



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Leidiani Müller

Tratamento com plasma frio em PELBD para desenvolvimento de filmes antibacterianos contendo nanopartículas de ZnO, amido e quitosana

Florianópolis

2019

Leidiani Müller

Tratamento com plasma frio em PELBD para desenvolvimento de filmes antibacterianos contendo nanopartículas de ZnO, amido e quitosana

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coorientadores: Profa. Dra. Cristiane da Costa, Prof. Dr. Humberto Gracher Riella

Florianópolis

2019

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

Müller, Leidiani
Tratamento com plasma frio em PELED para
desenvolvimento de filmes antibacterianos contendo
nanopartículas de ZnO, amido e quitosana / Leidiani Müller ;
orientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi, coorientador,
Cristiane da Costa, coorientador, Humberto Gracher
Riella, 2019.
128 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Engenharia de Alimentos.
3. Filmes antibacterianos. 4. Nanopartículas de óxido de
zinco. 5. Plasma frio. I. Carciofi, Bruno Augusto Mattar .
II. Costa, Cristiane da . III. Riella, Humberto Gracher
IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Leidiani Müller

**TRATAMENTO COM PLASMA FRIO EM PELBD PARA
DESENVOLVIMENTO DE FILMES ANTIBACTERIANOS CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE ZnO, AMIDO E QUITOSANA**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Cristiane da Costa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cristiano José de Andrade
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori
UNOCHAPECÓ

Profª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos.

Profª. Sandra Regina Salvador Ferreira, Dra.
Coordenadora do Programa

Prof. Bruno Augusto Mattar Carciofi, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2019.

Este trabalho é dedicado a quem deu sentido à minha vida, meu filho Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Bruno, pela confiança, pelos ensinamentos e paciência no decorrer desta pesquisa.

À minha coorientadora professora Cristiane por abraçar a pesquisa já iniciada, pela disponibilidade e relevantes contribuições.

Ao meu coorientador, professor Humberto Gracher Riella, por toda sua experiência.

Ao professor João Laurindo por todo conhecimento e por apostar no projeto do plasma.

Ao Laboratório de Materiais e Corrosão (LABMAC) pela disponibilidade para a realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI) pelo acolhimento e troca de experiências, e aos colegas pela força-tarefa na produção de filmes na fase final da pesquisa.

À Central de Análises do EQA e ao Leandro pelo auxílio na parte experimental de caracterização.

Ao Laboratório de Controle de Processos (LCP) pela possibilidade realização de experimentos.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) e à professora Gláucia pelo conhecimento e apoio na etapa inicial da pesquisa.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME) pela colaboração nas análises.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos da UFSC por todo suporte.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Felipe Cassini, à empresa Energiae e ao Diego Morschbacher, pela colaboração na construção, funcionamento e reparos no aparato experimental.

Aos bolsistas de iniciação científica Felipe Cybis e Carolline Françolle por toda colaboração na parte experimental. À bolsista de iniciação científica e orientada de TCC, Gabriela Zanghelini, por toda a ajuda, pronta disponibilidade independente do horário e pela grande amiga que se tornou.

À Denise Laroque pela amizade e enriquecedoras discussões sobre a pesquisa e por toda colaboração especialmente na fase final da pesquisa.

À toda a minha família por todo incentivo, amor e exemplo.

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho.

RESUMO

As embalagens ativas produzidas com agentes antimicrobianos incorporados à matriz polimérica são capazes de aumentar a vida útil dos alimentos com a inibição ou eliminação de micro-organismos. Neste sentido, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de ZnO (NPs-ZnO) já são conhecidas e por isso tem se estudado a incorporação destas nanopartículas em diferentes polímeros. O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes ativos antibacterianos com nanopartículas de ZnO (NPs-ZnO) incorporadas em polietileno linear de baixa densidade (PELBD) através de duas diferentes técnicas: aspersão das NPs-ZnO em PELBD parcialmente fundido e pela aplicação do plasma frio de ar atmosférico em PELBD para aderir um biopolímero (amido ou quitosana) contendo essas nanopartículas. Para os filmes obtidos por aspersão, as NPs-ZnO foram adicionadas nas concentrações de 0,9 e 1,5 mg/cm² e para os filmes multicamadas, nas concentrações de 0,2 e 0,5 mg/cm². Os filmes de PELBD foram tratados por 120 s de plasma frio utilizando ar atmosférico em um reator de descarga com barreira dielétrica (DBD) nas condições de 32 kV, 132 Hz à pressão atmosférica, o que tornou o filme mais hidrofílico e aumentou a energia livre superficial, viabilizando a adesão da camada biodegradável. As propriedades mecânicas não foram alteradas na presença das NPs e das camadas com os biopolímeros. A propriedade física de molhabilidade dos filmes de PELBD puro e com a incorporação das NPs-ZnO por aspersão não apresentou alteração. Enquanto, os filmes com a sobrecamada de amido resultaram nas superfícies mais hidrofílicas. Porém, a adição das NPs-ZnO diminuiu a hidroflicidade tanto para os filmes com amido e com quitosana. No aspecto de cor, os filmes de quitosana se apresentaram mais amarelados e homogêneos, não sendo possível se perceber a presença das NPs. Entretanto, para os filmes de PELBD com as NPs aspersas apresentaram visíveis aglomerados do ZnO, e os filmes de amido se mostraram transparentes e, com a adição das NPs, mantiveram-se homogêneos, mas adquiriram coloração branca. A ação antimicrobiana dos filmes foi avaliada frente às bactérias patogênicas, Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Salmonella* Enteritidis, e a bactéria deteriorante Gram-positiva *Lactobacillus sakei* de acordo com a norma JIS Z 2801:2000. Entre os filmes com a adição das NPs-ZnO, para a bactéria *L. sakei*, apenas os filmes de PELBD com aspersão de 0,9 mg/cm² NPs-ZnO não se mostraram como superfície antibacteriana efetiva, para as outras duas bactérias, todos os filmes se mostraram antibacterianos efetivos. Os filmes multicamadas de quitosana contendo as NPs foram os mais efetivos, capazes de inativar totalmente as bactérias *L. sakei* e *S. Enteritidis* em 24 horas e a bactéria *S. aureus* em apenas 12 horas, na maior concentração de NPS (0,5 mg/cm²). Esse efeito superior ocorreu devido as propriedades antimicrobianas da quitosana frente as três bactérias. Percebe-se que a adição de NPs-ZnO em polímeros é capaz de originar superfícies antimicrobianas e por isso têm potencial para serem utilizados como embalagens ativas antimicrobianas para alimentos.

Palavras-chave: Filmes antibacterianos. Plasma frio. Nanopartículas de ZnO. Bactérias patogênicas. Bactérias deteriorantes.

ABSTRACT

Active packaging with antimicrobial agents incorporated into its polymer matrix is an emerging technology that is capable of increasing the shelf life of food by inhibiting or eliminating microorganisms. The antimicrobial properties of ZnO nanoparticles (NPs-ZnO) are well-known, which is why the incorporation of these nanoparticles in different polymers has been a frequent research topic over the last few years. The objective of this work was to develop antibacterial films using a linear low-density polyethylene (LLDPE) base and ZnO nanoparticles (NPs-ZnO). The different films were obtained either by spraying 0.9 or 1.5 mg/cm² of NPs-ZnO on partially melted LLDPE, or by a surface treatment of LLDPE with subsequent casting of a biopolymer layer (starch or chitosan) containing 0.2 or 0.5 mg/cm² of NPs-ZnO. The film surface was treated with cold plasma using atmospheric air in a dielectric barrier discharge (DBD) reactor at 32 kV, 132 Hz and atmospheric pressure for 120 s, resulting in films with higher hydrophilicity and higher surface free energy, thus enabling the adhesion of the biodegradable layer. The different films obtained presented no significant differences in mechanical properties. The hydrophobicity of the LLDPE films remained unaltered by the incorporation of NPs-ZnO by spraying, whereas in the multilayer films the addition of NPs-ZnO resulted in decreased hydrophilicity. The presence of the NPs-ZnO in the multilayer films with chitosan was unnoticeable, and the films remained transparent; in contrast, the multilayer films with starch presented a whiter coloration once NPs-ZnO were added. The films obtained by spraying presented a heterogeneous surface, with visible NPs-ZnO agglomerates. The antimicrobial action of the films was tested against two pathogenic bacteria, the Gram-positive *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative *Salmonella* Enteritidis, and one spoilage bacteria, the Gram-positive *Lactobacillus sakei*, using the norm JIS Z 2801:2000. Among the films with NPs-ZnO, the LLDPE films sprinkled with 0.9 mg/cm² NPs-ZnO were the only samples that presented no efficacy as an antibacterial surface towards *L. sakei*. When tested against the two pathogenic bacteria, all films produced were effective. The multilayer films with chitosan and NPs-ZnO were the most effective against the bacteria; at the highest concentration of NPs (0.5 mg/cm²), the films allowed to completely inactivate *L. sakei* and *S. Enteritidis* bacteria in 24 h, while the inactivation of *S. aureus* was accomplished in only 12 h. The higher antibacterial effect observed for chitosan-containing films is due to the significant antibacterial activity of chitosan against the three bacteria tested. The addition of NPs-ZnO in polymers is capable of producing antimicrobial surfaces and therefore has the potential to be used as antimicrobial active food packaging.

Keywords: Antibacterial films. Cold plasma. ZnO nanoparticles. Pathogenic bacteria. Spoilage bacteria.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática das estruturas da cadeia polimérica do (a) PEAD, (b) PEBD e (c) PELBD. | 30 |
| Figura 2. Representação esquemática da estrutura molecular da (a) amilose e (b) amilopectina. | 32 |
| Figura 3. Representação do processo de desacetilação da quitina, para a produção de quitosana. | 34 |
| Figura 4. Representação esquemática para os complexos formados entre quitosana e Zn^{2+} (a) modelo pendente e (b) modelo em ponte. | 38 |
| Figura 5. Forma de onda típica da tensão e da corrente em função d tempo de um reator DBD. | 40 |
| Figura 6. Regimes de operação do plasma DBD: (a) regime difuso, e (b) regime filamentar. | 41 |
| Figura 7. Modificações causadas pelas espécies reativas do plasma sobre a superfície polimérica. | 42 |
| Figura 8. Deposição de água com azul de metileno sobre uma placa de Petri de poliestireno (a) sem aplicação de plasma e (b) após aplicação de plasma. | 42 |
| Figura 9. Desenho do reator de plasma DBD. | 47 |
| Figura 10. Foto do painel de exibição da fonte de alta tensão pulsada. | 47 |
| Figura 11. Foto do aparato experimental de plasma DBD. | 48 |
| Figura 12. (a) Folha de Mylar e molde de Mylar (10x15 cm). Esquema de disposição molde de Mylar e pellets para obtenção dos filmes de PELBD: (b) Visão lateral; (c) Visão superior. | 51 |
| Figura 13. Fluxograma de produção de filmes de PELBD com aspersão de NPs-ZnO. | 52 |
| Figura 14. Foto do borrifador utilizado no procedimento de aspersão das NPs-ZnO nos filmes de PELBD. | 53 |
| Figura 15. Fluxograma de produção de filmes multicamadas de PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO. | 54 |
| Figura 16. Fluxograma de produção de filmes multicamadas de PELBD/Am e PELBD/Am(NPs-ZnO). | 55 |
| Figura 17. Representação esquemática do teste de diluição em caldo. | 61 |
| Figura 18. Representação esquemática da NORMA JIS Z 2801:2000. | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Faixas de frequência de geração de plasma frio nas tensões máximas (V_{max}) alcançadas pela fonte de alta tensão, 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior em diferentes pressões absolutas: (+) pressão atmosférica; (■) 0,87 atm; (◆) 0,74 atm; (▲) 0,61 atm; (x) 0,47 atm; (*) 0,34 atm e (●) 0,21 atm. | 65 |
| Figura 20. Faixas de tensão com a presença de plasma na frequência mínima (f_{min}) de 30 Hz, 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior e em diferentes pressões absolutas | 66 |
| Figura 21. Foto do plasma gerado a 32 kV, 132 Hz, pressão atmosférica, ar atmosférico como gás ionizante e 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior. | 67 |
| Figura 22. Fotos de uma gota de água sobre a superfície de PELBD: a) não tratado; e tratados com plasma DBD por b) 30 s; c) 60 s; d) 120 s; e) 180 s. | 68 |
| Figura 23. Média do ângulo de contato dos filmes armazenados em função dos tempos de tratamento: (○) PELBD sem tratamento; (◇) dia 0; (x) dia 5; (Δ) dia 10; (□) dia 20 e (*) dia 30. | 71 |
| Figura 24. Imagens dos filmes de PELBD obtidas por microscopia eletrônica: não tratado na ampliação de (a) 500x e (b)25000x; e tratado com plasma por 120 s na ampliação de (c) 500x e (d)25000x..... | 73 |
| Figura 25. Difratoograma das NPs-ZnO. | 74 |
| Figura 26. Imagem das NPs-ZnO. | 75 |
| Figura 27. Histograma de distribuição de tamanho de (a) diâmetro e (b) comprimento das NPs-ZnO..... | 76 |
| Figura 28. Fotografias dos filmes: (a) PELBD puro; (b) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO); (c) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO); (d) PELBD/QTS; (e) PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO); (f) PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO); (g) PELBD/Am; (h) PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) e PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO)..... | 77 |
| Figura 29. Fotografia do filme de PELBD tratado com plasma frio com posterior aspersão de NPs-ZnO..... | 78 |
| Figura 30. Imagens dos filmes de PELBD obtidas por microscopia eletrônica: aspersão de 0,9 mg/cm ² NPs-ZnO na ampliação de (a) 500x e (b) 25000x e aspersão de 1,5 mg/cm ² NPs-ZnO na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x..... | 81 |
| Figura 31. Imagens dos filmes de PELBD/QTS obtidas por microscopia eletrônica na ampliação de (a) 500x e (b) 25000x; PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x e PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) na ampliação de (e) 500x e (f) 25000..... | 82 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32. Imagens dos filmes de PELBD/Am obtidas por microscopia eletrônica na ampliação de (a) 500x e (b)25000x; PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x e PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) na ampliação de (e) 500x e (f) 25000..... | 83 |
| Figura 33. Média dos dados experimentais do crescimento microbiano de <i>L. sakei</i> na presença dos filmes: (o) PELBD puro; (□) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) e (Δ) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO). | 90 |
| Figura 34. Média dos dados experimentais do crescimento microbiano de <i>S. aureus</i> na presença dos filmes: (o) PELBD puro; (□) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) e (Δ) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO). | 91 |
| Figura 35. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>L. sakei</i> na presença dos filmes: (◊◆) PELBD puro; (□■) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO). | 92 |
| Figura 36. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>L. sakei</i> na presença dos filmes multicamadas com quitosana. (◊◆) PELBD puro; (Δ▲) PELBD/QTS; (□■) PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO)..... | 92 |
| Figura 37. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>L. sakei</i> na presença dos filmes multicamadas com amido. (◊◆) PELBD puro; (Δ▲) PELBD/Am; (□■) PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO)..... | 92 |
| Figura 38. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>S. aureus</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. (◊◆) PELBD puro; (□■) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO)..... | 95 |
| Figura 39. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>S. aureus</i> na presença dos filmes multicamadas com quitosana. (◊◆) PELBD puro; (Δ▲) PELBD/QTS; (□■) PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO)..... | 97 |
| Figura 40. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>S. aureus</i> na presença dos filmes multicamadas com amido. (◊◆) PELBD puro; (Δ▲) PELBD/Am; (□■) PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO)..... | 97 |
| Figura 41. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de <i>S. Enteritidis</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. (◊◆) PELBD puro; (□■) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO). | 101 |

Figura 42. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. Enteritidis* na presença dos filmes multicamadas com quitosana. (◊◆) PELBD puro; (▲▲) PELBD/QTS; (□■) PELBD/QTS (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO)..... 101

Figura 43. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. Enteritidis* na presença dos filmes multicamadas com amido. (◊◆) PELBD puro; (▲▲) PELBD/Am; (□■) PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO)..... 103

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Características mecânicas de filmes de polietileno linear de baixa densidade (PELBD) e polietileno de baixa densidade (PEBD)..... | 30 |
| Tabela 2. Parâmetros fixados e faixas de operação nas quais se observou formação do plasma frio..... | 49 |
| Tabela 3. Dimensões utilizadas para a determinação da resistência à tração: altura (a), largura (l) em mm e espessura em μm para cada filme obtido..... | 58 |
| Tabela 4. Média das medidas do ângulo de contato em água e energia livre de superfície total (γ) e seus componentes: polar (γ^p) e dispersivo (γ^d) com seus respectivos desvios padrão. ... | 68 |
| Tabela 5. Média e desvio padrão da opacidade dos filmes de PELBD (não tratado) e PELBD tratado com plasma por diferentes intervalos de tempo..... | 70 |
| Tabela 6. Média das medidas dos parâmetros de cor e opacidade dos filmes de PELBD puro e com adição de NPs-ZnO com seus respectivos desvios padrão. | 80 |
| Tabela 7. Resultados de EDS e seus respectivos desvios padrão para os filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO, PELBD/Am e PELBD/Am com NPs-ZnO. | 85 |
| Tabela 8. Média e desvio padrão dos ângulos de contato com água dos filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e, PELBD/Am com e sem NPs-ZnO com NPs-ZnO. | 86 |
| Tabela 9. Medidas de energia livre de superfície total (γ) e seus componentes: polar (γ^p) e dispersivo (γ^d) para os filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO, PELBD/Am e PELBD/Am com NPs-ZnO..... | 87 |
| Tabela 10. Média e desvio padrão de espessura, tensão máxima no <i>yield point</i> , tensão de ruptura e alongamento para os filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO, PELBD/Am e PELBD/Am com NPs-ZnO..... | 89 |
| Tabela 11. Ação antimicrobiana dos filmes frente <i>L. sakei</i> após 24 horas. | 93 |
| Tabela 12. Ação antimicrobiana dos filmes frente <i>S. aureus</i> após 24 horas..... | 98 |
| Tabela 13. Ação antimicrobiana dos filmes frente <i>S. Enteritidis</i> após 24 horas. | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag - Prata

Am - Amido

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAL - Bactérias ácido láticas

B. cereus - *Bacillus cereus*

BHI - Caldo infusão cérebro coração

CIM - Concentração inibitória mínima

CO₂ - Dióxido de carbono

DBD - Descarga com barreira dielétrica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DRX - Difração de raio X

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

E. coli - *Escherichia coli*

FEG - Microscopia de varredura de alta tensão

FDA - Food and Drug Administration

GD - Grau de desacetilação

GRAS - Geralmente reconhecido como seguro

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

JIS Z - Japanese Industrial Standart

L. sakei - *Lactobacillus sakei*

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRS - Man, Rogosa e Sharpe

NaOH - Hidróxido de Sódio

NH₂ - Amina

NPs - Nanopartículas

NPs-Ag - Nanopartículas de prata

NPs-ZnO - Nanopartículas de óxido de zinco

O₂ - Gás oxigênio

PCA - Ágar padrão de contagem

PE - Polietileno

PEAD - Polietileno de alta densidade

PEBD - Polietileno de baixa densidade

PELBD - Polietileno linear de baixa densidade

PELBD-AM - Polietileno linear de baixa densidade modificado com anidrido maleico

PEMD - Polietileno de média densidade

PET - Politereftalato

PMMA - Polimetilmetacrilico

PP - Polipropileno

PVC - Policloreto de vinila

QTS - Quitosana

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

S. Enteritidis - *Salmonella entérica* Enteritidis

S. Typhimurium - *Salmonella enterica* Typhimurium

UFC - Unidades formadoras de colônias

UV - Luz ultravioleta

ZnO - Óxido de zinco

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 20 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 20 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 20 |
| 2 | DESENVOLVIMENTO | 22 |
| 2.1 | EMBALAGENS ATIVAS | 22 |
| 2.2 | MICRO-ORGANISMOS VINCULADOS AOS ALIMENTOS..... | 23 |
| 2.2.1 | Micro-organismos deteriorantes | 24 |
| 2.2.2 | Micro-organismos patogênicos | 24 |
| 2.3 | AGENTES ANTIMICROBIANOS | 25 |
| 2.3.1 | Nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) | 26 |
| 2.4 | PRINCIPAIS POLÍMEROS UTILIZADOS NAS EMBALAGENS DE ALIMENTOS..... | 28 |
| 2.4.1 | Polietileno | 29 |
| 2.4.1.1 | Polietileno Linear de Baixa Densidade (PELBD)..... | 30 |
| 2.5 | POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS E BIOPOLÍMEROS | 31 |
| 2.5.1 | Filmes de amido | 32 |
| 2.5.2 | Filmes de quitosana | 33 |
| 2.5.2.1 | Atividade antibacteriana da quitosana..... | 35 |
| 2.5.2.2 | Ação quelante do zinco em quitosana | 37 |
| 2.6 | TECNOLOGIA DE PLASMA FRIO PARA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE POLÍMEROS | 38 |
| 2.6.1 | Plasma frio a partir de um reator de descarga com barreira dielétrica (DBD) . | 39 |
| 2.7 | CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE | 43 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 3.1 | MATERIAL..... | 46 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.1.1 | Matérias-primas e reagentes utilizados para a obtenção dos filmes..... | 46 |
| 3.2 | DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DE PLASMA FRIO | 46 |
| 3.3 | OBTENÇÃO DOS FILMES | 49 |
| 3.3.1 | Filmes de PELBD | 50 |
| 3.3.2 | Filmes de PELBD com aspersão de NPs-ZnO..... | 51 |
| 3.3.3 | Filmes multicamadas de PELBD/QTS com NPs-ZnO..... | 53 |
| 3.3.4 | Filmes de PELBD/Am com NPs-ZnO..... | 54 |
| 3.4 | CARACTERIZAÇÃO DAS NPs-ZnO | 55 |
| 3.5 | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES | 56 |
| 3.5.1 | Molhabilidade e energia de superfície | 56 |
| 3.5.2 | Ensaio de tração | 57 |
| 3.5.3 | Análise de cor e opacidade dos filmes..... | 58 |
| 3.5.4 | Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG) com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)..... | 59 |
| 3.5.5 | Análise estatística | 59 |
| 3.6 | ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... | 60 |
| 3.6.1 | Micro-organismos..... | 60 |
| 3.6.2 | Meios de cultura | 60 |
| 3.6.3 | Teste de diluição em caldo..... | 60 |
| 3.6.4 | Teste antimicrobiano em superfície (NORMA JIS Z 2801:2000)..... | 62 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 4.1 | ESTUDO DO PLASMA | 64 |
| 4.1.1 | Determinação de parâmetros capazes de gerar o plasma frio | 64 |
| 4.1.2 | Análise das alterações causadas nos filmes de PELBD tratados com plasma frio | 67 |
| 4.1.2.1 | Estudo da reversibilidade do efeito do plasma frio | 71 |
| 4.1.2.2 | Alterações na superfície dos filmes PELBD tratados com plasma | 73 |

| | | |
|---------|---|------------|
| 4.2 | CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO | 74 |
| 4.3 | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES | 76 |
| 4.3.1 | Aspectos visuais, análise de cor e opacidade | 76 |
| 4.3.2 | Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG) com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)..... | 81 |
| 4.3.3 | Ângulo de contato e energia livre de superfície..... | 85 |
| 4.3.4 | Resistência à tração | 88 |
| 4.4 | ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... | 89 |
| 4.4.1 | Teste de diluição em caldo para os filmes de PELBD com NPs-ZnO..... | 89 |
| 4.4.2 | Teste antimicrobiano de acordo com a NORMA JIS Z 2801:2000 | 91 |
| 4.4.2.1 | Ação antimicrobiana dos filmes contendo NPs-ZnO frente <i>L. sakei</i> | 91 |
| 4.4.2.2 | Ação antimicrobiana dos filmes contendo NPs-ZnO frente <i>S. aureus</i> | 95 |
| 4.4.2.3 | Ação antimicrobiana dos filmes contendo NPs-ZnO frente <i>S. Enteritidis</i> | 100 |
| 5 | CONCLUSÃO | 105 |
| | REFERÊNCIAS | 107 |
| | ANEXO A – Especificação técnica dos pellets | 126 |

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), as perdas e desperdícios de alimentos causam impactos éticos, econômicos e ambientais. Enquanto 8,21 milhões de pessoas no mundo se encontram em estado de insegurança alimentar, 1/3 dos alimentos produzidos mundialmente são desperdiçados diariamente. No quesito ambiental, a emissão de gases a partir alimentos desperdiçados é igual à poluição por dióxido de carbono gerado pelo setor automotivo mundial (FAO, 2018).

