

Camila Rodrigues

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCOMPÓSITOS DE QUITOSANA-ARGILA-ZnO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Gracher Riella

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares e Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rodrigues, Camila

Preparação e Caracterização de Nanocompósitos de Quitosana-Argila-ZnO /
Camila Rodrigues ; Orientador, Humberto Gracher Riella ; coorientadora, Cintia
Soares ; coorientador, Márcio Antônio Fiori – Florianópolis, SC, 2017.

112 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Embalagem de alimentos. 3. Nanopartículas. 4.
Quitosana. 5. Biopolímeros. I. Riella, Humberto Gracher. II. Soares, Cintia. III.
Fiori, Márcio Antônio. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Camila Rodrigues

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCOMPÓSITOS DE QUITOSANA-ARGILA-ZnO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Humberto Gracher Riella
Orientador

Prof^a. Dr^a. Cintia Soares
Coorientadora

Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Cintia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Prof^a. Dr^a. Josiane Maria Muneron de Mello

Aos meus pais Dinaura e Erni.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Dinaura e Erni, pela base, princípios e incentivo.
À toda a minha família.

Ao meu orientador, professor Humberto Riella e meus coorientadores professor Márcio e professora Cintia, pelos ensinamentos, dedicação e orientações.

Ao Daniel, pela ajuda, companheirismo e carinho.

Aos meus colegas de laboratório Lusitâneo, Jonas e Jéssica pelas contribuições, enriquecimento do trabalho, pelas palavras e descontrações.

Aos meus amigos, Angelo, Simone e Samara pela parceria e ensinamentos ao longo do mestrado.

Ao Laboratório de Materiais e Corrosão, pelo acolhimento e troca de experiências.

A Central de Análises, pela possibilidade de realizar a maior parte dos experimentos. Ao Leandro pela dedicação prestada.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos, pela possibilidade de realização de experimentos. Aos colegas Laura e Juliano pela atenção dedicada.

Ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Unochapecó pela parceria. A Janayne e Ana Paula pelos ensinamentos e total apoio durante a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À FAPESC, pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Pensar é o trabalho mais difícil que existe, e esta é, provavelmente, a razão que tão poucas pessoas se dedicam a ele”.

(Henry Ford)

RESUMO

Nanopartículas de argila bentonita, montmorilonita sódica, modificadas organoflicamente por octadecilamônio (Np-A) e nanopartículas de óxido de zinco (Np-ZnO) foram incorporadas em matriz de quitosana (Q) em diferentes proporções para avaliar suas propriedades mecânicas, físico-químicas e antimicrobianas. Os nanocompósitos foram obtidos pelo método de intercalação do polímero por solução utilizando ácido acético (1% v/v) como solvente com o objetivo de aumentar estas propriedades. Os grupos funcionais, o comportamento térmico e a morfologia da superfície do filme de quitosana e dos nanocompósitos QA (2% argila), QZnO (6,5% ZnO), Q1 (5% ZnO + 1% argila), Q2 (5% ZnO + 3% argila), Q3 (8% ZnO + 1% argila), Q4 (8% ZnO + 3% argila), Q5 (4,4% ZnO + 2% argila), Q6 (8,6% ZnO + 2% argila), Q7 (6,5% ZnO + 0,59% argila), Q8 (6,5% ZnO + 3,4% argila), Q9/Q10 (6,5% ZnO + 2% argila) foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que o efeito combinado da argila e ZnO em quitosana aumenta significativamente as propriedades mecânicas da quitosana pura ($p < 0,05$). Os resultados de FTIR confirmaram boa compatibilidade entre os grupos funcionais da quitosana/montmorilonita/óxidos metálicos por meio do deslocamento de bandas. A distribuição das Np-ZnO se tornou mais uniforme com a argila na quitosana, sendo assim, a argila compatibiliza as Np-ZnO com a quitosana aumentando as propriedades mecânicas e não afetando a atividade antimicrobiana dos filmes. A temperatura de decomposição (T_{dc}) não mudou significativamente com a adição das Np-A, porém alterou-se significativamente com a adição de Np-ZnO ($p < 0,05$). No teste antimicrobiano foi descoberto que a quitosana e as Np-ZnO mostraram um efeito sinérgico na atividade antimicrobiana contra *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, tornando-se atrativo para embalagens de alimentos.

Palavras-chave: Quitosana. Nanopartículas de argila bentonita organoflica. Nanopartículas de ZnO. Nanocompósitos. Embalagem de alimentos.

ABSTRACT

Bentonite clay nanoparticles, sodium montmorillonite, organophilically modified by octadecylammonium (Np-A) and zinc oxide nanoparticles (Np-ZnO) were incorporated into chitosan (C) matrix in different proportions to evaluate its mechanical, physical-chemical and antimicrobial properties. The nanocomposites were obtained by polymer intercalation method by solution using acetic acid (1% v/v) as solvent to enhance these properties. The functional groups, thermic behavior and surface morphology of the chitosan film and nanocomposites CClay (2% clay), CZnO (6,5% ZnO), C1 (5% ZnO + 1% clay), C2 (5% ZnO + 3% clay), C3 (8% ZnO + 1% clay), C4 (8% ZnO + 3% clay), C5 (4,4% ZnO + 2% clay), C6 (8,6% ZnO + 2% clay), C7 (6,5% ZnO + 0,59% clay), C8 (6,5% ZnO + 3,4% clay), C9/C10 (6,5% ZnO + 2% clay) were characterized through Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the combined effect of clay and zinc oxide increases significantly the mechanical properties of pure chitosan ($p < 0,05$). FTIR results confirmed good compatibility among functional groups of chitosan, montmorillonite/metallic oxides by bands shift. The distribution of Np-ZnO became more uniform with the clay in the chitosan, thus, the clay compatibilizes the Np-ZnO with the chitosan increasing the mechanical properties and not affecting the antimicrobial activity of the films. The decomposition temperature (Tdc) did not change significantly with addition of clay, but changes significantly with addition of Np-ZnO ($p < 0,05$). In the antimicrobial test was found that the chitosan and the Np-ZnO showed a synergistic effect in the antimicrobial activity against to *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*, being attractive to food packaging.

Keywords: Chitosan. Bentonite organoclay nanoparticles. ZnO nanoparticles. Nanocomposites. Food packaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ZnO: a) fase wurtzita; b) blenda de zinco; c) sal de rocha.	29
Figura 2 - Métodos de síntese dos nanocompósitos: a) mistura simples dos componentes; b) síntese de nanopartículas <i>in situ</i> ; c) polimerização do polímero <i>in situ</i>	30
Figura 3 - Estrutura cristalina de uma esmectita.	33
Figura 4 - Formação dos compósitos em estrutura de fase separada (a), estrutura intercalada (b) e estrutura esfoliada (c).	34
Figura 5 - Efeito do grau de cristalinidade sobre as propriedades dos polímeros.....	37
Figura 6 - Estrutura química da quitosana.....	37
Figura 7 - Fluxograma global das etapas a serem desenvolvidas no estudo.	45
Figura 8 - Fluxograma operacional para o preparo dos nanocompósitos.	47
Figura 9 – Imagem nanocompósito obtido pelo método de intercalação do polímero por solução em formato real (a) e cortado em pedaços (b).	55
Figura 10 - Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de quitosana pura na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.	56
Figura 11 - Imagens obtidas por MEV da superfície de QA na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.....	57
Figura 12 - Imagens obtidas por MEV da superfície de QZnO na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.....	57

Figura 13 - Imagens obtidas por MEV da superfície de Q9 na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.....	58
Figura 14 - Espectros de FTIR obtidos para o filme de quitosana pura (Q), quitosana-argila (QA) e quitosana-ZnO (QZnO).	60
Figura 15 - Espectros de FTIR obtidos para os demais nanocompósitos quitosana-argila-ZnO (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9).....	60
Figura 16 - Perfil de TG e DTG do filme de quitosana pura (Q).	61
Figura 17 - Curvas de DSC do filme de quitosana pura (Q), quitosana-argila (QA) e quitosana-ZnO (QZnO).....	62
Figura 18 - Curvas de DSC dos demais nanocompósitos: quitosana-argila-ZnO (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9).	62
Figura 19 – Diagrama de Pareto para os valores de temperatura de decomposição.....	68
Figura 20 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referentes aos valores de temperatura de decomposição.....	69
Figura 21 - Ensaio de tensão × deformação do filme de quitosana pura (Q) e dos nanocompósitos.....	70
Figura 22 - Imagem do corpo de prova antes do ensaio.....	71
Figura 23 – Imagem do corpo de prova durante o ensaio.	71
Figura 24 - Diagrama de Pareto para os valores de tensão máxima.....	75
Figura 25 - Diagrama de Pareto para os valores de alongamento na ruptura.	75
Figura 26 - Diagrama de Pareto para os valores de módulo de Young.	76
Figura 27 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de tensão.	78
Figura 28 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de alongamento na ruptura.	79

Figura 29 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores do módulo de Young.	80
Figura 30 - Resultados dos testes de difusão em ágar por meio de poços para as Np-A: (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	81
Figura 31 - Resultados dos testes de difusão em ágar por meio de poços para as Np-ZnO: (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	81
Figura 32 - Resultados dos testes de difusão em ágar para quitosana pura Q (branco): (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	82
Figura 33 - Resultados dos testes de difusão em ágar para QA: (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	83
Figura 34 - Resultados dos testes de difusão em ágar para QZnO: (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	83
Figura 35 - Resultados dos testes de difusão em ágar para Q4: (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	84
Figura 36 - Resultados dos testes de difusão em ágar para Q9: (a) <i>E. coli</i> ; (b) <i>S. aureus</i>	84
Figura 37 - Curva de morte para a bactéria <i>S. aureus</i> obtida com o filme de quitosana pura (Q) e com os nanocompósitos (QA, QZnO, Q4 e Q9).	86
Figura 38 - Curva de morte para a bactéria <i>E. coli</i> obtida com o filme de quitosana pura (Q) e com os nanocompósitos (QA, QZnO, Q4 e Q9)..	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidades e relações mássicas de argila e ZnO estabelecidas de acordo com o planejamento central composto em relação a 1 g de quitosana.	48
Tabela 2 – Quantidades e relações mássicas de argila e ZnO estabelecidas de acordo com o planejamento fatorial em relação a 1 g de quitosana.	49
Tabela 3 - Quantidades e relações mássicas de argila e ZnO utilizadas em relação a 1 g de quitosana.....	49
Tabela 4 - Resultados de EDS da superfície do filme de quitosana pura e dos nanocompósitos.	58
Tabela 5 - Valores para a temperatura de desidratação, entalpia de desidratação, temperatura de decomposição, entalpia de decomposição e para a temperatura de transição vítrea obtidos com os filmes de quitosana puro e diferentes percentuais de Np-A e Np-ZnO. Condições experimentais definidas de acordo com a estrutura de um planejamento experimental central composto.....	63
Tabela 6 - ANOVA para os resultados de temperatura de decomposição.	64
Tabela 7 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de temperatura de decomposição.	65
Tabela 8 - ANOVA para os resultados de entalpia de decomposição... ..	65
Tabela 9 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de entalpia de decomposição.....	65
Tabela 10 - ANOVA para os resultados de entalpia de desidratação... ..	66
Tabela 11 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de entalpia de desidratação.....	66

Tabela 12 - ANOVA para os resultados de temperatura de transição vítrea.	66
Tabela 13 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de temperatura de transição vítrea.	67
Tabela 14 - Valores de tensão máxima, alongamento e módulo de Young obtidos para filmes de quitosana pura e contendo diferentes percentuais de Np-A e Np-ZnO. Condições experimentais definidas de acordo com a estrutura de um planejamento experimental fatorial 2^2 . .	72
Tabela 15 - ANOVA para os resultados de tensão.....	72
Tabela 16 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de tensão. .	73
Tabela 17 - ANOVA para os resultados de alongamento na ruptura.	73
Tabela 18 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de alongamento na ruptura.....	73
Tabela 19 - ANOVA para os resultados de módulo de Young.....	74
Tabela 20 - Matriz de efeitos estimados para os resultados do módulo de Young.....	74
Tabela 21 - Valores médios do halo de inibição de crescimento microbiano.	85
Tabela 22 - Resultados da análise microbiológica para o teste de curva de morte obtidos para os filmes de quitosana pura e incorporados com diferentes composições de Np-A e Np-ZnO.	88
Tabela 23 - Porcentagem de redução das colônias bacterianas após 24 h de tempo de contato com os filmes de quitosana com diferentes composições de Np-A e Np-ZnO.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*
MMT - montmorilonita
GRAS - Substância Segura para Consumo
FDA - *Food and Drug Administration*
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
GA - grau de acetilação
nm - nanômetro
PLA - ácido polilático
B. subtilis - *Bacillus subtilis*
E. coli - *Escherichia coli*
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
L. plantarum - *Lactobacillus plantarum*
PEBD - polietileno de baixa densidade
L. monocytogenes - *Listeria monocytogenes*
 μm - micrômetro
MMT- Na^+ - montmorilonita sódica
GD - grau de desacetilação
KDa – kilodalton
ASTM - American Society for Testing and Materials
Np-ZnO - nanopartículas de óxido de zinco
Np-A - nanopartículas de argila bentonita organofílica
MPa - mega pascal
GPa - giga pascal
FTIR - espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
TGA – análise termogravimétrica
DSC - calorimetria exploratória diferencial
ANOVA – análise de variância
T_{dc} - temperatura de decomposição
 ΔH_d - entalpia de desidratação
 ΔH_{dc} - entalpia de decomposição
T_g – temperatura de transição vítrea
UFC - unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo geral	27
1.1.2	Objetivos específicos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	ÓXIDO DE ZINCO	29
2.1.1	Efeito antimicrobiano	30
2.2	ARGILA BENTONITA ORGANOFÍLICA	32
2.2.1	Efeito nas propriedades mecânicas.....	35
2.3	POLÍMEROS	35
2.3.1	Quitosana	37
2.3.2	Incorporação de nanomateriais e substâncias com efeito antimicrobiano.....	39
2.3.3	Incorporação de nanomateriais e substâncias com efeito nas propriedades mecânicas	40
2.4	BACTÉRIAS PATOGÊNICAS VINCULADAS AOS ALIMENTOS.....	42
2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.4.2	<i>Escherichia coli</i>	43
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	MATERIAIS	45
3.2	PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS.....	46
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	49
3.3.1	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	50

3.3.2	Análise termogravimétrica.....	50
3.3.3	Calorimetria exploratória diferencial	50
3.3.4	Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por dispersão de energia.....	50
3.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS	51
3.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	51
3.5.1	Nanopartículas de argila bentonita organofílica e nanopartículas de ZnO	51
3.5.1.1	Método de difusão em ágar.....	51
3.5.2	Filmes de quitosana incorporados com nanopartículas de argila e óxido de zinco.....	52
3.5.2.1	Difusão em ágar (teste de halo)	52
3.5.2.2	Crescimento microbiano	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	NANOCOMPÓSITOS DE QUITOSANA.....	55
4.2	PROPRIEDADES MECÂNICAS: ENSAIO DE TENSÃO VERSUS DEFORMAÇÃO	70
4.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	80
4.3.1	Nanopartículas de argila bentonita organofílica e nanopartículas de ZnO	81
5	CONCLUSÃO.....	89
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE A – Curvas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	107

1 INTRODUÇÃO

Para garantir a preservação dos produtos alimentares, a qualidade da embalagem é fundamental, pois garante que o produto alimentício chegue até seu destino final em perfeitas condições (HAN, 2005). Por esta razão, novos conceitos de embalagens ativas estão desempenhando um papel cada vez mais importante na indústria, oferecendo soluções inovadoras para estender ou manter a durabilidade dos produtos, como também melhorar a qualidade e segurança alimentar (DOBRUCKA; CIERPISZEWSKI, 2014).

Embalagens produzidas a partir de polímeros naturais, como as proteínas e os polissacarídeos, são uma alternativa promissora em relação aos polímeros sintéticos (YOO et al., 2011), pois apresentam a vantagem de serem biodegradáveis e proporcionarem um ciclo de vida curto, colaborando para um desenvolvimento sustentável (IBARRA; SENDÓN; QUIRÓS, 2016).

Dentre os biopolímeros utilizados atualmente, a quitosana, produzida pela desacetilação da quitina, se apresenta como uma alternativa para ser usada como embalagem ativa de alimentos devido as suas propriedades antimicrobianas, de elasticidade, flexibilidade, biocompatibilidade e por fornecer uma boa barreira ao oxigênio (GIUNCHEDI et al., 1998; RINAUDO, 2006; LECETA; GUERRERO; DE LA CABA, 2013). Esta apresenta um alto peso molecular, formada por ciclos de piranose que contém ao menos 50 - 60% de unidades N-acetil-d-glucosamina e N-glucosamina e por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A quitosana possui potencial de aplicação na área alimentícia, na nutrição, na biotecnologia, na ciência dos materiais, nas drogas e nos produtos farmacêuticos, na agricultura e na proteção ambiental e, atualmente, na terapia genética (AZEVEDO et al., 2007). Dentre as várias aplicações, a quitosana tem atraído o interesse na indústria alimentícia para produção de filmes antimicrobianos e de revestimentos (CAGRI; UNSTUNOL; RYSER, 2004).

A incorporação de partículas em escala nanométrica em biopolímero de quitosana está sendo amplamente estudada (SOZER; KOKINI, 2009). Estas partículas apresentam uma proporção de área/volume de superfície elevada, resultando em intensa interação quando dispersas em matrizes poliméricas (DAMM; NEUMANN; MÜNSTEDT, 2006; ASSIS et al., 2012). Em consequência, aumentam as propriedades antimicrobianas, mecânicas e de barreira do filme, fazendo com que se tornem superiores aos compósitos convencionais (TRINDADE; O'BRIEN; PICKETT, 2001; SOZER; KOKINI, 2009).

Contudo, esses polímeros modificados pela incorporação de nanopartículas, os chamados, nanocompósitos, se distinguem dos convencionais não pelo simples fato das partículas terem dimensões nanométricas, mas também, pelo fato das suas propriedades serem determinadas por essas dimensões nanométricas (PAOLI, 2008).

Wu, Liu e Berglund (2002), como também, Bae et al. (2009), argumentam que as nanopartículas de argila mais utilizadas que proporcionam um aumento na resistência mecânica dos biopolímeros são as que pertencem à família dos filossilicatos, do grupo das smectitas, sendo a montmorilonita (MMT) a mais importante e a mais utilizada para produção de nanocompósitos. A argila bentonita, composta por aproximadamente 60% a 95% de montmorilonita (PAIVA et al., 2008), quando modificada organofilicamente, reduz sua energia, melhorando a interação com os polímeros (MARKARIAN, 2005; CARASTAN, 2007).

Para aprimorar a atividade antimicrobiana, nanopartículas metálicas são utilizadas, tais como óxido de alumínio (Al_2O_3), óxido férrico (Fe_2O_3), óxido de zinco (ZnO), nanopartículas de prata (LLORENS et al., 2012; RHIM; WANG; HONG, 2013), nanotubos de carbono e compostos orgânicos (FUJISHIMA; RAO; TRYK, 2000; ORIAKHI, 2000). O ZnO vem chamando bastante atenção pois, além de apresentar potencial antimicrobiano, possui outras características desejáveis para incorporação em matriz polimérica, como elevada estabilidade, boa atividade fotocatalítica (WANG, 2004) e também é reconhecido como substância segura para consumo (GRAS) pela U.S. Food and Drug Administration (21CFR182.8991) (FDA, 2014). Outra razão para que sua utilização seja uma motivação para o estudo é que, atualmente, o ZnO possui condições legais e científicas para comercialização (BLASCO; PICÓ, 2011).

A produção de nanocompósitos a partir de biopolímeros, sendo destinada, principalmente, a produtos alimentares de padaria e produtos à base de carne é o que atrai a maioria das aplicações das embalagens ativas de alimentos, principalmente no Japão, Austrália e Estados Unidos (SILVESTRE; CIMMINO; DURACCIO, 2011).

Apesar de existir vários trabalhos mostrando a síntese de nanocompósitos de quitosana incorporados com óxidos metálicos, óleos e alguns tipos de argila, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliam simultaneamente o efeito do ZnO e da argila bentonita organofílica.

Dessa maneira, neste trabalho são investigados os efeitos da combinação das nanopartículas de argila bentonita organofílica e óxido

de zinco sobre as propriedades mecânicas, físico-químicas e antimicrobianas do filme de quitosana para obtenção de embalagem de alimentos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar as propriedades mecânicas, físico-químicas e antimicrobianas frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de filmes de quitosana incorporados com nanopartículas de argila bentonita organofílica e nanopartículas de óxido de zinco.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) produzir o filme de quitosana e os nanocompósitos através do método de intercalação do polímero por solução utilizando ácido acético como solvente;
- b) analisar o filme de quitosana e os nanocompósitos, por meio de análises físico-químicas como grupos funcionais presentes, comportamento térmico e morfologia da superfície;
- c) avaliar as diferentes proporções de nanopartículas de argila bentonita organofílica e nanopartículas de ZnO através de planejamento experimental e análise estatística e verificar quais variáveis influenciam no aumento das propriedades mecânicas e térmicas;
- d) verificar o filme de quitosana e os nanocompósitos quanto às propriedades mecânicas de tensão, deformação e módulo de Young;
- e) investigar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de argila bentonita organofílica e das nanopartículas óxido de zinco frente às bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e às bactérias gram-negativas *Escherichia coli*;
- f) identificar a atividade antimicrobiana do filme de quitosana e dos nanocompósitos frente às bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e às bactérias gram-negativas *Escherichia coli*;

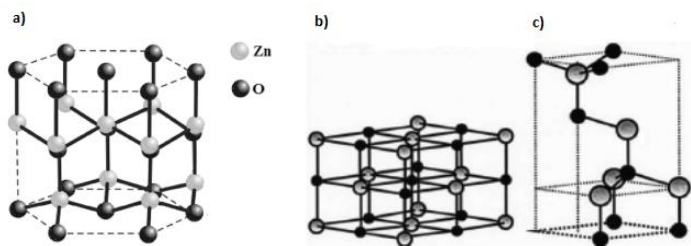
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÓXIDO DE ZINCO

O óxido de zinco é um composto inorgânico (ESPITIA et al., 2012), apresentado na forma de pó fino, de cor branca, de caráter anfótero, encontrado naturalmente no mineral chamado zincita. Apresenta massa específica de $5,6 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, é uma molécula covalente e um semiconductor intrínseco, ou seja, sem dopagem, apresentando uma alta energia de ligação de excitação e boa mobilidade eletrônica (JANOTTI; VAN DE WALLE, 2009). É também um composto com boa atividade fotocatalítica, alta estabilidade, com propriedades antimicrobianas e não tóxicas (WANG, 2004).

