.; SANZ, M. I. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre Cedex, v. 51, n. 9, p. 1306-1313, set. 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, dez. 2011.

FLORES-CANTILLANO, R. F. **Morango: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2003, 28 p. (Frutas do Brasil, 42).

FRANCISCO, E. V.; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, California, v. 238, n. 1, p. 1-11, dez. 2018.

GE, L.; LI, Q.; WANG, M.; OUYANG, J.; LI, X.; XING, M. M. Q. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 2399-2407, mai. 2014.

GEORGE, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 53, n. 5, 1370-1373, mar. 2005.

GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, Roma, v. 28, n. 1, p. 9-19, jan. 2012.

GOLDBERG, T.; AGRA, H.; BEN-ARIE, R. Non-destructive measurement of fruit firmness to predict the shelf life of 'Hayward' kiwifruit. **Scientia Horticulturae**, Agassiz, v. 244, n. 1, p. 339-342, jan. 2019.

GOSSINGER, M.; MORITZ, S.; HERMES, M.; WENDELIN, S.; SCHERBICHLER, H.; HALBWIRTH, H. Effect of processing parameters on colour stability of strawberry nectar made from puree. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 90, n. 2, p. 171-178, jan. 2009.

GOTO, T., TERAMINAMI, A., LEE, J. Y., OHYAMA, K., FUNAKOSHI, K., KIM, Y. KAWADA, T. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v. 23, n. 7, p. 768-776, jul. 2012.

GUIDELLI, E. J.; RAMOS, A. P.; ZANIQUELLI, M. E. D.; BAFFA, O. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles using natural rubber latex extracted from *Hevea brasiliensis*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Cracovia, v. 82, n. 1, p. 140-145, nov. 2011.

GUPTA, N.; VISHNOI, G.; WAL, A.; WAL, P. Medicinal value of *Euphorbia tirucalli*. **Systematic Reviews in Pharmacy**, Malasia, v. 4, n. 1, jan./dez. 2013.

HUANG, J. Y.; LI, X.; ZHOU, W. Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. **Trends in Food Science & Technology**, Norwich, v. 45, n. 2, p. 187-199, out. 2015.

HUANG, Y.; CHEN, S.; BING, X.; GAO, C.; WANG, T.; YUAN, B. Nanosilver migrated into food-simulating solutions from commercially available food fresh containers. **Packaging Technology and Science**, Surrey, v. 24, n. 5, p. 291-297, ago. 2011.

IBRAHIM, E.; KILANY, M.; MOSTAFA, O. M. S.; SHAKER, K. H.; ALSHEHRI, M.; M. ALSYAAD, K. M.; ALSHEHRI, A.; ALIKHAN, K.; NAHLAKOTB, M. Q. A.; GHRAH, A. S. A. H.; DAJEM, S. M. TH1/TH2 chemokines/cytokines profile in rats treated with tetanus toxoid and *Euphorbia tirucalli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, In press, ago. 2018.

JANTRA, C.; SLAUGHTER, D. C.; ROACH, J.; PATHAVEERAT, S. Development of a handheld precision penetrometer system for fruit firmness measurement. **Postharvest Biology and Technology**, Leuven, v. 144, n. 1, p. 1-8, out. 2018.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I. M. B.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. F.; THRANE, U.; JENSEN, D. F.; LARSEN, J. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 160, n. 3, p. 313-322, jan. 2013.

JIN, P.; SHIOW, Y.; WANG, C.; CHIEN, Y.; WANG, A.; ZHENG, Y. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. **Food Chemistry**, Norwich, v. 124, n. 1, p. 262-270, jan. 2011.

JIN, P.; WANG, H.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZHENG, Y. Uv- enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. **Scientia Horticulture**, Agassiz, v. 225, n. 1, p. 106-111, nov. 2017.

KALAISELVI, D.; MOHANKUMAR, A.; G. SHANMUGAM, G.; S. NIVITHA, S.; P. SUNDARARAJ, P. Green synthesis of silver nanoparticles using latex extract of *Euphorbia tirucalli*: a novel approach for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, Lincoln, v. 117, n. 1, p. 108-114, mar. 2019.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.

KESHRI, N.; TRUPPEL, I.; HERPPICH, W. B.; GEYER, M.; WELTZIEN, C.; MAHAJAN, P. V. Development of sensor system for real-time measurement of respiration rate of fresh produce. **Computers and Electronics in Agriculture**, Gainesville, v. 157, n. 1, p. 322-328, fev. 2019.

KHALAF, H. H.; SHAROBA, A. M.; EI-TANAHI, H. H.; MORSY, M. K. Stability of antimicrobial activity of pullulan edible films incorporated with nanoparticles and essential oils and their impact on turkey deli meat quality. **Journal of Food and Dairy Science**, Mansoura University, v. 4, n. 11, p. 557-573, nov. 2013.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. L.; KIM, S. H.; PARK, Y. J.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H.; CHO, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Omaha, v. 3, n. 1, p. 95-101, mar. 2007.