Neste sentido, o desenvolvimento de embalagens capazes de garantir a proteção do produto e aumentar a sua vida útil tem um papel importante na redução destas perdas. As embalagens ativas vêm se destacando com o conceito de incorporar componentes capazes de prolongar a vida útil dos alimentos através da liberação ou absorção de substâncias (ABRE, 2015).

Entre as embalagens ativas, as antimicrobianas são capazes de aumentar a vida útil dos alimentos com a inibição ou eliminação de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (HAN, 2003). Entre os agentes antimicrobianos usados em embalagens, as nanopartículas metálicas apresentam um papel de destaque pelas propriedades singulares que assumem devido ao seu tamanho reduzido, sendo capazes de desestabilizar a membrana externa e penetrar nas células danificando-as por meio do estresse oxidativo (HAN, 2000; BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007). Dentre as nanopartículas metálicas que vem sendo utilizadas como agentes antimicrobianos, evidenciam-se as nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) por serem atóxicas, sendo que o zinco possui uma ingestão diária recomendada de 7 mg/dia. As propriedades das NPs-ZnO dependem de suas características de tamanho e forma, uma vez que as partículas menores, com maior área superficial, apresentam maior atividade antimicrobiana (JONES et al., 2008; ESPITIA et al., 2012). Entretanto, a elevada polaridade das NPs-ZnO resulta em seu caráter superficial hidrofílico e na tendência à aglomeração. Logo, a incorporação destas NPs em polímeros convencionalmente utilizados para fabricação de embalagens de alimentos, como o polietileno linear de baixa densidade (PELBD), é um grande desafio.

O uso de PELBD em embalagens de alimentos se deve as suas boas propriedades mecânicas, de barreira, baixo custo e por ser atóxico (COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003; BARÃO, 2011). Contudo, este material tem limitações quanto à adesão a

outras superfícies, resultado da baixa energia superficial e do seu caráter hidrofóbico. Essas propriedades podem ser melhoradas através de tratamentos superficiais como aplicação de plasma (SILVEIRA, 2012). O plasma frio interage com a superfície polimérica quebrando as ligações covalentes e causando mudanças na molhabilidade e energia livre de superfície que melhoram as propriedades de adesão e possibilitam a compatibilização com outros polímeros (SHIN et al., 2002; VIDAURRE CASTRO, et al., 2002).

O plasma é capaz de compatibilizar polímeros sintéticos com biopolímeros como o amido (Am) e a quitosana (QTS) são promissores para a incorporação de NPs-ZnO por serem hidrofílicos e biodegradáveis. Além disso, esses dois biopolímeros apresentam excelente barreira ao oxigênio e aromas. Entretanto, têm aplicabilidade limitada devido à baixa resistência mecânica e justamente, por sua afinidade com a água (BUTLER et al., 2006; CARVALHO; GROSSO, 2006; ELSABEE; ABDOL, 2013).

De um modo geral, através da combinação de diferentes polímeros em filmes multicamadas, busca-se agregar as propriedades desejadas de cada polímero e contornar as limitações dos mesmos (MARTINS, 2015). Adicionalmente, ao se utilizar uma camada biodegradável, pode-se reduzir a quantidade de resíduos plásticos sintéticos depositados no meio ambiente e ainda, facilitar o processo de reciclagem (SHIN et al., 2002).

Neste sentido, este trabalho visa desenvolver uma superfície de PELBD com atividade antibacteriana através da incorporação de NPs-ZnO. A fixação destas nanopartículas à matriz polimérica será avaliada através da aspersão da suspensão aquosa no PELBD parcialmente fundido e através da incorporação desta NPs em biopolímeros (amido ou quitosana) em filmes multicamadas. Estes filmes multicamadas serão obtidos a partir de uma camada base de PELBD, o qual passará por tratamento com plasma frio em ar atmosférico para aumentar a energia de superfície e diminuir a hidrofobicidade desse polímero e assim promover a adesão dos biopolímeros.

O plasma frio tem sido amplamente estudado por apresentar vantagens como modificação superficial em curto tempo de exposição, não produzir resíduos em relação a modificação promovida por agentes químicos, é possível promover a adesão entre superfícies utilizando o ar como gás ionizante à pressão atmosférica, facilitando o controle do processo e reduzindo os custos.

O estudo da compatibilização entre polímeros sintéticos como o PELBD e biopolímeros é importante para reduzir o uso e os danos que os primeiros causam ao meio

ambiente. Para isso, dois biopolímeros serão avaliados, o amido que é barato e mais hidrofílico e a quitosana com maior custo, porém, é menos hidrofílica que o amido, e ainda, possui a vantagem de apresentar atividade antibacteriana. O estudo do processo de obtenção destes filmes ativos à base de PELBD com a incorporação das NPs-ZnO por diferentes rotas, bem como, o efeito antibacteriano dos mesmos é importante para o aumento da vida útil de alimentos e, conseqüentemente, reduzir as perdas e desperdícios dos mesmos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar filmes antibacterianos de PELBD incorporados com nanopartículas de ZnO (NPs-ZnO) e revestidos com biopolímero (amido ou quitosana) empregando as técnicas de aspersão com a fusão parcial e de plasma frio de ar atmosférico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Incorporar com NPs-ZnO filmes de PELBD utilizando o processo de aspersão da suspensão aquosa e de fusão parcial do polímero;
- Montar o reator de plasma frio de barreira dielétrica (DBD) e definir os parâmetros de operação para gerar plasma de ar atmosférico (tensão, frequência, distância do eletrodo ao dielétrico e pressão);
- Modificar a superfície dos filmes de PELBD utilizando plasma frio DBD e avaliar a influência do tempo de tratamento de plasma, bem como a reversibilidade do tratamento sobre a superfície polimérica;
- Utilizar os filmes de PELBD com a superfície modificada pelo tratamento de plasma frio DBD e compatibilizar um biopolímero biodegradável (quitosana ou amido) contendo as NPs-ZnO para obter filmes multicamadas;
- Caracterizar os filmes de PELBD incorporados com NPs-ZnO por aspersão e os filmes multicamadas quanto à molhabilidade, energia de superfície, resistência à tração, cor, opacidade e morfologia de superfície;

- Avaliar as propriedades antibacterianas dos filmes obtidos frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus sakei* e Gram-negativa *Salmonella* Enteritidis.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 EMBALAGENS ATIVAS

Atualmente, tem-se feito uma ampla relação entre embalagem e sustentabilidade, onde o desenvolvimento da embalagem, bem como, suas interações ao longo do ciclo de vida do produto podem minimizar impactos ambientais do sistema embalagem-produto. Desta forma, um projeto capaz de otimizar a embalagem garantindo a proteção necessária ao produto, prolongando ao máximo sua vida útil com a utilização mínima de material, é capaz de reduzir significativamente as perdas e colaborar para a sustentabilidade (KARASKI et al., 2016).

Neste sentido, as embalagens ativas vêm se destacando com o conceito de incorporar componentes capazes de prolongar a vida útil dos alimentos através da liberação ou absorção de substâncias. Os componentes absorvedores removem compostos indesejáveis (excesso de água, oxigênio, dióxido de carbono, etanol). Enquanto os componentes liberadores emitem ao produto ou ao espaço livre, substâncias como antimicrobianos e antioxidantes; ambos com a finalidade de retardar a deterioração dos alimentos (BRAGA; PERES, 2010; ABRE, 2015).

Para uma embalagem ser considerada ativa, ela deve exercer funções adicionais ao alimento, além da barreira inerte a influências externas. Estas embalagens interagem com o alimento para melhorar sua qualidade, vida útil, segurança ou propriedades sensoriais e em alguns casos respondem às mudanças que acontecem no produto (LABUZA; BREENE, 1989; GONTARD, 1997; AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000).

Dentre as embalagens ativas, as antimicrobianas são promissoras para aumentar ou manter a qualidade microbiológica dos alimentos através da inibição (efeito bacteriostático) ou eliminação (efeito bactericida) de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos sem afetar seu hospedeiro ou consumidor (HAN, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Inicialmente, os agentes ativos, como os antimicrobianos eram incorporados às embalagens na forma de sachê, os quais tendem a gerar uma percepção negativa por parte dos consumidores devido à presença de um elemento não comestível junto ao produto. Portanto, a atual tendência está na incorporação destes agentes na matriz polimérica da embalagem (PEREIRA DE ABREU; CRUZ; LOSADA; 2012). Uma vez incorporados, os agentes antimicrobianos podem permanecer imobilizados e atuar somente na superfície do produto ou

pode ocorrer a liberação dos mesmos para o alimento (HAN, 2005). Os processos de incorporação podem acontecer pela modificação e revestimento da superfície polimérica, deposição física de vapor, deposição por plasma, processos químicos, processos térmicos como fusão e extrusão (AN et al., 2000).

Geralmente, os antimicrobianos são incorporados ou revestidos nas camadas dos polímeros, onde alguns grupos funcionais dos compostos são anexados à cadeia polimérica. Ou ainda, são imobilizados na estrutura da embalagem. Assim, a ação antimicrobiana ocorre através do contato direto entre a embalagem e a superfície do alimento (HAN, 2000).

Diversos fatores influenciam no desenvolvimento de uma embalagem antimicrobiana, como: as características do composto antimicrobiano e do alimento, condições de estocagem, método de preparo do filme, interação entre antimicrobiano e polímero e tipo do polímero utilizado (CHA et al., 2004).

2.2 MICRO-ORGANISMOS VINCULADOS AOS ALIMENTOS

As bactérias são classificadas de acordo com a estrutura de sua parede celular em Gram-positivas e Gram-negativas. As primeiras apresentam uma estrutura espessa, formada por várias camadas de peptídeoglicanos e ácidos teicóicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010; TALARO; CHESS, 2015). Enquanto que, as Gram-negativas possuem uma parede com poucas camadas de peptídeoglicanos, mas possuem uma camada externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, fosfolipídeos e, não possuem os ácidos teicóicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

As bactérias também podem ser classificadas quanto à sua toxicidade em micro-organismos deteriorantes e patogênicos. As bactérias deteriorantes são responsáveis pela alteração da vida útil dos alimentos causando modificações sensoriais nos produtos, alterando o sabor, cheiro, textura e cor, sendo responsáveis pela cor verde e secreção viscosa encontrada geralmente em produtos cárneos (IULIETTO et al., 2015).

Os micro-organismos patogênicos não costumam causar alterações sensoriais, mas causam danos à saúde que vão de um simples mal estar, náuseas, dores de cabeça, diarreia e até paralisias respiratórias, cardíacas ou cerebrais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.2.1 Micro-organismos deteriorantes

O desperdício de alimentos está associado a danos físicos, danos por reações químicas e danos biológicos como o crescimento microbiano (GRAM et al. 2002; RAY; BHUNIA, 2013). As bactérias ácido lácticas (BAL), conhecidas por causarem a deterioração dos alimentos, estão presentes em pequenas quantidades na maioria dos alimentos como carnes e derivados, leite e derivados, vegetais entre outros (DALCANTON et al., 2013; MANIOS; LAMBERT; SKANDAMIS, 2014; IULIETTO et al., 2015).

As BAL são consideradas micro-organismos seguros (GRAS) (OGIER et al., 2008); e muitas vezes são usadas em condições específicas para inibir micro-organismos patogênicos através da competição pelo substrato, ou ainda, pela produção de bacteriocinas (ZHANG; HOLLEY, 1999; KRÖCKEL, 2013). Como é o caso das BAL usadas para inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Campylobacter jejuni* e *Clostridium estertheticum* (AMMOR et al., 2006; JONES et al., 2008; TAMANINI et al., 2012). Outra possibilidade é o uso dos efeitos combinados de BAL e agentes antimicrobianos ou outras barreiras, como pH e temperatura (LEISTNER, 2000).

Apesar de seus benefícios, as BAL são os principais deteriorantes de alimentos; em produtos cárneos, a espécie *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*) se destaca. Este micro-organismo é Gram-positivo (característica das BAL) heterofermentativo, ou seja, produz uma quantidade significativa de catabólitos indesejáveis (CO₂, etanol, ácido acético, ácido butanóico) além do ácido láctico produzido pelos homofermentativos (KROCKEL, 2013; BATT; TORTORELLO, 2014; IULIETTO et al., 2015).

2.2.2 Micro-organismos patogênicos

Entre as bactérias Gram-positivas e patogênicas, encontra-se a espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a qual é comumente encontrada na microbiota local da pele e do trato respiratório superior. Estas bactérias produzem enterotoxinas que são resistentes às enzimas proteolíticas gástricas e jejunais, passando intactas pelo sistema digestivo. Por isso estão associadas às intoxicações alimentares (JAY, 2005; SANTOS et al., 2007).

As bactérias *S. aureus* são bactérias aeróbicas, com coagulase positiva, mesófilas com temperatura ótima de crescimento a 36 °C, o pH ótimo de crescimento está entre 6 e 7, podendo se desenvolver na faixa de 4-10 (TRABULSI et al., 1999; JAY, 2005; ASPERGER; ZANGERL, 2011; MARTIN; LINA; DUMITRESCU, 2014).

Os alimentos que mais estão associados às intoxicações estafilocócicas são leite e derivados, carnes e derivados, produtos a base de ovos e demais alimentos com ampla manipulação humana, sendo associados a condições de higiene precária (MEDVEĎOVÁ et al., 2009; OLIVEIRA, 2013).

A *Salmonella* é um bastonete Gram-negativo, mesófilo, aeróbio facultativo, com pH ótimo de desenvolvimento de 7,0-7,5 e atividade de água acima de 0,94 (BRASIL, 2011). A *Salmonella entérica*, subespécie *entérica*, sorotipo Enteritidis, conhecida apenas como *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) representa 39,5% de todos os sorovares relatados em casos de infecção humana, enquanto que *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) corresponde a 20,2% (EFSA, 2015). A *S. Enteritidis* corresponde ainda, a 99% das salmoneloses humanas (MENDONÇA, 2016).

Em 2017, a *Salmonella* foi identificada como o segundo agente etiológico responsável por surtos com 14,6% a partir da ingestão de alimentos contaminados (BRASIL, 2019). O *habitat* natural desta bactéria é o trato intestinal de humanos e animais e por isso está associada ao consumo de alimentos como ovos, carnes de aves, leite. A *Salmonella entérica* é eliminada nas fezes, contaminando o solo, água e por consequência os alimentos. Sua sobrevivência no meio ambiente pode ser muito longa, em particular na matéria orgânica (BRASIL, 2011).

2.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Agentes antimicrobianos são considerados substâncias utilizadas nos alimentos como meio de preservação dos produtos, estendendo a sua vida útil e garantindo a segurança do consumidor (DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2005).

Os agentes antimicrobianos podem inibir ou eliminar o crescimento de microorganismos. Eles possuem origem natural (microbiana, animal, vegetal) ou química (agentes orgânicos e inorgânicos) (HAN, 2005). Entre os agentes naturais de origem bacteriana estão a nisina, pediocina e reuterina; entre os agentes de origem animal, a quitosana, a lactoferrina, a

lisozima e, entre os de origem vegetal, os óleos essenciais têm sido amplamente estudados devido à presença de compostos fenólicos (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011; SOUZA et al., 2013).

Entre os agentes antimicrobianos orgânicos, de origem química, encontram-se os sorbatos, nitrito e nitrato de sódio e ácido sórbico; já entre os inorgânicos, as nanopartículas metálicas apresentam papel de destaque (HAN, 2000). Pode-se considerar como nanopartículas uma coleção de partículas com pelo menos uma dimensão menor que 1 μm (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Esses compostos que apresentam dimensões nanométricas e podem ser obtidos de diversas maneiras, vem sendo o foco de muitas pesquisas (AZEREDO, 2013). O tamanho reduzido destas partículas e conseqüente elevada área superficial confere propriedades singulares como penetrar barreiras fisiológicas e danificar organismos vivos (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

2.3.1 Nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO)

O óxido de zinco (ZnO) é um antimicrobiano inorgânico de origem química considerado como substância GRAS (geralmente reconhecida como segura) pela U.S. *Food and Drug Administration* (FDA, 2016) e a ingestão diária de zinco recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária é de 7 mg/dia para adultos (BRASIL, 2005).

As características, tais como o tamanho e forma das NPs-ZnO, dependem das variáveis de síntese, como solvente utilizado, pH, temperatura de reação (ESPITIA et al., 2012). As partículas menores, ou seja, com uma área superficial maior, apresentam maior atividade antimicrobiana em bactérias e fungos (JONES et al., 2008; ESKANDARI et al., 2011). Isso ocorre porque uma área de superfície maior resulta em uma maior reatividade do ZnO, gerando maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) (OHIRA et al., 2008).

Lepot et al. (2011) avaliaram a qualidade de dispersão de NPs-ZnO incorporadas em polipropileno orientado e observaram que as NPs esféricas apresentam maior tendência de aglomeração em relação aos bastões do mesmo diâmetro. Conseqüentemente, as NPs-ZnO aglomeradas diminuem a sua área superficial e por isso, diminuem o seu efeito antimicrobiano.

Portanto, fatores além do tamanho das partículas, devem ser considerados e podem influenciar no efeito contra micro-organismos. Adams, et al. (2006) enfatizaram que a toxicidade contra bactérias específicas, a intensidade/sensibilidade de luz e a concentração de micro-organismos também apresentam influência na ação antimicrobiana (ADAMS; LYON; ALVAREZ, 2006).

Diversos estudos apontam as espécies reativas de oxigênio (ROS) como o principal mecanismo responsável pela atividade antibacteriana do óxido de zinco. Como espécies reativas, têm-se superóxido (O_2^-), hidróxido (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies provocam o estresse oxidativo da membrana resultando na entrada de H_2O_2 para o citoplasma das bactérias apresentando toxicidade às proteínas, lipídios e inibindo a síntese de DNA e por fim impedindo o crescimento bacteriano ou provocando a sua morte (SAWAI, 1996; OBERDÖRSTER; STONE; DONALDSON, 2005; ADAMS; LYON; ALVAREZ, 2006; ZHANG et al., 2009; XIA et al., 2008; GORDON et al., 2011).

Os mecanismos exatos de inibição de bactérias ainda são muito discutidos e não totalmente esclarecidos, porém a discussão obrigatoriamente aborda a estrutura e composição da parede celular. (KUMAR et al., 2017). As bactérias gram-negativas apresentam características estruturais que permitem maior resistência a peroxidação lipídica na presença de espécies ROS (KLODZINSKA et al., 2010; JAIN; BHARGAVA; PODDAR, 2013).

Em relação as bactérias Gram-positivas, a camada espessa de peptídeoglicanos, aprisiona maior quantidade de NPs-ZnO em comparação com às Gram-negativas em que essa camada é mais fina. Logo, quanto mais NPs-ZnO aprisionadas, mais espécies ROS são geradas (TAYEL, et al., 2011; AAL et al., 2015), acarretando em maior ação antimicrobiana. (TAM, et al.; 2008; KIM; AN, 2012; KUMAR et al., 2017).

Porém, alguns estudos detectaram maior efeito antibacteriano do ZnO nas bactérias Gram-Negativas em relação às Gram-Positivas (BANOEE et al., 2005; WANG et al., 2007; TAWALE et al., 2010). A camada de peptídeoglicanos mais espessa nas Gram-Positivas dificultaria a entrada das NPs-ZnO ou espécies reativas nessas bactérias (TAWALE et al., 2010).

Tayel et al. (2011) compararam o efeito antimicrobiano de ZnO em pó com tamanho médio de 5 μ m e NPs-ZnO com tamanho médio de 50 nm. Os pesquisadores determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) dessas partículas para bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*S. Enteritidis*, *S. Tiphymurium*, *P. aeruginosa*, *P.*

fluorescens e *E. coli*) e para todas elas encontraram menores valores de CIM para as nanopartículas. Neste estudo, observaram maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas ao ZnO, com valores de CIM de 0,57 e 0,81 mg/mL para *B. cereus* e *S. aureus*, respectivamente. Enquanto que para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* foi de 1,62 e 1,78 mg/mL e concentrações ainda maiores, de 2,10 e 1,94 mg/mL foram necessárias para inibir *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, respectivamente.

Souza (2015) avaliou a atividade antibacteriana de filmes de PELBD e PELBD modificado com anidrido maleico (PELBD-AM) incorporados com NPs-ZnO por aspersão e extrusão frente bactérias patogênicas. As concentrações investigadas foram de 0,5 até 10% de NPs-ZnO em relação aos filmes. Os filmes obtidos por aspersão apresentaram efeito bacteriostático para *S. aureus*. Com a *S. Typhimurium* observaram um efeito bactericida e bacteriostático para os filmes com 10% de Nps-ZnO de PELBD-AM e PELBD, respectivamente. Já para os filmes extrusados, não foi observado nenhum efeito antimicrobiano, possivelmente pelas NPs-ZnO se encontrarem aprisionadas no interior da matriz polimérica.

Emamifar et al. (2011) avaliaram o efeito antibacteriano de embalagens extrusadas de PELBD com 1,5 e 5% de nanocompósitos de prata (NPs-Ag) contendo dióxido de titânio e prata; e com 0,25 e 1% de NPs-ZnO na inativação da BAL *Lactobacillus plantarum* em suco de laranja sob refrigeração à 4 °C. As embalagens apresentaram efeito contra a bactéria, sendo que o polímero com as NPs-Ag apresentou efeito antibacteriano superior ao com NPs-ZnO. No entanto, a prata apresenta toxicidade e não é reconhecida como uma substância segura (GRAS) pelo FDA (1999).

Na literatura, encontram-se diversos trabalhos que investigam a atividade antagônica de *L. sakei* contra outras bactérias patogênicas. Porém, não foram encontrados trabalhos a respeito da inibição deste micro-organismo por meio de NPs-ZnO e de filmes com NPs-ZnO.

2.4 PRINCIPAIS POLÍMEROS UTILIZADOS NAS EMBALAGENS DE ALIMENTOS

No mercado, encontram-se diversos tipos de embalagens que atendem às diferentes necessidades dos produtos. De acordo com a Associação Brasileira de Embalagens (ABRE, 2015), as indústrias de embalagens tiveram um faturamento bruto de R\$ 71,5 bilhões no ano de 2017, o que representou um aumento de 5,1% em relação ao ano anterior. Entre as

embalagens, os plásticos correspondem a 38,85% do total no valor da produção. Sendo também o segmento que mais emprega, totalizando 115.558 empregos formais, o que corresponde a 52,97% dos postos de trabalho no setor. A indústria de plásticos ainda assume o *ranking* nas exportações com 57,80% do total de embalagens exportadas.

Os polímeros são compostos químicos obtidos a partir de ligações covalentes de pequenas unidades, os monômeros (MANO; MENDES, 2004). Os polímeros podem ser classificados de acordo com a sua origem em naturais, artificiais ou sintéticos. Os primeiros são encontrados na natureza como celulose, borracha, amido, quitina. Os segundos são os naturais modificados por reações químicas como o acetato de celulose e quitosana. E por último, os que são sintetizados por meio de reações químicas como o polietileno (CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

2.4.1 Polietileno

O polietileno é um dos polímeros mais usado pela indústria e mais estudado (CAMILO, 2011). É um polímero semicristalino, termoplástico de estrutura básica $(-CH_2-)_n$, com ramificações ou cadeias laterais. Tanto a quantidade de ramificações como o comprimento destas cadeias laterais influenciam diretamente nas características do material, visto que, são obstáculos na formação de cristais. Quanto maior o grau de ramificações das cadeias poliméricas, menor a cristalinidade, logo, menor a densidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002; COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003).

Esta organização das cadeias e a densidade levam a classificação deste polímero em: polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de média densidade (PEMD), polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno linear de baixa densidade (PELBD). O PEAD apresenta 80% de cristalinidade, o PEBD apresenta 50%. Isso porque, a presença de ramificações grandes no PEBD dificulta a formação de cristais, resultando em um polímero menos cristalino e com cristalitos de menor perfeição (Figura 1) (PEACOCK, 2000; CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

Figura 1. Representação esquemática das estruturas da cadeia polimérica do (a) PEAD, (b) PEBD e (c) PELBD.



Fonte: Peacock (2000).

2.4.1.1 Polietileno Linear de Baixa Densidade (PELBD)

O PELBD apresenta incorporadas em sua cadeia polimérica diferentes α -olefinas como 1-buteno, 1-hexeno ou 1-octeno. Este polímero possui propriedades intermediárias ao PEAD e PEBD, com ramificações aleatórias a cada 25 e 100 átomos de carbono. As ramificações diminuem a cristalinidade e a densidade em relação ao PEAD, apresentando uma densidade entre 0,90 e 0,94 g/cm³ (PEACOCK, 2000; SEYMOUR; CARRAHER, 2003).