O ZnO apresenta estrutura cristalina e seus cristais estão dispostos em forma de wurtzita, blenda de zinco ou sal de rocha (Figura 1). Na fase wurtzita (a), em condições ambientes, permanece estável e apresenta uma estrutura hexagonal, onde cada átomo de zinco (Zn) está no centro de um tetraedro com quatro átomos de oxigênio (O); a estrutura do tipo blenda de zinco (b) pode ser estabilizada unicamente em substratos cúbicos e a estrutura do sal de rocha (c) pode ser obtida em altas pressões (ÖZGÜR et al., 2005; MARANA et al., 2010).

Figura 1 - Estrutura do ZnO: a) fase wurtzita; b) blenda de zinco; c) sal de rocha.



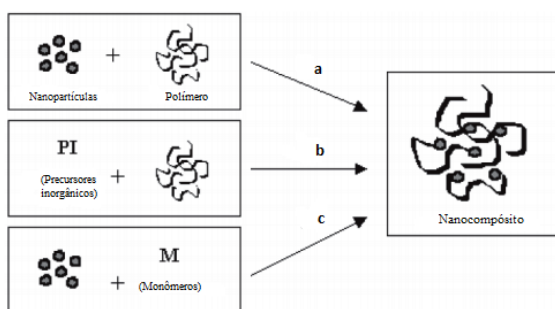
Fonte: ÖZGÜR et al., (2005); MARANA et al., (2010).

A produção de nanocompósitos, ou seja, em que ao menos um dos seus compostos apresenta dimensão em escala nanométrica, o ZnO se torna bastante promissor devido às suas potenciais propriedades mecânicas, ópticas, químicas, elétricas e magnéticas, que se acredita, em grande parte, que são resultado de sua superfície e confinamento quântico (WANG, 2004; HONG et al., 2006). Conseqüentemente, o ZnO consegue exibir diversas morfologias de crescimento em sua

nanoestrutura, tais como bastões, anéis, hélices/molhas, fitas, fios, etc., características estas que influenciam diretamente nas propriedades e na aplicação do material, que são dependentes das condições de síntese (WANG, 2004; FAN; LU, 2005; GUSSATI et al., 2010).

Os nanocompósitos podem ser obtidos com diferentes nanocargas, sendo elas partículas esféricas, fibras/nanotubos e estrutura em camadas. A Figura 2 mostra a rota de preparação dos nanocompósitos obtidos através da inserção do composto inorgânico na estrutura do polímero (a), síntese das nanopartículas *in situ* (b) e inserção no monômero e posterior polimerização *in situ* (c) (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

Figura 2 - Métodos de síntese dos nanocompósitos: a) mistura simples dos componentes; b) síntese de nanopartículas *in situ*; c) polimerização do polímero *in situ*.



Fonte: adaptado de Esteves, Barros-Timmons e Trindade (2004).

Na indústria, o ZnO atende as mais variadas aplicações (MORKOÇ; ÖZGUR, 2009). É utilizado na elaboração de cosméticos, na fabricação de borrachas, de tintas, de material cerâmico, etc., e na indústria de alimentos é empregado em embalagens, decorrente de suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, mecânicas e de barreira (KUO et al., 2010; ESPITIA et al., 2012; SINGH; NIMMO; WILLIAMS, 2013).

2.1.1 Efeito antimicrobiano

Atualmente, o ZnO é reconhecido como substância segura (GRAS) pela U.S. Food and Drug Administration e está sendo estudado devido ao seu excelente potencial antimicrobiano e antifúngico,

motivando o estudo da sua aplicação em comparação a outras nanopartículas metálicas (FDA, 2014).

Os antimicrobianos previnem o crescimento superficial de microrganismos nos alimentos, fazendo com que não ocorra contaminação e, conseqüentemente, desperdícios (LACOSTE et al., 2005). Estudos mostram que as nanopartículas de ZnO têm apresentado atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar (ESPITIA et al., 2012) e estão recebendo importância dos pesquisadores e da indústria (CHA; CHINNAN, 2004). É apresentado também como uma das melhores e mais seguras soluções para embalagens de alimentos, além de já ser incorporado em uma vasta quantidade de polímeros (MURARIU et al., 2011; SIRELKHATIM et al., 2015).

Stoimenov et al. (2002) mostraram que as nanopartículas óxido metálicas apresentam ótimas propriedades biocidas, tanto em bactérias gram-positivas, quanto em gram-negativas. Alguns dos principais agentes patogênicos de origem alimentar, como *Escherichia Coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, apresentaram redução do seu crescimento com a utilização de nanopartículas de ZnO, mostrando, assim, seu efeito inibidor (LIU et al., 2009).

A atividade antimicrobiana do ZnO é atribuída a sua ação bacteriostática ou bactericida dependendo da concentração de ZnO, ou seja, causando a inibição parcial ou a total (99%) dos microrganismos, respectivamente (JONES et al., 2008).

Apesar dos mecanismos da atividade antibacteriana do ZnO ainda não serem bem compreendidos, Fujishima et al. (2000) e Sawai e Yoshikawa (2004) acreditam que podem estar relacionados com a indução do stress oxidativo devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é altamente tóxico e consegue penetrar na célula bacteriana. O ZnO pode também ser ativado pela luz visível e ultravioleta, gerando espécies altamente reativas de oxigênio, como o radical hidroxil (OH \cdot), superóxido (O_2^{2-}) e H_2O_2 , que podem causar a deterioração da estrutura da membrana celular das bactérias. Stoimenov et al. (2002) e Sondi e Salopek-Sondi (2004) sugerem que a ligação das nanopartículas de ZnO na superfície das bactérias por meio de forças eletrostáticas também podem causar a morte bacteriana. Porém, dependendo das características intrínsecas de cada microrganismo e da concentração presente no meio, pode haver diferença no processo metabólico dos íons. Por exemplo, os íons Zn^{+2} ora podem ser indesejáveis e tóxicos para alguns microrganismos, ora podem servir como nutrientes para o crescimento bacteriano, visto que o

elemento zinco é um cofator essencial em diversos processos celulares (REDDY et al., 2007; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008).

Smentana et al. (2008) afirmam que as nanopartículas podem causar prejuízo direto à membrana celular, pois ao interagirem diretamente com a membrana bacteriana, aderindo e penetrando no interior da célula, induzem a formação de buracos na membrana celular e, como resultado, tem-se o vazamento do conteúdo celular.

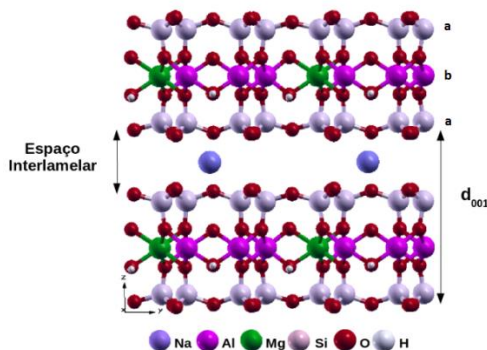
Stoimenov et al. (2002) citam que uma possível explicação do efeito bactericida do ZnO esteja relacionado com a textura abrasiva da superfície destas partículas. As nanopartículas de ZnO são mais abrasivas devido aos seus defeitos de superfície.

Segundo Padmavathy e Vijayaraghavan (2008), a atividade antimicrobiana do ZnO é quantitativamente avaliada pelo estudo do crescimento médio bacteriano. No entanto, o tamanho das partículas é um fator determinante para a análise da atividade antimicrobiana, onde partículas com menores dimensões exibem melhores propriedades antimicrobianas (SAWAI et al., 2002).

2.2 ARGILA BENTONITA ORGANOFÍLICA

Bentonita é uma terminologia tecnológica aplicada a argilas com granulação muito fina, sendo constituída essencialmente pelo argilomineral esmectítico montmorilonita e, em sua maioria, são formadas pela modificação de cinzas vulcânicas (GRIM; GÜVEN, 1978; PAIVA, et al., 2008). A cor da bentonita pode variar, sendo de cor castanha ao cinza azul, verde-oliva, marrom e, raramente, branca, como também confere a propriedade de expandir várias vezes o seu volume quando em contato com a água. Possui partículas de tamanhos que podem variar de 0,1 μm a 2 μm , com tamanho médio de 0,5 μm , e apresentam formato de placas ou lâminas empilhadas formando os tactóides (micro cristais). Como se pode observar na Figura 3, uma esmectita apresenta uma estrutura cristalina, sendo formada por duas folhas de tetraedros com silício no centro (a) e oxigênio nos vértices, intercaladas por uma folha central octaédrica de aluminato (b) e oxigênio ou hidroxila nos vértices (XIE et al., 2001; PAIVA et al., 2008).

Figura 3 - Estrutura cristalina de uma esmectita.



Fonte: adaptado de Fonseca et al., (2016).

Diferentes cátions podem ser substituídos na estrutura da montmorilonita, ou seja, o silício tetravalente (Si^{4+}) pode ser substituído pelo alumínio trivalente (Al^{3+}), ao passo que o Al^{3+} pode ser substituído pelo magnésio bivalente (Mg^{2+}), ferro bivalente (Fe^{2+}) ou lítio bivalente (Li^{2+}) (PAIVA et al., 2008). Consequentemente, essas substituições causam um desbalanceamento elétrico na superfície das camadas, gerando cargas negativas. Porém, no espaço interlamelar residem cátions livres que podem ser trocáveis por outros cátions (inorgânicos) com a função de equilibrar essas cargas negativas geradas pelas substituições (XIE et al., 2001). Quando estes cátions são hidratados eles podem ser trocados por cátions orgânicos que agem como surfactantes, em sua maioria sais de amônio quaternário, tornando a superfície das lamelas organofílicas e permitindo a intercalação de monômeros ou polímeros. O espaço existente entre as camadas pode ser utilizado para a produção de nanocompósitos para se estudar as interações físico-químicas que podem ocorrer entre estes íons e o polímero (CARASTAN, 2007).

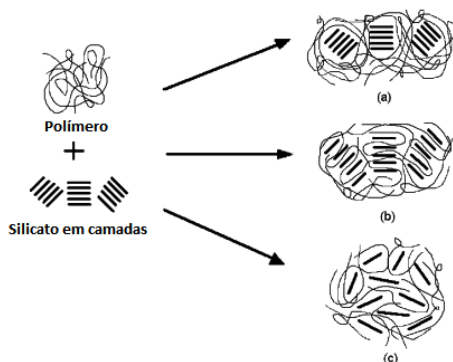
A bentonita pode ser sódica ou cálcica, porém a sódica possui capacidade de troca catiônica maior que a cálcica, propriedade esta que facilita a troca da água e dos cátions do espaço interlamelar com moléculas orgânicas, que é de fundamental importância para a produção de argilas organofílicas, como citado anteriormente. Além disso, a bentonita sódica apresenta maior área superficial, contribuindo, assim, com as características de elevada capacidade de adsorção e alta viscosidade (MURRAY, 2007).

A partir da década de 80, os pesquisadores conseguiram intercalar polímero entre as lamelas de argila (SENGUPTA et al., 2007) e

atualmente a maioria das argilas organofílicas produzidas é utilizada na produção de nanocompósitos poliméricos, visto que uma boa dispersão, esfoliação e intercalação das partículas da argila na matriz polimérica são de fundamental importância.

Na Figura 4 são apresentados três tipos de obtenção dos compósitos formados com cargas de estrutura em camadas, ou seja, camadas de silicatos (argilas). A primeira formação (a) é correspondente aos compósitos convencionais, em que os silicatos não são incorporados na matriz polimérica. Na segunda (b), os silicatos se apresentam intercalados e na terceira (c) os silicatos se apresentam em camadas esfoliadas (SENGUPTA, 2007).

Figura 4 - Formação dos compósitos em estrutura de fase separada (a), estrutura intercalada (b) e estrutura esfoliada (c).



Fonte: adaptado de Sengupta (2007).

Quando há pouca interação entre a argila e o polímero, que ocorre na maioria das vezes quando a argila não é tratada organofílicamente, não há penetração alguma do polímero nas galerias do silicato. Neste caso, obtém-se um compósito convencional, onde os tactóides se encontram dispersos na matriz polimérica. Em alguns casos, os compósitos podem também conter partes intercaladas e esfoliadas ao mesmo tempo (CARASTAN, 2007).

A argila bentonita organofílica se torna atrativa para a produção de nanocompósitos pois, além de estar associada ao baixo custo e disponibilidade natural, vem ao encontro da melhoria das propriedades mecânicas, físicas (térmica e de barreira) e química dos nanocompósitos, reduzindo a energia superficial e aumentando a sua compatibilidade com a matriz polimérica. Além disto, facilita que o

polímero se intercale nas camadas da argila devido ao aumento do espaçamento basal (MARKARIAN, 2005; CARASTAN, 2007; PAIVA et al., 2008).

2.2.1 Efeito nas propriedades mecânicas

O grau de dispersão da argila na matriz polimérica é dependente das propriedades dos nanocompósitos. Para uma carga se comportar como um bom agente de reforço na matriz polimérica faz-se necessário considerar três fatores: tamanho de partícula, estrutura e características da superfície (BRAGA, 2010). Em adição, a eficiente interação entre matriz e carga está relacionada com as características interfaciais, superfície formada por uma fronteira comum entre o reforço e a matriz que se encontram em contato, e que permite a transferência de carga entre os componentes. Essa adesão interfacial está, por sua vez, intimamente relacionada com a transferência de tensão da matriz para o reforço (SENGUPTA et al., 2007; BRAGA, 2010). Logo, a maior interação química entre esses dois componentes faz com que as tensões, nas quais o material é submetido, sejam transferidas com mais eficiência da matriz para a carga, conferindo maior resistência mecânica (BRAGA, 2008).

2.3 POLÍMEROS

Os polímeros são compostos de origem orgânica natural ou sintética formados pela repetição de pequenas unidades químicas chamadas monômeros. Contudo, nem sempre os monômeros constituem a unidade repetitiva, como é o caso do Nylon 66, no qual a unidade repetitiva difere da unidade monomérica por duas moléculas de água (SARANTÓPOULOS et al., 2002; AKCELRUD, 2007).

Os monômeros são geralmente moléculas orgânicas simples contendo uma ligação dupla ou, no mínimo, dois grupos funcionais ativos que agem como força motriz para acrescentar uma molécula de monômero sobre a outra para formar a molécula do polímero. Esse processo de transformação é chamado de polimerização, que é feita por reações de adição e condensação, que implicam na não formação ou formação de subprodutos, respectivamente, durante o processo de polimerização (CHANDA; ROY, 1987; ASKELAND; FULAY; WRIGHT, 2011).

Os plásticos são materiais à base de compostos poliméricos e eles podem conter aditivos que melhoram suas propriedades (ASKELAND; FULAY; WRIGHT, 2011).

As propriedades de um polímero são função da estrutura química e molecular do material, da massa específica, da massa molecular, do grau de cristalinidade, do tipo de copolímero, etc. O processo de fabricação de filmes plásticos, por sua vez, determina as propriedades associadas à orientação das moléculas, ao grau de cristalinidade, à homogeneidade da distribuição de espessura do filme, como também da presença ou ausência de defeitos superficiais (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

A massa molecular tem grande efeito nas propriedades do polímero. Por exemplo: polímeros com elevada massa molecular média (nos processos industriais há uma variação entre as massas moleculares das moléculas individuais) possuem maior resistência ao *stress cracking*, ao impacto e à tração, porém baixa processabilidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

A massa específica de um polímero é influenciada pela composição química, pela massa molecular das moléculas individuais, pela conformação adotada por uma molécula numa estrutura cristalina e pela forma como estão compactadas as moléculas. Polímeros compostos por somente carbono e hidrogênio apresentam sua massa por unidade de volume baixa. Entretanto, polímeros que apresentam oxigênio, cloro, flúor ou bromo em sua estrutura possuem maior massa específica (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Existem polímeros amorfos e cristalinos. Os amorfos são formados por arranjos atômicos aleatórios e sem simetria ou ordenação de longo alcance. Os cristalinos possuem características geométricas perfeitamente ordenadas; contudo, os polímeros nunca são perfeitamente cristalinos (ASKELAND; FULAY; WRIGHT, 2011).

A proporção entre o somatório das regiões cristalinas sobre a massa total de polímero é definida como grau de cristalinidade, que é de fundamental importância, pois afeta várias propriedades de um polímero. Na Figura 5 é apresentado o efeito do grau de cristalinidade sobre as propriedades do polímero (SARANTÓPOULOS et al., 2002; ASKELAND; FULAY; WRIGHT, 2011).

Figura 5 - Efeito do grau de cristalinidade sobre as propriedades dos polímeros.



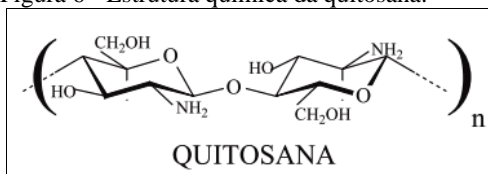
Fonte: adaptado de SARANTÓPOULOS et al., (2002).

2.3.1 Quitosana

A quitosana é definida como um copolímero catiônico de origem natural que apresenta potencial antimicrobiano. Não é tóxica, possui vantagens de biodegradabilidade, biocompatibilidade, caráter hidrofílico, boa adesão e tem alta capacidade de formar filmes (GOOSEN, 1996; TIANWEI, XIAOJING; WEIXIA, 2001; HU; JOU; YANG, 2003).

Apresenta alta massa molecular que consiste por ciclos de piranose que contém ao menos 50-60% de unidades N-acetil-d-glucosamina e N-glucosamina e ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), conforme ilustra a Figura 6. O grau médio de acetilação (GA) define a porcentagem de unidades presentes, em média, nas cadeias do polímero (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina em meio alcalino e a altas temperaturas, embora esta desacetilação quase nunca é completa (KUMAR, 2000; AZEVEDO et al., 2007). O grau de desacetilação e a massa molecular são dois fatores importantes que acabam influenciando na solubilidade da quitosana (SANTOS, 2006).

Figura 6 - Estrutura química da quitosana.



Fonte: CAMPANA-FILHO et al., (2007).

No estado sólido, a quitosana apresenta estrutura semicristalina. Sua morfologia tem sido muito investigada e muitos polimorfismos são mencionados na literatura (AZEVEDO et al., 2007).

É solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos por apresentar o grupo funcional amino (NH_2) em sua estrutura molecular (GOOSEN, 1996) que propicia a modificação química da estrutura polimérica original, como também amplia suas propriedades funcionais (AIROLDI, 2008). Além disto, o grupo amino pode ser protonado para amônio (NH_3^+) em um meio ácido, resultando em atividade antifúngica ou antimicrobiana, desde que cátions possam ligar-se com sítios aniônicos em proteínas (JUNG et al., 1999).

O potencial da quitosana é amplo, tendo aplicações na área alimentícia, na biotecnologia, na ciência dos materiais, em drogas e produtos farmacêuticos, na agricultura e proteção ambiental e, atualmente, na terapia genética (AZEVEDO et al., 2007). Dentre alguns exemplos podem-se citar sua atuação como agente floculante para tratamento de águas e águas residuais, agente quelante para a remoção de frações de metais pesados à partir de soluções aquosas, revestimento para melhorar as características de tingimento de fibras de vidro, adesivos, espessantes, fibras e filmes (HENCH, 1998).

Dentre as várias aplicações, a quitosana tem atraído muito interesse na indústria alimentícia para produção de filmes antimicrobianos e revestimentos (CAGRI; UNSTUNOL; RYSER, 2004), sendo que os biopolímeros melhoram a qualidade e a durabilidade dos alimentos, além de serem favoráveis a incorporação de uma variedade de aditivos, como os antimicrobianos, antifúngicos e antioxidantes (HAN et al., 2010).

Filmes de quitosana são facilmente preparados por evaporação à partir de soluções ácidas diluídas. Vários estudos sobre as características antimicrobianas de filmes de quitosana foram realizados anteriormente (CHEN; YEH; CHIANG, 1996; OUATTARA et al., 2000 ; COMA et al., 2002).

Como desvantagem, o biofilme de quitosana apresenta baixa resistência mecânica e de barreira a gases e fraca resistência à água (WANG et al., 2005; XU; REN; HANNA, 2006). Devido a este fato, a produção de filmes híbridos com biopolímeros e materiais em escala nanométrica, conhecidos como filmes de nanocompósitos, estão sendo uma alternativa viável e promissora devido aos mesmos melhorarem algumas propriedades dos biopolímeros, como a estabilidade térmica e oxidativa (DARDER; COLILLA; RUIZ-HITZKY, 2003), a resistência mecânica (LAVORGNA et al., 2010), a diminuição da permeabilidade de gases e líquidos (RHIM; NG, 2007; CASARIEGO et al., 2009), o retardamento à chama e a melhor resistência a solventes (KUMAR, 2003 ; HAN et al., 2010).

2.3.2 Incorporação de nanomateriais e substâncias com efeito antimicrobiano

Pesquisadores, como Trindade, O'Brien e Pickett (2001); Damm, Neumann e Münstedt (2006); Sozer e Kokini (2009) e Assis (2012) têm abordado que a incorporação de nanomateriais, usualmente entre 0,1 e 100 nm em polímeros, origina materiais com maior resistência mecânica, maior estabilidade térmica ou com propriedades ópticas, magnéticas ou elétricas superiores pelo fato de apresentarem uma área de superfície elevada. Quando dispersas em matrizes poliméricas conseguem promover uma intensa interação química entre as cargas e o polímero.

Produtos como carne, peixe, aves, de padaria, queijo, frutas e vegetais são os mais utilizados em embalagens produzidas a partir de agentes antimicrobianos (LABUZA; BREENE, 1989; SILVESTRE; CIMMINO; DURACCIO, 2011).

Além da incorporação de nanomateriais em biofilme de quitosana, vários autores relatam estudos sobre a incorporação de outras substâncias (óleo de alho e cravo, ácidos orgânicos, bacteriocinas, extratos de especiarias, etc.) (ABOUGROUN; COUSIN; JUDGE, 1993; MILLER; CALL; WHITING, 1993; HOTCHKISS, 1995; MÖLLER et al., 2004; PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005; MÜLLER, 2013) em outros materiais, como ácido polilático (PLA), gelatina, vidro, papel, poliuretano, polietileno (GHULE et al., 2006; LI et al., 2009; ESKANDARI et al., 2011; EMAMIFAR et al., 2011; SHANKAR, 2015; MARRA, et al., 2016), utilizando diferentes métodos de incorporação e apresentaram resultados eficazes contra a proliferação de bactérias patogênicas em alimentos.

Li et al. (2010) estudaram os efeitos da atividade antimicrobiana em quitosana incorporada com nanopartículas de ZnO e prata (Ag) e constataram que os filmes apresentam excelentes propriedades antimicrobianas contra *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e levedura. Também descobriram que misturas de quitosana com nanopartículas de ZnO e Ag, especialmente com 0,1% em peso de Ag e 10% em peso de ZnO, apresentaram um amplo e eficaz espectro de atividades antimicrobianas em relação a misturas contendo apenas quitosana/nano de ZnO e quitosana/nano de Ag, além de manterem a cor inicial da quitosana, o que torna viável a aplicação em embalagens de alimentos.