KRISHNARAJ, C.; JAGAN, E. G.; RAJASEKAR, S.; SELVAKUMAR, P.; KALAIHELVAN, P. T.; MOHAN, N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Hamilton, v. 76, n. 1, p. 50-56, mar. 2010.

KUSTER, R. M.; CAXITO, M. L. C.; SABINO, K. C. C.; COSTA, H. B.; TOSE, L.V.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G.; SILA, A. G. Identification of maloyl glucans from *Euphorbia tirucalli* by ESI- (-)-FT-ICR MS analyses. **Phytochemistry Letters**, Londres, v. 12, n. 1, p. 209-214, jun. 2015.

LAFARGA, T.; COLÁS-MEDÀ, P.; ABADÍAS, M.; AGUILÓ-AGUAYO, I.; BOBO, G.; VIÑAS, I. Strategies to reduce microbial risk and improve quality of fresh and processed strawberries: a review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Berlin, v. 52, n. 1, p. 197-212, mar. 2019.

LIU, C.; ZHENG, H.; SHENG, K.; LIU, W.; ZHENG, L. Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Leuven, v. 139, n. 1, p. 47-55, mai. 2018.

MAHDI, S. S.; VADOOD, R.; NOURDAHR, R. Study on the antimicrobial effect of nanosilver tray packaging of minced beef at refrigerator temperature. **Global Veterinária**, Cairo, v. 9, n. 3, p. 284-289, jan. 2012.

MALI, P. Y.; PANCHAL, S. S. *Euphorbia tirucalli* L: review on morphology, medicinal uses, phytochemistry and pharmacological actives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 7, n. 7, p. 603-613, jul. 2017.

MARCHIORE, N. G.; MANSO, I. J.; KAUFMANN, K. C.; LEMES, G. F.; PIZOLLI, A. P. O.; DROVAL, A. A.; BRACHT, L.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. **LWT - Food Science and Technology**, Athens, v. 76, part. B, p. 203-208, mar. 2017.

MATAR, C.; GAUCEL, S.; GONTARD, N.; GUILBERT, S.; GUILLARD, V. Predicting shelf life gain of fresh strawberries 'Charlotte cv' in modified atmosphere packaging. **Postharvest Biology and Technology**, Leuven, v. 142, n. 1, p. 28-38, ago. 2018.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, Israel, v. 31, n. 2, p. 346-356, mar./abr. 2013.

MOTLAGH, N. V.; MOSAVIAN, M. T. H.; MORTAZAVI, S. A. Effect of polyethylene packaging modified with silver particles on the microbial, sensory and appearance of dried barberry. **Packaging Technology and Science**, Surrey, v. 26, n. 1, p. 39-40, jan. 2013.

MUKARATIRWA-MUCHANYEREYI, N.; MUCHENJE, T.; NYONI, S.; SHUMBA, M.; MUPA, M.; GWATIDZO, L.; RAHMAN, A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia confinalis* stem extract, characterization and evaluation of antimicrobial activity. **Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology**, Starkville, v. 6, n. 3, mai. 2017.

MWINE, J.; SSEKYEWA, C.; KALANZI, K.; VAN DAMME, P. Evaluation of selected pesticide al plant extracts against major cabbage insect pests in the field. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nigéria, v. 7, n. 22, p. 1580-1586, jun. 2013.

NASCIMENTO, J. M.; SERRA, A. P.; BACCHI, L. M.; GAVASSONI, W. L.; VIEIRA, M. C. Inibição do crescimento micélio de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, supl. 1, p. 751-756, out. 2013.

NIZIOL, J.; MISIOREK, M.; RUMAN, T. Mass spectrometry imaging of low molecular weight metabolites in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Primoris with <sup>109</sup>Ag nanoparticle enhanced target. **Phytochemistry**, Nantes, v. 159, n. 1, p. 11-19, mar. 2019.

ORLANDA, J. F. F.; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 730-736, dez. 2015.

ORNELAS-PAZ, J. J.; YAHIA, E. M.; RAMÍREZ-BUSTAMANTE, N.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J. D.; ESCALANTE-MINAKATA, M. P.; IBARRA-JUNQUERA, V.; ACOSTA-MUÑIZ, C.; GUERRERO-PRIETO, V.; OCHOA-REYES, E. Physical attributes

and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**, Norwich, v. 138, n. 1, p. 372-381, mar. 2013.

PILJAC-ŽEGARAC, J.; ŠAMEC, D. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. **Food Research International**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 345-350, jan. 2011.

PIRTARIGHAT, S.; GHANNADNIA, M.; BAGHSHAHI, S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled conditions for bactericidal application. **Materials Science and Engineering: C**, Cambridge, v. 98, n. 1, p. 250-255, mai. 2019.