O PELBD e o PEBD muitas vezes possuem as densidades semelhantes, porém as estruturas e as características poliméricas são distintas devido às diferenças nas ramificações, bem como as propriedades mecânicas (resistência à tração, tensão na ruptura, alongamento e resistência ao rasgamento), apresentadas na Tabela 1, e propriedades morfológicas. Desta forma, o comportamento mecânico superior do PELBD como a flexibilidade, boas propriedades ópticas e elevada capacidade de selagem a quente fazem com que as dificuldades de processamento em relação ao PEBD sejam superadas (COUTINHO, 2003). Além destas propriedades, o baixo custo e toxicidade, fazem com que os filmes de PELBD sejam amplamente utilizados como embalagens de alimentos para produtos cárneos, lácteos, de panificação e demais produtos alimentícios, principalmente os secos (COUTINHO, 2003; BARÃO, 2011).

Tabela 1. Características mecânicas de filmes de polietileno linear de baixa densidade (PELBD) e polietileno de baixa densidade (PEBD).

| Propriedade (MPa) | PELBD | PEBD |
|--|-------|------|
| Resistência à tração (ASTM D882) | 37 | 24 |
| Tensão na ruptura | 11 | 06 |
| Alongamento na ruptura | 630 | 90 |
| Resistência ao rasgamento (ASTM D1938) | 10,5 | 6 |

Fonte: Coutinho (2003).

Por se tratar de uma poliolefina, estas embalagens apresentam superfícies inertes e não porosas, causando problemas quanto a sua adesão e impressão. A baixa energia superficial aliada ao caráter hidrofóbico (ângulo de contato em torno de 100°) destes filmes prejudica a adesão de substâncias à sua superfície. Assim, tratamentos podem ser aplicados sobre o polímero visando melhorar a energia de superfície e a molhabilidade (SILVEIRA, 2012).

As embalagens com filmes multicamadas são comuns no mercado. A indústria vem combinando as propriedades mecânicas com as propriedades de barreira à umidade e gases de diferentes polímeros visando a obtenção de uma embalagem que atenda as necessidades de seus produtos. Porém, existe uma enorme dificuldade na reciclagem de filmes com multicamadas sintéticas, de tal modo que a indústria de alimentos tem considerado a utilização de biopolímeros na produção de filmes multicamadas (DOGUE et al., 1995; SHIN et al., 2002).

2.5 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS E BIOPOLÍMEROS

Os polímeros biodegradáveis são polímeros decompostos pela ação de micro-organismos aeróbios ou anaeróbios (SHAH et al., 2008); este processo pode levar semanas ou meses sob condições favoráveis (MOHANTY et al., 2005; BRIASSOULIS; PIKASI; HISKAKIS, 2019). Podem ter origem natural renovável (cana-de-açúcar, milho, celulose), ser sintetizados por bactérias (polihidroxibutirato), obtidos a partir de fonte animal (quitina, quitosana) (RAY et al., 2005; BELGACEM et al., 2008;) ou até mesmo ter origem em fontes fósseis (policaprolactonas, poliesteramidas) (AVÉROUS, 2008). Os filmes biodegradáveis também podem atuar como veículo de aditivos com o intuito de aumentar a vida útil dos alimentos (PRATES, 2010). Os biopolímeros são polímeros provenientes de fontes renováveis, são biodegradáveis, geralmente apresentam alta disponibilidade com baixo custo e são considerados seguros devido a sua origem. Podem ser utilizados na produção de embalagens plásticas para alimentos com curto prazo de vida útil, ou ainda, em filmes multicamadas, como modo de substituir parcialmente um percentual da embalagem sintética (THARANATHAN; KITTUR, 2003; LIN; ZHAO, 2007; BRANDELERO, BRANDELERO, DE ALMEIDA; 2016).

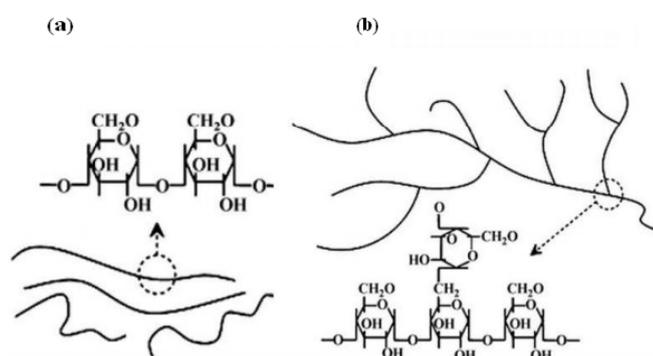
2.5.1 Filmes de amido

O amido é o segundo biopolímero mais abundante no meio ambiente, atrás apenas da celulose. Esse biopolímero é encontrado principalmente em grãos, cereais e raízes, como batata, mandioca, milho, aveia, arroz e trigo (AVÉROUS; HALLEY, 2009; ROCHA et al., 2014). O grânulo de amido é composto por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina; o primeiro possui formato helicoidal, solúvel e é composto por ligações α 1-4 D-glicose e o segundo possui ligações α 1-4 D-glicose e ligações α -1-6 D-glicose, é insolúvel e se apresenta na forma de cadeia ramificada (BOBBIO; BOBBIO, 1995). Estas estruturas estão apresentadas na Figura 2.

A proporção generalizada de amilose e amilopectina presentes no amido são, respectivamente, 20-30% e 70-80% (FENNEMA, 1996). A massa molar da amilopectina é cerca de 100 vezes maior que a da amilose, que é cerca de 10^6 g/mol. Assim, as ramificações e a maior massa molar da amilopectina, interferem nas ligações de hidrogênio reduzindo a molhabilidade das cadeias (HOOVER et al., 2010).

A amilose e as porções ramificadas da amilopectina são responsáveis pelas regiões amorfas do amido, enquanto as cadeias curtas da amilopectina são responsáveis pelas regiões cristalinas do grânulo. Estas características fazem com que a estrutura do amido seja considerada semicristalina, com cristalinidade de 20 a 45% (YU; CHEN, 2008).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura molecular da (a) amilose e (b) amilopectina.



Fonte: Liu et al. (2009).

A produção de filmes de amido se dá a partir do processo de gelatinização dos grânulos. Para isso é necessária a presença de água e calor. Neste processo, acontece inicialmente o inchaço granular, seguido da fusão da região cristalina com a formação de uma

fase polimérica contínua. As ligações de hidrogênio enfraquecem e possibilitam a permeação da água que hidrata a porção linear da amilopectina, ocorrendo a perda da birrefringência e a solubilização do amido (YU e CHEN, 2008).

Após a gelatinização, as moléculas de amilose tendem a se orientar paralelamente para formarem ligações de hidrogênio entre as hidroxilas de polímeros adjacentes, aumentando a cristalinidade e formando partículas insolúveis, fenômeno chamado de retrogradação. Assim, sendo o amido convertido do estado amorfo (gel) para o estado cristalino (CARLSTEDT et al., 2015).

O amido dá origem a filmes frágeis e quebradiços. Para contornar essas características, costuma-se adicionar plastificantes como compostos de baixa massa molar (glicerol e o sorbitol) que também são capazes de formar ligações de hidrogênio com o amido (CHUNG et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Estes plastificantes aumentam a flexibilidade dos filmes por reduzirem as interações entre as moléculas adjacentes (COUPLAND et al.; 2000).

Os filmes à base de amido possuem alta barreira aos gases dióxido de carbono (CO_2) e oxigênio (O_2). No entanto, devido ao seu caráter hidrofílico, apresentam alta permeabilidade ao vapor de água, dificultando sua aplicação como embalagem para determinados alimentos (CARVALHO; GROSSO, 2006). Uma maneira de melhorar as propriedades desse polímero biodegradável é através da combinação de polímeros, buscando agregar as propriedades desejadas de cada polímero (TANG, et al., 2003; MARTINS, 2015).

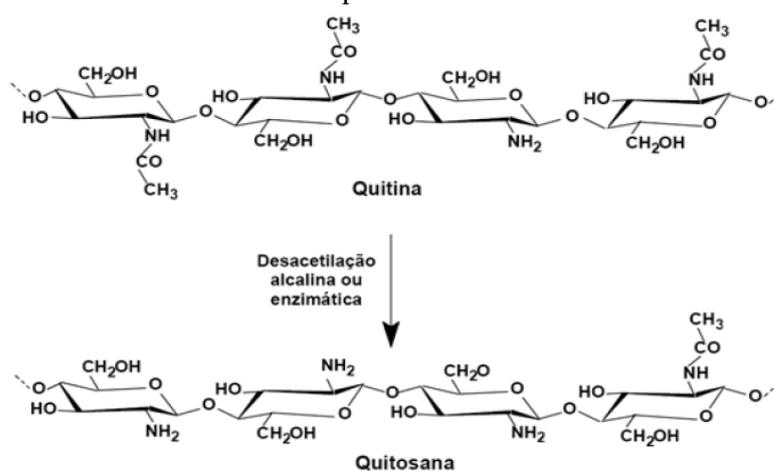
Os filmes de amido podem ser obtidos por *casting* que consiste na solução do componente polimérico em solvente com a posterior evaporação do mesmo. A solubilização consiste num processo físico, logo, não altera a estrutura química do polímero. Já o processo de evaporação pode causar notáveis mudanças na morfologia (GHOSH; PAL; RAY, 2013).

2.5.2 Filmes de quitosana

A quitosana é um biopolímero, geralmente produzido industrialmente pela desacetilação alcalina da quitina, por se tratar do método de obtenção de menor custo (THARANATHAN e KITTUR, 2003). Mas, ela pode ser produzida através de processos enzimáticos com alto custo e baixa produtividade (CAMPANA FILHO et al., 2007); ou ainda, pode ser encontrada em pequenas concentrações nos fungos do gênero *Mucor* (PETER, 1995; CAMPANA FILHO et al., 2007).

No processo de desacetilação alcalina, acontece a transformação parcial dos grupos acetamidos (NHCCH_3) característicos da quitina em grupos aminos (NH_2) característicos da quitosana, Figura 3. Esta amina primária reage facilmente e se faz responsável pela obtenção de novos compostos (CAMPANA FILHO, 2007; ALMEIDA, 2009).

Figura 3. Representação do processo de desacetilação da quitina, para a produção de quitosana.



Fonte: Oliveira Junior (2006).

A quitina e a quitosana são copolímeros de unidades β -(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e β -(1-4) 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopiranosose distribuídas aleatoriamente ou em blocos por toda a cadeia polimérica. O percentual dessas unidades ao longo da cadeia quitina/quitosana é denominado grau de acetilação (ALMEIDA, 2009). O grau médio de desacetilação define a porcentagem de unidades de 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopiranosose presentes na cadeia do polímero e pode variar de 40 a 98% (DODANE, VILIVALAM, 1998; TRINDADE NETO, 2008; HOLANDA, 2011).

As características da quitosana obtida dependem da razão quitina/solução alcalina, concentração dessa solução alcalina, temperatura, tempo, atmosfera de reação e tamanho das partículas de quitina (CAMPANA FILHO et al., 2007).

Quando o grau de desacetilação da quitosana é superior a 50% ela se torna solúvel em meio ácido, ocorrendo a protonação do grupo amino do carbono 2 da unidade de repetição da D-glicosamina. Quando dissolvida em meio ácido a quitosana possui alta carga positiva sobre os grupos $-\text{NH}_3^+$, isso faz com que ela consiga aderir às superfícies carregadas negativamente, agregando-se a compostos polianiônicos e quelando os íons de metais

pesados. Ambas as características, tanto de solubilidade em meios aquosos ácidos quanto agregação com poliânions conferem à quitosana propriedades específicas de biocompatibilidade e biodegradabilidade (COSTA JÚNIOR, 2008).

Assim como o grau de desacetilação, a massa molecular também é influenciada pelas condições de processamento da quitina e fica acima de 10^5 Da (ROBERTS, 1992). A massa molecular da quitosana possui interferência direta em diversas propriedades funcionais deste polímero. A elevada massa molecular forma soluções com maior viscosidade (SANTOS, 2006).

A quitosana tem sido amplamente estudada na área de alimentos como filmes comestíveis ou embalagens (WONG, et al., 1992). Em relação aos polímeros encontrados comercialmente, os filmes de quitosana apresentam boa barreira à permeação de O_2 , porém com baixa característica de barreira a vapor de água, assim como o amido (BUTLER, et al., 1996).

Shin et al. (2002) desenvolveram filmes multicamadas de PELBD com quitosana e zeína de milho com a finalidade de combinar as propriedades destes diferentes polímeros. A adesão entre estes polímeros foi obtida com a aplicação de plasma com descarga corona utilizando os gases O_2 e tetrafluorometano (CF_4). A superfície do PELBD tratada com o CF_4 resultou na formação de grupos hidrofóbicos formados por reação química. Os filmes revestidos com quitosana ou zeína de milho aumentaram em dez vezes a barreira ao oxigênio em relação ao filme puro de PELBD. Porém, os filmes multicamadas apresentaram pequena diminuição na resistência à tração.

2.5.2.1 Atividade antibacteriana da quitosana

A quitosana apresenta baixa toxicidade em mamíferos e um amplo espectro de ação contra micro-organismos, superando inclusive, a ação de alguns agentes antimicrobianos químicos (RABEA et al., 2003; RAGHAVENDRA et al., 2016).

Vários estudos mostram o efeito antimicrobiano da quitosana contra uma ampla gama de bactérias (CHUNG et al., 2004; ELSABEE; ABDU, 2013; BENHABILES et al., 2012; RAGHAVENDRA et al., 2016). Sua atividade antimicrobiana é influenciada pelo grau de desacetilação, massa molecular, pH e temperatura. Estas variáveis atuam modificando a estrutura química da quitosana, logo, o potencial de ligação às membranas celulares

(GOMES, 2007). Estes fatores atuam de forma ordenada e independente para cada tipo de micro-organismo (BADAWI; RABEA, 2011).

O mecanismo de ação da quitosana frente às bactérias tem sido amplamente estudado. Dentre os mecanismos propostos, o mais aceito se refere às interações entre as cargas catiônicas da quitosana com moléculas aniônicas da superfície celular. Como resultado, ocorrem alterações vitais na permeabilidade da membrana comprometendo o metabolismo dos micro-organismos, podendo em alguns casos, levar à lise da célula (RAVI KUMAR, 2000; LIU et al., 2004).

Para Goy, Brito e Assis (2009) a atividade antimicrobiana da quitosana é explicada por três mecanismos: 1) A interação superficial iônica entre a quitosana e o micro-organismo resultando em vazamento de eletrólitos e outros constituintes proteicos de baixa massa molecular pela parede celular; 2) A penetração da quitosana no núcleo dos micro-organismos inibindo a síntese de RNA e proteínas e 3) A formação de uma barreira externa que acaba inibindo a absorção de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano.

Para Muzzarelli et al. (1997), a quitosana pode ainda quelar oligo-elementos essenciais ou nutrientes do meio inibindo o crescimento bacteriano. Alguns pesquisadores afirmam que a sensibilidade das bactérias Gram-negativas está relacionada à quantidade de moléculas aniônicas na superfície celular (LIU et al., 2004).

A massa molecular apresenta influência no efeito bactericida da quitosana. Nas Gram-positivas a elevada massa molecular gera acúmulo de quitosana ao redor da célula, impedindo a entrada de nutriente. Enquanto que, nas Gram-negativas, a quitosana com baixa massa molecular consegue penetrar com maior facilidade na célula, alterando e causando distúrbios no metabolismo destes micro-organismos e impedindo a transcrição do DNA e RNA (JUNG, et al., 1999; ZHENG; ZHU, 2003).

Ouattara et al. (2000) investigaram o efeito de filmes de quitosana obtidos a partir de diferentes soluções. Os filmes de quitosana a partir da solução aquosa não apresentaram efeito contra a *L. sakei*, enquanto que os filmes preparados com as soluções de ácido acético e ácido propiônico apresentaram efeito devido à protonação do grupo amino. Darmadji e Izumimoto (1991) investigaram o efeito de diferentes concentrações de quitosana em pó misturada em carne contra o crescimento de *L. plantarum*; na concentração de 0,1% foi observada a inibição de crescimento e com 0,5% não houve crescimento da bactéria.

Ulbin-Figlewicz, Zimoch-Korzycka e Jarmoluk (2014) desenvolveram filmes comestíveis de quitosana incorporados com até 1% de lisozimas e expostos ao plasma a frio com gás hélio por até 10 min, com o objetivo de inibir o desenvolvimento nestas superfícies das bactérias Gram-positiva *L. monocytogenes* e as Gram-negativas *P. fluorescens* e *Yersinia enterocolitica*. A quitosana apresentou atividade antibacteriana para as três bactérias, o aumento da concentração de lisozimas provocou o aumento da atividade contra *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*. O tratamento com plasma a frio não apresentou diferença na ação bacteriana comparado com os filmes sem tratamento. Ainda, observou-se que o ângulo de contato do filme não foi significativamente alterado com a aplicação do plasma a pressão de 20 kPa e frequência de 70 kHz.

Al-Naamani, Dobretsov e Dutta (2016), investigaram o efeito antibacteriano de 2% de quitosana com 0,1% de NPs-ZnO aderidos em filmes de PE tratados com plasma à pressão de 0,2 mbar com gás O₂. A atividade inibitória dos filmes foi investigada em bactérias Gram-negativas, *S. enterica* e *E. coli*, e Gram-positiva, *S. aureus*; os filmes de PE revestidos com quitosana apresentaram efeito inibitório em relação aos sem revestimento, os filmes resvestidos com quitosana e NPs-ZnO inibiram totalmente as bactérias ao final das 24 h de análise.

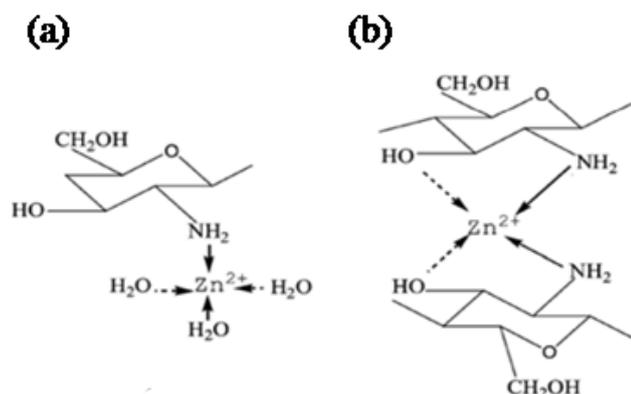
2.5.2.2 Ação quelante do zinco em quitosana

A teoria ácido-base de Lewis é capaz de descrever a formação de complexos entre a quitosana e metais. Esta complexação acontece devido aos grupos aminos presentes na quitosana, os quais formam ligações covalentes com íons metálicos, que por sua vez, recebem um par de elétrons do polissacarídeo (LIMA, 2009).

Em soluções de quitosana com pH mais elevado, onde a mesma não se encontra protonada, a reação de adsorção dos íons metálicos fica mais evidenciada (MILIOLI, 2011). O zinco é um dos íons capaz de se ligar facilmente à cadeia deste polímero (WANG; DU; LIU, 2004). Geralmente, dois modelos têm sido empregados para explicar o mecanismo de disposição de íons metálicos na quitosana. O primeiro deles considera que, os íons metálicos se encontram ligados aos grupos aminos da quitosana formando um tipo de complexo, chamado de modelo pendente (Figura 4(a)). O segundo modelo considera a formação de um complexo em que os íons metálicos se encontram ligados a vários grupos amino e grupos

hidroxilas da mesma cadeia polimérica ou ainda de diferentes cadeias, chamado de modelo em ponte (Figura 4(b)).

Figura 4. Representação esquemática para os complexos formados entre quitosana e Zn^{2+} (a) modelo pendente e (b) modelo em ponte.



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2004).

O tipo de complexo formado depende do pH do meio, em valores de pH mais baixos deve acarretar a formação de complexos do modelo pendente; em pH mais elevados, devido a neutralização dos grupos NH_3^+ , ocorre a formação do modelo em ponte. (LIMA, 2009).

2.6 TECNONOLOGIA DE PLASMA FRIO PARA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE POLÍMEROS

A tecnologia de plasma frio tem sido amplamente estudada para modificar a superfície de polímeros e melhorar suas propriedades superficiais de energia, molhabilidade e adesão (TUOMINEN et al., 2010; NIEMIRA, 2012; SILVEIRA, 2012). O plasma consiste em um gás parcialmente ou totalmente ionizado, composto por fótons, íons, elétrons livres, nêutrons e átomos em seus estados fundamentais ou excitados, com uma carga total neutra (MILOSAVLJEVI, KARKARI, ELLINGBOE, 2007; MISRA et al., 2011).

O plasma frio, de baixa temperatura é proveniente do não equilíbrio termodinâmico, onde a energia gerada pelas colisões das partículas não é igualmente distribuída entre as espécies do plasma. Essa energia é canalizada para os elétrons, que mantem a temperatura em torno de 3000 K, enquanto os prótons e nêutrons se mantêm a temperatura um pouco superior a ambiente. Esse não equilíbrio termodinâmico permite a aplicação dessa tecnologia em

materiais termosensíveis como polímeros e tecidos biológicos (NEHRA et al., 2008; ZANG, et al., 2010).

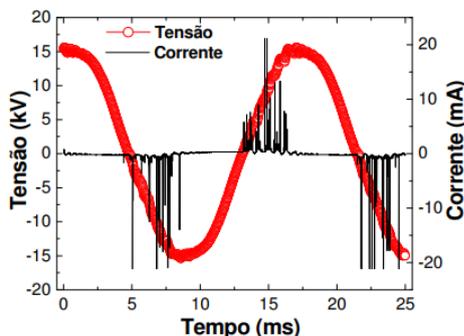
As pesquisas desta tecnologia a pressões atmosféricas vêm se destacando em relação às de baixa pressão devido às vantagens relacionadas aos custos das instalações de linhas de vácuo, e também por não restringir a aplicação diante de materiais com alta pressão de vapor e líquidos em geral. Assim, várias técnicas de plasma frio em pressão atmosférica foram desenvolvidas, como descarga corona, descarga de cátodo oco, tocha de plasma e descarga por barreira dielétrica (DBD) (NEHRA et al., 2008; SOUZA, 2013).

2.6.1 Plasma frio a partir de um reator de descarga com barreira dielétrica (DBD)

Descarga com barreira dielétrica (DBD) é um tipo de descarga que acontece no espaço entre dois eletrodos metálicos na presença de um gás e um dielétrico. Com a aplicação da diferença de potencial entre os eletrodos, cargas elétricas se acumulam na superfície da barreira dielétrica até ao ponto que estas cargas se tornam capazes de romper a rigidez do gás, gerando uma microdescarga. Quando isso acontece, o campo elétrico pontual que gerou esta microdescarga diminui e o microfilamento se extingue. Como nestes sistemas se trabalha com valores altos de diferença de potencial elétrico, estes microfilamentos acontecem em diversos pontos aleatórios da superfície da barreira dielétrica. Este processo se repete a cada meio ciclo do pulso da tensão aplicada entre os eletrodos, resultando de forma macroscópica no plasma a frio DBD (KOGELSCHATZ; ELIASSON; EGLI, 1987; ELIASSON; KOGELSCHATZ, 1991; BOGAERTS et al., 2002).

Durante estas microdescargas elétricas, a corrente elétrica apresenta diversos picos que correspondem a um grupo de microdescargas de plasma que acontecem simultaneamente (Figura 5). No momento em que a tensão atinge seu valor absoluto máximo ($dV/dt=0$), as microdescargas deixam de acontecer (PONS; MOREAU; TOUCHARD, 2005).

Figura 5. Forma de onda típica da tensão e da corrente em função d tempo de um reator DBD.



Fonte: dos Santos (2010).

Considerando a corrente de deslocamento no dielétrico como I_D , tem-se a Equação 1:

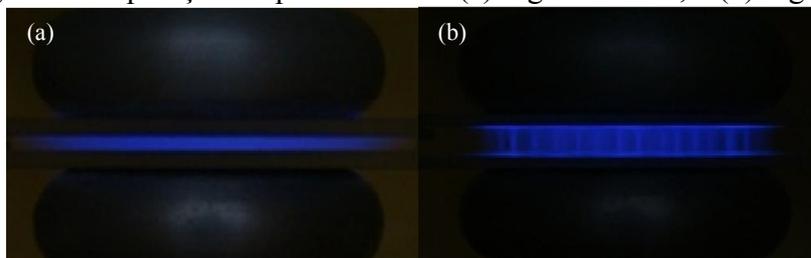
$$I_D = Cd \, dV/dt \quad (1)$$

Onde, Cd corresponde à capacitância do dielétrico. Ou seja, a microdescarga se extingue quando a corrente de deslocamento ao longo do dielétrico é nula, reiniciando no próximo meio ciclo de tensão aplicada. Essas microdescargas acontecem do ânodo para o cátodo (WAGNER et al., 2003).