Filmes elaborados com PLA incorporados com 5% em peso de ZnO apresentaram uma redução de 99,99% de atividade antimicrobiana para *E. coli* após 24 h de incubação (MARRA et al., 2016).

Emamifar et al. (2011) observaram o efeito do crescimento microbiano de *L. plantarum* em embalagens de suco de laranja feitas a partir de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporado com nanopartículas de ZnO e Ag utilizando diferentes tempos de incubação. Os resultados mostraram que o PEBD incorporado com nano de Ag apresentou efeitos antimicrobianos mais expressivos comparados com o PEBD com nano de ZnO durante 112 dias de armazenamento de suco de laranja inoculado.

Nanocompósitos elaborados a partir de gelatina e ZnO mostraram intensa atividade antibacteriana frente a ambas bactérias patogênicas gram-positivas (*L. monocytogenes*) e gram-negativas (*E. coli*) (SHANKAR, 2015).

Han et al. (2010) estudaram os efeitos da atividade antimicrobiana em quitosana incorporada com nanopartículas de argila (Na^+ montmorilonita) e verificaram que os nanocompósitos mostraram um efeito sinérgico contra *E. coli* e *S. aureus*. Constataram também que as bactérias gram-negativas são mais suscetíveis aos agentes antimicrobianos, fato este que pode estar relacionado a uma menor parede celular, permitindo uma absorção mais rápida dos íons na célula. Em adição, citam que a combinação da quitosana com o ácido orgânico (ácido acético utilizado na formulação dos filmes) pode também ter aumentado o efeito antimicrobiano.

A utilização de substâncias antimicrobianas em matriz polimérica para a produção de embalagens de alimentos tem promovido benefícios notáveis, visto que prolongam a vida útil do produto em termos de prazo de validade e promovem segurança alimentar ao inibirem a proliferação de patógenos nos alimentos (RODRIGUES; HAN, 2000; COMA et al., 2001).

2.3.3 Incorporação de nanomateriais e substâncias com efeito nas propriedades mecânicas

Os principais nanomateriais que são estudados atualmente para aumentar a resistência mecânica dos nanocompósitos são as argilas, principalmente as que são modificadas organofilicamente, pois conferem melhor interação com os monômeros e polímeros (; MARKARIAN, 2005; CARASTAN, 2007). Porém, não se descarta a investigação da associação da argila com outros nanomateriais a fim de

se obter um efeito sinérgico que melhore ainda mais a resistência mecânica dos nanocompósitos.

Nanoargilas, como a montmorilonita sódica (MMT- Na^+) e Cloisite 30B incorporadas em matriz de quitosana, foram estudadas por Xu, Ren e Hanna (2006) e suas propriedades mecânicas foram analisadas. O estudo revelou que a força de tensão dos nanocompósitos aumentou com a adição de pequenas quantidades (1 e 3% em peso em relação a 20 g quitosana) de MMT- Na^+ , mas não significativamente quando Cloisite 30B foi adicionada. Já, o alongamento na ruptura diminuiu com a adição de Cloisite 30B, mas não expressivamente com a adição de MMT- Na^+ .

Li et al. (2010) estudaram as propriedades mecânicas das nanopartículas de ZnO incorporadas em quitosana e constataram que os nanocompósitos, com até 3% em peso de ZnO (em relação a 1 g de quitosana), apresentaram melhores propriedades mecânicas em relação a quitosana pura. A força de tensão dos nanocompósitos, com até 10% em peso de ZnO, também foi maior em relação à quitosana pura. Porém, os autores destacam que 1% de ZnO em peso exibiu as melhores propriedades e à medida que a quantidade de ZnO era aumentada, as propriedades mecânicas começaram a diminuir. Este fato pode estar relacionado com o movimento das cadeias moleculares, as quais se tornam mais fracas à medida que maiores quantidades de ZnO se ligam com os grupos -OH e - NH_2 da quitosana.

Abdollahi et al. (2012) incorporaram óleo essencial de alecrim e nanoargila MMT em quitosana e avaliaram seu impacto nas propriedades mecânicas dos compósitos. Os autores descobriram que o efeito combinado da argila e do óleo de alecrim melhoram significativamente a força de tensão e alongamento da quitosana ($p < 0.05$). Segundo Xu, Ren e Hanna (2006), o aumento nas propriedades mecânicas, à baixas concentrações de argila, pode estar relacionado à dispersão uniforme da (MMT) na matriz de quitosana e intensa interação entre ambas. Já a diminuição nas propriedades mecânicas, a altas concentrações de argila, pode ser causada pela agregação das partículas de MMT com a alta energia de superfície. Em relação ao óleo de alecrim em baixas quantidades, os nanocompósitos melhoraram significativamente. A maior força de tensão foi observada para nanocompósitos com até 5% de MMT e 0,5% de óleo (em relação a 20g de quitosana), cujo valor obtido esteve em torno de 36,5% maior que a quitosana pura. Em adição, o alongamento dos filmes melhora expressivamente em até 44% com a incorporação de óleo, podendo ser atribuído à sua habilidade plastificante.

2.4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS VINCULADAS AOS ALIMENTOS

Uma ampla quantidade de organismos causadores de doenças decorrentes da ingestão de alimentos contaminados estão relacionados a bactérias patogênicas. As bactérias são encontradas em uma variedade de alimentos, apresentando várias estruturas, produtos ou mecanismos, que são responsáveis por gerar doenças agudas, crônicas ou intermitentes (FORSYTHE, 2013).

As bactérias são seres procarióticos, cuja estrutura da parede celular as dividem em dois grandes grupos: gram positivas e gram negativas. As gram positivas são constituídas por uma parede celular de peptídeoglicano mais espessa situada sobre a membrana plasmática, enquanto que as gram negativas contêm somente uma camada de lipopolissacarídeo, porém apresentam a vantagem de serem mais resistentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria do grupo gram positiva, anaeróbica facultativa, que se apresenta na forma de cocos, agrupando-se em formato de cachos de uva com temperatura de crescimento em torno de 30 a 37 °C. São imóveis, medem de 0,5 a 1,0 µm e encontram-se frequentemente na pele e na mucosa nasal, podendo disseminar uma ampla variedade de infecções por meio dos alimentos (LOWY, 1998).

Cerca de 45% das intoxicações alimentares são causadas por *S. aureus*, espécie mais frequente dentre os *Staphylococcus*, e é apontada como um dos tipos mais comuns de doença transmissível por alimento. A intoxicação causada por estas bactérias ocorre devido à produção de toxinas proteicas termoestáveis, denominadas de enterotoxinas (ARCURI et al., 2006; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007). Pelo fato desta enterotoxina ser termoestável, ela não é inativada a altas temperaturas (SANTOS et al., 2007; MADIGAN et al., 2010).

Carnes e derivados, produtos a base de ovos, produtos de panificação, como bolos com cremes, leite e seus derivados, são alimentos frequentemente atribuídos em casos de intoxicação alimentar estafilocócica. No entanto, qualquer alimento manipulado e armazenado em temperatura elevada possui potencial para proliferação do microrganismo e consequente produção de enterotoxina (FDA, 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Já em lácteos, a intoxicação pode ocorrer devido ao consumo de leite infectado de vacas com mastite

estafilocócica, assim como dos derivados lácteos fabricados a partir desse leite (JAY, 2005).

2.4.2 *Escherichia coli*

E. coli são bacilos gram-negativos flagelados, com dimensões entre 0,3 a 1 e 1 a 6 μm . São provenientes da flora intestinal, com características de serem anaeróbios facultativos e não esporulados. Pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo uma das espécies mais comuns e mais importantes (ALVES, 2012; PAULA, CASARIN e TONDO, 2014).

São bactérias oportunistas mesofílicas, capazes de se desenvolver em temperaturas entre 7 e 46 °C. Sua temperatura ótima de crescimento é de 37 °C e seu pH ótimo é próximo do neutro. Contudo, algumas cepas conseguem se multiplicar a 4 °C e se desenvolver em pH abaixo de 4,4 (GERMANO, 2001).

A transmissão dessa bactéria ocorre através da água ou alimentos contaminados, ou através do contato com as fezes da pessoa contaminada. Alimentos crus, tanto de origem vegetal ou animal (que não tenham sido processados) podem veicular *E. coli*. Estas bactérias causam infecções gastrintestinais e quando produzem toxinas causam graves doenças de origem alimentar (ALVES, 2012; TORTORA, FUNKE e CASE, 2017).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da revisão bibliográfica realizada, destaca-se a importância de se utilizar a quitosana como uma alternativa para obtenção de um polímero biodegradável com muitas características desejáveis para se produzir embalagem ativa de alimentos.

Também foi possível analisar qual mineral e qual composto inorgânico, do grupo das smectitas e dos óxidos metálicos, respectivamente, têm maior possibilidade de fornecer melhores resultados mecânicos, físico-químicos e antimicrobianos quando incorporados em quitosana levando em consideração aspectos sustentáveis, econômicos, de qualidade e segurança alimentar. Sobretudo, a concentrações (de 1 e 3% em peso de argila e 5 e 8% em peso de ZnO), utilizadas neste trabalho.

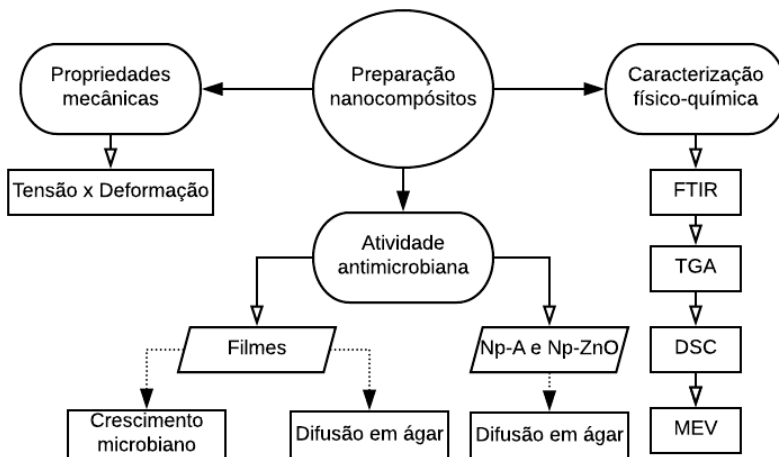
Da revisão bibliográfica realizada, não foi encontrado nenhum artigo que estuda o efeito simultâneo da argila bentonita modificada

organoflicamente e ZnO em quitosana, conforme observado neste trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais, bem como, as metodologias empregadas para a realização dos procedimentos experimentais, para a obtenção de nanocompósitos de quitosana-argila-ZnO, sua caracterização físico-química e análise das propriedades mecânicas e antimicrobianas. Na Figura 7, é apresentado o fluxograma global das atividades a serem desenvolvidas no presente estudo.

Figura 7 - Fluxograma global das etapas a serem desenvolvidas no estudo.



Fonte: a autora (2017).

3.1 MATERIAIS

A quitosana foi cedida pela empresa Purifarma (São Paulo, Brasil) para o Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC. O grau de desacetilação (GD) da quitosana e sua massa molar foi determinada por Müller (2013) através do método descrito por Signini e Campana Filho (1998) e apresentou uma GD de 81,9% e massa molar de 111,01 kDa.

O ZnO utilizado foi fornecido pela empresa Kher Nanotecnologia Química Ltda. A produção das nanopartículas de ZnO foi obtida por Souza (2015) segundo método descrito por Gusatti et al. (2010), onde as Np-ZnO mostraram-se com elevado grau de pureza, com morfologia predominante do tipo bastão e com comprimento entre 90,1 e 100,0 nm

(10,5 %) e espessura entre 80,1 e 90,0 nm (21 %) e valores médios de 145,1 e 97,2 nm, respectivamente.

A argila bentonita utilizada foi fornecida gentilmente pela Mina de Boane-Moçambique. Sua capacidade de troca catiônica foi determinada por Massiga et al. (2010) que obtiveram o valor de 67 mmol/100 g de bentonita. Macuvele (2016) submeteu a argila bentonita ao processo de organofilização com octadecilamônio.

Os meios de cultura utilizados nos testes antimicrobianos foram ágar Müeller-Hinton (Kasvi) e caldo infusão de cérebro e coração - BHI (Himedia).

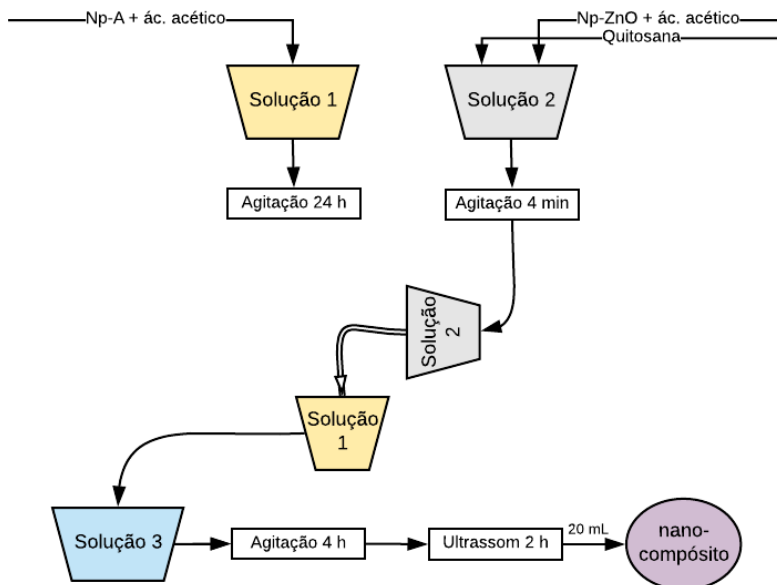
As bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e as bactérias gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram utilizadas. As bactérias teste foram ativadas em 3 mL de caldo BHI (Himedia) a 37 ± 1 °C por 24 h antes do início dos testes.

3.2 PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

O método de preparação dos nanocompósitos foi feito por intercalação do polímero por solução utilizando ácido acético como solvente, em que se torna possível misturar o polímero com a argila e o óxido de zinco no mesmo solvente (ZHA et al., 2005).

Para a produção dos nanocompósitos, quantidades apropriadas de Np-A foram dispersas em 5 mL de solução de ácido acético (1% v/v) e mantidas em agitação durante 24 h. Quantidades apropriadas de Np-ZnO foram diluídas em 100 mL de solução de ácido acético a 1% (v/v) e mantidas sobre agitação por 4 min. 1 g de quitosana em pó foi adicionada na solução de óxido de zinco e agitada por mais 4 min para se obter uma boa dissolução do polímero. Em seguida, esta solução foi depositada na solução de argila e deixada em constante agitação por 4 h e ultrassom por 2 h. Finalizado o processo, 20 mL da solução pronta foi adicionada em placas de Petri (diâmetro de 8,5 cm) e mantida em secagem por, no mínimo, 72 h a temperatura ambiente ($T = 25$ °C). Na Figura 8 é apresentado um fluxograma operacional da produção dos nanocompósitos.

Figura 8 - Fluxograma operacional para o preparo dos nanocompósitos.



Fonte: a autora (2017).

Para a escolha das quantidades de Np-A (1 e 3% em peso) e Np-ZnO (5 e 8% em peso) a se incorporar na matriz polimérica de quitosana para produção de nanocompósitos, foram feitos dois planejamentos experimentais: fatorial 2^2 e central composto (Tabelas 1 e 2). Para o planejamento fatorial as variáveis de resposta escolhidas foram as propriedades mecânicas e para o central composto foram as propriedades térmicas. Os planejamentos foram analisados pelo método de superfície de resposta com o objetivo de obter os melhores nanocompósitos, além de observar o efeito das variáveis independentes sobre as variáveis de resposta. As variáveis independentes selecionadas foram: a concentração de argila bentonita organofílica e a concentração de ZnO.

Os dados experimentais foram obtidos com o auxílio do software Statistics versão 10 (StatSoft, Inc, USA). A tensão (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de Young (GPa) foram as variáveis dependentes selecionadas como resposta do ensaio mecânico, como também foi realizado teste de Tukey para comparação das médias das respostas mecânicas. E, para a resposta do ensaio térmico foram escolhidas as variáveis dependentes: entalpia de desidratação (J/g),

temperatura de decomposição ($^{\circ}\text{C}$), entalpia de decomposição (J/g) e temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$).

Para o planejamento central composto as variáveis independentes e seus níveis foram codificados em $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$, totalizando 10 experimentos, incluindo 4 pontos cubos, 4 pontos axiais e 2 pontos centrais (Tabela 1).

Para o planejamento fatorial as variáveis independentes e seus níveis foram codificados em -1 , 0 , 1 , totalizando 5 experimentos, incluindo 4 pontos cubos e 1 ponto central (Tabela 2).

Para cada resposta estudada, uma análise de variância (ANOVA) e matriz de efeitos estimados foram realizados, a um nível de confiança de 95%. Diagramas de Pareto também foram construídos e analisados.

Tabela 1 – Quantidades e relações mássicas de argila e ZnO estabelecidas de acordo com o planejamento central composto em relação a 1 g de quitosana.

Experimentos	Amostras	RM de ZnO em Q (wt%)	Quant. ZnO adicionado (g)	RM de argila em Q (wt%)	Quant. argila adicionada (g)
1	Q1	5,0 (-1)	0,050	1,00 (-1)	0,0100
2	Q2	5,0 (-1)	0,050	3,00 (1)	0,0300
3	Q3	8,0 (1)	0,080	1,00 (-1)	0,0100
4	Q4	8,0 (1)	0,080	3,00 (1)	0,0300
5	Q5	4,4 ($-\alpha$)	0,044	2,00 (0)	0,0200
6	Q6	8,6 (α)	0,086	2,00 (0)	0,0200
7	Q7	6,5 (0)	0,065	0,59 ($-\alpha$)	0,0059
8	Q8	6,5 (0)	0,065	3,40 (α)	0,0340
9	Q9	6,5 (0)	0,065	2,00 (0)	0,0200
10	Q10	6,5 (0)	0,065	2,00 (0)	0,0200

RM - Relação mássica; Q - quitosana; Quant. – quantidade.

Fonte: desenvolvido pela autora (2017).

Tabela 2 – Quantidades e relações mássicas de argila e ZnO estabelecidas de acordo com o planejamento fatorial em relação a 1 g de quitosana.

Experimentos	Amostras	RM de ZnO em Q (wt%)	Quant. ZnO adicionado (g)	RM de argila em Q (wt%)	Quant. argila adicionada (g)
1	Q1	5,0 (-1)	0,050	1 (-1)	0,01
2	Q2	5,0 (-1)	0,050	3 (1)	0,03
3	Q3	8,0 (1)	0,080	1 (-1)	0,01
4	Q4	8,0 (1)	0,080	3 (1)	0,03
5	Q9	6,5 (0)	0,065	2 (0)	0,02

RM - Relação mássica; Q - quitosana; Quant. – quantidade.

Fonte: desenvolvido pela autora (2017).

Filmes de quitosana pura e nanocompósitos apenas com argila (QA) e somente com óxido de zinco (QZnO) foram também preparados a fim de se avaliar os resultados a partir destas concentrações individuais e não estão incluídos no planejamento experimental. As quantidades de argila e de ZnO escolhidas correspondem ao valor médio dos valores mínimos e máximos propostos no planejamento experimental. Na Tabela 3 as quantidades de argila e de ZnO utilizadas em relação a 1 g de quitosana são apresentadas.

Tabela 3 - Quantidades e relações mássicas de argila e ZnO utilizadas em relação a 1 g de quitosana.

Amostras	RM de ZnO em Q (wt%)	Quant. ZnO adicionado (g)	RM de argila em Q (wt%)	Quant. argila adicionada (g)
Q	0,0	0,000	0	0,00
QA	0,0	0,000	2	0,02
QZnO	6,5	0,065	0	0,00

RM - Relação mássica; Q - quitosana; Quant. – quantidade.

Fonte: desenvolvido pela autora (2017).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O filme de quitosana e os filmes de nanocompósitos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia com dispersão de energia (EDS).

3.3.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A análise de FTIR foi realizada para determinar os grupos funcionais presentes no filme de quitosana pura e nos nanocompósitos. Dependendo das ligações interatômicas, diferentes tipos de vibrações entre átomos podem ser observados. A análise de FTIR foi realizada na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC utilizando o software Resolutions Pro versão 5.2.0 (Agilent Technologies) com alcance de 400 a 4000 cm^{-1} em resolução de 4 cm^{-1} .

3.3.2 Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram obtidas por meio de um analisador termogravimétrico Netzsch, modelo STA 449 F3 com um programa de temperatura de 25 a 800 °C, taxa de aquecimento de 10°C/min e vazão de 80 mL/min, sob atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química da UFSC.

3.3.3 Calorimetria exploratória diferencial

As medições de DSC foram realizadas no equipamento Perkin-Elmer Jade-DSC na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Cerca de 7mg de amostra foram colocados em cadinhos de alumínio modelo Perkin-Elmer. O processo desenvolveu-se em atmosfera de nitrogênio em 20 mL/min em três estágios: aquecimento de 25 °C a 400 °C (taxa 10°C/min), seguido de resfriamento até -30 °C (taxa 10 °C/min) e reaquecimento até 400 °C (taxa 10 °C/min). O procedimento foi realizado segundo a Norma ASTM D 3417.

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por dispersão de energia

O filme de quitosana e os nanocompósitos foram caracterizados utilizando a técnica de MEV (JEOL JSM-6390LV) acoplado com equipamento de EDS (NORAN System SIX versão 2.0), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, UFSC. O preparo das amostras foi realizado com a fixação dos filmes em um suporte metálico, *stub*, por

meio de uma fita adesiva dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro, sob vácuo.

A superfície dos filmes foram analisadas em MEV com ampliação de 50 e 5000 vezes e tensão de 5 e 10 kV. Em EDS foram utilizados ampliação de, aproximadamente, 150 vezes e tensão de 5 e 10kV e estudadas entre uma ou duas regiões na superfície dos filmes para observar a distribuição elementar de zinco, silício, oxigênio e carbono.

3.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS

A força de tensão, alongamento na ruptura e módulo de Young do filme de quitosana e dos nanocompósitos foram determinados com o equipamento da marca Instron Universal Testing Machine (Modelo TA.HD.plus Texture Analyser, Stable Micro Systems) na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. De acordo com a Norma ASTM D 882-02 (para filmes com espessura inferior a 1 mm), as amostras foram seccionadas em formato retangular com dimensões de $2,54 \times 7,5$ cm. A distância inicial entre as garras foi ajustada em 40 mm e a velocidade em 0,01mm/s. Este teste foi repetido 6 vezes para cada amostra com o objetivo de confirmar sua reprodutibilidade.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ensaio envolvendo a atividade antimicrobiana foram realizados visando determinar se os filmes de quitosana incorporados com nanopartículas de argila e ZnO são capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ.

3.5.1 Nanopartículas de argila bentonita organofílica e nanopartículas de ZnO

3.5.1.1 Método de difusão em ágar

Foi realizado poços em meio de cultura sólido. O ágar Müeller-Hinton é recomendado como meio para padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por difusão (Norma M2-A8 -

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS).