PONARULSELVAM, S.; PANNEERSELVAM, C.; MURUGAN, K.; AARTHI, N.; KALIMUTHU, K.; THANGAMANI, S. Synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Catharanthus roseus* Linneu. G. Don and their antiplasmodial activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, n. 7, p. 574-580, jul. 2012.

POURMORTAZAVI, S. M.; TAGHDIRI, M.; MAKARI, V.; RAHIMI-NASRABADI, M. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kraków, v. 136, part. C, p. 1249-1254, fev. 2015.

POZZAN, M. S., BRAGA, G. C., SALIBE, A. B. Teores de antocianinas, fenóis totais, taninos e ácido ascórbico em uva 'bordô' sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 5, p. 701-708, out. 2012.

PRASAD, T. N. V. K. V.; ELUMALAI, E. Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 1, n. 6, p. 439-442, dez. 2011.

RAHUMAN, A. A.; GOPALAKRISHNAN, G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, Murdoch, v. 102, n. 5, p. 867-73, abr. 2008.

RAJ, S.; MALI, S. C.; TRIVEDI, R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 503, n. 4, p. 2814-2819, set. 2018.

RAJA, S.; RAMESH, V.; THIVAHARAN, V. Green/ biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxidesensing capability. **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, v. 10, n. 2, p. 253-262, fev. 2017.

RAJKUBERAN, C.; PRABUKUMAR, S.; SATHISHKUMAR, G.; WILSON, A.; RAVINDRAN, K.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Facile synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia antiquorum* L. latex extract and evaluation of their biomedical perspectives as anticancer agents. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, v. 21, n. 8, p. 911-919, dez. 2017.

RASAEI, I.; GHANNADNIAA, M.; BAGHSHAHIB, S. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Satureja hortensis* treated with NaCl and its antibacterial properties. **Microporous and Mesoporous Materials**, Mülheim an der Ruhr, v. 264, n. 1, p. 240-247, jul. 2018.

RASHEED, T.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; LI, C. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Hamilton, v. 158, n. 1, p. 408-415, out. 2017.

RODRÍGUEZ-GUITIÉRREZ, G.; CARDOSO, R. C.; SENENT, F. R.; SERRANO, A.; BORJA, R.; FERNANDEZ- BOLAÑOS, J.; FERMOSO, F. Thermally-treated strawberry extrudate: a rich source of antioxidant phenol and sugars. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Berlin, v. 51, n. 1, p. 186-193, jan. 2019.

ROTILI, M. C. C.; VILLA, F.; BRAGA, G. C.; FRANCA, D. L. B.; LAURETH, J. C. U. Bioactive compounds, antioxidant and physico-chemical characteristics of the dovyalis fruit. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 40, e35465, p. 1-8, mar. 2018.

SABRE, M. M.; MIRTAJANI, S. B.; KARIMZADEH, K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Trapa natans* extract and their anticancer activity against A431 human skin cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Lille, v. 47, n. 1, p. 375-379, out. 2018.

SANCHES, A. G.; COSTA, J. M.; SILVA, M. B.; MOREIRA, E. G. S. Utilização de radiação gama e amido de milho no armazenamento pós-colheita das folhas de couve manteiga. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 3, n. 4, p. 24-31, out. /dez. 2016.

SHINDE, N. M.; LOKHANDE, A. C.; LOKHANDE, C. D. A green synthesis method for large area silver thin film containing nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Quebec, v. 136, n. 5, p. 19-25, jul. 2014.

SINGH, R.; SINGH, D. P.; GUPTA, P.; JAIN, P.; SANCHITA, T. M.; KUMAR, A.; DHAWAN, S. S.; SHIRKE, P. A. Nanoparticles alter the withanolide biosynthesis and carbohydrate metabolism in *Withania somnifera* (Dunal). **Industrial Crops & Products**, St Martin d'Herès, v. 127, n. 1, p. 94-109, jan. 2019.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New Haven, v. 299, part. A, p. 152-178, 1999.

SOGVAR, O. B.; SABA, M. K.; EMAMIFAR, A.; HALLAJ, R. Influence of nano-ZnO on microbial growth, bioactive content and postharvest quality of strawberries during storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 35, n. 1, p. 168-176, jun. 2016.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, 1999.

SUH, W.; SUSLICK, K.; STUCKY, G.; SUH, Y. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress in Neurobiology**, Princeton, v. 87, n. 3, p. 133-170, fev. 2009.

TIWARI, S.; SINGH, A. Biochemical stress response in freshwater fish *Channa punctatus* induced by aqueous extracts of *Euphorbia tirucalli* plant. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 36-42, jun. 2006.

TOURNAS, V.H.; KATSODAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruit. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 105, n. 1, p. 11-17, nov. 2015.