Em um reator DBD existem dois regimes diferentes de operação para se obter o plasma frio: o regime filamentar e o regime difuso (Figura 6). No primeiro, a ruptura do gás entre os eletrodos gera um grande número de microdescargas e estas duram alguns nanosegundos e se distribuem uniformemente sobre a superfície do dielétrico. Este é o regime mais utilizado industrialmente (WAGNER et al., 2003; SIRA et al., 2008; SHAO et al., 2010).

Enquanto no regime difuso, a descarga é mais homogênea e não acontece a formação de filamentos, para isso, são necessárias condições especiais de operação de tensão, frequência, distância dos eletrodos e principalmente definidas pelo gás. Com os gases hélio, neônio e nitrogênio este regime é mais facilmente alcançado. Porém, qualquer instabilidade na descarga, ou ainda presença de impurezas podem levar a uma descarga filamentar (WAGNER et al., 2003; SIRA et al., 2008).

Figura 6. Regimes de operação do plasma DBD: (a) regime difuso, e (b) regime filamentar.



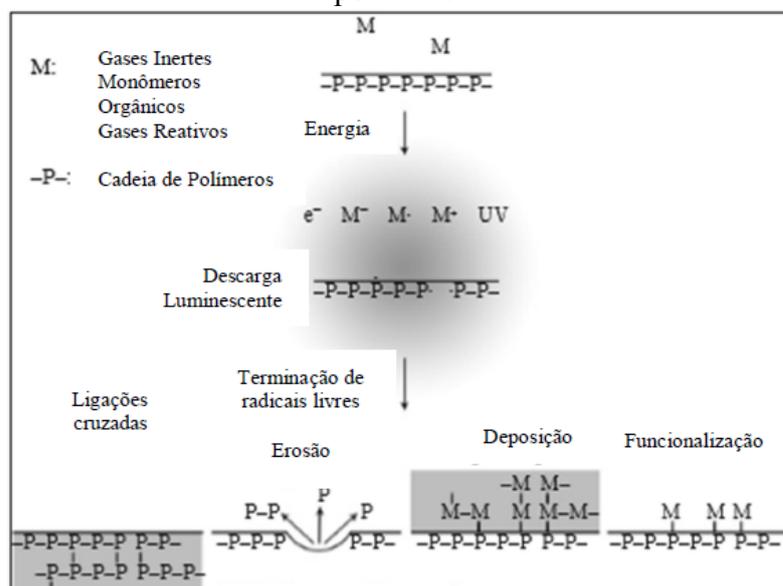
Fonte: Shao et al. (2010).

A intensidade luminosa das microdescargas, as espécies ativas, os radicais e íons do plasma frio dependem da composição dos gases, pressão, frequência, tensão, configuração da descarga e da polaridade do campo elétrico (XU, 2001; PANKAJ et al. 2014). A tensão aplicada em um reator DBD geralmente varia de 5-40 kV, a frequência de 50 Hz - 80 kHz, a pressão em até 1 bar, e a barreira dielétrica pode consistir em vidro, quartzo, cerâmicas e alguns polímeros como poliéster e teflon (ELIASSON; KOGELSCHATZ, 1991; WAGNER et al., 2003).

Grupos polares como carbonilas (C=O), ácidos carboxílicos (HOC=O), éster (C-OC=O), hidroxilas (C-OH), peróxido (C-O-O) e carbonatos (OC(O)O) podem ser formados a partir das partículas reativas do plasma ao quebrar as ligações C-C e C-H e gerar radicais livres na superfície do polímero (FREITAS, et al., 2006; SHENTON; LOVELL-HOARE; STEVENS, 2001). Desta maneira, o plasma a frio DBD é composto por uma grande variedade de radicais livres, radiação ultravioleta (UV), espécies reativas, moléculas, átomos e elétrons que interagem com a superfície dielétrica e podem causar mudanças como o aumento da molhabilidade e energia superficial (SHAO et al., 2010).

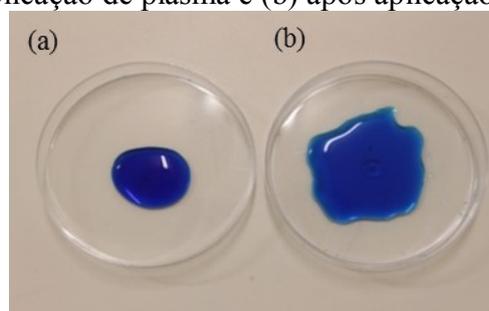
Esta interação do plasma DBD com a superfície de um polímero resulta na quebra das ligações covalentes das cadeias poliméricas gerando compostos de menor peso molecular (Figura 7). As modificações superficiais podem acontecer através da oxidação (erosão) da superfície; pela funcionalização da face polimérica exposta ao tratamento; pela deposição e acúmulo das espécies sobre a superfície e ainda, na presença de gases inertes, pode ocorrer a formação de ligações cruzadas (*cross-link*) com radicais livres de outras cadeias poliméricas (COLTRO; ALVES, 2001; VIDAURRE CASTRO, et al., 2002).

Figura 7. Modificações causadas pelas espécies reativas do plasma sobre a superfície polimérica.



O plasma obtido a pressões atmosféricas e na presença de ar como gás de ionização é capaz de aumentar a hidrofiliabilidade (Figura 8), a rugosidade e a relação de O/C sobre a superfície de polímeros sintéticos como polipropileno (LEROUX et al., 2008) e poliestireno (CUI et al., 2007), com a recuperação parcial da hidrofobicidade com o tempo devido a reorganização das espécies polares (WIACEK, 2015). Porém, utilizando o ar como gás ionizante, o regime obtido é o filamentar (WAGNER et al., 2003; SIRA et al., 2008). E a utilização da pressão atmosférica exige condições de maior tensão e/ou frequência da fonte responsável pela descarga elétrica (OLIVEIRA JUNIOR, 2002; HOWATSON, 2013).

Figura 8. Deposição de água com azul de metileno sobre uma placa de Petri de poliestireno (a) sem aplicação de plasma e (b) após aplicação de plasma.



Fonte: a autora.

Rancourt et al. (2013) avaliaram a encapsulação de NPs-ZnO nos co-polímeros poli(ácido acrílico) (PAA) e em poli(metacrilato de metil-ácido co-metacrilico) [P(MMA-MA)] e também a possibilidade de incorporação direta destas nanopartículas na superfície de polipropileno (PP). A superfície do PP foi tratada com plasma frio utilizando o gás argônio e pressão abaixo de 4 Pa, logo após as amostras do polímero foram imersas em uma solução contendo as NPs-ZnO encapsuladas e não encapsuladas. O enxerto do ZnO na cadeia polimérica aconteceu mesmo sem a encapsulação. As amostras com o NPs-ZnO encapsuladas e não encapsuladas apresentaram o mesmo efeito antibacteriano frente a *E. coli*.

Paisoonsin, Pornsunthorntawee e Rujiravanit (2013) também incorporaram ZnO na superfície de filmes de PP tratados com plasma DBD, que foi gerado com a alimentação contínua de ar zero (livre de contaminantes) e pressão de 30 psig, cerca de 206,8 kPa. Em seguida, os filmes foram imersos em solução aquosa de diferentes concentrações de nitrato de zinco ($Zn(NO_3)_2$), com posterior adição de hidróxido de sódio (NaOH) para a conversão de Zn^{2+} para ZnO. A solução mais concentrada de $Zn(NO_3)_2$ resultou no aumento da quantidade de ZnO no filme e da atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, com exposição à luz UV, após 3 h inibiu 99,8% e 96,5% de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Enquanto que, sem exposição à luz UV, foram necessárias 24 h para atingir 99% de inibição das bactérias.

O plasma frio também tem sido utilizado para a produção de filmes multicamadas ou para compatibilizar o revestimento de uma superfície sintética com um polímero biodegradável. Theapsak, Watthabaphanit e Rujiravanit (2012) aplicaram o plasma frio DBD sobre filmes de PE numa tensão de 15 kV e frequência de 350 Hz por 10 segundos e com distância entre os eletrodos de 4 mm. Após o tratamento, os filmes foram imersos em solução de quitosana com posterior secagem a temperatura ambiente e a atividade antibacteriana foi avaliada frente a *S. aureus* e *E. coli*. Com 0,25% de quitosana inibição do *S. aureus* foi maior, com 2% de quitosana 100% de ambas bactérias foram inibidas.

2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

De acordo com a revisão bibliográfica, diversos estudos comprovam a atividade antimicrobiana de NPs-ZnO. O presente trabalho deu continuidade a dissertação de Souza (2015), onde foram definidas as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas das NPs-

ZnO para algumas bactérias e houve a incorporação destas aos filmes de PEBD e PELBD modificado com anidrido maleico (PELBD-AM) por aspersão/fusão e por extrusão. As amostras extrusadas não apresentaram ação antimicrobiana frente às bactérias testadas, possivelmente pelo aprisionamento das NPs dentro da matriz polimérica. Em contrapartida, os filmes de PELBD-AM em que as NPs foram incorporadas por aspersão apresentaram um efeito bactericida para *S. Thiphymurium* com a redução da concentração de células bacterianas, mas sem sua eliminação total. Adicionalmente, para a bactéria *S. aureus* foi detectada ação bacteriostática quando as nanopartículas estavam aderidas aos polímeros PEBD e PELBD-AM.

Em vista das dificuldades e resultados do trabalho de SOUZA (2015), percebeu-se a necessidade de melhorar/possibilitar a ação destas NPs-ZnO quando aderidas aos filmes de PE. Para isso, faz-se necessário melhorar o método de obtenção desses filmes, bem como, buscar um método de análise antibacteriana capaz de detectar o efeito inibitório destes filmes contra bactérias de interesse na preservação e segurança de alimentos.

Na literatura, também se encontram trabalhos que obtiveram a funcionalização da superfície de poliolefinas através de plasma frio para a incorporação de NPs-ZnO com posterior avaliação da atividade antimicrobiana. Neste sentido, utilizar esta tecnologia de plasma frio é uma alternativa para a compatibilização do PE com outros polímeros e as NPs visando uma superfície com ação antibacteriana.

Além disso, a utilização de polímeros biodegradáveis em substituição parcial dos polímeros sintéticos pode reduzir o impacto ambiental causado por estes plásticos sintéticos. A quitosana é um interessante biopolímero biodegradável, visto que, apresenta efeito contra diversos micro-organismos, logo, somar o efeito de NPs-ZnO à quitosana pode ser vantajoso na inibição bacteriana.

O amido é outra interessante opção de biopolímero biodegradável, com menor custo e maior disponibilidade em relação à quitosana. Porém, os filmes de amido costumam apresentar limitações de aplicação principalmente devido a sua fragilidade, baixa resistência mecânica e baixa barreira à umidade que podem ser contornadas com a associação ao PELBD; e com a presença de NPs-ZnO, pode-se melhorar sua hidrofiliabilidade. Até o momento, não foram encontrados trabalhos de filmes multicamadas de PELBD/Am viabilizados pela aplicação do plasma frio, nem de PELBD/Am contendo NPs-ZnO e nem de filmes com propriedades antimicrobianas de Am/NPs-ZnO.

As bactérias mais comuns investigadas em filmes antimicrobianos são *E. coli* e *S. aureus* principalmente, seguidas de algumas espécies de *Salmonella* e de *Pseudomonas*. No entanto, pouco se investigam o efeito destes filmes diante das BAL. Especificamente, quanto ao *L. sakei*, não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito das NPs-ZnO e nem de filmes contendo essas nanopartículas. É importante ressaltar que, mesmo que estas bactérias não causem danos à saúde dos consumidores, elas são responsáveis por deteriorar os alimentos. Consequentemente conhecer o seu comportamento diante de superfícies antimicrobianas e controlar seu desenvolvimento é necessário para se alcançar o aumento de vida útil dos alimentos e reduzir os custos e desperdício dos alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matérias-primas e reagentes utilizados para a obtenção dos filmes

Os *pellets* de PELBD utilizados para a obtenção dos filmes foram cedidos pela empresa Dow Brasil (especificações técnicas no Anexo A). A quitosana da Purifarma (São Paulo, Brasil) foi cedida pelo Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) do Departamento de Química da UFSC com grau de desacetilação de 81,9% e massa molecular de 111,01 kDa, determinados por Müller (2013). O amido de mandioca foi adquirido no mercado local (Florianópolis, SC, Brasil), da marca Yoki Alimentos S.A. As NPs-ZnO foram cedidas pela empresa Kher Nanotecnologia Química Ltda, mesmo lote de NPs-ZnO utilizadas no trabalho de Souza (2015). Ácido acético glacial (99,7% de pureza) da empresa Synth Company e Glicerol (99,5%) da empresa Sigma-Aldrich.

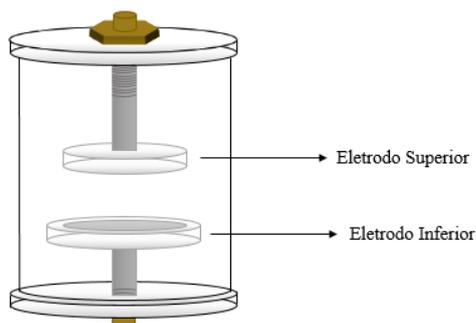
3.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DE PLASMA FRIO

Para o presente estudo, foi projetado e construído um equipamento com flexibilidade suficiente para atender às várias demandas de pesquisa do Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI) gerando plasma a frio a partir de um reator de Descarga em Barreira Dielétrica (DBD). O reator DBD (Figura 9) consiste num tubo de acrílico com parede de 3 mm de espessura, 120 mm de diâmetro e 150 mm de altura, aberto nas duas extremidades, nas quais duas tampas de teflon se encaixam pelo sistema de rosca. Nas tampas encontram-se fixados os eletrodos, também pelo sistema de roscas, que permite a regulagem da distância entre o eletrodo superior e o eletrodo inferior. O eletrodo superior possui 50 mm de diâmetro, enquanto o inferior 64 mm. Os eletrodos foram feitos de aço inoxidável com as laterais de ambos revestidos com teflon, para evitar formação de arco elétrico. que consiste num caminho preferencial de descarga elétrica.

Nesta conformação, o campo elétrico gerado pela diferença de potencial aplicada entre os eletrodos é uniforme, garantindo que o plasma gerado ocupe todo o volume delimitado pela área do eletrodo superior (anodicamente polarizado) até a superfície do dielétrico, que fica disposto sobre o eletrodo inferior (catodicamente polarizado). O que

significa que os elétrons se movimentam por este campo uniformemente, adquirindo grande energia e colidindo com as moléculas do gás que ocupam este espaço, resultando no processo de excitação e/ou ionização que são característicos deste volume de descarga sobre o dielétrico (DE SOUZA, 2013).

Figura 9. Desenho do reator de plasma DBD.



Fonte: Zanghelini (2017).

Para gerar a descarga elétrica, foi utilizada uma fonte de alta tensão pulsada (modelo Pulse 0130, Inergiae), onde os pulsos alcançam a energia de até 0,2 J, o que pode fazer a tensão de saída chegar a 30 kV e uma frequência de até 1,0 kHz. A taxa de repetição dos pulsos pode ser de até 500 pulsos por segundo, o que representa uma potência de 100 W.

O princípio de funcionamento da fonte consiste na acumulação e descarga de energia. Através de um potenciômetro multi-voltas, pode-se controlar a tensão e a frequência e, monitorar a energia de saída e de temperatura interna da fonte no painel de exibição da fonte (Figura 10).

Figura 10. Foto do painel de exibição da fonte de alta tensão pulsada.



Fonte: a autora.

O plasma frio gerado a partir do aparato experimental (Figura 11) depende dos seguintes parâmetros: distância do eletrodo ao dielétrico, da tensão elétrica, frequência,

pressão do sistema e gás utilizado. Os primeiros testes foram realizados no Instituto de Eletrônica de Potência (INEP - UFSC), junto à empresa que desenvolveu a fonte, a Inergiae Conversores Estáticos, para se determinar as faixas de formação de plasma frio no reator em função da variação de alguns destes parâmetros. Durante estes testes, utilizou-se um osciloscópio (marca MSO/modelo DPO4000B) para se certificar da presença do plasma no reator e também para o treinamento visual da presença do mesmo. Afinal, entre as espécies geradas pelo plasma, tem a radiação UV (coloração roxa) e espécies reativas de oxigênio como o ozônio (coloração azulada), logo a presença da tonalidade azul/roxa funciona como um indicador da presença do plasma, mesmo que em tonalidade fraca e muitas vezes, pouco perceptível a quem não está treinado.

O osciloscópio foi acoplado por uma sonda de alta tensão (marca Tektronix/modelo TCP 0020) na saída do reator. De acordo com a revisão bibliográfica, a corrente apresenta diversos picos correspondentes a um grupo de microdescargas elétricas, então a partir destes diversos picos na saída do reator indica a presença de plasma (PONS; MOREAU; TOUCHARD, 2005).

Figura 11. Foto do aparato experimental de plasma DBD.



Fonte: a autora.

Para se determinar os parâmetros de operação necessários para a geração de plasma, foram realizados testes em duas etapas. Na primeira, foram fixados os parâmetros de distância entre o eletrodo superior da barreira dielétrica, pressão e a tensão (V) máxima alcançada pelo potenciômetro multi-voltas, tendo como resposta um intervalo de frequência (f) no qual se observou a presença do plasma visualmente e no osciloscópio.

Na segunda etapa, manteve-se a mesma distância entre o eletrodo superior da barreira dielétrica, a mesma pressão e foi fixada a frequência em seu ponto mínimo (observado na etapa anterior) para definir o intervalo de tensão em que plasma frio foi gerado (Tabela 2). Assim como na etapa anterior, a presença do plasma foi identificada visualmente e

pelo osciloscópio. Estas duas etapas foram repetidas em diferentes pressões absolutas: 0,21; 0,34; 0,47; 0,61; 0,75; 0,87 atm e pressão atmosférica.

Não foi utilizada a injeção de qualquer gás ionizante, apenas o ar presente no reator. O parâmetro de distância dos eletrodos foi baseado na pesquisa de THEAPSAK, WATTHABAPHANIT e RUJIRAVANIT (2012), que aplicaram o plasma DBD sobre filmes de PE na tensão de 15 kV e frequência de 350 Hz por 10 s e distância entre os eletrodos de 4 mm.

Tabela 2. Parâmetros fixados e faixas de operação nas quais se observou formação do plasma frio.

| Distância entre superior da barreira dielétrica (mm) | Pressão absoluta (atm) | Parâmetros fixados | Faixas de operação para geração plasma frio |
|---|-------------------------------|----------------------------|--|
| 4 | 1 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) |
| | | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) |
| | 0,87 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) |
| | | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) |
| | 0,74 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) |
| | | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) |
| | 0,61 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) |
| | | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) |
| 0,47 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) | |
| | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) | |
| 0,34 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) | |
| | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) | |
| 0,21 | V_{\max} (kV) | $f_{\min} - f_{\max}$ (Hz) | |
| | f_{\min} (Hz) | $V_{\min} - V_{\max}$ (kV) | |

3.3 OBTENÇÃO DOS FILMES

Inicialmente, foram preparados os filmes de PELBD puros, aos quais se adicionou NPs-ZnO por aspensão ou com a adesão de uma sobrecamada de biopolímero (amido ou quitosana) contendo as nanopartículas. Obteve-se assim, diferentes filmes ao final do processo que foram investigados quanto às suas propriedades mecânicas, superficiais, de cor e antimicrobianas.

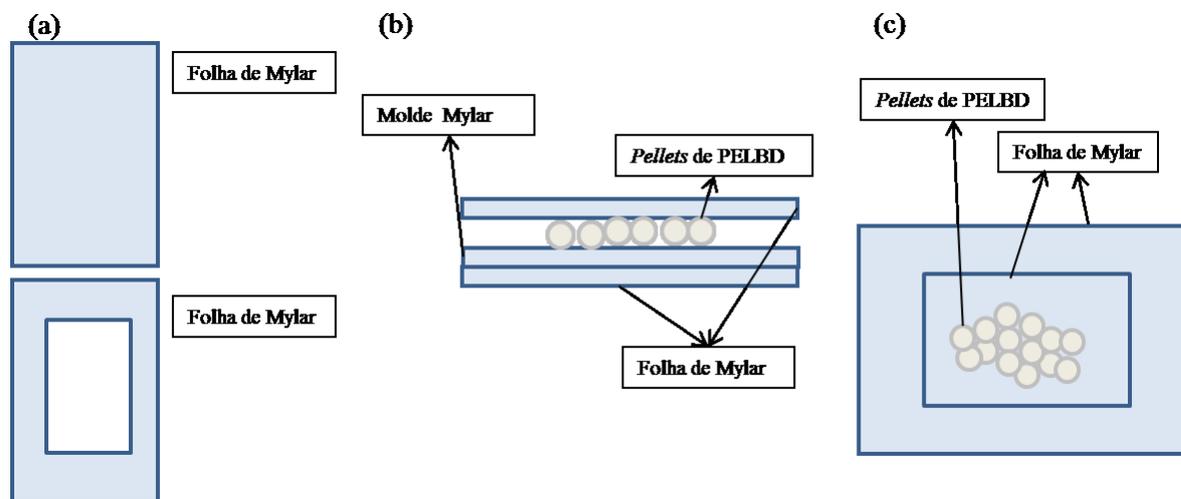
As NPs-ZnO foram incorporadas aos filmes de PELBD puros por aspersão em duas concentrações, 0,9 e 1,5 mg/cm². Essas concentrações foram determinadas através da diferença de massa dos filmes antes e após o processo de aspersão. Para a obtenção dos filmes multicamadas PELBD/QTS foi necessária a modificação superficial do PELBD para que fosse possível a adesão da biopolímero ao mesmo. As NPs-ZnO foram adicionadas à solução de quitosana, também em duas concentrações, 0,2 e 0,5 mg/cm². De maneira análoga, obteve-se os filmes multicamadas de PELBD/Am com as NPs-ZnO, inclusive com as mesmas concentrações de nanopartículas (0,2 e 0,5 mg/cm²).

Ao final, foram obtidos 06 filmes com NPs-ZnO: PELBD/Asp.(0,9 mg/cm² NPs-ZnO), PELBD/Asp.(1,5 mg/cm² NPs-ZnO), PELBD/QTS(0,2 mg/cm² NPs-ZnO), PELBD/QTS(0,5 mg/cm² NPs-ZnO), PELBD/Am(0,2 mg/cm² NPs-ZnO), PELBD/Am(0,5 mg/cm² NPs-ZnO). Sendo que, para as caracterizações e avaliação antimicrobiana, foram produzidas as amostras controles de PELBD puro, PELBD/QTS e PELBD/Am.

3.3.1 Filmes de PELBD

Os filmes de PELBD foram obtidos por termoprensagem, baseado na metodologia descrita por Medeiros (2017) e Souza (2015). Para isso foi utilizado um conjunto com 3 folhas de Mylar, a folha central continha um retângulo vazado de 10x15 cm onde era depositado 6,25 g de *pellets* de PELBD, de tal modo que os *pellets* ficassem entre as folhas de Mylar (Figura 12).

Figura 12. (a) Folha de Mylar e molde de Mylar (10x15 cm). Esquema de disposição molde de Mylar e pellets para obtenção dos filmes de PELBD: (b) Visão lateral; (c) Visão superior.



Fonte: a autora.

Este conjunto contendo os *pellets* foi posicionado sobre a chapa inferior de uma termoprensa hidráulica (Somar, Brasil) pré-aquecida a 130 °C. Então, aproximou-se a chapa superior até encostar ao conjunto molde e se manteve por 7 min sem pressão, para fundir os *pellets*. Em seguida, para evitar a formação de bolhas de ar no filme, a pressão foi elevada gradativamente a 327, 1307, 1962, 2616 kPa, pelos tempos respectivos de 1, 1,5, 3 e 5 minutos. Então, retirou-se o molde da chapa e depositou-se sobre a bancada para o resfriamento e posterior destacamento do filme obtido com espessura de 350 µm.