O método consistiu na abertura de poços, de aproximadamente 8 mm de diâmetro, no ágar Müeller-Hinton previamente inoculado com a bactéria teste, na concentração de 10^8 UFC/mL pela técnica de plaqueamento em superfície. Em cada placa foram feitos três poços equidistantes e preenchidos com 0,10 g de Np- ZnO e Np-A.

O resultado foi analisado através da presença ou ausência de um halo de inibição de crescimento microbiano em torno do poço, cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do agente antimicrobiano testado e com a sensibilidade da bactéria.

3.5.2 Filmes de quitosana incorporados com nanopartículas de argila e óxido de zinco

3.5.2.1 Difusão em ágar (teste de halo)

O método de difusão em ágar foi realizado através da fixação de amostras de filmes, em formato circular com diâmetro de 1 cm, em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton previamente inoculado com a bactéria teste, na concentração de 10^8 UFC/mL, pela técnica de plaqueamento em superfície. O controle foi o filme de quitosana sem a incorporação de Np-A e Np-ZnO. O teste foi realizado em triplicata. O resultado foi analisado através da presença ou ausência de um halo de inibição de crescimento microbiano em torno do filme, cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano testado e a com a sensibilidade da bactéria.

3.5.2.2 Crescimento microbiano

Conforme metodologia descrita pela norma japonesa JIS Z 2801-10 adaptada por Capelezzo (2017), as suspensões bacterianas foram cultivadas em caldo BHI durante 24 h a 37 ± 1 °C e, após, ajustadas em água salina 0,85% para uma concentração inicial de 10^4 UFC/mL.

Os filmes utilizados para os testes antimicrobianos foram previamente esterilizados em luz ultravioleta durante 30 min.

O ensaio consistiu na adição de 40 µL da suspensão bacteriana em cada filme, com dimensões de 2×2 cm, e adição de 1 mL de água salina a 0,85% ao redor de cada um destes com o objetivo de manter a umidade do ambiente propícia ao crescimento bacteriano, sendo que cada filme foi colocado individualmente em uma placa de Petri. Uma lâmina de vidro estéril era colocada sobre o filme para espalhar a

alíquota de bactérias por toda a extensão dos mesmos. As placas foram, então, encaminhadas à estufa bacteriológica à 37 ± 1 °C.

A análise foi realizada nos tempos de 0, 6 e 24 h. Em cada tempo retirou-se uma amostra da estufa bacteriológica e esta foi inserida em um saco de *stomacher* (marca Nazco whirl-pak) juntamente com 10 mL de água salina 0,85% e, então, homogeneizada por aproximadamente 1 min (10^0). Com isso, as amostras passaram por diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}). Retirou-se 0,1 mL do saco de *stomacher*, e das respectivas diluições que foram semeados em profundidade, juntamente com 7 mL caldo Müeller-Hinton. As placas de Petri foram homogeneizadas e incubadas em estufa bacteriológica na posição invertida a 37 ± 1 °C por um período de 24 h. Repetiu-se o procedimento para todos os tempos de análise, sendo que o ensaio foi realizado em triplicata. Depois de decorridas as 24 h, a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por cm^2 (UFC/ cm^2) foi realizada com o auxílio de um contador de colônias (marca Quimis, modelo Q295B). O número de bactérias viáveis por área foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$N = \frac{C * fd * V}{A} \quad (1)$$

sendo:

N: número de células viáveis por cm^2

C: contagem de colônias (de 30 a 300 UFC/ cm^2)

fd: fator de diluição (adimensional)

V: volume (mL) de água salina 0,85% usado para a lavagem da amostra (10 mL)

A: área superficial da amostra (4 cm^2)

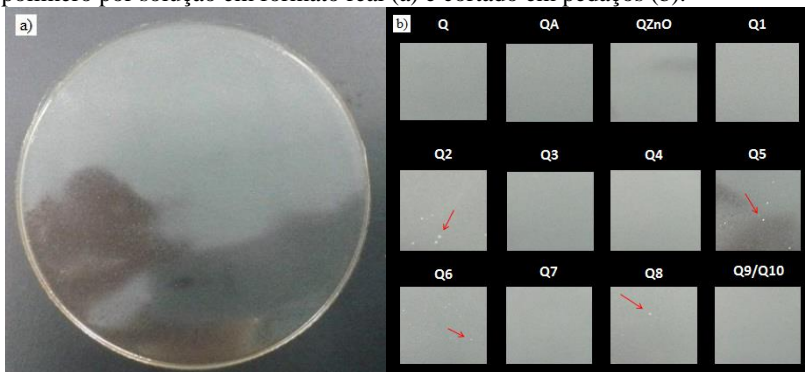
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho.

4.1 NANOCOMPÓSITOS DE QUITOSANA

Os nanocompósitos de quitosana obtidos pelo método de intercalação do polímero por solução (Figura 9) resultaram em um filme de material flexível e apresentaram aparência homogênea a olho nu, exceto para as amostras Q2, Q5, Q6 e Q8 que apresentaram pontos brancos de nanopartículas distribuídos.

Figura 9 – Imagem nanocompósito obtido pelo método de intercalação do polímero por solução em formato real (a) e cortado em pedaços (b).



Fonte: a autora (2017).

Para determinar a real diferença entre os filmes foram obtidas imagens por MEV do filme de quitosana pura (Q) e dos filmes de nanocompósitos QA e QZnO, além de um dos que apresentaram maior força de tensão Q9.

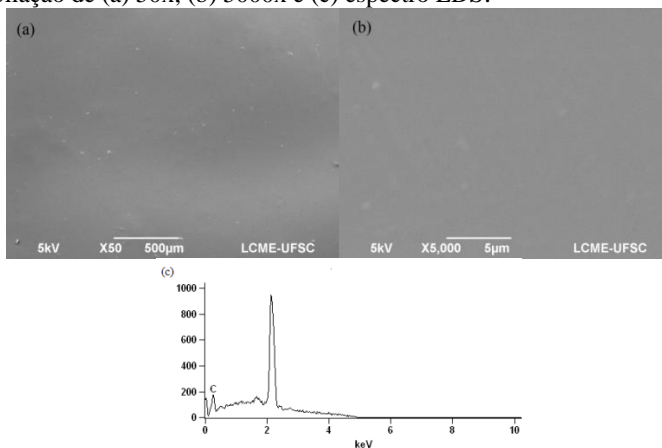
As imagens obtidas por MEV do filme de quitosana pura e dos nanocompósitos, com seus respectivos espectros de EDS, são apresentadas abaixo nas Figuras 10 a 13. O filme de quitosana pura (Figura 10) apresenta superfície lisa, com pequenos aglomerados, provavelmente aglomerados de moléculas de quitosana.

Para os filmes de quitosana contendo bentonita (QA) (Figura 11) é possível observar a presença de aglomerados da nanoargila.

Para QZnO observa-se uma distribuição das nanopartículas de ZnO na forma de linhas (anisotrópica) (Figura 12).

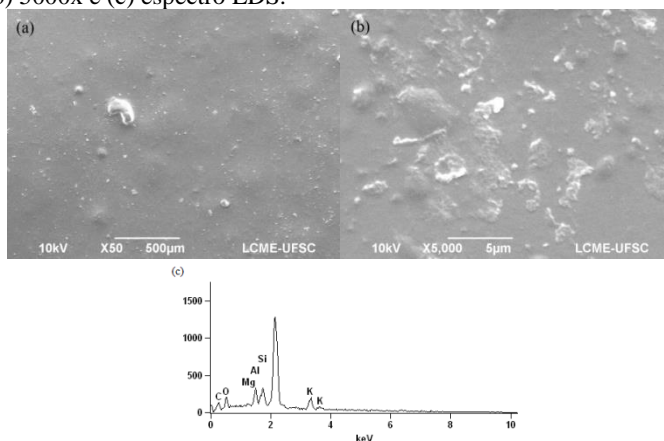
Na Figura 13 (a) fica evidente que a distribuição do óxido de zinco não está mais exposta em linhas, mas sim uniformemente junto com a argila na quitosana. Este comportamento vem ao encontro da melhoria das propriedades mecânicas, pois a argila compatibiliza as nanopartículas de óxido de zinco, além de não reduzir a capacidade antimicrobiana da quitosana. Na Figura 13 (b) consegue-se perceber que não há defeitos entre as fases de quitosana, argila e ZnO e apresenta menor rugosidade.

Figura 10 - Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de quitosana pura na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.



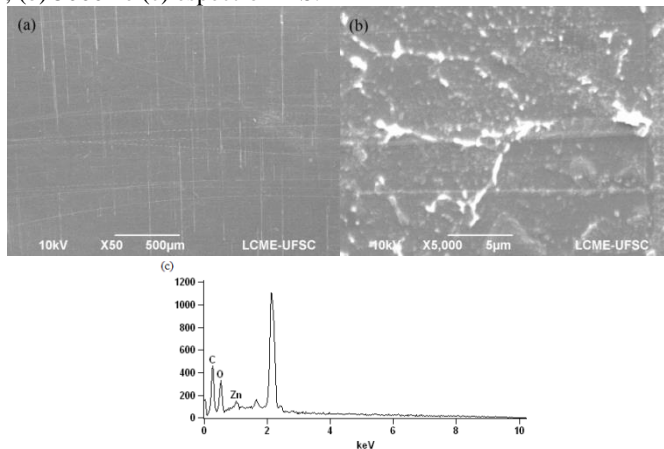
Fonte: a autora (2017).

Figura 11 - Imagens obtidas por MEV da superfície de QA na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.



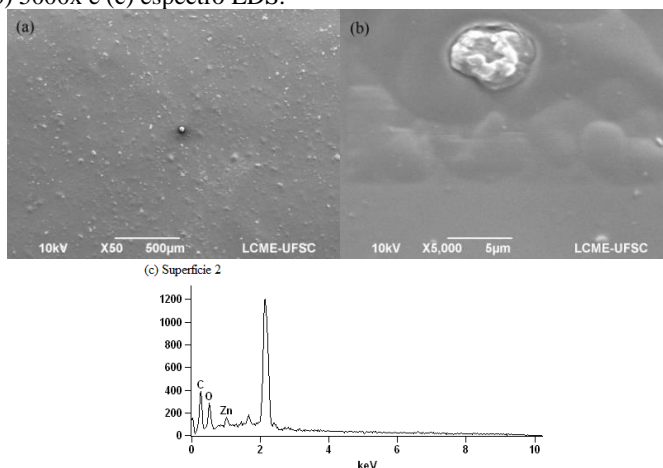
Fonte: a autora (2017).

Figura 12 - Imagens obtidas por MEV da superfície de QZnO na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.



Fonte: a autora (2017).

Figura 13 - Imagens obtidas por MEV da superfície de Q9 na ampliação de (a) 50x; (b) 5000x e (c) espectro EDS.



Fonte: a autora (2017).

A composição percentual em massa dos elementos carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), magnésio (Mg), potássio (K), alumínio (Al), silício (Si) e zinco (Zn) obtidas por EDS para a superfície do filme de quitosana e dos nanocompósitos são apresentados na Tabela 4. A análise de EDS nos filmes confirmou a ausência dos elementos Mg, K, Al, Si e Zn no filme de quitosana pura.

Tabela 4 - Resultados de EDS da superfície do filme de quitosana pura e dos nanocompósitos.

Amostras	Elementos (%)							
	C	N	O	Mg	K	Al	Si	Zn
Q	100,00±5,11	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
QA	31,49±2,22	0,00±0,00	15,38±1,18	1,07±0,22	23,03±1,36	9,78±0,63	19,26±0,78	0,00±0,00
QZnO	46,68±1,08	0,00±0,00	11,14±0,27	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	42,19±1,19
Q9	45,67±1,31	0,00±0,00	14,82±0,49	0,96±0,14	0,00±0,00	6,13±0,39	21,06±0,51	50,86±1,27

Fonte: a autora (2017).

Os demais picos encontrados no espectro de EDS não foram analisados neste estudo, pois estão relacionados com os elementos utilizados no recobrimento de preparo de amostra (elemento ouro e impurezas).

Nas Figuras 14 e 15 são apresentados os espectros de FTIR obtidos com o filme de quitosana pura (Q), QA e QZnO e os espectros obtidos com os nanocompósitos Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8 e Q9, respectivamente.

Nos espectros de FTIR para os filmes de quitosana pura a banda de 3000 a 3500 cm^{-1} corresponde ao modo vibracional por estiramento da hidroxila livre e ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações N-H presentes no grupo amino da molécula (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010). As bandas em 1063 e 1022 cm^{-1} estão associadas com os modos vibracionais por estiramento dos grupos -OH, 3'-OH e 5'-OH (LI et al., 2010), como também, as bandas 1639 e 1549 cm^{-1} associadas com os modos vibracionais por estiramento do grupo C=O e por dobramento angular do grupo -NH₂, respectivamente (BRUGNEROTTO et al., 2001).

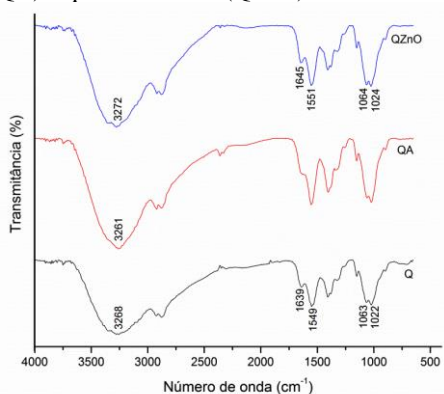
As bandas em 1406 e 1382 cm^{-1} estão associadas com os modos vibracionais de deformação simétrica do grupo CH₂ (SANUJA; AGALYA; UMAPATHY, 2014). A banda em 1323 cm^{-1} correspondente ao grupo amida III, devido à combinação da deformação do grupo NH e a vibração por estiramento CN e da ligação C-O presente na banda 1022 cm^{-1} (CÁRDENAS; SANZANA; MEI, 2002).

Como pode ser observado no espectro apresentado na Figura 14, a banda em 3268 cm^{-1} no espectro da quitosana pura, associada com a presença dos grupos N-H e O-H, é deslocado para menor número de onda 3261 cm^{-1} quando é adicionado 2% de bentonita na matriz de quitosana (QA). Este comportamento indica que os grupos -NH₂ e -OH da molécula de quitosana pode estar formando ligações de hidrogênio com o grupo -OH da bentonita e de menor energia nos modos vibracionais (WANG, et al., 2006). Este é um indicativo de que a bentonita pode estar interferindo positivamente nas interações intermoleculares das moléculas de quitosana.

Com a adição de 6,5% de óxido de zinco na matriz de quitosana (QZnO) a banda associada aos grupos de -OH sofrem deslocamento para número de onda maiores (3272 cm^{-1}), o que indica que as nanopartículas de óxido de zinco podem estar interferindo de forma positiva na interação intermolecular entre as moléculas de quitosana. O mesmo comportamento é observado com as demais bandas dos espectros associadas com os grupos funcionais C=O, -NH₂, 3'-OH e 5'-OH. Estes resultados indicam que as nanopartículas de óxido de zinco proporcionam modos vibracionais de maior energia, podendo este fenômeno estar relacionado com a formação de ligações de hidrogênio entre ZnO e quitosana (DONG et al., 2004).

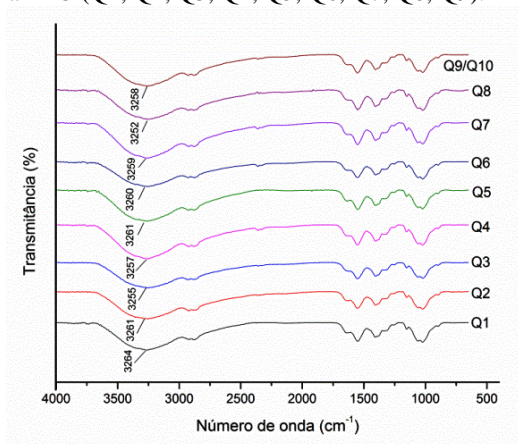
Os resultados de FTIR não indicam o surgimento ou desaparecimento de bandas características da quitosana quando produzidos os nanocompósitos, o que comprova que não ocorre interações químicas significativas entre os grupos funcionais da quitosana e com as Np-A e Np-ZnO, apenas interações físicas.

Figura 14 - Espectros de FTIR obtidos para o filme de quitosana pura (Q), quitosana-argila (QA) e quitosana-ZnO (QZnO).



Fonte: a autora (2017).

Figura 15 - Espectros de FTIR obtidos para os demais nanocompósitos quitosana-argila-ZnO (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9).

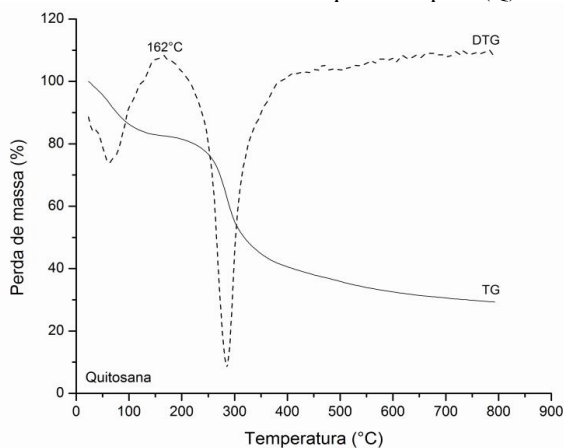


Fonte: a autora (2017).

A estabilidade térmica da quitosana foi avaliada através da análise de TG sendo o perfil da análise apresentado na Figura 16, onde a curva sólida (identificada como TG) expressa a leitura direta da massa na temperatura de ensaio e a curva pontilhada DTG a derivada que permite a identificação de eventuais alterações estruturais nas amostras.

O primeiro evento referente à sorção de água ligada principalmente nos grupos amino e hidroxilas da quitosana teve início em 23,01 °C e seguiu até 162,07 °C com uma perda de massa de 17,38%. O segundo estágio, correspondente a uma intensa perda de material orgânico e despolimerização teve início em 162,07 °C e finalizou em 792,78 °C com uma perda de massa de 70,73%. A análise foi realizada até a temperatura de 800 °C, não contemplando o terceiro estágio da decomposição pirolítica da quitosana (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

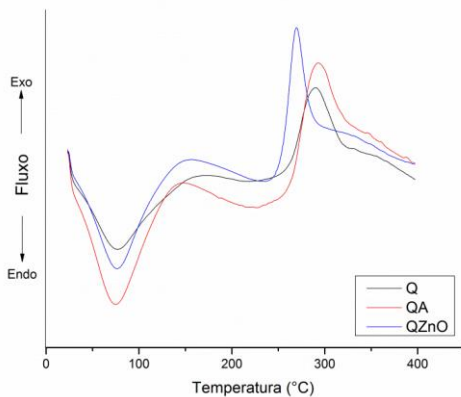
Figura 16 - Perfil de TG e DTG do filme de quitosana pura (Q).



Fonte: a autora (2017).

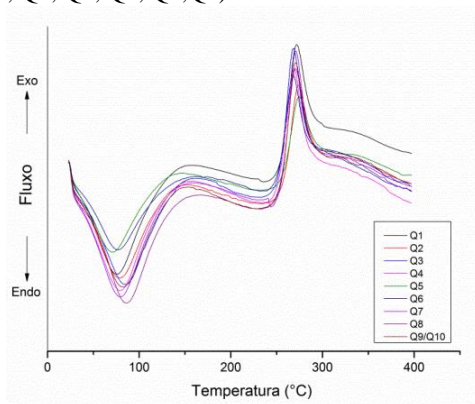
As curvas de DSC do filme de quitosana pura e dos nanocompósitos podem ser observadas nas Figuras 17 e 18 e o Apêndice A mostra as curvas da temperatura de transição vítrea (T_g) determinadas por meio do software (Pyris 9.0.2.0193). Valores para a temperatura de desidratação, entalpia de desidratação, temperatura de decomposição, entalpia de decomposição e para a temperatura de transição vítrea obtidos com os filmes de quitosana pura e diferentes percentuais de Np-A e Np-ZnO são apresentados na Tabela 5.

Figura 17 - Curvas de DSC do filme de quitosana pura (Q), quitosana-argila (QA) e quitosana-ZnO (QZnO).



Fonte: a autora (2017).

Figura 18 - Curvas de DSC dos demais nanocompósitos: quitosana-argila-ZnO (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9).



Fonte: a autora (2017).

Tabela 5 - Valores para a temperatura de desidratação, entalpia de desidratação, temperatura de decomposição, entalpia de decomposição e para a temperatura de transição vítrea obtidos com os filmes de quitosana puro e diferentes percentuais de Np-A e Np-ZnO. Condições experimentais definidas de acordo com a estrutura de um planejamento experimental central composto.

Amostras	A (wt%)	ZnO (wt%)	Td (°C)	ΔH_d (J/g)	Tdc (°C)	ΔH_{dc} (J/g)	Tg (°C)	R ²
Q	0,00	0,0	76	165,50	289	144,48	197,49	0,95
QA	2,00	0,0	74	239,36	292	237,30	181,44	0,90
QZnO	0,00	6,5	76	209,51	269	112,50	196,45	0,90
Q1	1,00	5,0	75	317,81	271	197,95	197,28	0,86
Q2	3,00	5,0	78	248,03	273	147,23	189,72	0,86
Q3	1,00	8,0	85	310,85	268	153,53	194,31	0,90
Q4	3,00	8,0	79	275,47	268	151,57	190,95	0,92
Q5	2,00	4,4	70	205,12	274	118,02	187,21	0,88
Q6	2,00	8,6	76	190,32	268	138,75	206,84	0,89
Q7	0,59	6,5	79	316,80	270	156,40	193,67	0,90
Q8	3,40	6,5	85	298,36	270	194,70	203,30	0,87
Q9/Q10	2,00	6,5	82	272,49	270	157,89	186,81	0,84

Td – Temperatura de desidratação; ΔH_d – entalpia de desidratação

Tdc – Temperatura de decomposição; ΔH_{dc} – entalpia de decomposição

Tg – Temperatura de transição vítrea

R² – Coeficiente de correlação referente aos valores de ΔH_d e ΔH_{dc}

Fonte: a autora (2017).

Como pode ser observado nas Figuras 17 e 18, foram detectados dois picos na fase de aquecimento, sendo um endotérmico e outro exotérmico. Os picos endotérmicos na faixa de 70 a 85 °C são atribuídos à temperatura de desidratação (Td) da quitosana e dos nanocompósitos devido à evaporação da água associada aos grupos hidrofílicos dos polímeros, sendo também responsável pela força da interação água-polímero (KITTUR et al., 2002).

Os picos exotérmicos na faixa de 268-292 °C são atribuídos à decomposição estrutural da quitosana, no qual está normalmente relacionada a degradação das unidades de glucosaminas em sua estrutura (MARTINS et al., 2016) e o desvio deste evento para temperaturas mais baixas confirma a redução da estabilidade estrutural promovida pela incorporação de ambas nanopartículas ou somente de uma das nanopartículas, fato este, que vai ser investigado pela análise

estatística abaixo. Este fenômeno também pode ser confirmado pela análise de TG da quitosana, apresentado anteriormente na Figura 17.