TRINDADE, M. J. S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Habana, v. 19, n. 4, p. 292-309, dez. 2014.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, J.; RIC DE VOS, C. H.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Munique, v. 56, n. 3, p. 696-704, jan. 2008.

VALERO, D.; SERRANO, M. **Postharvest biology and technology for preserving fruit quality**. Boca Raton: CRC-Taylor & Francis, 2010. 217 p.

VALODKAR, M.; NAGAR, P. S.; JADEJA, R. N.; THOUNAOJAM, M. C.; DEVKAR, R. V.; THAKORE, S. Euphorbiaceae latex induced green synthesis of non-cytotoxic metallic nanoparticle solutions: a rational approach to antimicrobial applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Berlim, v. 384, n. 1-3, p. 337-344, jul. 2011.

VANAJA, M.; ANNADURAI, G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. **Applied Nanoscience**, Evanston, v. 3, n. 3, p. 217-223, jun. 2013.

VEERASAMY, R.; XIN, T. Z.; GUNASAGARAN, S.; XIANG, T. F. W.; YANG, E. F. C.; JEYAKUMAR, N.; DHANARAJ, S. A. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, v. 15, n. 2, p. 113-120, abr. 2011.

VERGAUWEN, D.; SMET, I. D. The strawberry tales: size matters. **Trends in Plant Science**, Londres, v. 24, n. 1, p. 1-3, jan. 2019.

VILCHIS-NESTOR, A. R.; SÁNCHEZ-MENDIETA, V.; CAMACHO-LÓPEZ, M. A.; GÓMEZ-ESPINOSA, R. M.; CAMACHO-LÓPEZ, M. A.; ARENAS-ALATORRE, J. A. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. **Materials Letters**, Erlangen, v. 62, n. 17-18, p. 3103-3105, jun. 2008.

VIVEK, M.; KUMAR, P. S.; STEFFI, S.; SUDHA, S. Biogenic silver nanoparticles by *Gelidiella acerosa* extract and their antifungal effects. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology – AJMB**, Teerã, v. 3, n. 3, p. 143-148, jul./set. 2011.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. In: CAMPOS, M. R. S. (ed.). **Bioactive compounds: health benefits and potential applications**. Woodhead Publishing, 2019. cap. 2, p. 33-50.

VUONG, Q. V.; NGUYEN, V. T.; THANH, D. T.; BHUYAN, D. J.; CHLOE, D.; GOLDSMITH, C. G.; SADEQZADEH, E.; SCARLETT, C. J.; BOWYER, M. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant *Euphorbia tirucalli* using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, St Martin d'Herès, v. 63, n. 1, p. 197-202, jan. 2015.

WANG, L.; WU, Y.; XIE, J.; WU, S.; WU, Z. Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. **Materials Science and Engineering: C**, Cambridge, v. 86, n. 1, p. 1-8, mai. 2018.

WANG, Z.; ZHANG, M.; WU, Q. Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. **LWT - Food Science and Technology**, Athens, v. 60, n. 2, part. 2, p. 1174-1178, mar. 2015.

WEI, Y.; WEI, Y.; XU, F.; SHAO, X. The combined effects of tree oil and hot air treatment on the quality and sensory characteristics and decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, Leuven, v. 136, n. 1, p. 139-144, fev. 2018.

XIA, Z. K.; MA, Q. H.; LI, S. Y.; ZHANG, D. Q.; CONG, L.; TIAN, Y. L.; YANG, R. Y. The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 49, n. 2, p. 182-188, abr. 2016.

XU, G.; QIAO, X.; QIU, X.; CHEN, J. Green synthesis of highly pure nano-silver sols electrolysis. **Rare Metal Materials and Engineering**, Pequim, v. 42, n. 2, p. 249-253, fev. 2013.

YAN, J.; LUO, Z.; BAN, Z.; LU, H.; LI, D.; YANG, D.; AGHDAM, M. S.; LI, L. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Leuven, v. 147, n. 1, p. 29-38, jan. 2019.

YANG, F. M.; LI, H. M.; LI, F.; 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**, Raleigh, v. 75, n. 3, p. 236-240, abr. 2010.

YIN, N.; GAO, R.; KNOWLES, B.; WANG, J.; WANG, P.; SUN, G.; CUI, Y. Formation of silver nanoparticles by human gut microbiota. **Science of the Total Environment**, Barcelona, v. 651, part. 1, p. 1489-1494, fev. 2019.

ZHANG, X.; SUN, Y.; YANG, Q.; CHEN, L.; LI, W.; ZHANG, H. Control of postharvest black rot caused by *Alternaria alternata* in strawberries by the combination of *Cryptococcus laurentii* and Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester. **Biological Control**, College Station, v. 90, n. 1, p. 96-101, nov. 2015.