3.3.2 Filmes de PELBD com aspersão de NPs-ZnO

Para o procedimento de aspersão, preparou-se uma dispersão de 10% (m/m) de NPs-ZnO em água destilada. A dispersão foi mantida em agitador do tipo Vórtex (Phoenix Lufesco) por 2 minutos e em seguida submetida ao banho de ultrassom por 30 minutos para obter uma dispersão homogênea. Antes de cada procedimento de aspersão, a mistura foi agitada novamente em Vórtex por 1 minuto.

O método de incorporação das NPs-ZnO no PELBD puro foi adaptado de De Souza (2015) (Figura 13). Antes da aplicação das nanopartículas, o filme de PELBD foi colocado sobre uma folha de Mylar na termoprensa pré-aquecida a 130 °C por 4 min com o espaçamento entre as chapas de cerca de 1 cm. Em seguida, realizou-se a aspersão manual da solução de NPs-ZnO utilizando um borrifador (Figura 14). Visando a obtenção de filmes com

as concentrações de 2,5 e 4,5% (massa NPs-ZnO/massa PELBD), equivalente a 0,9 e 1,5 mg/cm² (massa de NPs-ZnO/área de filme), foram realizadas 60 e 110 borrifadas, respectivamente. A concentração das NPs-ZnO nos filmes foi obtida pela diferença de massa dos filmes secos em estufa a 80°C por 24 horas antes e depois do processo de aspersão.

Após a aspersão, os filmes foram colocados novamente na termoprensa por 8 minutos a 130 °C para a evaporação da água, com 1 cm de distância entre as chapas da termoprensa. Os filmes foram retirados e resfriados à temperatura ambiente e então lavados em água corrente por 1 minuto para a retirada das NPs-ZnO que não haviam aderido ao filme de PELBD.

Figura 13. Fluxograma de produção de filmes de PELBD com aspersão de NPs-ZnO.

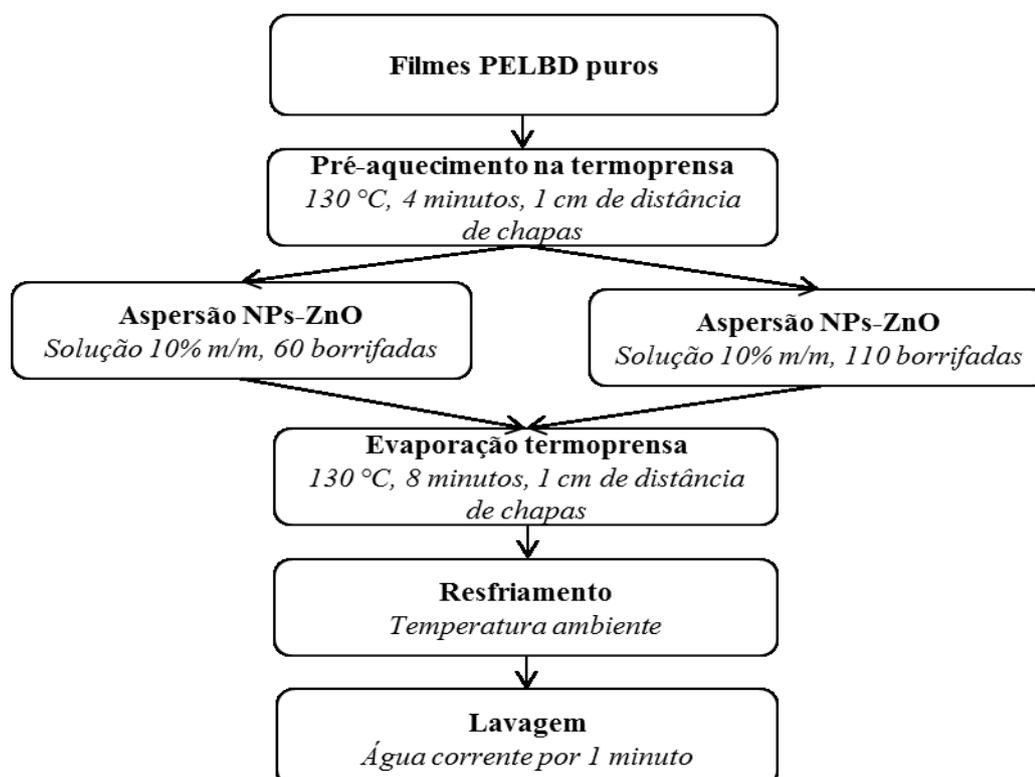


Figura 14. Foto do borrifador utilizado no procedimento de aspersão das NPs-ZnO nos filmes de PELBD.



Fonte: a autora.

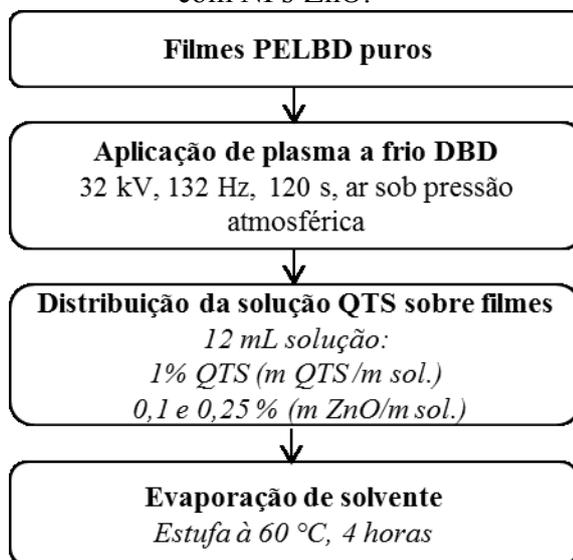
3.3.3 Filmes multicamadas de PELBD/QTS com NPs-ZnO

A obtenção da solução de quitosana com as NPs-ZnO foi baseada no método de Müller (2013). As NPs-ZnO nas concentrações 0,1 e 0,25% (m/m em relação à solução final) foram dispersas em solução de ácido acético 1% (v/v) em banho de ultrassom (UltraCleaner 1400, Unique) por 15 minutos. Então, adicionou-se 1% de quitosana (m/m em relação à solução final) e manteve-se a solução sob agitação mecânica (M-110, Nova Ética) por 18 horas. A quantidade de NPs em relação ao biopolímero equivale a 10 e 25% (m NPs-ZnO/m quitosana) e corresponde à concentração de 0,2 e 0,5 mg/cm² (massa NPs-ZnO/área de filme), respectivamente. Amostras controle sem NPs-ZnO também foram preparadas.

Para obtenção dos filmes multicamadas de PELBD/QTS (Figura 15), a superfície dos filmes de PELBD (produzidos conforme a descrição do item 3.3.1) foi tratada com plasma frio. Os filmes de PELBD foram cortados em círculos de 3,5 cm de diâmetro e colados com fita dupla-face sobre placas de Petri descartáveis de poliestireno de alta transparência. Essas placas foram posicionadas sobre o eletrodo inferior do reator plasma, a 4 mm de distância do eletrodo superior, e submetidas a uma descarga de plasma de 32 kV e 132 Hz por 120 segundos com o intuito de aumentar a adesividade entre o PELBD e a quitosana.

Após o tratamento superficial, distribuiu-se 12 mL da solução de QTS e QTS (NPs-ZnO) sobre o filme de PELBD. Em seguida, os filmes foram colocados em estufa com convecção (Servitech) a 60 °C por 4 horas para evaporação do solvente, método de *casting*.

Figura 15. Fluxograma de produção de filmes multicamadas de PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO.

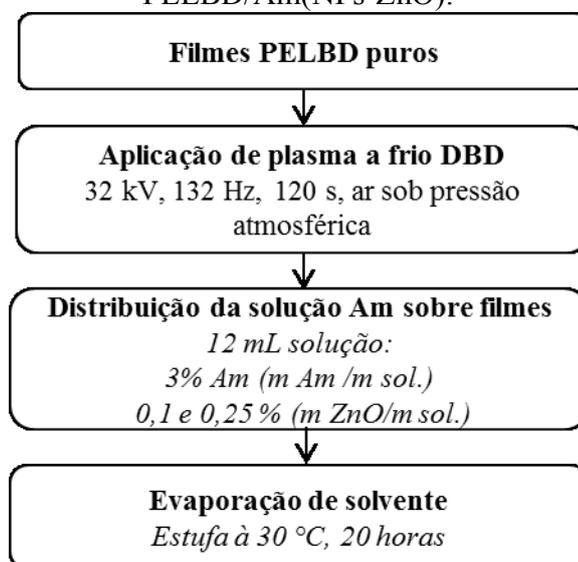


3.3.4 Filmes de PELBD/Am com NPs-ZnO

A solução de amido foi obtida a partir da mistura de 3% (m/m em relação à solução final) desse polissacarídeo, 0,8% (m/m em relação à solução final) de glicerol e água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria (Q334M, Quimis) até 80 °C, ponto de gelatinização para a solução de amido de mandioca de acordo com Belibi et al. (2014). Para a preparação das soluções de amido e NPs-ZnO, adicionou-se 0,1 e 0,25 % (m/m em relação à solução final) de NPs-ZnO à solução. Para estas soluções, a mistura foi aquecida até 84 °C, temperatura necessária para gelatinização (observada visualmente, comparando com a viscosidade da solução sem NPs). Logo após, a mistura foi colocada banho de ultrassom por 1 hora, a fim de melhor distribuir as NPs. A quantidade de NPs em relação ao biopolímero equivale a 3,33 e 8,33% (m NPs-ZnO/m amido) e corresponde à concentração de 0,2 e 0,5 mg/cm² (massa NPs-ZnO/área de filme), respectivamente. Amostras controle sem NPs-ZnO também foram preparadas.

A obtenção dos filmes multicamadas de Am contendo as NPs-ZnO foi semelhante aos filmes multicamadas de QTS (NPs-ZnO). Sobre os filmes de PELBD previamente tratados com plasma a frio foi depositado 12 mL da solução de Am e Am (NPs-ZnO). Então, os filmes foram levados para a evaporação do solvente em estufa com convecção a 30 °C por 20 horas (Figura 16).

Figura 16. Fluxograma de produção de filmes multicamadas de PELBD/Am e PELBD/Am(NPs-ZnO).



3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NPs-ZnO

As amostras de NPs-ZnO foram caracterizadas por difração de raio X (DRX) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A análise de DRX foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestutural do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC em um difratômetro de raio X da marca Philips, modelo X'Pert, com a varredura feita a 40 kV, 30 mA, com radiação incidente de CuK de 1,54 angstroms. As amostras de NPs-ZnO foram observadas em um intervalo de medida de 2θ à temperatura constante de 23 °C, com o aumento de 0,02° a cada 1 s.

A análise de MET foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC e permitiu a obtenção de informações morfológicas, cristalográficas e composicionais das amostras. O equipamento utilizado foi o JEM-1011 TEM, 100 kV. As amostras foram preparadas de acordo com De Souza (2015), com a dispersão de 1,0 mg/mL de NPs-ZnO em água destilada. Essa suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 30 minutos e então foi adicionada uma gota dessa dispersão a um *grid*, que é feito de um filme de carbono amorfo apoiado sobre uma malha de cobre. As imagens obtidas foram tratadas com o *software* ImageJ (Wayne Rasband, USA) para realizar as medições e determinar o tamanho das NPs-ZnO. Foram consideradas 250 NPs para a determinação do tamanho das mesmas.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

3.5.1 Molhabilidade e energia de superfície

Costuma-se utilizar as medidas de ângulo de contato para determinar a molhabilidade de um material. Quando o ângulo de contato for superior a 90° , trata-se de uma superfície hidrofóbica e quando for inferior a 90° , trata-se de uma superfície hidrofílica (BERG, 1993; WOK, 1998). Para uma boa adesividade na superfície um ângulo de contato em torno de $55-60^\circ$ é desejável (ARIMA; IWATA, 2007). Logo, a tendência de um líquido se espalhar na superfície de um sólido aumenta quando o ângulo de contato diminui, desta forma, o ângulo de contato é uma medida inversa da molhabilidade de uma superfície (CHAN, 1994).

A determinação do ângulo de contato dos filmes foi realizada na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, com o equipamento goniômetro Ramé-hart Instrument Co. e *software* DROPimage Advanced versão 2.4.8.5. As medidas foram feitas do ângulo formado entre a superfície dos filmes e a superfície de uma gota de água.

Estas medidas foram realizadas para os filmes de PELBD sem tratamento, PELBD tratado com plasma frio a tensão de 32 kV, 132 Hz de frequência, 4 mm de distância do eletrodo ao dielétrico e ar a pressão atmosférica nos tempos de 0, 30, 60, 120 e 180 segundos de tratamento. As amostras foram submetidas à análise no mesmo dia do tratamento e também foi investigada a reversibilidade das alterações causadas pelo plasma no ângulo de contato após 5, 10, 20 e 30 dias de tratamento, neste período as amostras foram armazenadas juntas em um recipiente à temperatura ambiente.

O ângulo de contato também foi determinado para os demais filmes obtidos nesse estudo: PELBD/Asp. (NPs-ZnO), filmes multicamadas de PELBD/QTS (NPs-ZnO) e PELBD/Am (NPs-ZnO) para o averiguação das características de hidrofobicidade/hidrofilicidade das amostras.

Para realizar as medidas dos ângulos de contato e determinação da molhabilidade, as amostras foram cortadas em tiras e coladas com fita dupla face sobre uma lâmina de vidro. Então, uma gota de água foi depositada por uma seringa sobre a amostra. O teste foi repetido por amostras em triplicata e foram realizadas dez medidas em cada gota em um intervalo de 1 segundo.

Diversos fenômenos estão relacionados à energia livre superficial, como: a) a tendência das gotas de líquidos se estabilizarem na forma esférica minimizando a área superficial; b) a tendência das gotas se aglomerarem também com o intuito de minimizar a área superficial e, c) no processo de sinterização, quando diversas partículas formam um único corpo para diminuir a energia livre do sistema (ADAMSON, 1990).

A energia de superfície (γ) foi determinada a partir de medições dos ângulos de contatos de líquidos polares e apolares: água (polar), diiodometano (apolar) e formamida (polar) no mesmo dia em que as amostras foram tratadas com plasma. A partir dessas medidas, o *software* do equipamento forneceu as componentes polares (γ^p) e dispersivas (γ^d) da energia livre de superfície, bem como a energia superficial total (γ) baseada na equação de Fowkes (Equação 2).

$$\gamma = \gamma^p + \gamma^d \quad (2)$$

3.5.2 Ensaio de tração

As propriedades de resistência ao alongamento, resistência à tração no ponto de ruptura e no *yield point* decorrente da tração são essenciais para caracterizar filmes flexíveis quanto à sua aplicação, à especificação e à sua qualidade (SARANTÓPOULOS, 2002; ROBERTSON, 2013).

Essas análises foram realizadas na Central de Análises da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC com o analisador de texturas da marca Stable Micro Systems, modelo TA.HD *plus Texture Analyzer*. As dimensões de altura (a) e largura (l) foram as mesmas para todos os filmes, variando a espessura em decorrência da sobreposição de diferentes polímeros nos filmes multicamadas e/ou presença de NPs-ZnO depositadas, Tabela 3. A espessura dos filmes foi determinada pela média das medidas realizadas em 4 pontos de 10 filmes com um micrômetro digital da marca japonesa Mitutoyo com ± 0.001 mm de precisão.

Tabela 3. Dimensões utilizadas para a determinação da resistência à tração: altura (a), largura (l) em mm e espessura em μm para cada filme obtido.

| Amostra | Dimensões (a x l) (mm) | Espessura (μm) |
|---|-----------------------------------|---|
| PELBD sem tratamento | 35 x 6,0 | 350 |
| PELBD tratado com plasma | | |
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 35 x 6,0 | 400 |
| PELBD/ Asp.(1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | | |
| PELBD/QTS | 35 x 6,0 | 450 |
| PELBD/QTS(0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | | |
| PELBD/QTS(0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | | |
| PELBD/Am | 35 x 6,0 | 470 |
| PELBD/Am(0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | | |
| PELBD/Am(0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | | |

Os ensaios de tração foram realização com 10 repetições para os filmes de PELBD e PELBD/Asp. NPs-ZnO e em triplicata para os filmes multicamadas, devido ao baixo rendimento na síntese destes. A análise foi realizada à velocidade constante de 10 mm.s⁻¹ e uma célula de carga de 50 kg.

3.5.3 Análise de cor e opacidade dos filmes

A análise de cor foi realizada em um colorímetro da marca Delta Color e modelo Delta Vista-450G-UK do Instituto Federal de Santa Catarina, câmpus São Miguel do Oeste - SC. Para a realização desta análise, utilizou-se a lente de 15 mm de diâmetro no colorímetro e foram realizadas medidas em sextuplicatas em diferentes filmes.

Através da análise, foram determinados os parâmetros L* que expressa o grau de luminosidade (L* = 100 = branco), a coordenada a* que expressa o grau de variação entre a coloração vermelha (+a) e a verde (-a) e a coordenada b* que representa o grau de variação entre a cor azul (-b) e amarela (+b).

A opacidade foi determinada através da adaptação do método de Medeiros (2017) usando um espectrofotômetro UV, marca Quimis e modelo Q898U2M5. Os filmes foram colocados diretamente em uma célula de teste do equipamento, sendo que, uma célula de teste

vazia foi usada como referência. Fez-se uma varredura do comprimento de onda de 200 a 500 nm e, com as medidas das absorbâncias, foram selecionados dois comprimentos de onda, o primeiro de 270 nm referente ao espectro de absorção ultravioleta e o segundo de 400 nm do espectro visível de absorção. A opacidade foi calculada através da razão entre a absorbância e a espessura dos filmes. Estes resultados indicam que, quanto mais alto valor da opacidade, menor o grau de transparência da amostra.

3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG) com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

Com o intuito de se observar a topografia dos filmes e a distribuição das NPs-ZnO nos mesmos, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Para o preparo das amostras, pequenos pedaços de cada filme foram colados com uma fita de carbono sobre os *stubs*. Estas amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro para garantir a condutividade elétrica. A análise foi realizada no microscópio JEOL JSM-6701F, o qual tem o EDS acoplado.

As análises de FEG foram conduzidas a uma tensão de 1 e 5 kV com as ampliações de 500 e 25000x, enquanto para o EDS a tensão foi aumentada para 15 kV. Nas condições aplicadas, os filmes de PELBD em contato com nitrogênio líquido não ficaram rígidos e nem quebradiços. Desta forma, não foi possível quebrá-los para realizar a análise de fratura criogênica. Visto que, qualquer intervenção como corte pode influenciar no resultado da análise.

3.5.5 Análise estatística

Os resultados das análises de caracterização dos filmes foram tratados estatisticamente através de Análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey HSD a 95% de confiança, através do programa Statistica 10.

3.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

3.6.1 Micro-organismos

A avaliação antibacteriana dos filmes contendo NPs-ZnO foi realizada com a bactéria Gram-positiva e patogênica *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Centro Ciências Agrárias, UFSC. A bactéria Gram-positiva e deteriorante *Lactobacillus sakei* (CCT 5841 ATCC 15521) cedida pelo Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. E a bactéria Gram-negativa e patogênica *Salmonella Enteritidis* (CCCD S002) cedida pelo Instituto Federal de Santa Catarina, câmpus São Miguel do Oeste-SC.

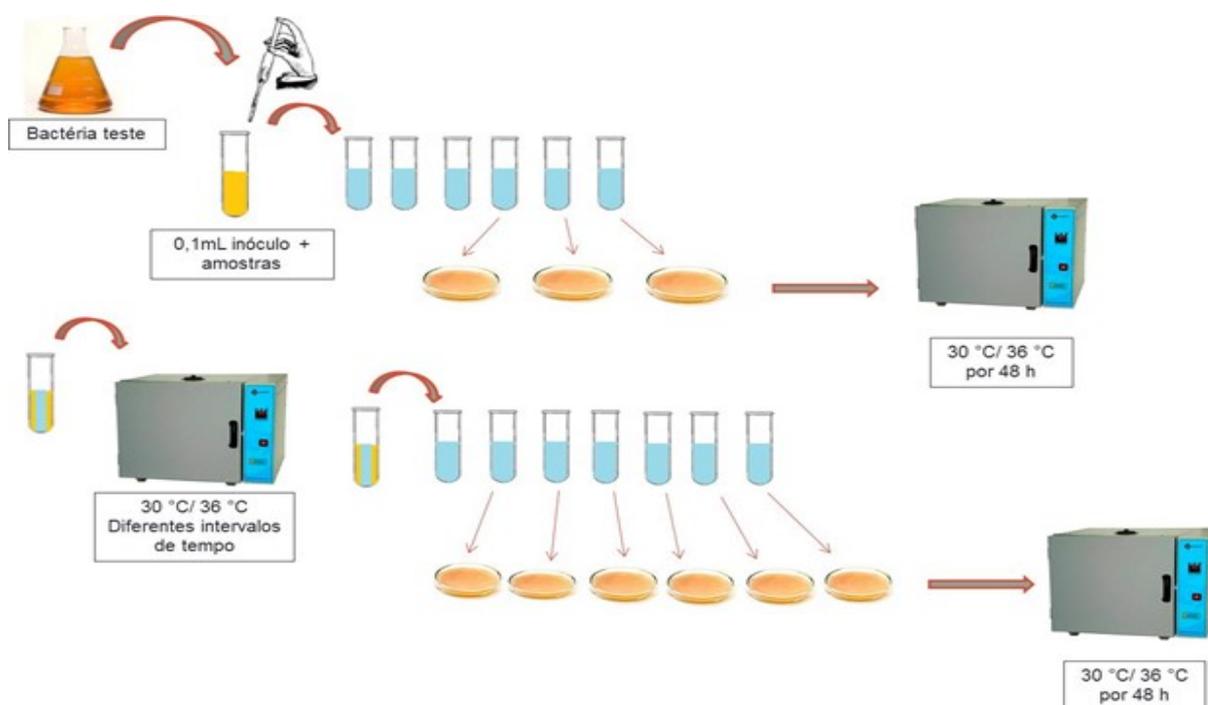
3.6.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para a técnica *Pour Plate* para os micro-organismos *S. aureus* e *S. Enteritidis* foram ágar padrão de contagem *Plate Count Ágar* (PCA) da marca Kasvi e Merck; Caldo Nutriente da marca Kasvi e Merck e caldo *Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate Broth* (SCDLP). Para as análises de *L. sakei*, utilizou-se o caldo *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) da Difco, Le Pont de Claix e para a obtenção do ágar MRS, fez-se a adição de 13,5 g ágar base da marca Difco para cada 1000 mL de caldo. Como diluente, utilizou-se água peptonada da marca Oxoid.

3.6.3 Teste de diluição em caldo

O teste de diluição em caldo foi realizado a partir da Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico (Norma M7-A6, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS) para *S. aureus* e para *L. sakei* (Figura 17). Este método foi utilizado nos testes iniciais e não foi realizado para a bactéria *S. Enteritidis*.

Figura 17. Representação esquemática do teste de diluição em caldo.



Fonte: a autora.

As cepas da BAL foram adicionadas no meio de cultivo MRS e incubadas em estufa bacteriológica (Q316M, Quimis) a temperatura de $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18 h atingindo concentração de 10^8 UFC/mL. A *S. aureus* foi adicionada em caldo Nutriente e incubada à temperatura de $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 22 h para atingir a concentração de 10^8 UFC/mL (Norma M7-A6, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). Destes inóculos, adicionou-se 0,1 mL aos tubos com 9 mL de caldo MRS e caldo Nutriente, para *L. sakei* e *S. aureus*, respectivamente, resultando numa concentração inicial de 10^6 UFC/mL.

Aos tubos foram adicionadas as amostras com filmes de PELBD incorporados com NPs-ZnO por aspersão com concentração de 0,9 e 1,5 mg/cm^2 , e um filme de PELBD sem tratamento, como controle negativo (Figura 17). Os tubos com as amostras foram agitados em vórtex (Phoenix-Luferco) e incubados a $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, para *L. sakei* e *S. aureus*, respectivamente.

Após tempos pré-determinados, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada 0,1%. Semeou-se 1 mL de cada diluição seriada em placas estéreis (técnica *pour plate*), adicionando-se posteriormente o Ágar MRS com sobrecamada para *L. sakei* e ágar

PCA em camada simples para *S. aureus*. As placas foram incubadas invertidas por 48 h a 30 °C ± 1 °C para a BAL e a 36 °C ± 1°C para a patogênica. Após a incubação, as placas contendo de 25 e 250 colônias foram contadas e os resultados foram expressos em UFC/mL.