A presença de temperatura de transição vítrea (Tg) no filme de quitosana pura foi observada em aproximadamente 197 °C, sendo este valor condizente com o estudo feito por Sakurai, Maegawa e Takahashi (2000) que relatam uma Tg para quitosana em torno de 203°C, e citam que sua estrutura é mais flexível, em relação à quitina por ter sofrido o processo de desacetilação. Também, não houve grande diferença para os nanocompósitos que apresentaram uma Tg entre 181 a 206 °C indicando uma estrutura flexível, ou seja, com baixa Tg.

O filme de quitosana pura e os nanocompósitos não mostraram nenhuma transição de fusão. Isto pode ser explicado pelo fato de que a maioria dos polissacarídeos não funde, mas se degrada após o aquecimento quando submetido acima de determinada temperatura (ELHEFIAN; NASEF; YAHAYA, 2010). Em consequência, não houve picos na fase de resfriamento e nem de reaquecimento.

Segundo as avaliações estatísticas com os valores para as condições e respostas apresentadas na Tabela 5, análise de variância (ANOVA) e matriz de efeitos estimados são apresentadas nas Tabelas 6 e 7 para a temperatura de decomposição, nas Tabelas 8 e 9 para a entalpia de decomposição, nas Tabelas 10 e 11 para a entalpia de desidratação e nas Tabelas 12 e 13 para a temperatura de transição vítrea.

Tabela 6 - ANOVA para os resultados de temperatura de decomposição.

ANOVA; Var.:Temperatura de decomposição (°C); R-sqr=0,94603					
	SS	df	MS	F	p
(1) ZnO (L)	33,97056	1	33,97056	83,69454	0,000262
ZnO (Q)	0,64286	1	0,64286	1,58383	0,263775
(2) Argila (L)	0,50000	1	0,50000	1,23187	0,317550
Argila (Q)	0,07143	1	0,07143	0,17598	0,692264
Error	2,02944	5	0,40589	-	-
Total SS	37,60000	9	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 7 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de temperatura de decomposição.

Efeitos estimados; Var.: Temperatura de decomposição (°C); R-sqr=0,94603									
	Efeitos	Err. Padrão	t(5)	P	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.	
	Média	270,0000	0,450493	599,3437	0,000000	268,8420	271,1580	270,0000	0,450493
(1)	ZnO (L)	-4,1213	0,450493	-9,1485	0,000262	-5,2793	-2,9633	-2,0607	0,225246
	ZnO (Q)	0,7500	0,595946	1,2585	0,263775	-0,7819	2,2819	0,3750	0,297973
(2)	Argila (L)	0,5000	0,450493	1,1099	0,317550	-0,6580	1,6580	0,2500	0,225246
	Argila (Q)	-0,2500	0,595946	-0,4195	0,692264	-1,7819	1,2819	-0,1250	0,297973

Fonte: a autora (2017).

Tabela 8 - ANOVA para os resultados de entalpia de decomposição.

ANOVA; Var.: ΔH_{dc} (J/g); R-sqr=0,44023						
	SS	df	MS	F	p	
(1)	ZnO (L)	14,481	1	14,4812	0,025422	0,879561
	ZnO (Q)	669,510	1	669,5103	1,175337	0,327793
(2)	Argila (L)	0,275	1	0,2754	0,000484	0,983307
	Argila (Q)	602,536	1	602,5360	1,057763	0,350884
	Error	2848,162	5	569,6325	-	-
	Total SS	5088,074	9	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 9 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de entalpia de decomposição.

Efeitos estimados; Var.: ΔH_{dc} (J/g); R-sqr=0,44023									
	Efeitos	Err. Padrão	t(5)	p	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.	
	Média	157,8900	16,87650	9,35561	0,000235	114,5076	201,2724	157,8900	16,87650
(1)	ZnO (L)	-2,6908	16,87650	-0,15944	0,879561	-46,0733	40,6916	-1,3454	8,43825
	ZnO (Q)	-24,2038	22,32551	-1,08413	0,327793	-81,5933	33,1858	-12,1019	11,16276
(2)	Argila (L)	0,3711	16,87650	0,02199	0,983307	-43,0113	43,7535	0,1855	8,43825
	Argila (Q)	22,9613	22,32551	1,02848	0,350884	-34,4283	80,3508	11,4806	11,16276

Fonte: a autora (2017).

Tabela 10 - ANOVA para os resultados de entalpia de desidratação.

ANOVA; Var.: ΔH_d (J/g); R-sqr=0,78937					
	SS	df	MS	F	p
(1) ZnO (L)	0,03	1	0,025	0,000033	0,995613
ZnO (Q)	3722,92	1	3722,921	4,902657	0,077693
(2) Argila (L)	2152,93	1	2152,930	2,835160	0,153041
Argila (Q)	3184,29	1	3184,293	4,193346	0,095915
Error	3796,84	5	759,368	-	-
Total SS	18026,38	9	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 11 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de entalpia de desidratação.

Efeitos estimados; Var.: ΔH_d (J/g); R-sqr=0,78937								
	Efeitos	Err. Padrão	t(5)	P	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.
Média	272,4900	19,48548	13,98426	0,000034	222,401	322,5790	272,4900	19,48548
(1) ZnO (L)	-0,1126	19,48548	-0,00578	0,995613	-50,202	49,9764	-0,0563	9,74274
ZnO (Q)	-57,0750	25,77687	-2,21419	0,077693	-123,337	9,1866	-28,5375	12,88843
(2) Argila (L)	-32,8095	19,48548	-1,68379	0,153041	-82,899	17,2795	-16,4048	9,74274
Argila (Q)	52,7850	25,77687	2,04777	0,095915	-13,477	119,0466	26,3925	12,88843

Fonte: a autora (2017).

Tabela 12 - ANOVA para os resultados de temperatura de transição vítrea.

ANOVA; Var.: Tg (°C); R-sqr=0,46984					
	SS	df	MS	F	p
(1) ZnO (L)	84,6366	1	84,63663	1,820452	0,235136
ZnO (Q)	70,7850	1	70,78503	1,522518	0,272071
(2) Argila (L)	0,9105	1	0,91049	0,019584	0,894168
Argila (Q)	99,4845	1	99,48446	2,139814	0,203382
Error	232,4605	5	46,49209	-	-
Total SS	438,4752	9	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 13 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de temperatura de transição vítrea.

Efeitos estimados; Var.: Tg (°C); R-sqr=0,46984									
	Efeitos	Err. Padrão	t(5)	p	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.	
	Média	186,8100	4,821415	38,74588	0,000000	174,4162	199,2038	186,8100	4,821415
(1)	ZnO (L)	6,5053	4,821415	1,34924	0,235136	-5,8886	18,8991	3,2526	2,410708
	ZnO (Q)	7,8700	6,378133	1,23390	0,272071	-8,5255	24,2655	3,9350	3,189067
(2)	Argila (L)	0,6747	4,821415	0,13994	0,894168	-11,7191	13,0686	0,3374	2,410708
	Argila (Q)	9,3300	6,378133	1,46281	0,203382	-7,0655	25,7255	4,6650	3,189067

Fonte: a autora (2017).

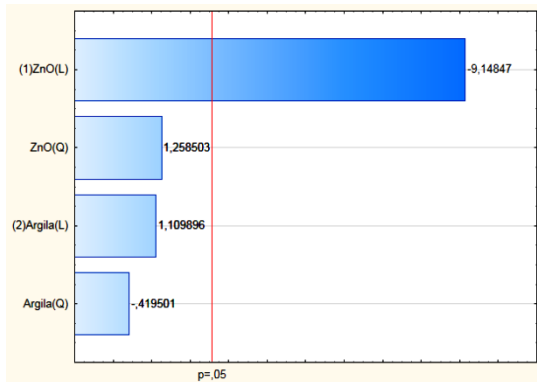
O diagrama de Pareto foi obtido para se determinar a relação entre a variável de resposta com as variáveis significativas. Em um nível de significância de 95%, os resultados mostram que a temperatura de decomposição é afetada significativamente apenas pela concentração de Np-ZnO e com efeito negativo (Figura 19). Pelos resultados estatísticos apresentados nas Tabelas 6 e 7, o efeito médio da adição de Np-ZnO é de uma diminuição de $(4,12 \pm 0,45)$ no valor da temperatura de decomposição.

Segundo Azizi et al. (2014), uma diminuição na estabilidade térmica ao se incorporar Np-ZnO em matriz de quitosana pode ser explicada como segue: primeiramente, a presença do ZnO poderia restringir o movimento das cadeias do polímero ou atuar como um isolante térmico e de barreira para os produtos voláteis formados ao longo da degradação, portanto isso leva a um atraso na decomposição térmica. Por outro lado, o ZnO como semicondutor é capaz de gerar oxigênio livre e espaços de oxigênio na estrutura do polímero induzida pela estimulação térmica. Os espaços de oxigênio podem absorver elétrons para fazer posições catalíticas ativas em ZnO e o oxigênio livre aumenta a criação de radicais peroxi para quebrar as cadeias do polímero. Portanto, a formação de espaços e oxigênio livre desempenha um papel principal na decomposição de polímeros (MA; ZHANG, 2009). Os dois efeitos acima mencionados competem e o efeito da catálise térmica das Np-ZnO supera a maioria dos biocompósitos.

Vicentini et al. (2010), citam que a diminuição na estabilidade térmica pode estar relacionada com o aumento das distâncias interatômicas entre ZnO e quitosana, e conseqüentemente, menos energia é necessária para decompor os filmes.

A concentração da argila não foi um fator estatisticamente significativo, o que sugere que a Tdc não é alterada pela quantidade de argila.

Figura 19 – Diagrama de Pareto para os valores de temperatura de decomposição.



Fonte: a autora (2017).

Segundo resultados estatísticos apresentados nas Tabelas 8 e 9 para a entalpia de decomposição, nas Tabelas 10 e 11 para a entalpia de desidratação e nas Tabelas 12 e 13 para a temperatura de transição vítrea, em um nível de significância de 95%, conclui-se que as concentrações de Np-ZnO e Np-A não afetaram significativamente no valor das entalpias e de temperatura de transição vítrea.

Os resultados estatísticos mostram que um modelo linear + quadrático de correlação entre os fatores significativos e o efeito da temperatura de decomposição é apropriado. O valor superior a 0,90 do coeficiente de correlação (R^2) para a temperatura de decomposição ($R^2 = 0,94$) mostra um ajuste linear + quadrático satisfatório.

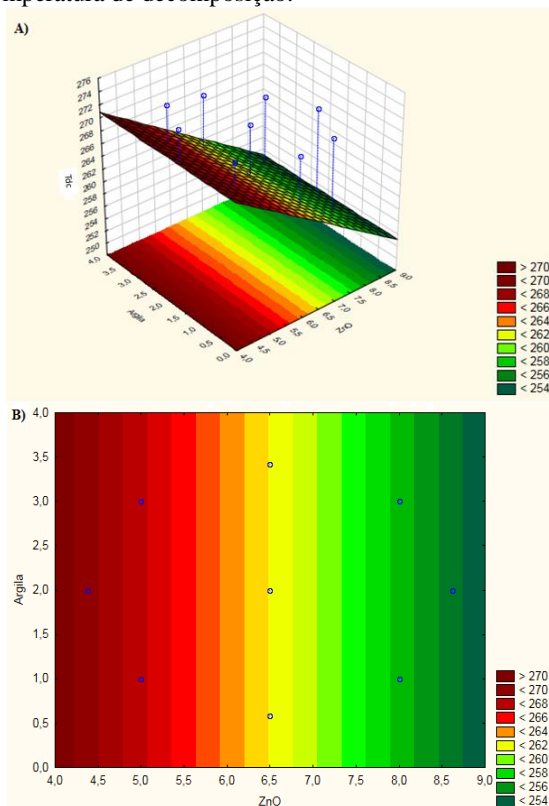
Como apenas a concentração de Np-ZnO em escala linear é significativo para a temperatura de decomposição no planejamento experimental executado, o modelo linear + quadrático reduz-se a função de uma variável, $ETdc = f(ZnO)$. A Equação 2 correlaciona o efeito da temperatura de decomposição (ETdc) com a concentração de ZnO (ZnO).

$$ETdc(ZnO) = 270(\pm 0,45) - 2,06(\pm 0,22)ZnO \quad (2)$$

Na prática, a equação é importante por apresentar um método para a estimativa da temperatura de decomposição, com a quantidade de ZnO para o desenvolvimento e produção de nanocompósitos.

Na Figura 20 podem ser observados a superfície de resposta (A) e os contornos (B), mostrando a dependência linear da concentração do ZnO em função da temperatura de decomposição. Os melhores valores foram observados nos níveis $(-1, -1)$, $(-\alpha, 0)$ e $(-1, 1)$ correspondentes as amostras Q5 (2% Np-A + 4,4% Np-ZnO), Q2 (3% Np-A + 5% Np-ZnO) e Q1 (1% Np-A + 5% Np-ZnO). Observa-se nas representações gráficas que o comportamento e a magnitude para o efeito de temperatura de decomposição não são modificados significativamente com as variações de concentração de argila.

Figura 20 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referentes aos valores de temperatura de decomposição.



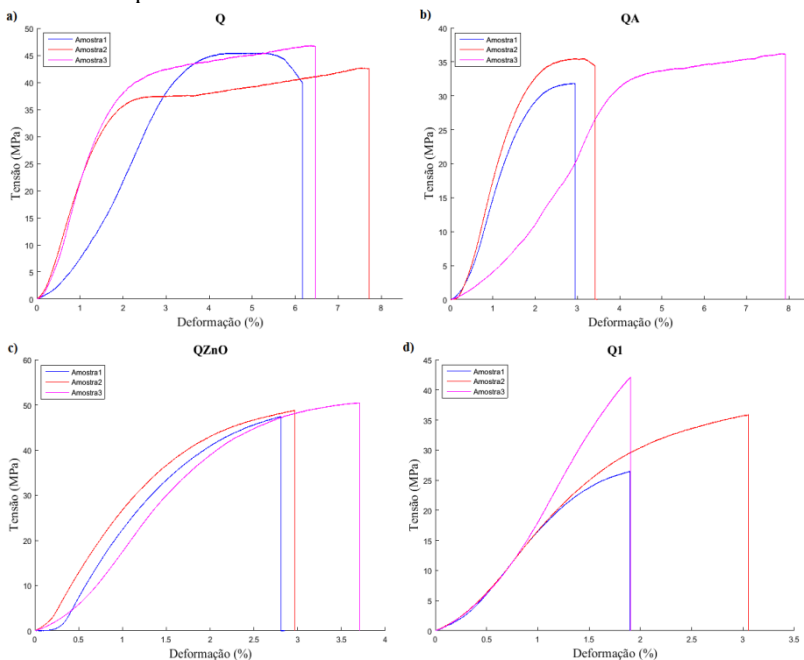
Fonte: a autora (2017).

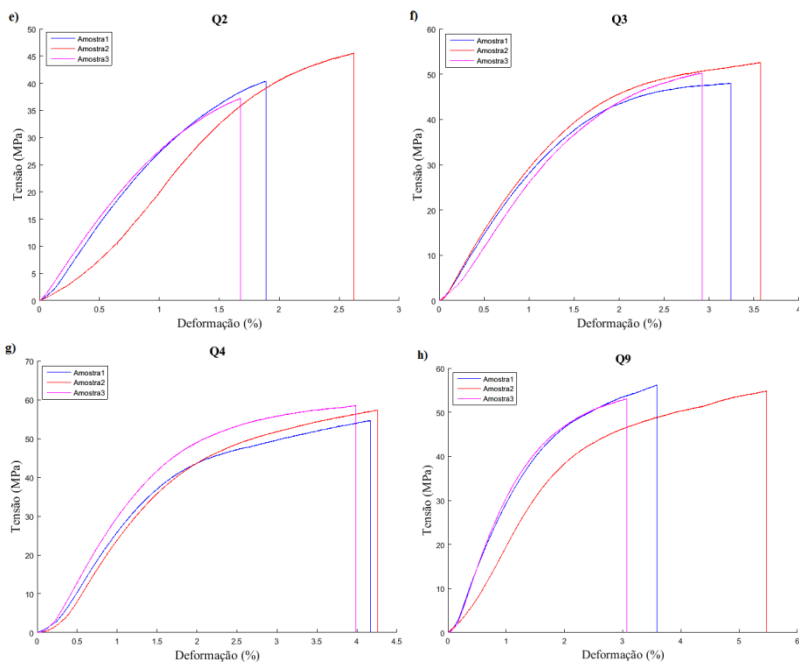
4.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS: ENSAIO DE TENSÃO *VERSUS* DEFORMAÇÃO

A resposta mecânica (tensão \times deformação) do filme de quitosana pura e dos nanocompósitos pode ser visualizada nas Figuras 21a até 21h. Nas Figuras 22 e 23 são apresentadas as imagens do corpo de prova antes e durante o ensaio.

Visando boa confiabilidade para as informações mecânicas, os ensaios previstos pela matriz de planejamento experimental foram realizados em sextuplicata. Porém, para fins estatísticos, foram utilizadas somente as três melhores amostras (com menor desvio padrão, em relação a tensão) de cada um dos experimentos. Os valores para a tensão máxima, alongamento e para o módulo de Young obtidos com os filmes de quitosana pura e diferentes percentuais de Np-A e Np-ZnO são apresentados na Tabela 14.

Figura 21 - Ensaio de tensão \times deformação do filme de quitosana pura (Q) e dos nanocompósitos.





Fonte: a autora (2017).

Figura 22 - Imagem do corpo de prova antes do ensaio.



Fonte: a autora (2017).

Figura 23 – Imagem do corpo de prova durante o ensaio.



Fonte: a autora (2017).

Tabela 14 - Valores de tensão máxima, alongamento e módulo de Young obtidos para filmes de quitosana pura e contendo diferentes percentuais de Np-A e Np-ZnO. Condições experimentais definidas de acordo com a estrutura de um planejamento experimental fatorial 2².

Amostras	A (wt%)	ZnO (wt%)	Tensão (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Módulo de Young (GPa)
Q	0	0,0	(33,68 ± 2,28) ^{ade}	(3,45 ± 0,27) ^a	(2,040 ± 0,15) ^{abcd}
QA	2	0,0	(22,34 ± 1,75) ^{bc}	(1,54 ± 0,07) ^{bd}	(1,750 ± 0,06) ^a
QZnO	0	6,5	(30,49 ± 1,17) ^{acc}	(1,48 ± 0,01) ^{bd}	(2,190 ± 0,02) ^{bcd}
Q1	1	5,0	(18,27 ± 2,60) ^{bc}	(0,84 ± 0,14) ^c	(1,800 ± 0,08) ^{ac}
Q2	3	5,0	(23,77 ± 1,20) ^c	(0,92 ± 0,03) ^c	(2,260 ± 0,15) ^{bcd}
Q3	1	8,0	(34,37 ± 2,40) ^{ade}	(1,54 ± 0,06) ^{bd}	(2,090 ± 0,05) ^{cd}
Q4	3	8,0	(38,86 ± 1,49) ^{de}	(2,08 ± 0,05) ^d	(2,410 ± 0,01) ^d
Q9	2	6,5	(37,08 ± 1,10) ^e	(1,78 ± 0,01) ^d	(2,220 ± 0,01) ^d

^{a-e} Diferentes sobrescritos dentro da mesma coluna indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$).

Fonte: a autora (2017).

Segundo as avaliações estatísticas com os valores para as condições e respostas apresentadas na Tabela 14, ANOVA e matriz de efeitos estimados são apresentadas nas Tabelas 15 e 16 para a tensão, nas Tabelas 17 e 18 para o alongamento na ruptura e nas Tabelas 19 e 20 para o módulo de Young.

Tabela 15 - ANOVA para os resultados de tensão.

ANOVA; Var.:Tensão máxima (MPa); R-sqr=0,77603					
	SS	df	MS	F	p
(1) ZnO	729,300	1	729,3002	34,52927	0,000107
(2) Argila	74,950	1	74,9500	3,54856	0,086287
1 by 2	0,765	1	0,7651	0,03622	0,852522
Error	232,333	11	21,1212	-	-
Total SS	1037,349	14	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 16 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de tensão.

Efeitos estimados; Var.:Tensão máxima (MPa); R-sqr=0,77603								
Efeitos	Err. Padrão	t(11)	P	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.	
Média	30,47067	1,186626	25,67841	0,000000	27,85892	33,08241	30,47067	1,186626
(1) ZnO	15,59167	2,653376	5,87616	0,000107	9,75162	21,43171	7,79583	1,326688
(2) Argila	4,99833	2,653376	1,88376	0,086287	-0,84171	10,83838	2,49917	1,326688
1 by 2	-0,50500	2,653376	-0,19032	0,852522	-6,34504	5,33504	-0,25250	1,326688

Fonte: a autora (2017).

Tabela 17 - ANOVA para os resultados de alongamento na ruptura.

ANOVA; Var.:Alongamento na ruptura (%); R-sqr=0,84551					
	SS	df	MS	F	p
(1) ZnO	2,557633	1	2,557633	51,24522	0,000018
(2) Argila	0,288300	1	0,288300	5,77643	0,035020
1 by 2	0,158700	1	0,158700	3,17974	0,102139
Error	0,549007	11	0,049910	-	-
Total SS	3,553640	14	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 18 - Matriz de efeitos estimados para os resultados de alongamento na ruptura.

Efeitos estimados; Var.:Alongamento na ruptura (%); R-sqr=0,84551								
Efeitos	Err. Padrão	t(11)	p	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.	
Média	1,432000	0,057683	24,82540	0,000000	1,305041	1,558959	1,432000	0,057683
(1) ZnO	0,923333	0,128983	7,15858	0,000018	0,639444	1,207223	0,461667	0,064491
(2) Argila	0,310000	0,128983	2,40342	0,035020	0,026111	0,593889	0,155000	0,064491
1 by 2	0,230000	0,128983	1,78318	0,102139	-0,053889	0,513889	0,115000	0,064491

Fonte: a autora (2017).

Tabela 19 - ANOVA para os resultados de módulo de Young.

ANOVA; Var.:Módulo Young (GPa); R-sqr=0,83217					
	SS	df	MS	F	p
(1) ZnO	0,147408	1	0,147408	12,90576	0,004225
(2) Argila	0,460992	1	0,460992	40,36035	0,000054
1 by 2	0,014560	1	0,014560	1,27477	0,282894
Error	0,125641	11	0,011422	-	-
Total SS	0,748602	14	-	-	-

Fonte: a autora (2017).

Tabela 20 - Matriz de efeitos estimados para os resultados do módulo de Young.