3.6.4 Teste antimicrobiano em superfície (NORMA JIS Z 2801:2000)

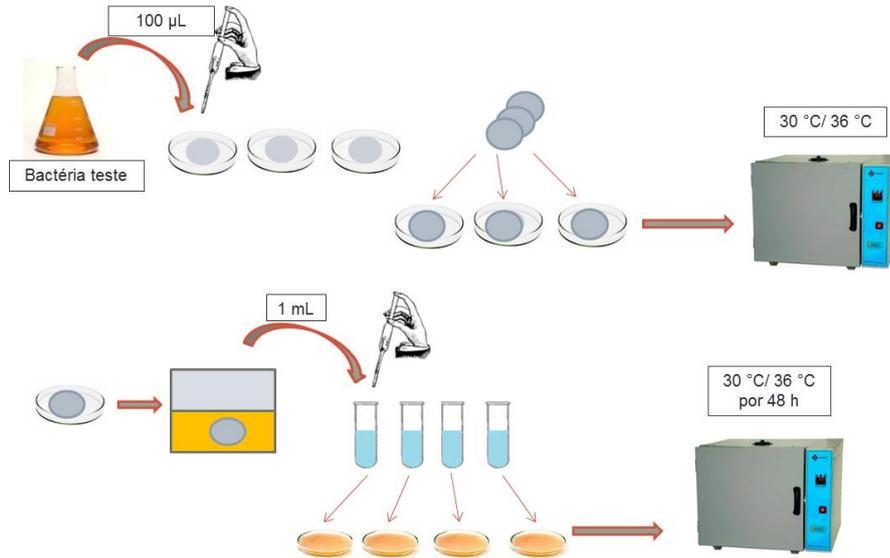
Os testes de inibição antimicrobiana em superfície foram adaptados a partir da norma JIS Z 2801:2000 (*Test for antimicrobial activity and efficacy - Japanese Industrial Standard*), desenvolvida para determinar a atividade e eficácia de agentes antimicrobianos em superfícies sólidas. Este método quantifica a atividade antimicrobiana a partir da diferença logarítmica na contagem de células bacterianas com e sem contato com o agente de inibição (JAPANESE INDUSTRIAL STANDART, 2000).

A adição das cepas de *L. sakei* e *S. aureus* aos respectivos caldos ocorreu conforme a descrição no item anterior e para a *S. Enteritidis*, aplicou-se o mesmo procedimento de crescimento da bactéria *S. aureus*.

Dos inóculos, 125 µL foram depositados sobre a superfície dos filmes de PELBD/Asp PELBD/QTS e PELBD/Am com e sem a presença das NPs-ZnO com formato circular de 3,5 cm de diâmetro (área de 9,62 cm²), dispostos dentro de uma placa de Petri estéril (Figura 18). As amostras foram cobertas com um filme de polietileno estéril, o qual foi pressionado levemente para distribuir o inóculo ao longo da superfície. As placas de Petri foram tampadas e incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C ± 1 °C no caso da BAL e a 35 °C ± 1 °C para as duas bactérias patogênicas. As amostras foram mantidas na estufa por diferentes períodos de tempo até no máximo 24 horas.

Após a incubação, cada amostra foi transferida para um saco estéril e adicionado 10 mL do caldo SCDLP para *S. aureus* e *S. Enteritidis* e caldo MRS para *L. sakei*. As amostras foram homogeneizadas manualmente por cerca de 2 minutos. A partir deste caldo foram realizadas diluições sucessivas e inoculadas (técnica *pour plate*), seguida da adição do ágar específico para cada bactéria.

Figura 18. Representação esquemática da NORMA JIS Z 2801:2000



Fonte: a autora.

As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica por 48 h a $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ para a BAL e a $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ para as patogênicas com posterior contagem das colônias. Os resultados foram expressos em UFC/mL. Conforme o método (JIS Z 2801), as placas com 30 até 300 colônias foram contadas e multiplicadas pelo fator de diluição. Para as placas com número de colônias inferior a 30, recomenda-se contar as colônias e expressar nos resultados e quando não houver crescimento, expressa-se como “<1” multiplicado pelo fator de diluição. Além disso, as amostras sem o agente antimicrobiano não podem apresentar contagem inferior a 1×10^3 UFC por amostra, após as 24 horas de análise. Para determinar a atividade antimicrobiana da superfície foi utilizada a Equação 3: (JAPANESE INDUSTRIAL STANDART, 2000)

$$R = \log\left(\frac{B}{A}\right) - \log\left(\frac{C}{A}\right) = \log\left(\frac{B}{C}\right) \quad (3)$$

Onde R é o valor da atividade antimicrobiana, A e B são as médias do número de colônias viáveis imediatamente depois da inoculação e após 24 horas, respectivamente e, C é a média do número de colônias viáveis com antimicrobiano após 24 horas. Para uma superfície ter sua ação bactericida comprovada, o valor de R deve ser superior a 2,0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DO PLASMA

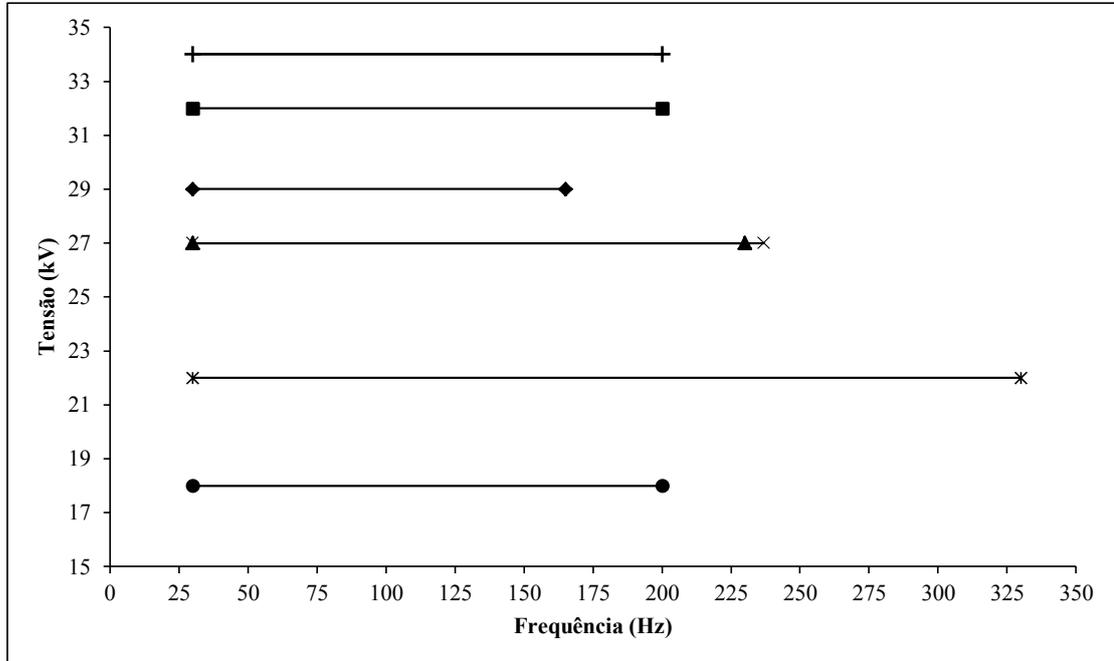
4.1.1 Determinação de parâmetros capazes de gerar o plasma frio

A caracterização do reator de plasma frio DBD foi realizada com o intuito de entender o comportamento do plasma gerado a partir do ar como gás ionizante. Neste caso, além da radiação UV, as espécies reativas geradas durante a formação do plasma são de oxigênio (como o ozônio - O₃) e de nitrogênio. O primeiro parâmetro investigado foi a faixa de frequência capaz de gerar plasma (Figura 19). A verificação ocorreu por meio do osciloscópio e sonda de alta tensão, diante da formação de um grupo de microdescargas elétricas, e comprovação visual pela presença de luz de cor roxa/azulada devido à presença de O₃ e UV.

Para esta caracterização, fixou-se a distância do eletrodo superior à barreira dielétrica em 4 mm, com ar como gás ionizante, e a tensão máxima (V_{\max}) foi obtida girando o botão multi-voltas da fonte até o final. Porém, como a tensão é influenciada por outros parâmetros como a frequência, observou-se que, em determinados momentos a fonte alcançava valores de tensão acima do valor descrito em sua especificação técnica, de 30 kV.

Observando a Figura 19, nota-se que, para todos os valores de pressão e de tensão, a faixa de frequência em que a presença do plasma frio foi detectada, inicia-se a partir de 30 Hz. Observa-se ainda que, quanto mais alta a pressão e mais próxima à pressão atmosférica, maior a V_{\max} requerida pelo sistema para gerar plasma. De acordo com Liang et al. (2011), a pressão atmosférica exige maiores níveis de energia para sustentar o sistema de plasma em relação às baixas pressões. Quando se aplica uma descarga elétrica alta o suficiente para as condições do reator, ocorre a ionização do gás e formação do plasma de descarga luminescente. Porém, diante da aplicação excessiva de um dos parâmetros como alta pressão ou alta tensão, a descarga pode se tornar um arco devido ao abrupto processo de ionização (OLIVEIRA JUNIOR, 2002).

Figura 19. Faixas de frequência de geração de plasma frio nas tensões máximas (V_{\max}) alcançadas pela fonte de alta tensão, 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior em diferentes pressões absolutas: (+) pressão atmosférica; (■) 0,87 atm; (◆) 0,74 atm; (▲) 0,61 atm; (x) 0,47 atm; (*) 0,34 atm e (●) 0,21 atm.

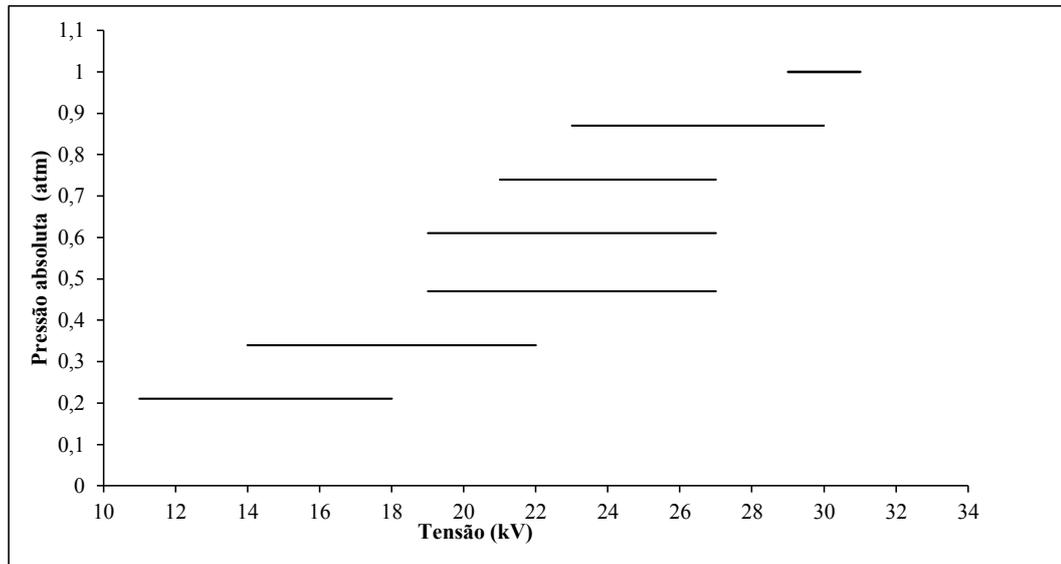


Para a pressão absoluta de 0,34 atm e à V_{\max} de 22 kV, obteve-se a maior faixa de frequência, de 30 a 330 Hz, capaz de gerar plasma. Para dois valores de pressões absolutas, 0,61 e 0,47 atm, as frequências obtidas com a presença de plasma são muito próximas, de 30 a 230 Hz e 30 a 237 Hz, respectivamente.

Nos testes seguintes, com o intuito de conhecer o intervalo de tensão capaz de gerar plasma; fixou-se a frequência em seu valor mínimo (f_{\min}) de 30 Hz e mantiveram-se os parâmetros de distância do eletrodo superior ao dielétrico, ar como gás ionizante nas pressões absolutas testadas (Figura 20).

Observa-se que os intervalos de tensão alcançados nas pressões absolutas de 0,61 e 0,47 atm continuam semelhantes para a formação de plasma, concordando com o comportamento já identificado na Figura 19. A condição de menor pressão investigada, 0,21 atm, gerou plasma nos menores valores de tensão, de 11 a 18 kV, corroborando mais uma vez com os dados da Figura 19 e com a literatura que relata que menores pressões exigem menos energia do sistema.

Figura 20. Faixas de tensão com a presença de plasma na frequência mínima (f_{\min}) de 30 Hz, 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior e em diferentes pressões absolutas



As descargas de gás em estados estáveis podem ser classificadas em três tipos: descarga escura (corrente menor que 10^{-6} A), descarga luminescente (corrente entre 10^{-6} a 10^{-1} A) e descarga de arco (corrente superior a 10^{-1} A). Sendo que, a luminescência do plasma obedece à seguinte lei: o comprimento do espaço escuro do catodo é inversamente proporcional à pressão. Ou seja, a descarga luminescente do plasma em baixas pressões é mais facilmente produzida e mantida em relação ao plasma de pressões atmosféricas ou superiores (OLIVEIRA JUNIOR, 2002; HOWATSON, 2013).

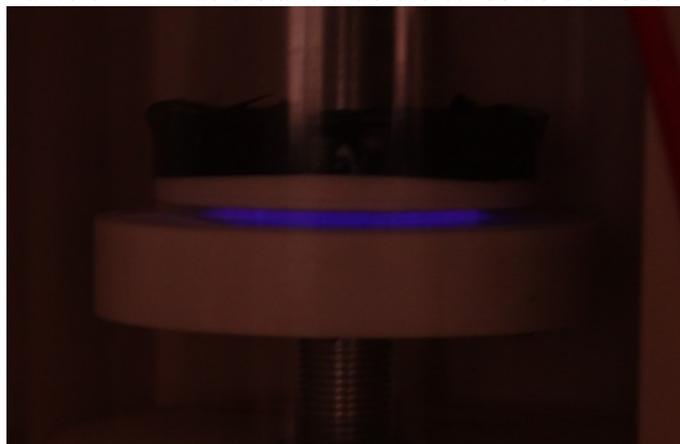
Neste sentido, observou-se que o plasma à pressão atmosférica realmente exigiu mais da fonte de alta tensão, quando o botão multi-voltas estava em seu máximo, a fonte chegou a atingir uma descarga de 34 kV em alguns valores de frequência. Enquanto que, para a f_{\min} de 30 Hz, obteve-se se um intervalo de tensão de 29 a 31 kV com a presença de plasma (Figura 20).

Os resultados obtidos mostram que o reator DBD pode ser utilizado em uma ampla faixa de pressões, frequências e tensões. Os valores das faixas de tensão estão dentro dos valores típicos encontrados em trabalhos da literatura, de 5 a 40 kV. O f_{\min} encontrado está abaixo dos valores típicos da literatura que costumam ser a partir de 50 Hz (ELIASSON; KOGELSCHATZ, 1991; WAGNER et al., 2003). Porém, estes valores dependem do modelo do reator, do material do dielétrico, do gás utilizado e demais condições aplicadas (XU, 2001; PANKAJ et al., 2014).

Mesmo diante da maior dificuldade de se gerar e manter o plasma frio na pressão atmosférica, essa foi a condição escolhida para a continuação do trabalho, pensando numa possível aplicação industrial. Um processo com baixa pressão exige a implantação e manutenção de um sistema mais complexo e caro (LOPES, 2013). O ar como gás ionizante também foi uma escolha visando a aplicação industrial, especialmente o custo. Além de que, estudos reportam que o plasma gerado a partir do ar é possível alcançar significativas mudanças na molhabilidade, impressão e adesão de polímeros (KOGELSCHATZ; ELIASSON; EGLI, 1999; KOGELSCHATZ, SALGE; 2001; WIACEK, 2015).

A tensão escolhida para o tratamento do PELBD foi a máxima alcançada pelo aparato experimental (32 kV), na frequência de 132 Hz, na distância entre eletrodo superior e dielétrico já determinada em 4 mm. Nestas condições, percebeu-se a presença de plasma com menores oscilações, numa tonalidade luminescente intensa e de regime filamentar (Figura 21).

Figura 21. Foto do plasma gerado a 32 kV, 132 Hz, pressão atmosférica, ar atmosférico como gás ionizante e 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior.



4.1.2 Análise das alterações causadas nos filmes de PELBD tratados com plasma frio

Através das medidas do ângulo de contato dos filmes de PELBD tratados de 30 a 180 s de plasma frio nas condições estabelecidas, 32 kV, 132 Hz, em ar e pressão atmosférica com 4 mm de distância do dielétrico ao eletrodo superior (Figura 22 e Tabela 4), observou-se a alteração do caráter hidrofóbico dos filmes, bem como de sua energia superficial total livre (Tabela 4).

Figura 22. Fotos de uma gota de água sobre a superfície de PELBD: a) não tratado; e tratados com plasma DBD por b) 30 s; c) 60 s; d) 120 s; e) 180 s.

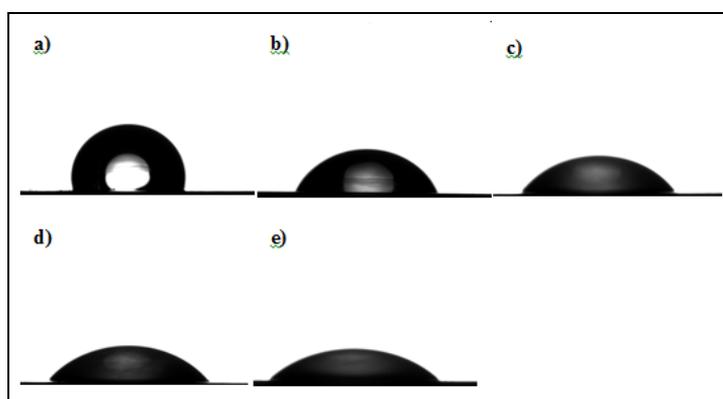


Tabela 4. Média das medidas do ângulo de contato em água e energia livre de superfície total (γ) e seus componentes: polar (γ^p) e dispersivo (γ^d) com seus respectivos desvios padrão.

| Tempo de exposição | Ângulo de contato em água (°) | γ^p (mN.m ⁻¹) | γ^d (mN.m ⁻¹) | γ (mN.m ⁻¹) |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 95,79 ± 0,63 ^a | 2,50 ± 0,18 ^a | 28,36 ± 0,85 ^a | 30,87 ± 0,67 ^b |
| 30 s | 64,30 ± 1,52 ^b | 8,94 ± 1,73 ^{ab} | 38,39 ± 2,71 ^b | 48,31 ± 0,98 ^c |
| 60 s | 50,77 ± 1,08 ^c | 12,23 ± 1,28 ^b | 38,73 ± 1,71 ^b | 50,96 ± 0,43 ^c |
| 120 s | 48,41 ± 1,27 ^c | 13,64 ± 1,77 ^b | 39,36 ± 1,85 ^b | 52,34 ± 0,06 ^c |
| 180 s | 45,41 ± 2,10 ^c | 18,37 ± 2,55 ^b | 40,57 ± 0,85 ^b | 58,94 ± 1,70 ^a |

Médias com letras diferentes em cada coluna diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

Observa-se que o filme de PELBD não tratado apresenta caráter hidrofóbico, ou seja, ângulo de contato superior a 90° (ADAMSON, 1990; KWOK et al., 1998). Após o tempo mínimo de tratamento com plasma frio (30 s), ocorre a redução significativa no ângulo de contato do filme. A mesma redução significativa aconteceu para a amostra tratada por 60 s com um ângulo de contato de 50,77°, enquanto que pelo teste de Tukey, os demais tratamentos (120 e 180 s) não apresentaram diferença significativa em relação a esse ângulo. Ao final dos 180 s de tratamento, foi possível atingir uma redução de 50,38°, resultando numa superfície hidrofílica com 45,41° de ângulo de contato. Isso porque a aplicação de plasma frio sobre um polímero pode gerar grupos funcionais capazes de tornar a superfície do mesmo, mais hidrofílica e acarretar também em alterações da rugosidade (FERNÁNDEZ-BLÁZ et al., 2011; PASCUAL et al, 2008; LOPES, 2017).

Na Tabela 4, nota-se que, em relação ao componente dispersivo, referente à fração apolar da superfície, as amostras tratadas com plasma a frio não apresentaram diferenças significativas entre si. Porém, apresentaram diferença significativa em relação à superfície sem tratamento.

No componente polar de energia de superfície, a alteração foi maior do que a alteração na componente dispersiva e os tempos de tratamento influenciaram nesta alteração. A amostra que permaneceu sob plasma por 180 s não apresentou um aumento significativo em relação às demais amostras tratadas. Porém, a amostra tratada por apenas 30 s, não sofreu alteração significativa em relação à amostra de PELBD sem aplicação de plasma. Esperava-se este aumento na componente polar de energia de superfície, pois as espécies reativas de oxigênio que podem ser geradas pelo plasma interagem física e quimicamente na superfície do polímero podendo quebrar ligações químicas de sua estrutura (C-H, C-C). Estas podem se recombinar com as espécies reativas e formar grupos polares com características hidrofílicas (ALVES, et al., 2011; MEEMUSAW, MEGARAPHAN, 2016).

Para a energia livre de superfície total a amostra sem tratamento e a amostra tratada durante o maior tempo (180 s) apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) em relação às demais. Enquanto que, os filmes submetidos ao plasma por 30, 60 e 120 s não apresentaram diferenças significativas.

De um modo geral, os filmes de PELBD apresentaram um aumento na energia superficial total, resultado do aumento de ambos componentes (polar e dispersivo) de energia. Este aumento de energia livre total de superfície possibilita a compatibilização do PELBD com outros polímeros para a obtenção dos filmes multicamadas.

Karam et al. (2016) aplicaram plasma frio de radiofrequência com 13,56 MHz gerado em N_2 por 300 s e obtiveram aumento na energia livre de superfície total de 34,7 para 57,5 $mN.m^{-1}$. Valores semelhantes aos obtidos neste trabalho com a exposição de 120 e 180 s. Porém, no trabalho Karam e colaboradores, o aumento ocorreu somente devido à porção polar.

Kaminska; Kackmarek e Kowalonek (2002) avaliaram o aumento da energia livre de superfície total de diferentes polímeros, como PE, polipropileno (PP), politereftalato (PET) e polimetilmetacrílico (PMMA) com plasma frio na frequência de 2860 MHz e 2×10^{-2} mbar de pressão. Observou-se um aumento em ambos componentes de energia de superfície, evidenciando que a quantidade de grupos funcionais na superfície aumentou após a exposição.

Sendo que, os maiores aumentos da energia aconteceram para os polímeros PET e PMMA, seguidos do PE e por último o PP. Para o PE, o aumento da energia livre de superfície total ocorreu de 34,19 até 57,18 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em 60 segundos, Neste trabalho, obteve-se um aumento semelhante em 120 s, pode-se atribuir esta diferença de tempo às diferenças das condições aplicadas para a geração do plasma.

Popelka et al. (2015) aplicaram plasma frio de barreira de superfície coplanar difusa em pressão atmosférica em ar durante 15 s com o objetivo de enxertar ácido poliacrílico em PELBD. Neste estudo, também ocorreu o aumento dos componentes polar e dispersivo resultando num aumento da energia superficial total de 31,7 para 45,6 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Além das alterações superficiais de molhabilidade e energia livre de superfície, o plasma frio também causou modificações na opacidade dos filmes de PELBD (Tabela 5). Observa-se que, tanto no espectro de absorção visível (400 nm) quanto no ultravioleta (270 nm), a amostra de PELBD apresentou diferença significativa em relação às amostras tratadas.