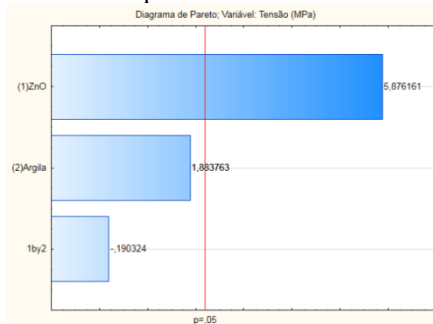
Efeitos estimados; Var.: Módulo Young (GPa); R-sqr=0,83217								
	Efeitos	Err. Padrão	t(11)	p	-95%	95%	Coef.	Err. Padrão coef.
Média	2,155600	0,027595	78,11682	0,000000	2,094865	2,216335	2,155600	0,027595
(1) ZnO	0,221667	0,061703	3,59246	0,004225	0,085859	0,357475	0,110833	0,030852
(2) Argila	0,392000	0,061703	6,35298	0,000054	0,256192	0,527808	0,196000	0,030852
1 by 2	-0,069667	0,061703	-1,12906	0,282894	-0,205475	0,066141	-0,034833	0,030852

Fonte: a autora (2017).

Diagramas de Pareto foram obtidos para se determinar a relação entre a variável de resposta com as variáveis significativas. Em um nível de significância de 95%, os resultados mostraram que a tensão máxima é afetada significativamente apenas pela concentração de Np-ZnO e com efeito positivo (Figura 24). Pelos resultados estatísticos apresentados nas Tabelas 15 e 16, o efeito médio da adição de Np-ZnO é de um aumento de $(15,60 \pm 2,66)$ no valor da tensão máxima. Segundo Li et al. (2010), este comportamento mecânico pode estar associado a um grande número de estruturas de cadeias cíclicas que a quitosana apresenta, em que as forças intramoleculares e intermoleculares das pontes de hidrogênio foram formadas pela ligação de $-OH$ e $-NH_2$, o que dificultou a rotação e o movimento da cadeia molecular. Possivelmente quando o ZnO foi incorporado, as forças intermoleculares das pontes de hidrogênio foram enfraquecidas e novas pontes de hidrogênio foram formadas entre a quitosana e o ZnO, colaborando para um melhor movimento e rotação da cadeia molecular, aumentando, assim, a força de tensão dos filmes.

De acordo com Sanuja, Agalya e Umaphaty (2015), outro motivo que pode estar associado é que pode ocorrer a máxima dispersão das Np-ZnO na matriz polimérica de quitosana, que impede o material de coagular, e também a forte interação entre ambos, como foi observado no espectro de FTIR. No entanto, a concentração da argila não foi fator estatisticamente significativo para o aumento da tensão.

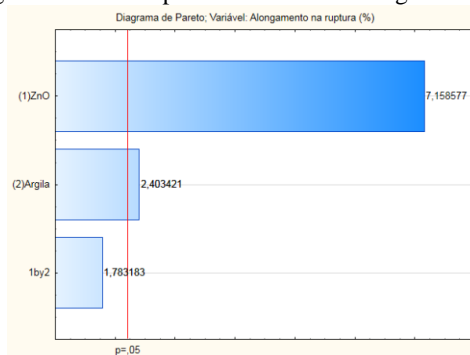
Figura 24 - Diagrama de Pareto para os valores de tensão máxima.



Fonte: a autora (2017).

Para o alongamento na ruptura, é possível observar no Diagrama de Pareto (Figura 25) que a concentração de Np-ZnO e Np-A foram estatisticamente significativas no intervalo de confiança de 95%. Ambos possuem efeito positivo no alongamento na ruptura, aumentando-o em $(0,92 \pm 0,12)$ em relação a concentração de Np-ZnO e $(0,31 \pm 0,12)$ para a concentração de Np-A.

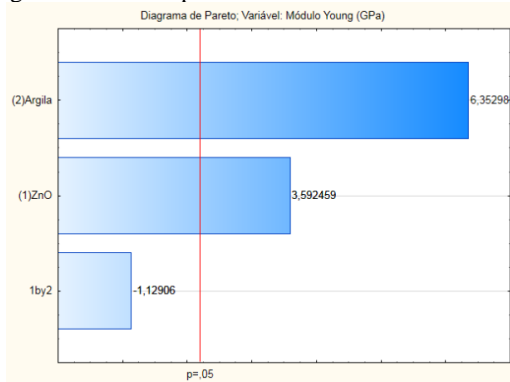
Figura 25 - Diagrama de Pareto para os valores de alongamento na ruptura.



Fonte: a autora (2017).

Este efeito ocorre também para o módulo de Young, onde as concentrações de Np-ZnO e Np-A foram significativas para o aumento da rigidez dos nanocompósitos (Figura 26). A concentração de Np-ZnO tem efeito positivo no módulo de Young, aumentando-o em $(0,23 \pm 0,06)$ e para a concentração de Np-A, aumentando-o em $(0,39 \pm 0,06)$.

Figura 26 - Diagrama de Pareto para os valores de módulo de Young.



Fonte: a autora (2017).

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 14 mostra que um modelo de duas interações entre os fatores significativos e os efeitos mecânicos é aceitável. Os valores acima de 0,70 do coeficiente de correlação (R^2) para tensão ($R^2 = 0,77$), alongamento na ruptura ($R^2 = 0,84$) e módulo Young ($R^2 = 0,84$) mostram um ajuste de duas interações satisfatório.

Como apenas a concentração de Np-ZnO é significativo para a tensão máxima no planejamento experimental executado, o modelo de duas interações reduz-se a uma função de uma variável, $E_t = f(\text{ZnO})$. A Equação 3 correlaciona o efeito da tensão (E_t) com a concentração de ZnO (ZnO).

Para o alongamento na ruptura, a concentração de Np-ZnO e a concentração de Np-A foram significativas. O modelo de duas interações reduz-se a uma função de duas variáveis, $E_a = f(\text{ZnO}, A)$. A Equação 4 correlaciona o efeito do alongamento (E_a) com a concentração de (ZnO) e argila (A).

Ambas as concentrações, de Np-ZnO e Np-A, também foram significativas para o aumento no módulo de Young. O modelo de duas interações reduz-se a uma função de duas variáveis, $E_m = f(\text{ZnO}, A)$. A

Equação 5 correlaciona o efeito módulo (E_m) com a concentração de (ZnO) e argila (A).

$$E_t(\text{ZnO}) = 30,48(\pm 1,19) + 7,79(\pm 1,33)\text{ZnO} \quad (3)$$

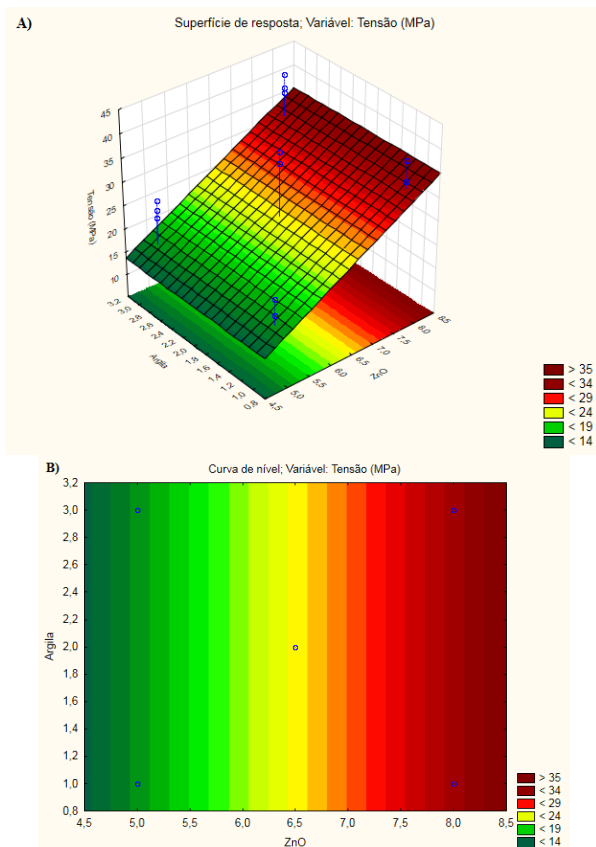
$$E_a(\text{ZnO}, A) = 1,43(\pm 0,057) + 0,47(\pm 0,064)\text{ZnO} + 0,15(\pm 0,064)A \quad (4)$$

$$E_m(\text{ZnO}, A) = 2,15(\pm 0,027) + 0,11(\pm 0,03)\text{ZnO} + 0,19(\pm 0,03)A \quad (5)$$

Na prática, tais equações são importantes por apresentarem um método para a estimativa das propriedades mecânicas com base na quantidade de argila e de óxido de zinco para o desenvolvimento e produção de nanocompósitos.

Numa representação gráfica, na Figura 27 podem ser visualizados a superfície de resposta (A) e os contornos (B), mostrando a dependência da concentração do ZnO em função da tensão. Os melhores valores foram observados nos níveis (+1, +1) e (0, 0) correspondentes as amostras Q4 (3% Np-A + 8% Np-ZnO) e Q9 (2% Np-A + 6,5% Np-ZnO). Observa-se nas representações gráficas que o comportamento e a magnitude para o efeito de tensão não são modificados significativamente com as variações de concentração de argila.

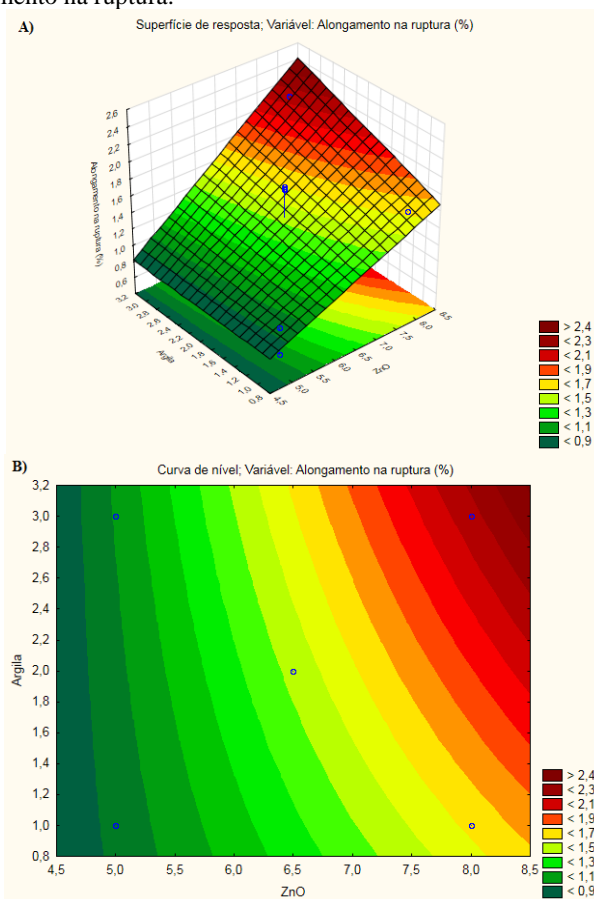
Figura 27 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de tensão.



Fonte: a autora (2017).

Considerando-se os valores de alongamento na ruptura, é possível observar que o aumento do mesmo é dependente da concentração de ZnO e da concentração de argila. Verifica-se que a melhor região foi observada no nível (+1, +1) correspondente a amostra Q4 (3% Np-A + 8% Np-ZnO) (Figura 28).

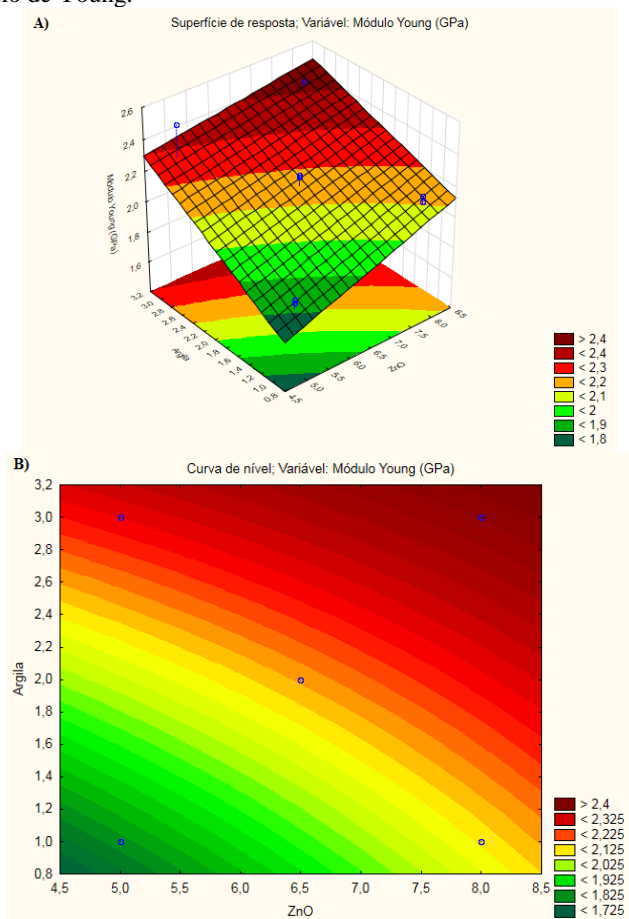
Figura 28 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de alongamento na ruptura.



Fonte: a autora (2017).

Considerando-se os valores do módulo de Young, observa-se que a concentração de ZnO e a concentração de argila foram significativas para o aumento na rigidez dos nanocompósitos. Esta observação também está de acordo com os resultados estatísticos. Verifica-se que a melhor região foi observada no nível (+1, +1) também correspondente a amostra Q4 (3% Np-A + 8% Np-ZnO) (Figura 29).

Figura 29 - Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores do módulo de Young.



Fonte: a autora (2017).

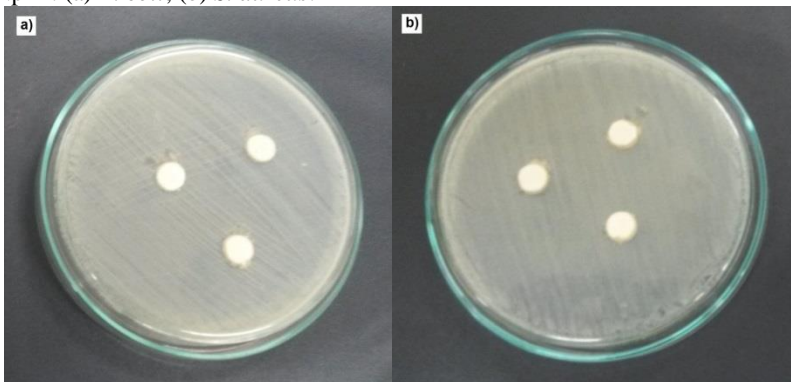
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, os filmes com os maiores resultados de resistência à tração (força de tensão) foram selecionados, sendo estes as amostras Q4 (8% ZnO + 3% argila) e Q9 (6,5% ZnO + 2% argila). Além disso, as amostras de quitosana pura (branco), QA e QZnO também foram submetidas ao teste.

4.3.1 Nanopartículas de argila bentonita organofílica e nanopartículas de ZnO

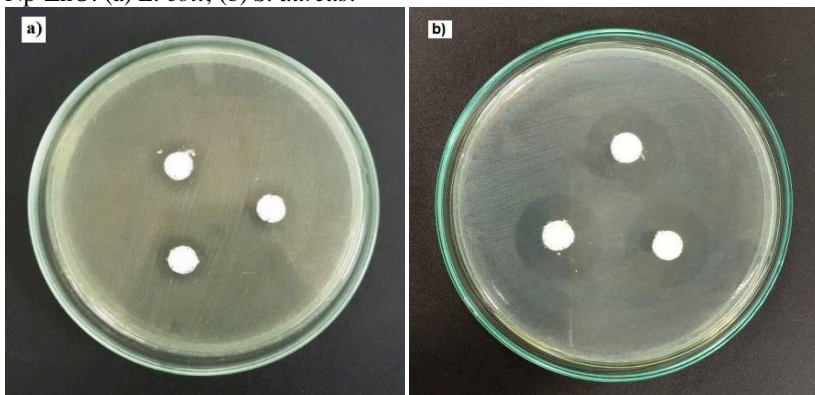
O método de difusão em ágar foi utilizado como uma análise qualitativa em função de uma predição para o comportamento bacteriostático das Np-ZnO e Np-A. As imagens das placas do teste de difusão em ágar frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli* estudadas são apresentadas nas Figuras 30 e 31.

Figura 30 - Resultados dos testes de difusão em ágar em meio sólido para as Np-A: (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



Fonte: a autora (2017).

Figura 31 - Resultados dos testes de difusão em ágar em meio sólido para as Np-ZnO: (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



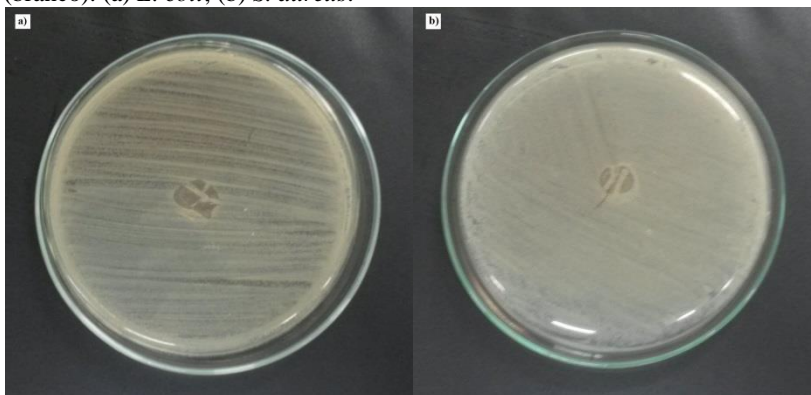
Fonte: a autora (2017).

Como pode ser observado nas Figuras 30 e 31, um efeito bacteriostático para ambas as bactérias foi observado somente para as Np-ZnO, pois um halo de inibição de crescimento microbiano foi formado. Porém, para as Np-A nenhum halo de inibição foi identificado.

De acordo com Mirhosseini e Firouzabadi (2013), a ação de inibição de ZnO em meios de cultura microbiana pode decorrer do desaparecimento do crescimento e/ou da morte celular das bactérias. Com maiores concentrações de Np-ZnO, primeiramente ocorre a morte de uma subpopulação de células sensíveis, fazendo com que a população microbiana seja reduzida e, após, retardam o crescimento de uma subpopulação resistente, que pode manter-se em baixa concentração ou começar a crescer. Em concentrações inferiores, o tratamento apenas suprime o crescimento de bactérias e prolongam a fase de latência antes do início do crescimento em velocidade exponencial.

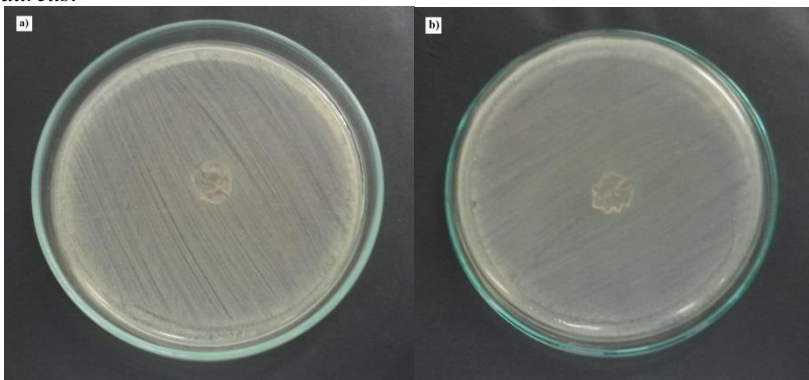
Nas Figuras 32 a 36 são apresentadas as imagens das placas do teste de difusão em ágar em meio sólido de amostras de filmes frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Figura 32 - Resultados dos testes de difusão em ágar para quitosana pura Q (branco): (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



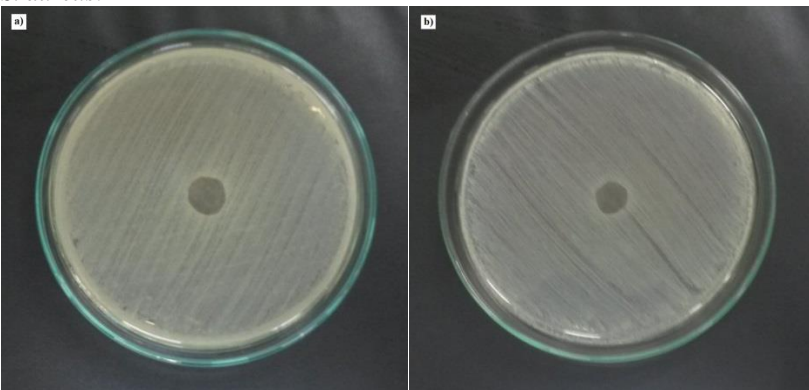
Fonte: a autora (2017).

Figura 33 - Resultados dos testes de difusão em ágar para QA: (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



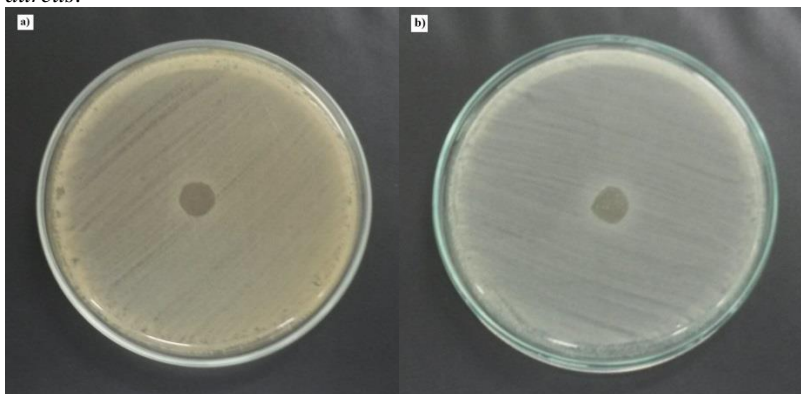
Fonte: a autora (2017).

Figura 34 - Resultados dos testes de difusão em ágar para QZnO: (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



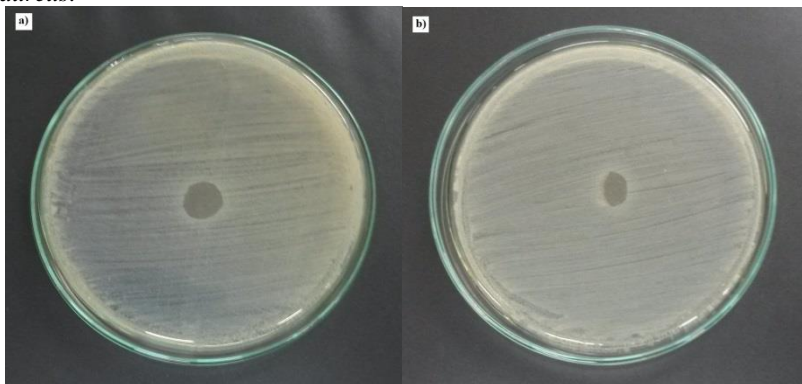
Fonte: a autora (2017).

Figura 35 - Resultados dos testes de difusão em ágar para Q4: (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



Fonte: a autora (2017).

Figura 36 - Resultados dos testes de difusão em ágar para Q9: (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.



Fonte: a autora (2017).

Para a amostra Q (branco) (Figura 32) a zona de inibição foi de difícil visualização para ambas as bactérias, pois não apresenta halo bem delineado, mostrando-se difuso em direção ao meio. Apesar deste teste não afirmar que o biopolímero estudado (quitosana) apresenta atividade bacteriostática, vários autores como Hu, Jou e Yang (2003); Tianwei, Xiaojing e Weixia, (2001) e Goosen (1996) citam que a quitosana apresenta potencial antimicrobiano.

Para a amostra QA (Figura 33) nenhum halo de inibição foi observado, sugerindo, assim, que a argila bentonita organofílica

utilizada não apresenta efeito bacteriostático frente às bactérias estudadas. Em adição, não há relatos na literatura sobre seu potencial antimicrobiano.

As amostras QZnO, Q4 e Q9 (correspondentes as Figuras 34, 35 e 36) apresentaram efeito bacteriostático para ambas as bactérias devido a ocorrência de um halo de inibição de crescimento microbiano.

Na Tabela 21 são apresentados os valores médios do halo de inibição para o teste de difusão em ágar para as nanopartículas como também para os filmes frente às bactérias *E.coli* e *S.aureus*.

Tabela 21 - Valores médios do halo de inibição de crescimento microbiano.

Amostras	Valores médios do halo de inibição (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
Np-A	0,0±0,00	0,0±0,00
Np-ZnO	30,0±0,6	80,0±10,0
Q	difuso	difuso
QA	0,0±0,0	0,0±0,0
QZnO	10,0±0,6	20,0±0,5
Q4	10,0±0,5	10,0±0,5
Q9	20,0±0,6	30,0±0,6

Fonte: a autora (2017).

A partir da Tabela 21 é possível constatar que os maiores halos de inibição são observados para a bactéria gram-positiva *S.aureus*. Segundo Tortora, Funke e Case (2010) e Muñoz-Bonilla e Fernández-García (2012), essas bactérias apresentam uma parede celular de peptídeoglicano mais espessa, enquanto que as gram-negativas contêm somente uma camada de lipopolissacarídeo e apresentam a vantagem de ser mais resistente, fato este que justifica a ocorrência de um halo menor para a bactéria *E.coli*. Segundo Sonohara et al. (1995) e Rhim et al. (2006), a diferença na polaridade da membrana celular também é justificável, sendo que a gram-positiva apresenta carga negativa menor, permitindo, assim, maior penetração de radicais livres, causando danos e/ou morte celular.

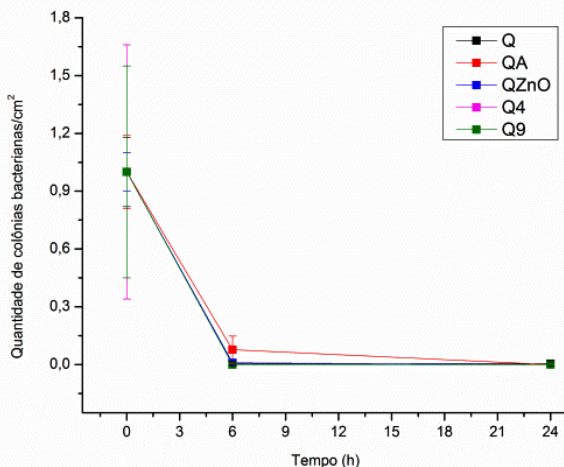
Apesar de ter sido observado halo de inibição de crescimento microbiano, este método não é recomendado para se analisar os resultados quantitativamente. Uma das justificativas é que o processo é suscetível a pequenas alterações nas condições de trabalho, como a espessura do meio e a precisão na adição da amostra.

O teste de curva de morte é considerado confirmatório e mais preciso do que os de difusão em ágar, pois a possibilidade de interação das nanopartículas com as bactérias é mais elevada na fase líquida

(NEGI et al., 2012). Deste modo, para a obtenção da curva de morte foram realizados testes de diluição em série.

As Figuras 37 e 38 apresentam os resultados microbiológicos de curva de morte para as bactérias *S. aureus* e *E.coli*, respectivamente, obtidos para as amostras de filmes Q, QA, QZnO, Q4 e Q9. O filme de quitosana pura (Q) foi a contraprova (branco). Os resultados são expressos em quantidade de colônias bacterianas por cm^2 de amostra.

Figura 37 - Curva de morte para a bactéria *S. aureus* obtida com o filme de quitosana pura (Q) e com os nanocompósitos (QA, QZnO, Q4 e Q9).



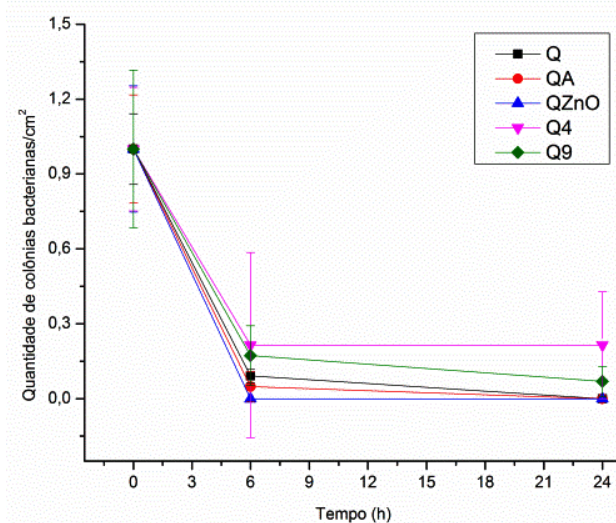
Fonte: a autora (2017).

Como se observa na Figura 37, todos os filmes poliméricos apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus*. Verifica-se que para o tempo de 6 h de contato, as amostras apresentaram uma atividade antimicrobiana satisfatória. Para a amostra Q (branco) houve uma redução de 99,59%, para QA 95,8%, QZnO 99,18%, Q4 e Q9 100%. Conseqüentemente, observa-se que para o tempo de 24 h as amostras QA e QZnO conseguem reduzir 100% do crescimento microbiano, exceto para a amostra de quitosana pura (Q), que mantém a mesma porcentagem em relação ao tempo de 6 h. É interessante mencionar que o filme de quitosana pura apresentou potencial antimicrobiano, fato este que pode estar atribuído a sua forte interação com a superfície eletronegativa dos microrganismos, induzindo mudanças na permeabilidade, nos distúrbios metabólicos e, finalmente, ocasionando a morte (FANG, et al., 1994). Han et al. (2010)

citam que a quitosana apresenta atividade antimicrobiana devido a sua propriedade catiônica. Além disso, de acordo com Jung et al. (1999), o grupo amino presente na quitosana, quando em meio ácido, pode ser protonado a amônio (NH_3^+), resultando em atividade antifúngica ou antimicrobiana. Ressalta-se também, que a incorporação do composto antimicrobiano (ZnO), em matriz de quitosana, vem a melhorar ainda mais este potencial.

A atividade antimicrobiana da amostra QA pode estar correlacionada com o fato de que grande quantidade de quitosana é utilizada para produção dos nanocompósitos, o que acaba incrementando sua atividade antimicrobiana.

Figura 38 - Curva de morte para a bactéria *E. coli* obtida com o filme de quitosana pura (Q) e com os nanocompósitos (QA, QZnO, Q4 e Q9).



Fonte: a autora (2017).

Verifica-se na Figura 38 que há uma queda considerável no crescimento microbiano para o tempo de 6 h de contato para a bactéria *E. coli*. Porém, a única amostra que consegue eliminar 100% das bactérias é a QZnO. As outras amostras seguem com uma redução na faixa de 91% a 95%. Para o tempo de 24 h de contato, as amostras Q4 e Q9 não conseguiram reduzir em 100% o crescimento das bactérias, o que sugere uma maior resistência das bactérias gram-negativas, como mencionado anteriormente.

Na Tabela 22 são apresentados os resultados obtidos no teste de curva de morte com o respectivo desvio padrão.

Tabela 22 - Resultados da análise microbiológica para o teste de curva de morte obtidos para os filmes de quitosana pura e incorporados com diferentes composições de Np-A e Np-ZnO.

Amostras	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	0 h	24 h	0 h	24 h
Q	1,000±0,183	0,010±0,007	1,000±0,142	0,000±0,000
QA	1,000±0,194	0,000±0,000	1,000±0,217	0,000±0,000
QZnO	1,000±0,097	0,000±0,000	1,000±0,253	0,000±0,000
Q4	1,000±0,657	0,000±0,000	1,000±0,247	0,210±0,214
Q9	1,000±0,553	0,000±0,000	1,000±0,317	0,070±0,060

Fonte: a autora (2017).

A Tabela 23 apresenta o percentual de redução das bactérias após 24 h de contato com os filmes de quitosana pura e incorporada com diferentes composições de Np-A e Np-ZnO.

Tabela 23 - Porcentagem de redução das colônias bacterianas após 24 h de tempo de contato com os filmes de quitosana com diferentes composições de Np-A e Np-ZnO.

Amostras	% redução <i>S. aureus</i>	% redução <i>E. coli</i>
Q	99,59	100,0
QA	100,0	100,0
QZnO	100,0	100,0
Q4	100,0	95,43
Q9	100,0	96,96

Fonte: a autora (2017).

5 CONCLUSÃO

Nanocompósitos de quitosana foram preparados com sucesso via método de intercalação do polímero por solução utilizando ácido acético como solvente.

Foi mostrado que a incorporação de pequenas quantidades de nanopartículas de argila bentonita organofílica e ZnO em matriz de quitosana melhora significativamente as propriedades mecânicas da quitosana. O teste mecânico mostrou que os filmes misturados com quitosana-argila-ZnO obtiveram maiores propriedades mecânicas em relação aos filmes com quitosana-argila e quitosana-ZnO. A amostra Q4 (8% ZnO + 3% argila) foi a que apresentou as melhores propriedades mecânicas de tensão, alongamento na ruptura e módulo de Young.

Para as propriedades térmicas, a temperatura de decomposição (T_{dc}) é influenciada significativamente pela quantidade de Np-ZnO, mas não é significativa quando argila é adicionada.

O espectro de FTIR demonstrou boa compatibilidade entre os componentes (quitosana/montmorilonita/óxidos metálicos), sendo que houve somente interação física entre os componentes, ou seja, não indicou nenhuma reação química.

O filme de quitosana apresentou através do MEV superfície lisa e os nanocompósitos apresentaram maior rugosidade devido a incorporação de Np-A e Np-ZnO. A distribuição do ZnO se torna mais uniforme junto com a argila na quitosana, sendo assim, a argila compatibiliza as Np-ZnO com a quitosana melhorando as propriedades mecânicas e não afetando a atividade antimicrobiana.

As análises microbiológicas mostraram que as Np-A não apresentaram ação antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli* testadas. A análise exibe um efeito sinérgico de ação antimicrobiana somente entre a quitosana e as Np-ZnO. Este efeito foi tanto bacteriostático quanto bactericida. A incorporação de um agente antimicrobiano em quitosana, como se mostrou a amostra QZnO, melhora ainda mais esta propriedade, o que torna interessante produzir bionanocompósitos para embalagens de alimentos.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) analisar o filme de quitosana pura e os nanocompósitos quanto às propriedades de barreira e grau de dispersão das nanopartículas na matriz;
- b) estudar o sinergismo com outros compostos antimicrobianos;
- c) realizar testes toxicológicos com as Np-ZnO utilizadas neste trabalho;
- d) estudar a migração de Np-ZnO em matrizes poliméricas.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, Mehdi; REZAEI, Masoud; FARZI, Gholamari. A novel active bionanocomposite film incorporating Rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Jour. of Food Eng.** v. 111, p. 343-350, 2012.

ABOUGROUN, H. A.; COUSIN, N.A.; JUDGE M.D. Extended shelf life of unrefrigerated prerigor cooked meat. **Meat Sci.**, v. 33, p. 207 – 229, 1993.

AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Quím. Nova**, v. 31, p. 144-153, 2008.

AKCELRUD, Leni. Estrutura e propriedades. In: AKCELRUD, Leni. Fundamentos da ciência dos polímeros. Barueri, SP: Manole, 2007. p. 1-46.

ALVES, A. R. F. Doenças alimentares de origem bacteriana. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa - UFP, Porto, Portugal, 2012.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; PINTO, S.M. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.58, p. 440-446, 2006.

ASKELAND, Donald R.; FULAY, Pradeep P. WRIGHT, Wendelin J. Polymers. In: GOWANS, Hilda. (Ed.). **The sci. and eng. of mat.** California: Cengage Learning, 2011. p. 601-638.

ASSIS, Letícia Marques; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa; PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos; SOUZA-SOARES, Leonor Almeida. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Braz. Food Tech.** Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012.

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; M. COSTA, A. C. F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Rer. elet. de mat. e proc.** v. 2.3, p. 27-34, 2007.

AZIZI, Susan; AHMAD, Mansor B.; IBRAHIM, Nor Azowa; HUSSEIN, Mohd Zobir; NAMVAR, Farideh. Cellulose Nanocrystals/ZnO as a Bifunctional Reinforcing Nanocomposite for Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Blend Films: Fabrication, Characterization and Properties. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n.6, p. 11040-11053, 2014.

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Sci. and Tech.** London, v. 42, n. 6, p. 1179-1186, 2009.

BLASCO, C.; PICÓ, Y. Determining nanomaterials in food. **Tren. in Analy. Chem.** Oxford, v. 30, n. 1, p. 84-99, 2011.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUÈLLES-MONAL, W.; DESBRIEÁRES, J.; RINAUDO M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Poly.**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

BRAGA, F. C. F. Nanocompósitos de elastômero termoplástico à base de PP/EPDM/argila organofílica. 2010, 154p. Dissertação (Mestrado em Química – Polímeros) – Instituto de Química, UERJ, RJ.

BRAGA, F. C. F.; OLIVEIRA, M. F. L.; OLIVEIRA, M. G. The effect of PP-MA amount on the properties of PP/EPDM/organoclay nanocomposites. In: 9th International Conference on Nanostructured Materials – NANO 2008, Rio de Janeiro, 2008. Abstracts, p. 78.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-deminas artesanal do Serro, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.59, p. 1570-1574, 2007.

CAGRI, Z.; USTUNOL, E.T.; RYSER, J. Antimicrobial edible films and coatings. **Food Prot.**, v. 67, p. 833–848, 2004.

CAMPANA-FILHO, S. O.; BRITTO,D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNIME, R.; LAVALL, R. L. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. **Quím. Nov.**, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CAPELEZZO, Ana Paula. **Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes poliméricos biodegradáveis aditivados com compostos a base de zinco**. 124 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Comunitária da região de Chapecó – Unochapecó. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Chapecó, 2017.

CARASTAN, D.J. Obtenção e caracterização reológica de nanocompósitos de polímeros estirênicos, p. 117. Tese de Doutorado, USP, Escola Politécnica, São Paulo, 2007.

CÁRDENAS, Galo; SANZANA, Johana; MEI, Lucia. Synthesis and Characterization of Chitosan-PHB Blends. **Bol. Soc. Chil. Quím.** v.47 n.4, 2002.

CASARIEGO, A. et al. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydroc.**, v. 23, n.7, p. 1895–1902, 2009.

CHA, D. S.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: review. **Crit. Review Food Sci. Nut.**, United Kingdom, v. 44, n. 4, p. 223-37, 2004.

CHANDA, Manas; ROY, S. K. Characteristics of polymers. In: HUDGIN, Donald. (Ed.). *Plastics technology handbook*. New York: M. Dekker, 1987. p. 1-92.

CHEN, M.C.; YEH G. H. C.; CHIANG B.H. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. **J. Food Proc Preserv**, v. 20, n.5, p. 379 – 390, 1996.

COMA, V. et al. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **J. Food Prot.** v. 64, n.4, p. 470 – 475, 2001.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; DESCHAMPS A. Edible antimicrobial film based on chitosan matrix. **J. Food Sci.**, v. 67, n.3, p. 1162-1169, 2002.

- DAMM, C.; NEUMANN, M.; MÜNSTEDT, H. Properties of nanosilver coatings on polymethyl methacrylate. **Soft Mat.**, v. 3, n.2, p.71-88, 2006.
- DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Biopolymer- Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite. **Chem. of Mat.**, v. 15, n.20, p. 3774–3780, 2003.
- DOBRUCKA, Renata; CIERPISZEWSKI, Ryszard. Active and Intelligent Packaging Food – Research and Development – A Review. **Food Nutr. Sci. Pol. J.**, v. 64, n. 1, p. 7-15, 2014.
- DONG, Z. F.; DU, Y.; FAN, L.; WEN Y.; LIU, H.; WANG, X. Preparation and properties of chitosan/gelatin/nano-TiO₂ ternary composite films. **Funct. Polym.**, v. 17, n. 1, p. 61-66, 2004.
- EL-HEFIAN, Esam A.; NASEF, Mohamed Mahmoud; YAHAYA, Abdul Hamid. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blended Films: Mechanical, Thermal and Surface Investigations. **E-J. of Chem.**, v.8, n.1, p. 91-96, 2010.
- EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Cont.**, v. 22, n. 3-4, p. 408–413, 2011.
- ESKANDARI, M.; HAGHIGHI, N.; AHMADI, V.; HAGHIGHI, F.; MOHAMMADI, S. R. Growth and investigation of antifungal properties of ZnO nanorod arrays on the glass. *Physica B: Cond. Matter*, v. 406, n. 1, p. 112–114, 2011.
- ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food and Biop. Tech.** v.5, p. 1447–1464, 2012.
- ESTEVEES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: Estratégias de síntese de materiais híbridos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 798–806, 2004.

FAN, Z.; LU, J. G. Zinc oxide nanostructures: Synthesis and properties. **J. of Nanosci. Nanotech.**, v. 5, n. 10, p. 1561-73, 2005.

FANG, S. W.; LI, C. F.; SHIH, D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. **J. Food Prot.** v.57, p.136–140, 1994.

Food and Drug Administration (FDA), (2014). Part 182 - Substances generally recognized as safe. Food and drug administration, Washington DC, USA. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.8991>>. Acesso em: 27 out. 2016.

FONSECA, C. G. et al. Na⁺ as a probe to structural investigation of dehydrated smectites using NMR spectra calculated by DFT. **Appl. Clay Sci.**, v. 126, p. 132-140, 2016.

Food and Drug Administration (FDA). Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [Staphylococcus aureus], 2012.

FORSYTHE, Stephen J. Infecções e intoxicações de origem alimentar. In : FORSYTHE, Stephen J. Microbiologia da segurança dos alimentos. Nottingham Trent University: Artmed, 2013. p. 19-24.

FUJISHIMA, T.N.; RAO, D.A.; TRYK. Titanium dioxide photocatalysis, **J.Photochem. Photobiol. C** 1, p. 1–21, 2000.

GERMANO, Pedro. GERMANO; Maria I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Varela, 2001.

GHULE, K.; GHULE, A. V.; CHEN, B.-J.; LING, Y.-C. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study. **Green Chem.**, v. 8, n. 12, p. 1034–1041, 2006.

GIUNCHEDI, P.; GENTA, I.; CONTI, B.; R.A.A. MUZZARELLI, R. A. A.; CONTE, U. Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres. **Biomat.** v. 19, p. 157–161, 1998.

GOOSEN, M. E. A. Applications of chitin and chitosan. Technomic Publishing Company, Lancaster (1996).

GRIM, R. E.; GÜVEN, N. Bentonites: geology, mineralogy, properties and uses. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1978. 158 p.

GUSATTI, M.; ROSÁRIO, J. A.; CAMPOS, C. E. M.; KUNHEN, N. C.; CARVALHO, E. U.; RIELLA, H. G.; BERNARDIN, A. M. Production and Characterization of ZnO Nanocrystals Obtained by Solochemical Processing at Different Temperatures. **J. of Nanosci. and Nanotech.**, v. 10, p. 4348–4351, 2010.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. In: AHVENAINEN, R. Novel Food Packaging Techniques. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 50-70.

HAN, Yang-Su; LEE, Sang-Hoon; CHOI, Kyung Ho; PARK, In. Preparation and characterization of chitosan–clay nanocomposites with antimicrobial activity. **Phy. and Chem. of Sol.** Cheonan, Republic of Korea, v. 71, p. 464–467, 2010.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biom.**, v. 19, p. 1419–1423, 1998.

HONG R.; PAN T.; QIAN J.; LI H. Synthesis and surface modification of ZnO nanoparticles. **Chem. Eng. J.** v.119, p. 71-81, 2006.

HOTCHKISS, J.S. Safety considerations in active packaging. In Rooney, ML (Ed.) **Act. food pack.** Glasgow, Blackie Academic and Professional, 1995. p 238-253.

HU, S.-G.; JOU, C.-H.; YANG, M.C. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chitoooligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid. **Biom.**, v. 24, p. 2685–2693, 2003.

IBARRA, V. G.; SENDÓN, R.; QUIRÓS A. R-B. Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. In: BARROS-VELAZQUEZ. (Ed.). **Ant. Food Pack**. Lugo, Spain: Elsevier, 2016. p. 363-384.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição, Rio Grande do Sul: Artmed, 2005.

JANOTTI, A.; VAN DE WALLE, C.G. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. **Reports on Prog. in Phys.** California, v. 72, 126501 (29pp), 2009.

JONES, N.; RAY1, B.; RANJIT, K. T.; MANNA, A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microb. Letters**, v. 279, p. 71–76, 2008.

JUNG, B.; KIM, C. H.; CHOI, K. S.; LEE, Y. M.; KIM, J. J. J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Appl. Polym. Sci**, v. 72, n.13, p. 1713-1719, 1999.

KITTUR, F. S. et al. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carboh. Polym.** v. 49, p. 185, 2002.

KUMAR, Ravi. A review of chitin and chitosan applications. **React. and Funct. Polym.**, v. 46, p. 1–27, 2000.

KUMAR, S.; JOG, J. P.; NATARAJAN, U. Preparation and characterization of PMMA-clay nanocomposites via melt intercalation: the effect of organoclay on the structure and thermal properties. **J Appl Polym Sci.**, v. 89, 1186-1194, 2003.

KUO, C. L. et al. Synthesis of zinc oxide nanocrystalline powders for cosmetic applications. **Ceram. Inter.** v. 36, p. 693-698, nov. 2010.

LABUZA, T.P; BREENE, W.M. Applications of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **J Food Proc Preserv**, v.13, n.1, p. 1-69, 1989.