Tabela 5. Média e desvio padrão da opacidade dos filmes de PELBD (não tratado) e PELBD tratado com plasma por diferentes intervalos de tempo.

| Comprimento de onda (nm) | Opacidade (mm^{-1}) | | | | |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | PELBD | PELBD 30s | PELBD 60s | PELBD 120s | PELBD 180s |
| 270 | $2,56 \pm 0,07^a$ | $3,30 \pm 0,08^b$ | $3,52 \pm 0,06^b$ | $3,45 \pm 0,01^b$ | $3,55 \pm 0,02^b$ |
| 400 | $1,72 \pm 0,03^a$ | $2,15 \pm 0,04^b$ | $2,30 \pm 0,05^b$ | $2,26 \pm 0,00^b$ | $2,31 \pm 0,02^b$ |

Médias com letras diferentes em cada linha diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

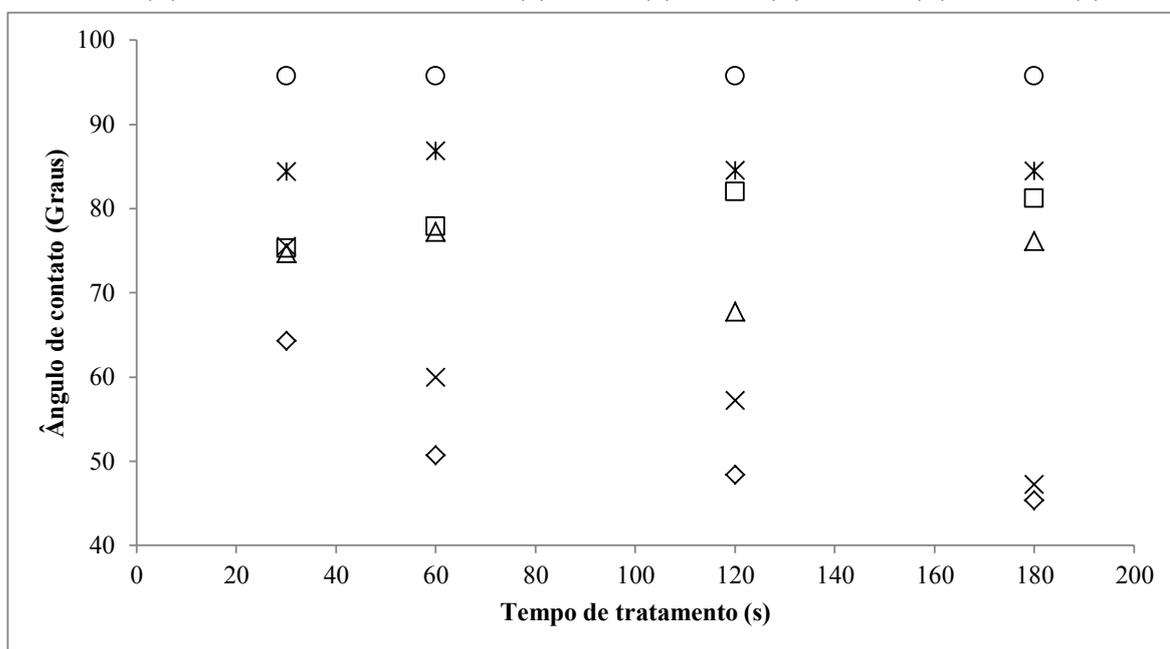
As amostras submetidas ao plasma não apresentaram diferenças significativas entre si, em ambos os comprimentos de onda. Pode-se concluir que, mesmo diante de um tratamento mais longo para a obtenção de maior hidrofobicidade do filme, a transparência do mesmo não será prejudicada em relação aos demais tratamentos com menor redução do ângulo de contato. Medeiros (2017) produziu filmes a partir do mesmo lote de *pellets* de PELBD e obteve opacidade de $1,34 \text{ mm}^{-1}$ para o comprimento de onda de 600 nm. Esta diferença pode ter ocorrido em virtude da diferença na espessura dos filmes obtidos, as adaptações de temperatura e tempos utilizados para na produção destes filmes, ou ainda, devido à diferença nos comprimentos de onda utilizados para a análise.

4.1.2.1 Estudo da reversibilidade do efeito do plasma frio

Existe uma tendência de reversão da hidrofiliicidade com o tempo devido à mobilidade das moléculas poliméricas, o que permite a reorganização dos grupos polares da superfície buscando minimizar a energia livre de superfície (DE GEYTE; MORENT; LEYS, 2008; MORTAZAVI; NOSONOVSKY, 2012; WIACEK, 2015; MEZARROBA, 2017). Observa-se o aumento do ângulo de contato dos filmes tratados com o tempo de armazenamento, indicando a recuperação parcial do caráter hidrofóbico destes filmes (Figura 23).

No dia em que se aplicou o tratamento de plasma frio (dia 0), a amostra submetida ao plasma por 30 s apresentou a menor alteração na superfície com ângulo de contato de $64,3^\circ$ e a amostra tratada por 180 s atingiu o ângulo de $45,4^\circ$. Nota-se significativo aumento na molhabilidade, de cerca de $31,5^\circ$ e $50,39^\circ$ nas amostras tratadas pelo menor e maior tempo, respectivamente.

Figura 23. Média do ângulo de contato dos filmes armazenados em função dos tempos de tratamento: (○) PELBD sem tratamento; (◇) dia 0; (x) dia 5; (Δ) dia 10; (□) dia 20 e (*) dia 30.



No 5º dia após o tratamento, as amostras submetidas ao plasma por 30, 60 e 120 s apresentaram a reversão de aproximadamente 10° do ângulo de contato. Enquanto que, a amostra tratada por 180 s, praticamente não havia iniciado seu processo de reversão. Porém,

10 dias após o tratamento as amostras expostas durante 30, 60 e 180 s apresentam ângulos de contato semelhante de 74, 69, 77,25 e 76,19, respectivamente. Ainda no 10º dia, a amostra com menor ângulo de contato é a tratada por 120 s, com 67,78°.

Ao final dos 30 dias, todas as amostras se assemelharam nos valores de ângulos de contato, em torno de 85°. Observando ainda que, as amostras expostas por 120 e 180 s entre os dias 20 e 30, não apresentaram significativas alterações em seus ângulos de contato, indicando estabilidade no processo de reversão.

Logo, a escolha do tempo de tratamento deve ser realizada de acordo com a aplicação do polímero. Diante da necessidade de pequena alteração na molhabilidade e a aplicação/tratamento subsequente demorar, o tratamento de apenas 30 s é interessante, pois irá apresentar a mesma molhabilidade que a superfície tratada por mais tempo. Porém, quando se deseja uma superfície mais hidrofílica, recomenda-se maior exposição ao plasma com a utilização do filme logo após o tratamento.

Meemusaw e Megaraphan (2016) avaliaram a redução do ângulo de contato e a sua reversibilidade em filmes e *pellets* de PEAD. Para isto, as amostras de filmes foram submetidas ao plasma comercial com tensão de 6 kV e frequência de 10 kHz utilizando tempos de tratamento de 15 a 120 s. Já os *pellets*, foram tratados com plasma (pressão atmosférica e mistura de ar com gás nitrogênio) e imediatamente foram submetidos à extrusão. Os filmes tratados com plasma apresentaram redução no ângulo de contato de 96,8 até 43,8° com 120 s de tratamento, após 450 dias o ângulo de contato retornou a cerca de 70°. Enquanto que, os filmes obtidos a partir de *pellets* tratados apresentaram menor redução no seu ângulo de contato, chegando a 80° com 15 s de tratamento e aumentando para 88° com 120 s de tratamento. Porém, surpreendentemente, após os 450 dias as amostras tratadas por 120 s continuaram reduzindo seu ângulo de contato até cerca de 80°. Os autores atribuem este comportamento à estrutura reticulada gerada pelo plasma, e acreditam que no maior tempo de tratamento, os grupos polares aparecem menos na superfície polimérica e com o tempo ocorreu o rearranjo destes para a superfície aumentando ainda a molhabilidade.

Švorčík et al. (2006) compararam o efeito reversível em superfícies de PELBD e PEAD expostas ao plasma atmosférico, com potência de 1,7 W por até 400 s. O PELBD obteve menor redução no ângulo de contato logo após o tratamento, mas também apresentou menor efeito de reversibilidade em relação ao PEAD. Segundo os pesquisadores, o maior grau de reticulação dessas amostras, estaria limitando o rearranjo das moléculas. Neste estudo

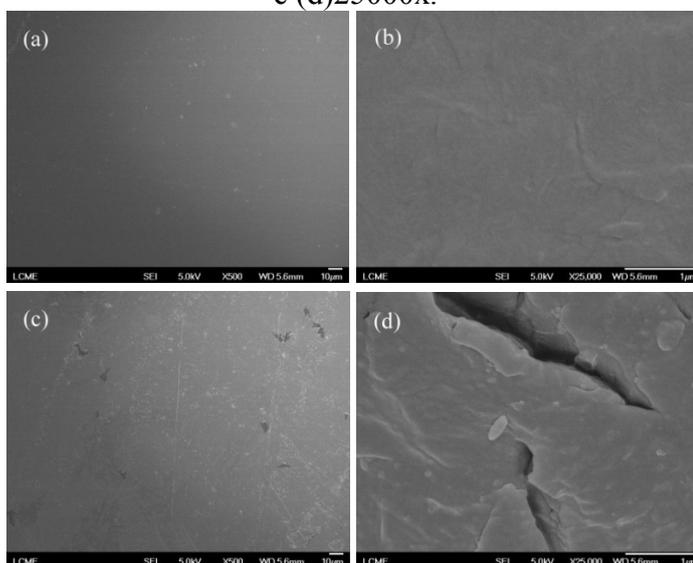
ainda, a reversibilidade foi avaliada após o período de 386 horas depois da exposição e o maior efeito reversível aconteceu para as amostras tratadas por maior tempo, concordando com o presente estudo.

Para as etapas seguintes deste trabalho, optou-se pelo tempo de exposição ao plasma frio de 120 s por se tratar de um tratamento intermediário, por atingir um ângulo de contato semelhante à amostra exposta por 180 s e pelo maior tempo necessário para a reversão da hidrofilicidade.

4.1.2.2 Alterações na superfície dos filmes PELBD tratados com plasma

A erosão química é a principal responsável pela alteração na rugosidade e topografia das superfícies dos filmes, causada pelas espécies ativas geradas pelo plasma (MEZARROBA, 2017). Assim, através de FEG foi observada a alteração na superfície do PELBD submetido às condições determinadas (32 kV, 132 Hz, 4mm de distância do eletrodo superior ao dielétrico em ar e pressão atmosférica) pelo tempo de 120 s (Figura 24).

Figura 24. Imagens dos filmes de PELBD obtidas por microscopia eletrônica: não tratado na ampliação de (a) 500x e (b) 25000x; e tratado com plasma por 120 s na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x.



As micrografias do filme de PELBD não tratado (Figura 24.a e 24.b) apresentam superfície lisa com pequenas deformações devido ao aquecimento da termoprensa e as imperfeições do molde de Mylar. As imagens do filme tratado indicam aumento na

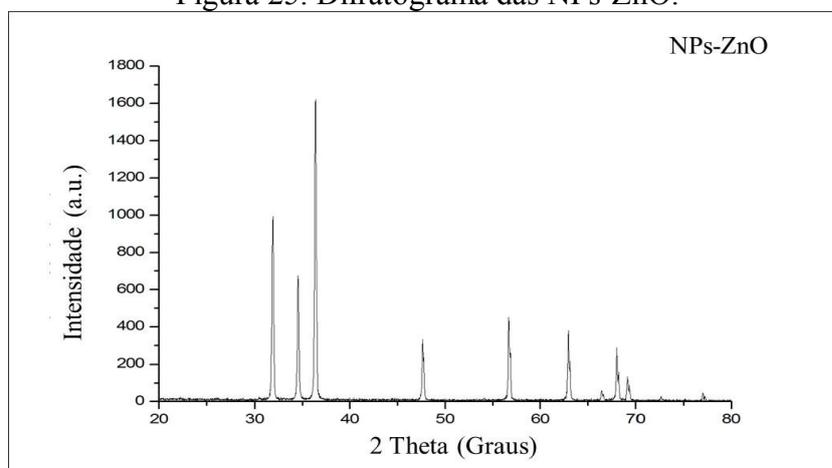
quantidade de imperfeições, e na imagem com aumento de 25000x fica nítida a modificação da superfície com a presença de fraturas e irregularidades causadas pelas colisões das espécies características do plasma (elétrons, fótons, nêutrons e íons) sobre o polímero.

Yan et al. (2015) investigaram o aumento da rugosidade e hidrofobicidade em três tipos de poliolefinas (polietileno, polipropileno e poliéster-polipropileno (PP-PET)) submetidas a três tipos de plasma: por acoplamento indutivo, por radiofrequência em baixa pressão e DBD à pressão atmosférica. Os autores constataram que a maior hidrofobicidade foi alcançada pelo PE tratado com plasma DBD, enquanto que a maior rugosidade para o PE foi alcançada pelo plasma por acoplamento indutivo. Porém, eles ressaltam ainda que, graves danos na superfície de um filme pode comprometer outras propriedades, como as mecânicas. As imagens dos filmes PE exposto ao plasma a frio DBD são semelhantes às obtidas pelo presente estudo, onde se observam alterações na superfície, porém sem descaracterizá-la.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

A técnica de DRX foi utilizada para investigar a estrutura cristalina das NPs-ZnO. O difratograma obtido (Figura 25) confirma que as partículas não contêm impurezas e apresentam estrutura hexagonal wurtzita do ZnO com grupo espacial $P6_3mc$ e com parâmetros de rede a e $b = 3,24 \text{ \AA}$ e $c = 5,19 \text{ \AA}$ e picos de difração que conferem com as informações obtidas nas fichas do banco de dados de ICSD, ficha PDF nº 01-075-0576.

Figura 25. Difratograma das NPs-ZnO.



A partir da análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram determinados a morfologia e o tamanho das nanopartículas. Na Figura 26, observa-se a presença majoritária de partículas no formato de bastão com uma grande heterogeneidade nos tamanhos das mesmas. No comprimento, há predominância de partículas de 90 a 280 nm com 82,07% das NPs-ZnO (Fig. 27.a) e na espessura a predominância fica entre 70 e 180 nm com 88,3% das NPs-ZnO (Fig. 27.b). Assim, o ZnO utilizado é considerado nanopartícula, que podem ser considerados os materiais com pelo menos uma dimensão menor que 1 μm (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Figura 26. Imagem das NPs-ZnO.

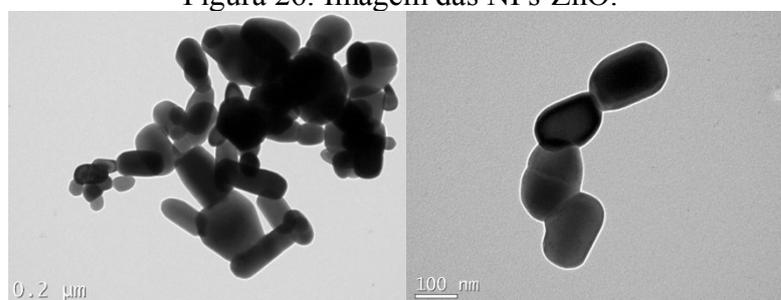
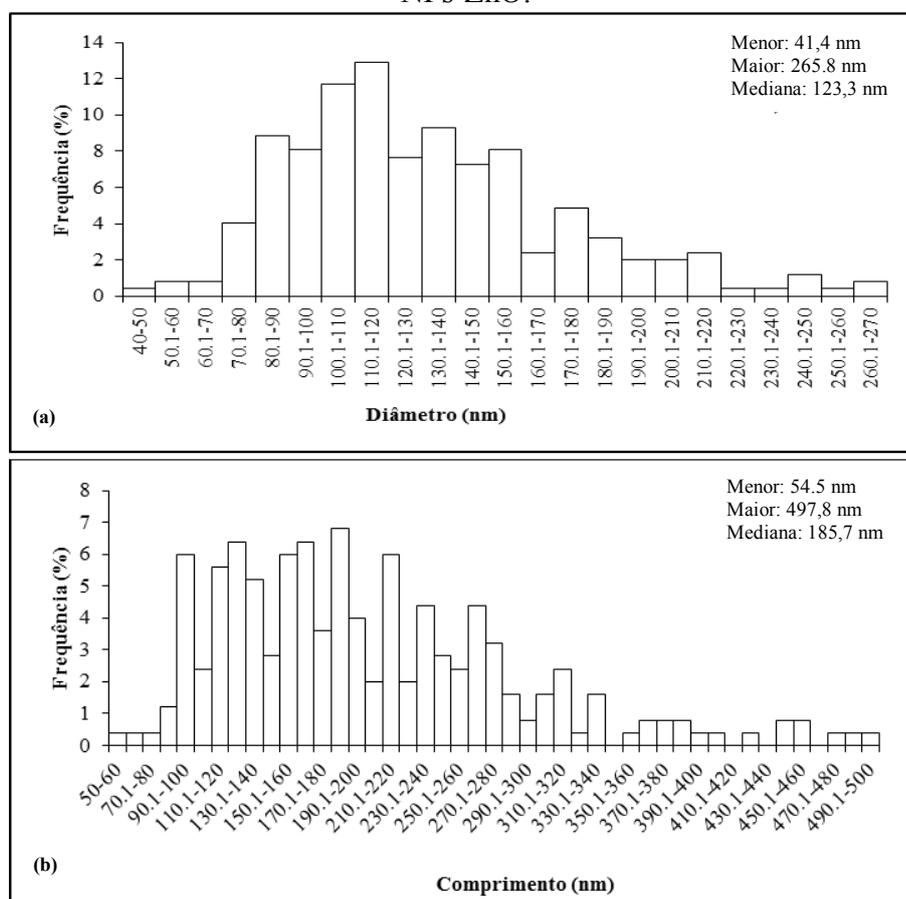


Figura 27. Histograma de distribuição de tamanho de (a) diâmetro e (b) comprimento das NPs-ZnO.



4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

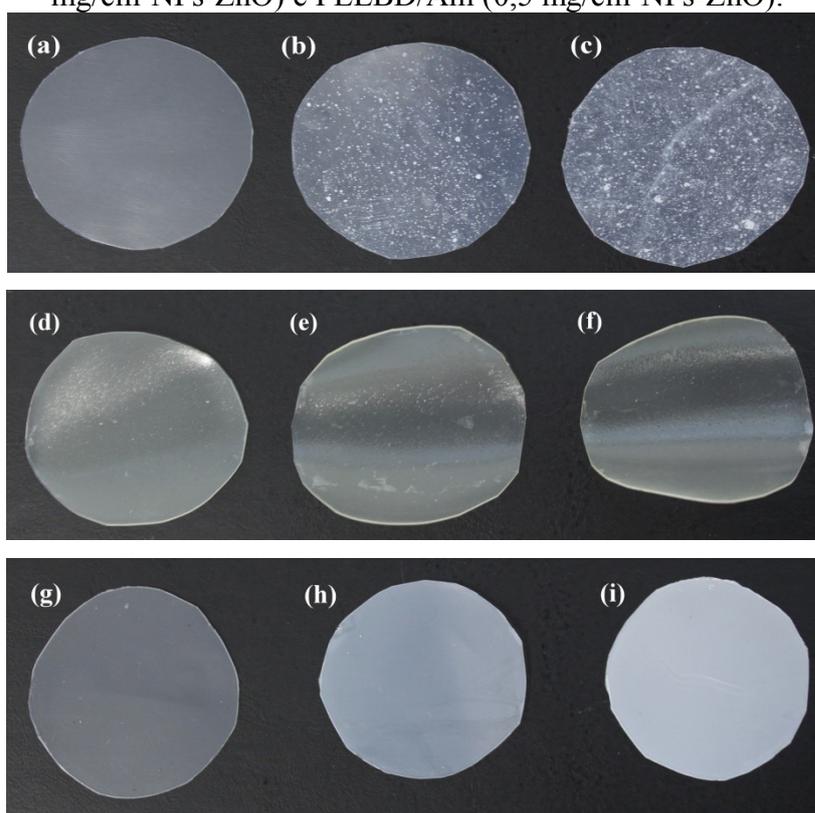
4.3.1 Aspectos visuais, análise de cor e opacidade

Os filmes de PELBD obtidos na termoprensa resultaram em um material flexível, sendo que esta característica se manteve após a incorporação das NPs-ZnO por aspersão e também nos filmes multicamadas.

O filme de PELBD puro resultou em uma superfície transparente, homogênea e com brilho uniforme (Figura 28.a). Entretanto, os filmes aos quais as NPs-ZnO foram acrescentadas por aspersão (Figura 28.b e 28.c), apresentaram aglomerados visíveis das NPs. Isto se deve ao método de incorporação das mesmas com posterior evaporação da água em

termoprensa, o que acelera a tendência das gotículas de água (que contém as NPs) a coalescerem.

Figura 28. Fotografias dos filmes: (a) PELBD puro; (b) PELBD/Asp. ($0,9 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO); (c) PELBD/Asp. ($1,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO); (d) PELBD/QTS; (e) PELBD/QTS ($0,2 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO); (f) PELBD/QTS ($0,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO); (g) PELBD/Am; (h) PELBD/Am ($0,2 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO) e PELBD/Am ($0,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO).

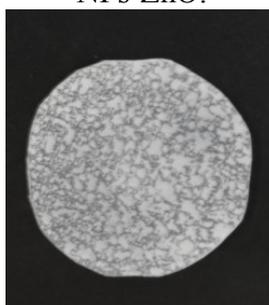


Os filmes multicamadas de PELBD/QTS mantiveram a transparência, a flexibilidade e uniformidade na superfície com visível aumento do brilho na superfície das amostras (Figura 28.d). Os filmes com a camada de QTS contendo as NPs-ZnO ficaram homogêneos (Figura 28.e e 28.f), não sendo possível se perceber a presença das NPs como nos demais filmes (com aspersão e com a camada de amido com ZnO).

Os filmes multicamadas de PELBD/Am (Figura 28.g), também conservaram a transparência, a flexibilidade, brilho e uniformidade na superfície. Mas, com a adição das NPs-ZnO ao biopolímero, a cor foi alterada tornando o filme esbranquiçado (Figura 28.h, 28.i). A amostra com maior concentração NPs resultou em um filme com aspecto leitoso e opaco.

Percebeu-se que, com o aumento da molhabilidade, a água com as NPs-ZnO se espalhou ao longo da superfície (Figura 29). A quantidade de solução com NPs-ZnO aplicada sobre o filme é a mesma quantidade de solução aplicada sobre o filme da Figura 28.c, mas, não é possível afirmar que a concentração em mg/cm^2 de NPs-ZnO é a mesma. Apesar do aspecto visual, este aumento na hidrofiliçidade poderia ser interessante e representar maior espalhamento das NPs-ZnO ao longo da superfície. Porém, através do contato, não foi percebida a presença das NPs na superfície na superfície como nos demais filmes obtidos por aspersão, possivelmente devido à entrada e ao aprisionamento destas no interior da matriz polimérica. Optou-se por não dar sequência à funcionalização através do plasma frio dos filmes de PELBD com aspersão das NPs-ZnO, e aplicar esta tecnologia apenas aos filmes multicamadas.

Figura 29. Fotografia do filme de PELBD tratado com plasma frio com posterior aspersão de NPs-ZnO.



Nos resultados da análise de cor (Tabela 6), percebe-se que para o parâmetro L^* , o filme de PELBD/Am ($0,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$ NPs-ZnO) apresenta tonalidade branca, conforme observado na Figura 28. Enquanto que, o filme de PELBD/QTS apresenta diferença significativa aos demais com menor tendência a coloração branca. Para o parâmetro a^* , a amostra de PELBD puro, PELBD incorporados com as NPs por aspersão e os filmes de PELBD/Am com e sem as NPs-ZnO, não apresentaram diferença significativa entre si e apresentam tendência à tonalidade esverdeada. Os filmes de PELBD/QTS com e sem as nanopartículas apresentam maior tendência à tonalidade verde.

No parâmetro b^* , os filmes de PELBD puro e aspersos apresentam tendência à tonalidade azul, enquanto que nos filmes multicamadas com amido essa tendência é menor. Já, os filmes multicamadas com QTS, apresentaram uma tendência para a coloração amarela, o que também já estava evidente na Figura 28.

Siripatrawan e Harte (2010) produziram filmes de quitosana com posterior incorporação de extrato de chá verde; para o parâmetro L^* de cor do filme de QTS puro, os valores são semelhantes ao do presente trabalho, para o parâmetro b^* também foi encontrada uma tendência ao amarelo. Mas, o parâmetro a^* obtido pelos autores, difere-se do presente trabalho, apresentando uma tendência a colocação vermelha, o que pode ocorrer devido as diferentes concentrações de quitosana no filme, bem como as suas características específicas como massa molecular e grau de desacetilação, e ainda, no caso do filme multicamada, pela presença do PELBD.

Observando a Tabela 6, referente aos valores de opacidade, nota-se que para o comprimento de onda do espectro UV (270 nm), os filmes de PELBD puro e os filmes multicamadas PELBD/QTS e PELBD/Am apresentaram os menores valores de opacidade, sem diferença significativa entre si ($p \geq 0,05$), ou seja, possuem maior transparência. E os filmes com adição das NPs-ZnO resultaram em filmes mais opacos, destacando-se o filme multicamada de PELBD/Am com a maior concentração de NPs-ZnO como o filme menos transparente. Essa característica pode ser vantajosa para alimentos que apresentam sensibilidade a luz, como aqueles que possuem altos teores de lipídios; ou pode não ser vantajosa, quando se deseja que a embalagem permita a visualização do produto nela armazenada.