- LACOSTE, A.; SCHAICH, K. M.; ZUMBRUNNEN, D.; YAM, K. L. Advancing controlled release packaging through smart blending. **Pack. Tech. and Sci.**, Inglaterra, v. 18, n. 2, p. 77-87, 2005.
- LAVORGNA, M.; PISCITELLI, F.; MANGIACAPRA, P.; BUONOCORE, G.G. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carboh. Poly.**, v. 82, n.2, p. 291–298, 2010.
- LECETA, I.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Functional properties of chitosan-based films. **Carboh. Poly.**, v. 93, p. 339-346, 2013.
- LI, J. H.; HONG, R. Y.; LI, M. Y.; LI, H. Z.; ZHENG, Y.; DING, J. Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings. **Prog. in Org. Coat.**, v. 64, n.4, p. 504–509, 2009.
- LI, Li-Hua; DENG, J. C.; DENG, H. R.; LIU, Z. L.; LI, X. Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. **Chem. Eng.**, v. 160, p. 378–382, 2010.
- LI, Li-Hua; DENG, J. C.; DENG, H. R.; LIU, Z. L.; XIN, L. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. **Carbohy. reseac.** v. 345, n. 8, p. 994-998, 2010.
- LIU, Y., et al. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, n. 4, p. 1193–1201, 2009.
- LLORENS, A.; LLORET, E.; PICOUET, P. A.; TRBOJEVICH, R.; FERNANDEZ, A. Metallic based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. **Trends in Food Sci. Tech.**, v. 24, n.1, p. 19–29, 2012.
- LOWY, F.D. Staphylococcus aureus infections. **J Med.**, v. 339, p. 520-532, 1998.
- MA, X.Y.; ZHANG, W.D. Effects of flower-like ZnO nanowhiskers on the mechanical, thermal and antibacterial properties of waterborne polyurethane. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 94, p. 1103–1109, 2009.

- MACUVELE, D. L. P.; NONES, J.; MATSINHE, J. V.; BEZERRA, A.T.; LIMA, M.M.; SANTOS, E.S.W.; FIORI, M.A.; RIELLA, H.G. Simultaneous Effect of Reaction Temperature and Concentration of Surfactant in Organo-Bentonite Synthesis. *Mat. Sci. Forum*, v. 899, p. 42-47, 2017.
- MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; DUNLAB, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12^a edição, São Paulo: Artmed, 2010.
- MARANA, Naiara Letícia et al. Propriedades eletrônicas, estruturais e constantes elásticas do ZnO. *Quím. Nova. SP*, v. 33, n.4, p. 810-820, 2010.
- MARKARIAN, J. Automotive and packaging offer growth opportunities for nanocomposites. **Plast. Add. e Comp.** v. 7, n.6, p.18–21, 2005.
- MARRA, Antonella et al. Polylactic acid/zinc oxide biocomposite films for food packaging application. *International. J. of Biol. Macrom.*, v. 88, p. 254–262, 2016.
- MARTINS, C.S.; MORGADO, D.L.; ASSIS, O.B.G. Cashew gum-chitosan blended films: Spectral, mechanical and surface wetting evaluations. **Macrom. Res.**, v. 24 b, 8, p. 691-697, 2016.
- MASSINGA, P. H; FOCKE, W.; VAAL, P. L.; ATANASOVA, M. Alkyl ammonium intercalation of Mozambican bentonite. **Appl. Clay Sci.**, v.49, p. 142-148, 2010.
- MILLER, A.J.; CALL, J.E.; WHITING, R.C. Comparison of organic acid salts for Clostridium botulinum control in an uncured turkey product. **J. Food Prot.**, v. 56, p. 958 – 962, 1993.
- MIRHOSSEINI, M; FIROUZABADI, F. B. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. **Inter. J. of Dairy Tech.**, v. 66, n. 2, 2013.
- MORKOÇ, H.; ÖZGUR, U. *Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Device Technology*. Wiley: Weinheim, 2009. 488 p.

MÖLLER, H.; GRELIER, S.; PARDON, P.; COMA, V. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan – HPMC – based films. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, n.21, p. 6581 – 6591, 2004.

MÜLLER, Leidiani. **Incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana e avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana.** 2013. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2013.

MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Prog. in Pol. Sci.**, vol. 37, p. 281-339, 2012.

MURARIU, M.; DOUMBIA, A.; BONNAUD, L.; DECHIEF, L.; PAINT, Y.; FERREIRA, M.; CAMPAGNE, C.; DEVAUX, E.; DUBOIS, P. High-performance polylactide/ZnO nanocomposites designed for films and fibers with special end-use properties. **Biom.**, v. 12, p. 1762–1771, 2011.

MURRAY, H.H. Occurrences, processing and application of kaolins, bentonites, palygorskite–sepiolite, and common clays. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 2007. 188 p.

NEGI, H.; AGARWAL, T.; ZAIDI, M. G. H.; GOEL, R. Comparative antibacterial efficacy of metal oxide nanoparticles against Gram negative bacteria. **Annals of Microb.**, v. 62, p. 765–772, 2012.

OLIVEIRA, J. J.; REZENDE, C. S. M.; OLIVEIRA, A. P.; MOREIRA, N. M.; FREITAS, F. A. Surtos alimentares de origem bacteriana. Enciclopédia biosfera, **Centro Cient. Conhec.** - Goiânia, v.9, n.17, p. 24-26, 2013.

ORIAKHI, C. O. Polymer Nanocomposition Approach to Advanced Materials. **J. Chem. Educ.** v. 77, p. 1138, 2000.

OUATTARA, B.; SIMARD, RE.; PIETTE G.; BEGIN, A.; HOLLEY, RA. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, n.1-2, p. 139 – 148, 2000.

ÖZGÜR, Ü.; ALIVOV, Y.I.; LIU, C.; TEKE, A.; RESHCHIKOV, M.A.; DOĞAN, S.; AVRUTIN, V.; CHO, S.-J.; MORKOÇD, H. A comprehensive review of ZnO materials and devices. **J. of Appl. Phys.** v. 98, p. 1-103, 2005.

PADMAVATHY, N; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Sci. and Tech. of Adv. Mat.**, v. 9, n. 3, p. 035004, 2008.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. V. Organoclays: Properties, preparation and applications. **Appl. Clay Sci.** v. 42, p. 8–24, 2008.

PAOLI, Marco-Aurelio de. Degradação e estabilização de polímeros. Campinas: Chemkeys, 2008. 221 p.

PAULA, C. M. D., CASARIN, L. S., TONDO, E. C. Escherichia coli O157:H7 - patógeno alimentar emergente. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, vol. 2, nº 04, p. 23-33, 2014.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT-Food Sci. Tech.**, v.38, p. 859-865, 2005.

REDDY, K. M.; FERIS, K.; BELL, J.; WINGETT, D. G.; HANLEY, C.; PUNNOOSE, A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Appl. Phys. Letters**, v. 90, n. 21, p. 213902, 2007.

RHIM, J. W.; HONG, S.I.; PARK, H.M.; NG, P.K.W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.16, p. 5814-5822, 2006.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Crit. Reviews in Food Sci. and Nut.**, New York, v. 47, n. 4, p. 411-433, 2007.

RHIM, J. W.; WANG, L. F.; HONG S. I. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food Hydroc.**, v. 33, n. 2, p. 327–335, 2013.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Prog. in Poly. Sci.**, v. 31, n. 7, p.603-632, 2006.

RODRIGUES, E.T.; HAN, J.H. Antimicrobial wheyprotein films against spoilage and pathogenic bacteria. Proceedings of the IFT Annual Meeting; Dallas, Tex.; June 10-14. Chicago, Ill.: Institute of Food Technologists. p. 191, 2000.

SAKURAI, K.; MAEGAWA, T.; TAKAHASHI, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. **Polym.** v. 41, p. 7051–7056, 2000.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: Visiting a strain of clinical importance. **J. Bras. de Pat. e Med. Lab.**, v. 43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, C. A. N. S. Propriedades de filmes de quitosano – influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero. 2006. Dissertação (Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro, Pt - 2006.

SANUJA, S.; AGALYA, A.; UMAPATHY, M. J. Studies on magnesium oxide reinforced chitosan bionanocomposite incorporated with clove oil for active food packaging application. **Intern. J. of Poly. Mat. and Pol. Biom.**, p. 37-41, 2014.

SANUJA, S.; AGALYA, A.; UMAPATHY, M. J. Synthesis and characterization of zinc oxide–neem oil–chitosan bionanocomposite for food packaging application. **Int. J. of Biol. Macro.**, v. 74, p. 76-84, 2015.

SARANTÓPOULOS, Claire I. G. L. et al. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA, 2002. 267 p.

SAWAI, J. et al. Short Communication Indirect Conductimetric Assay of Antibacterial Activities **J. Ind. Microbiol. Biotech**, 29:296, 2002.

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **J. of Appl. Microb.**, v. 96, p. 803-809, 2004.

SENGUPTA, R. et al. A Short review on rubber/clay nanocomposites with emphasis on mechanical properties. **Pol. Eng. and Sci.**, v. 47, p. 1956-1974, 2007.

SHANKAR, Shiv et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of gelatin/ZnO nanocomposite films. **Food Hydroc.**, v. 45, p. 264-271, 2015.

SIGNINI, Roberta; CAMPANA FILHO, Sérgio P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Pol.* v.8 n.4, 1998.

SILVESTRE C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v. 36, p. 1766–1782, 2011.

SINGH, S.; NIMMO, W.; WILLIAMS, P.T. An experimental study of ash behaviour and the potential fate of ZnO/Zn in the Co-combustion of pulverised South African coal and waste tyre rubber. **Fuel**, v. 111, p. 269-279, 2013.

SIRELKHATIM A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism, **Rev. Nano Micro Lett.**, v. 7, p. 219–242, 2015.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydro.** v. 24, n.8, p. 770-775, 2010.

SMETANA, A. B; KLABUNDE, K. J.; MARCHIN, G. R.; SORENSEN, C.M. Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles. **Langmuir**, v. 24, p. 7457-7464, 2008.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **J. of Colloid and Inter. Sci.**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SONOHARA, R., MURAMATSU, N., OHSHIMA, H., KONDO, T. Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. **Bio. Chem.**, vol. 55, n.3, p. 273-277, 1995.

SOUZA, Roberta Cristina. **Ação antimicrobiana de filmes de polietileno de baixa densidade e polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico incorporados com nanopartículas de óxido de zinco.** 2015. 132 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2015.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Review: Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotech.** v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

STOIMENOV, P. K.; KLINGER, R. L.; MARCHIN, G. L.; KLABUNDE, K. J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, v. 18, n. 17, p. 6679–6686, 2002.

TIANWEI, T.; XIAOJING, H.; WEIXIA, D. Adsorption behaviour of metal ions on imprinted chitosan resin. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 76, p. 191–195, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiology: An introduction. 10. ed., USA: Pearson, 2010.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 935.

TRINDADE, T.; O'BRIEN, P.; PICKETT, N.; Nanocrystalline semiconductors: synthesis, properties, and perspectives. **Chem. Mater.** v. 13, p. 3843-3858, 2001.

VICENTINI, D. S.; SMANIA, A., Jr., & LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. **Mat. Sci. and Eng.**, v. 30, n. 4, p. 503–508, 2010.

WANG, S. F.; SHEN, L.; TONG, Y. J.; CHEN, L.; PHANG, I. Y.; LIM, P. Q. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Poly. Degrad. and Stab.**, v. 90, p. 123-131, 2005.

WANG, Z.L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. **J. Phys.: Condens. Matter**. Atlanta, v. 16, R829–R858, 2004.

WANG, X.; DU, Y.; YANG, J.; WANG, X.; SHI, X.; HU, Y. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan/layered silicate nanocomposites. **Poly.** v. 47, n.19, p. 6738-6744, 2006.

WU, Qiuju; LIU, Xiaohui; BERGLUND, Lars A. FT-IR spectroscopic study of hydrogen bonding in PA6/clay nanocomposites. **Poly.**, v. 43, n.8, p. 2445-2449, abr. 2002.

XIE, W. et al. Thermal degradation chemistry of alkyl quaternary ammonium montmorillonite. **Chem. of Mat.** v. 13, n.9, p. 2979-2990, 2001.

XU, Y.; REN, X.; HANNA, M. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. **J. of Appl. Poly. Sci.**, v. 99, p.1684–1691, 2006.

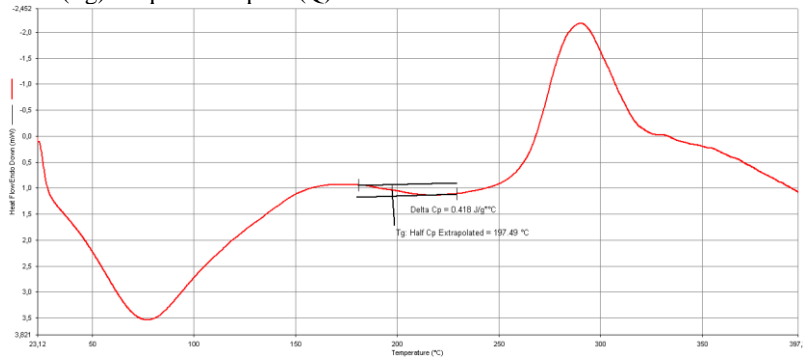
YOO, J.-W; IRVINE, D. J. ; DISCHER, D. E.; MITRAGOTRI, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. **Nat. Rev.Drug Discov.** [S.l.], v.10, p. 521 – 35, jul. 2011.

ZHA, W.; CHOI, S.; LEE, K. M.; HAN, C. D. Dispersion characteristics of organoclay in nanocomposites based on end-functionalized homopolymer and block copolymer. **Macrom.** v. 38, p. 8418-8429, 2005.

ZOHURIAAN, M.J; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Poly. Test.** v. 23, n. 5, p.575-579, 2004.

APÊNDICES
APÊNDICE A – Curvas de Calorimetria Diferencial de Varredura
(DSC).

Figura A1 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) da quitosana pura (Q).



Fonte: a autora (2017).

Figura A2 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) da amostra QA.

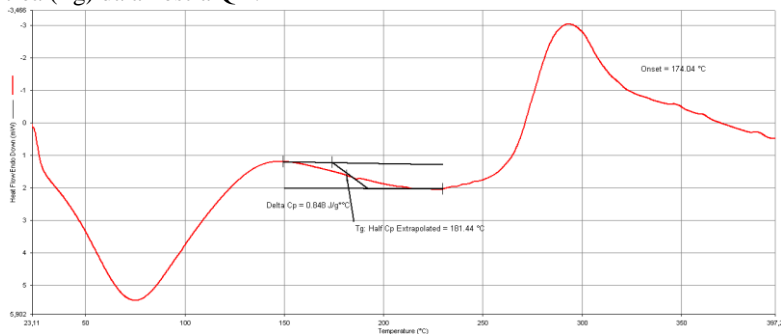


Figura A3 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) da amostra QZnO.

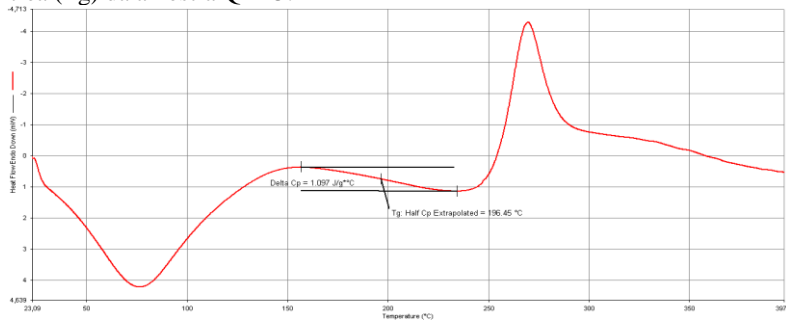


Figura A4 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg) da amostra Q1.

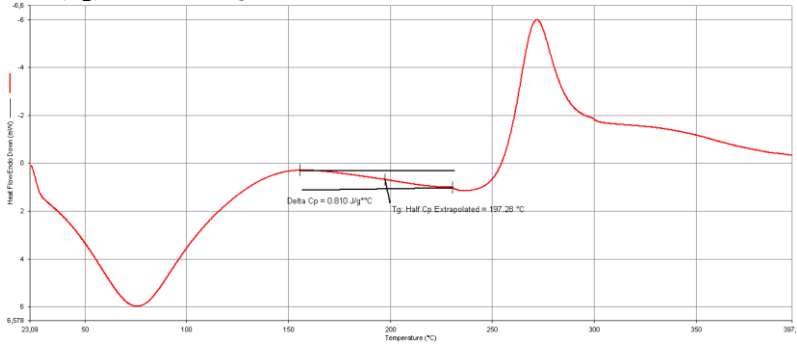


Figura A5 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg) da amostra Q2.

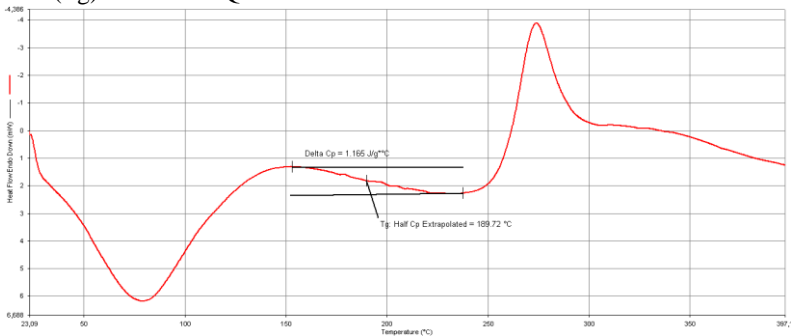


Figura A6 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg) da amostra Q3.

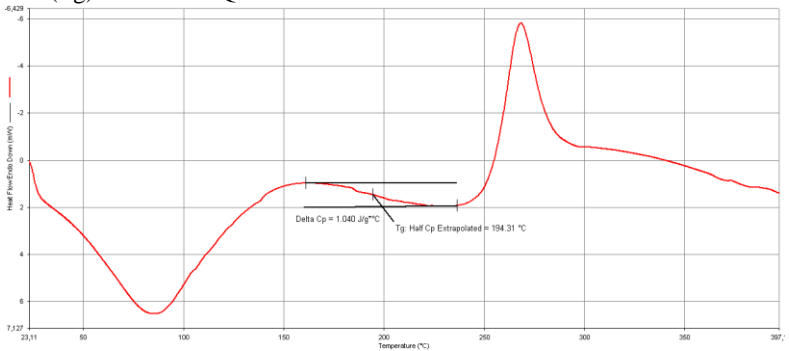


Figura A7 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítreia (Tg) da amostra Q4.

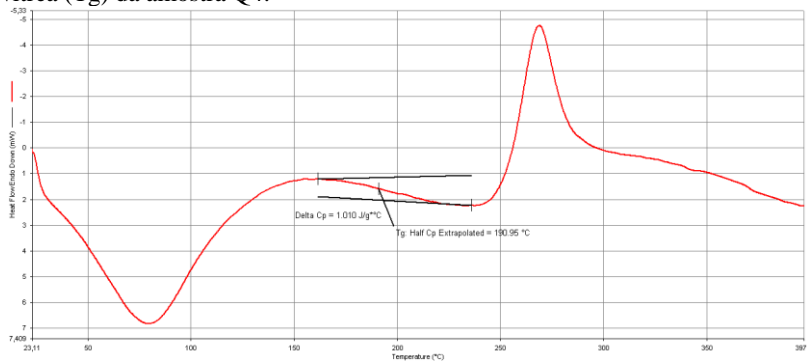


Figura A8 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítreia (Tg) da amostra Q5.

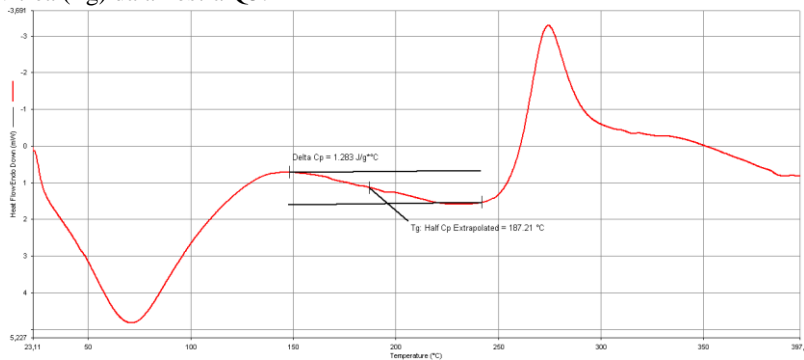


Figura A9 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítreia (Tg) da amostra Q6.

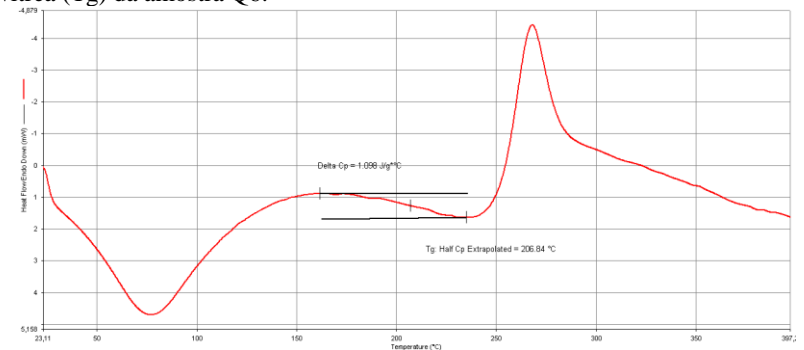


Figura A10 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg) da amostra Q7.

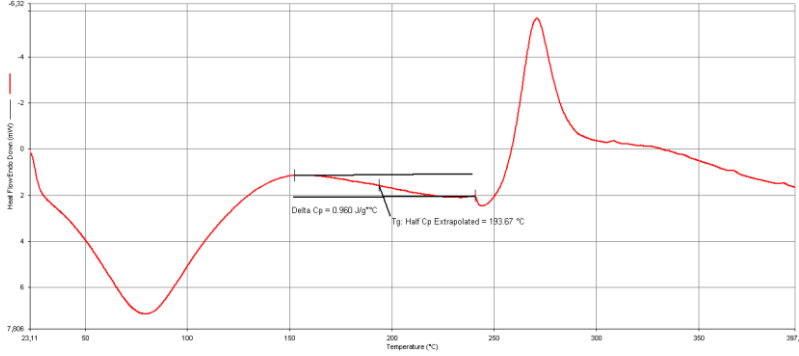


Figura A11 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg) da amostra Q8.

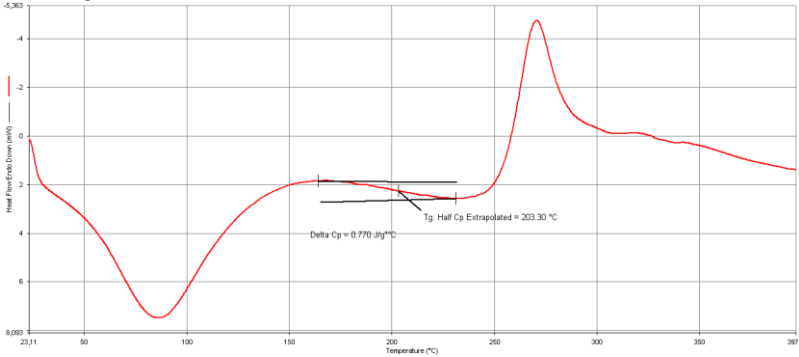


Figura A12 – Curva de DSC para a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg) da amostra Q9/Q10.