Ao se observar os resultados para o comprimento de onda de 400 nm, percebe-se que os filmes multicamadas com amido (com e sem as NPs) e o filme de aspersão com a maior concentração de ZnO apresentaram os maiores valores para opacidade, sem diferenças significativas entre si.

Tabela 6. Média das medidas dos parâmetros de cor e opacidade dos filmes de PELBD puro e com adição de NPs-ZnO com seus respectivos desvios padrão.

| Amostra de filme | Análise de cor | | | Opacidade (mm ⁻¹) | |
|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | L* | a* | b* | 270 nm | 400 nm |
| PELBD puro | 90,41 ± 0,29 ^{bc} | -1,27 ± 0,00 ^c | -1,23 ± 0,12 ^d | 2,56 ± 0,07 ^{bc} | 1,72 ± 0,03 ^b |
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 90,96 ± 0,21 ^{bc} | -1,21 ± 0,01 ^c | -1,46 ± 0,24 ^d | 2,63 ± 0,03 ^c | 1,86 ± 0,06 ^b |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 91,49 ± 0,07 ^{bc} | -1,17 ± 0,28 ^c | -1,70 ± 0,07 ^d | 2,74 ± 0,18 ^c | 1,98 ± 0,19 ^{ab} |
| PELBD/QTS | 89,45 ± 1,05 ^c | -3,10 ± 0,03 ^a | 5,90 ± 0,30 ^a | 1,95 ± 0,48 ^b | 1,27 ± 0,01 ^b |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 90,37 ± 0,41 ^{bc} | -2,51 ± 0,28 ^b | 3,42 ± 0,62 ^b | 2,64 ± 0,01 ^c | 1,60 ± 0,01 ^b |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 90,07 ± 0,38 ^{bc} | -2,41 ± 0,11 ^b | 2,81 ± 0,27 ^b | 2,87 ± 0,05 ^c | 1,69 ± 0,02 ^b |
| PELBD/Am | 91,25 ± 0,72 ^{bc} | -1,19 ± 0,05 ^c | -0,40 ± 0,23 ^c | 1,83 ± 0,00 ^b | 2,56 ± 1,32 ^{ab} |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 92,42 ± 0,37 ^b | -1,29 ± 0,06 ^c | -0,17 ± 0,17 ^c | 3,20 ± 0,04 ^c | 2,89 ± 0,02 ^{ab} |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 95,39 ± 0,32 ^a | -1,32 ± 0,05 ^c | -0,25 ± 0,18 ^c | 5,42 ± 0,03 ^a | 4,45 ± 0,04 ^a |

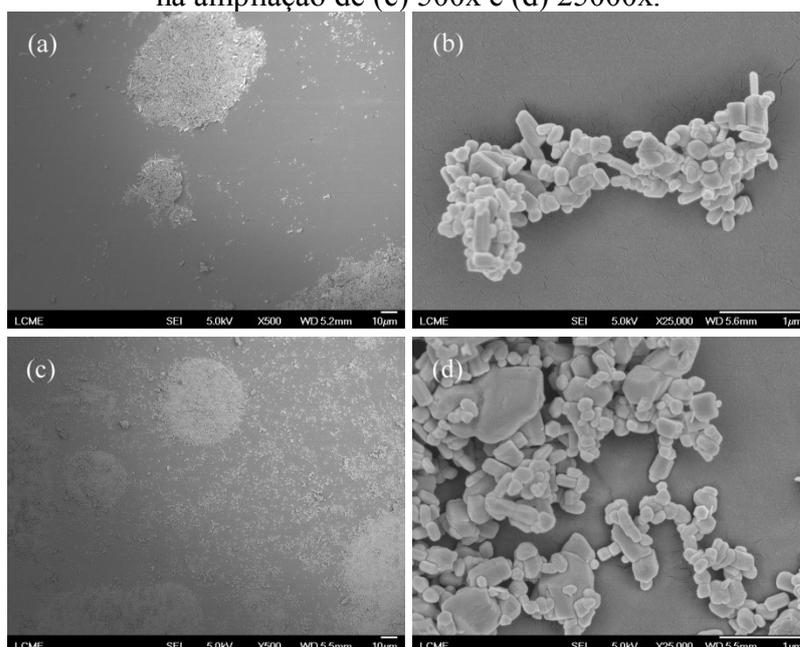
Médias com letras diferentes nas colunas diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG) com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

A observação da topografia e da morfologia é muito importante para verificar a superfície e examinar o recobrimento dos filmes de PELBD com os biopolímeros e a maneira como as NPs-ZnO ficaram depositadas nas diferentes amostras.

As imagens das superfícies dos filmes obtidos por aspersão mostram grande heterogeneidade na distribuição das NPs-ZnO (Figura 30), o que já era possível identificar visualmente (Figura 28). Observa-se a presença de aglomerados nos filmes obtidos com ambas as concentrações de NPs (Figura 30.a, 30.b, 30.c, 30.d).

Figura 30. Imagens dos filmes de PELBD obtidas por microscopia eletrônica: aspersão de $0,9 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO na ampliação de (a) 500x e (b) 25000x e aspersão de $1,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x.

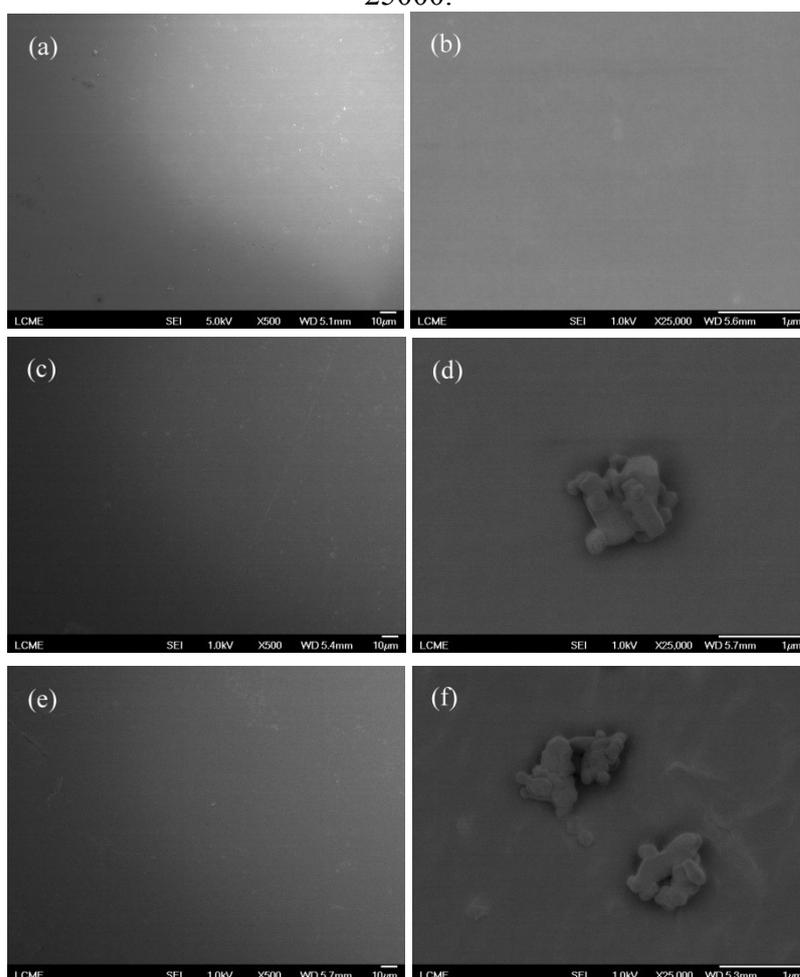


Pode-se visualizar nas imagens de microscopia, pequenos e grandes aglomerados que, provavelmente, se formaram já no momento da aspersão, uma vez que as gotículas de água tendem a coalescer e este processo pode se intensificar no momento da evaporação do solvente. Logo, no filme com maior concentração de NPs e conseqüentemente maior quantidade de solução aspersa, resultou numa amostra com maior quantidade e tamanho de aglomerados.

As imagens dos filmes multicamadas foram obtidas com dificuldade, pois, durante a aproximação, ajuste de foco e obtenção das imagens, o local selecionado da amostra degradava mesmo com a redução da tensão aplicada no equipamento para 1.0 kV, comprometendo a qualidade das imagens.

As imagens dos filmes multicamadas de PELBD/QTS (Figura 31.a e 31.b) mostram uma superfície lisa, com pequenas imperfeições. No aumento de 500x, verifica-se uma superfície lisa para os filmes de PELBD/QTS com as duas concentrações de NPs-ZnO (Figura 31.c e 31.e).

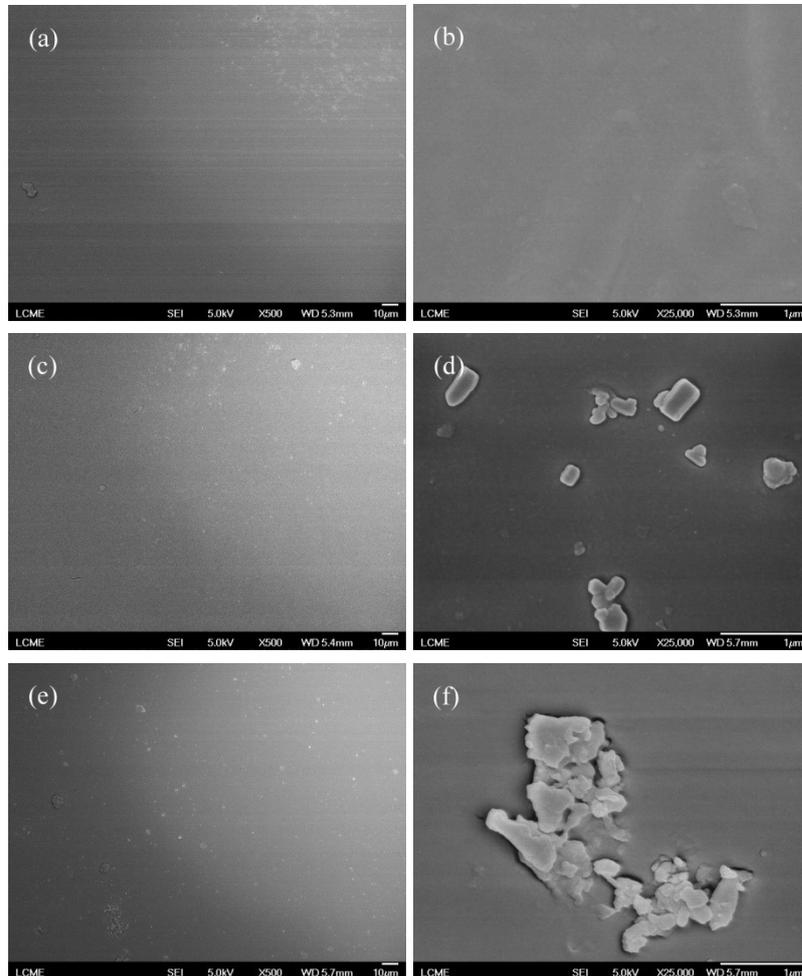
Figura 31. Imagens dos filmes de PELBD/QTS obtidas por microscopia eletrônica na ampliação de (a) 500x e (b) 25000x; PELBD/QTS (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x e PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) na ampliação de (e) 500x e (f) 25000.



Já no aumento de 25000x, observa-se a presença de pequenos aglomerados (Figura 31.d e 31.f) onde não se consegue ter uma visualização nítida das NPs, indicando a interação entre a quitosana e as NPs-ZnO possivelmente pela ação quelante desse biopolímero sobre o ZnO. Devido a menor concentração de NPs e melhor distribuição em relação ao filme produzido com a aspersão do ZnO, ocorreu a formação de pequenos aglomerados, possibilitando uma maior interação das NPs com o meio.

Os filmes de PELBD/Am também apresentaram uma superfície lisa (Figura 32.a e 32.b) com pequenas deformações que podem ser resultantes da secagem não uniforme. Nestes filmes multicamadas com a adição das NPs-ZnO, nota-se que as nanopartículas se encontram distribuídas em aglomerados, também recobertos pelo amido. Estes aglomerados se apresentam como pontos esbranquiçados nos aumentos de 500x (Figura 32.c e 32.e) evidenciados nas ampliações de 25000x (Figuras 32.d e 32.f).

Figura 32. Imagens dos filmes de PELBD/Am obtidas por microscopia eletrônica na ampliação de (a) 500x e (b) 25000x; PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) na ampliação de (c) 500x e (d) 25000x e PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) na ampliação de (e) 500x e (f) 25000.



A análise de EDS das amostras com quitosana e amido, também foi realizada com dificuldade, pois, no momento da varredura de áreas específicas, as amostras degradavam ainda mais do que no momento de obtenção imagem de FEG. Isto pode ter causado alteração nas proporções dos elementos, no entanto, a presença de ZnO nos filmes em que as nanopartículas foram incorporadas foi comprovada (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados de EDS e seus respectivos desvios padrão para os filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO, PELBD/Am e PELBD/Am com NPs-ZnO.

| Amostra de filme | C (%) | O (%) | Zn (%) | N (%) |
|---|--------------|-------------|--------------|------------|
| PELBD puro | 100 ± 0,59 | 0 | 0 | 0 |
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 67,15± 0,92 | 6,90± 0,32 | 25,95 ± 0,23 | 0 |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 57,31± 1,23 | 6,69± 0,36 | 36,00± 0,33 | 0 |
| PELBD/QTS | 64,93± 0,84 | 28,18± 0,72 | 0 | 6,89± 2,49 |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 50,84± 1,05 | 28,75± 0,79 | 13,13± 31,31 | 7,28± 2,28 |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 32,33± 0,53 | 6,81± 0,19 | 58,94± 28,48 | 1,92± 0,61 |
| PELBD/Am | 83,48± 1,64 | 16,52± 1,43 | 0 | 0 |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 71,75 ± 0,77 | 5,95± 0,28 | 22,30±0,19 | 0 |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 32,20 ± 0,93 | 10,69±0,34 | 57,11±79,96 | 0 |

Nas amostras dos filmes com a camada superior de QTS, observa-se a presença de nitrogênio que pertence aos grupos amino deste biopolímero. Os filmes de PELBD/QTS com NPs e PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) para a quantificação do ZnO apresentaram desvio padrão próximo a 30% e 80%, respectivamente, o que pode ser decorrente da heterogeneidade da amostra, ou ainda, pela degradação da amostra.

A quantificação de ZnO nos filmes PELBD com aspersão das NPs está relacionada com a área escolhida para a varredura do EDS. Mesmo com a seleção de três áreas distintas, incluindo um aglomerado grande, um intermediário e um pequeno; estas amostras não são uniformes. Portanto, esta análise possui apenas confiabilidade qualitativa.

4.3.3 Ângulo de contato e energia livre de superfície

O ângulo de contato com água de cada amostra foi medido com o intuito de determinar o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos filmes (Tabela 8). Observando os resultados, de um modo geral se percebe o aumento do ângulo de contato diante da adição do NPs-ZnO. Mesmo que, no caso do filme obtido por aspersão esta diferença não seja significativa ($p \geq 0,05$), estas medidas se assemelham às medidas encontradas no trabalho de Souza (2015), cujo processo de aspersão foi utilizado como referência.

Tabela 8. Média e desvio padrão dos ângulos de contato com água dos filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e, PELBD/Am com e sem NPs-ZnO com NPs-ZnO.

| Amostra de filme | Ângulo de contato (°) |
|---|------------------------------|
| PELBD puro | 95,79 ± 0,63 ^g |
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 97,70 ± 0,79 ^g |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 98,69 ± 0,17 ^g |
| PELBD/QTS | 58,82 ± 1,16 ^c |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 68,05 ± 1,34 ^b |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 77,13 ± 1,97 ^a |
| PELBD/Am | 27,01 ± 1,65 ^f |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 35,62 ± 1,13 ^e |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 46,78 ± 2,18 ^d |

Médias com letras diferentes nas colunas diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

O ângulo de contato de 60° encontrado para o filme recoberto pela camada de quitosana está próximo aos valores encontrados no trabalho de Mingyu et al. (2004) e Assis (2010), evidenciando seu caráter hidrofílico. Com a incorporação das NPs-ZnO à camada do biopolímero, a molhabilidade do filme diminuiu significativamente com o aumento das nanopartículas. Ou seja, na maior concentração de NPs-ZnO (0,5 mg/cm²), a superfície se apresentou menos hidrofílica atingindo um ângulo de contato de 77,13°. Entre os filmes multicamadas, esse foi o que se apresentou menos hidrofílico, o que é interessante para uma embalagem de um alimento com elevada atividade de água.

Para os filmes com a sobrecamada de amido, também se observou a diminuição da hidrofiliabilidade com a incorporação das nanopartículas às amostras. A redução desta hidrofiliabilidade devido a adição de NPs-ZnO entre os filmes com quitosana e amido foram semelhantes, de 18,31° e 19,77° respectivamente. Metais como alumínio, zinco e cobre têm sido usados para diminuir a hidrofiliabilidade de superfícies por ataque químico e são capazes de aumentar a rugosidade significativamente. Tais metais, costumam ser utilizados como componentes utilizados no desenvolvimento de superfícies super hidrofóbicas (ROACH; SHIRTCLIFFE; NEWTON, 2008).

Esta redução pode ser vantajosa, quando se deseja controlar ou diminuir a interação do biopolímero com o alimento ou com o ambiente. No caso destas propostas de embalagens multicamadas, o PELBD presente na face externa é capaz de garantir a integridade do

alimento durante a exposição a ambientes de alta umidade. Enquanto que, os biopolímeros presentes na face interna diminuem a interação com a água do alimento através da incorporação das NPs-ZnO apresentando ainda, um potencial efeito contra micro-organismos. Segundo a literatura, a característica de alta barreira ao vapor d' água do PELBD é associada com as características de alta barreira ao O₂ do amido e quitosana (BUTLER, et al., 1996; SHIN, et al., 2002 e CARVALHO e GROSSO, 2006).

A partir das medidas de ângulo de contato foram obtidas as energias livres de superfície para cada filme, bem como suas componentes polares e dispersivas (apolares) (Tabela 9).

Tabela 9. Medidas de energia livre de superfície total (γ) e seus componentes: polar (γ^p) e dispersivo (γ^d) para os filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO, PELBD/Am e PELBD/Am com NPs-ZnO.

| Amostra de filme | γ^p (mN.m ⁻¹) | γ^d (mN.m ⁻¹) | γ (mN.m ⁻¹) |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| PELBD puro | 2,50 ± 0,18 ^{cd} | 28,37 ± 0,85 ^a | 30,87 ± 0,67 ^a |
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 2,16 ± 0,04 ^d | 34,92 ± 0,15 ^{abc} | 37,09 ± 0,40 ^{ab} |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 3,69 ± 0,79 ^{bcd} | 33,74 ± 1,10 ^{ab} | 37,43 ± 1,89 ^{ab} |
| PELBD/QTS | 2,61 ± 1,19 ^{cd} | 39,67 ± 1,48 ^{bcd} | 42,28 ± 1,29 ^{bc} |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 1,92 ± 0,08 ^d | 44,54 ± 0,64 ^d | 46,45 ± 0,56 ^{cde} |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 1,27 ± 1,20 ^d | 43,02 ± 1,27 ^d | 44,29 ± 0,14 ^{de} |
| PELBD/Am | 13,27 ± 1,46 ^a | 39,08 ± 1,29 ^{bcd} | 52,36 ± 0,17 ^c |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 7,29 ± 1,60 ^b | 42,43 ± 1,70 ^{cd} | 49,72 ± 1,21 ^{cd} |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,15 ± 0,27 ^{bc} | 42,19 ± 0,38 ^{cd} | 48,34 ± 0,65 ^{cde} |

Médias com letras diferentes nas colunas diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

De maneira geral, as medidas da componente polar da energia de superfície livre, apresentaram-se semelhantes para os filmes de PELBD puro, para os filmes com adição de ZnO por aspersão e para os filmes multicamada com QTS com e sem as NPs. Os filmes com camada de amido apresentaram um aumento significativo da energia superficial em relação às demais amostras, sendo que a componente polar decresceu com a adição das NPs, corroborando com o ângulo de contato, pois, maiores valores da componente polar indicam maior possibilidade de interação com a água e, conseqüentemente, menor ângulo de contato.

Na energia livre de superfície total, o filme de PELBD não apresenta diferença significativa em relação aos PELBD com incorporação das NPs por aspersão. Nota-se

também que, a presença dos biopolímeros nos filmes multicamadas resulta numa maior energia superficial destes filmes.

Macedo et al. (2012) e Raghavendra et al. (2016) avaliaram a energia de superfície de filmes de quitosana com valores em torno de 42 mN.m^{-1} e 45 mN.m^{-1} , respectivamente, semelhantes aos deste trabalho. Raghavendra et al. (2016) encontraram ainda, valores muito próximos ao presente estudo para ambos componentes, em torno de 3 mN.m^{-1} para a fração polar e 42 mN.m^{-1} para a fração dispersiva. Os autores também estudaram a incorporação de NPs de Ag aos filmes através de diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3). Os valores de energia livre de superfície total aumentaram diante da adição de baixas concentrações de Ag. Mas, com o aumento da concentração de NPs-Ag, os valores da energia de superfície livre total diminuíram até $46,3 \text{ mN.m}^{-1}$, assemelhando-se ao filme sem a adição das NPs. Comportamento semelhante foi observado para os filmes multicamadas com QTS na Tabela 8.

Prokopovich e Perni (2009) investigaram a adesão bacteriana em diferentes tipos de amidos, como arroz, batata e mandioca. Para isso, os resultados da energia livre de superfície total variaram em função da fonte de amido e para o amido de mandioca a energia livre total encontrada foi de $47,82 \text{ mN.m}^{-1}$, semelhante ao observado na Tabela 8.

4.3.4 Resistência à tração

Os filmes de PELBD puros e com aspensão, apresentaram menor espessura em relação aos filmes multicamadas, devido à presença da camada extra dos biopolímeros. Os filmes com a camada de amido com as NPs apresentaram maior espessura em relação aos de quitosana, enquanto que a adição das NPs não alterou a espessura dos filmes multicamadas (Tabela 10).

As amostras dos filmes estudados não apresentaram diferenças significativas com nível de confiança de 95% para nenhum dos parâmetros mecânicos analisados, conforme o esperado. Os resultados obtidos para a tensão máxima no *yield point* (referente a tração no ponto máximo do alongamento elástico), tensão de ruptura e alongamento se devem a característica da camada base de PELBD. Durante a execução da análise observou-se que as camadas de amido e quitosana rompiam antes da camada de polietileno. Os resultados

encontrados para tensão de ruptura foram superiores aos de Coutinho (2003) propostos na revisão bibliográfica, enquanto que os dados de alongamento ficaram semelhantes.

Tabela 10. Média e desvio padrão de espessura, tensão máxima no *yield point*, tensão de ruptura e alongamento para os filmes de PELBD puro, com aspersão de ZnO, PELBD/QTS e PELBD/QTS com NPs-ZnO, PELBD/Am e PELBD/Am com NPs-ZnO.

| Amostra de filme | Espessura (μm) | Tensão no Yield Point (MPa) | Tensão na ruptura (MPa) | Alongamento (%) |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------|
| PELBD puro | 350 \pm 3,33 | 12,67 \pm 1,57 | 25,72 \pm 0,26 | 552,65 \pm 41,98 |
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 400 \pm 6,67 | 13,56 \pm 0,87 | 28,45 \pm 2,49 | 635,24 \pm 44,36 |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 400 \pm 6,54 | 14,50 \pm 1,06 | 30,94 \pm 2,52 | 653,95 \pm 50,65 |
| PELBD/QTS | 450 \pm 2,53 | 15,11 \pm 0,65 | 27,38 \pm 0,17 | 565,16 \pm 11,90 |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 450 \pm 5,24 | 12,35 \pm 0,47 | 24,50 \pm 3,15 | 558,09 \pm 31,85 |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 450 \pm 3,11 | 11,53 \pm 0,83 | 24,51 \pm 1,12 | 593,80 \pm 35,74 |
| PELBD/Am | 470 \pm 4,74 | 15,04 \pm 0,71 | 30,86 \pm 2,17 | 567,05 \pm 39,55 |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 470 \pm 4,86 | 13,77 \pm 3,63 | 32,23 \pm 0,79 | 560,57 \pm 17,35 |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 470 \pm 5,78 | 13,52 \pm 2,22 | 29,63 \pm 2,49 | 607,71 \pm 28,48 |

Não houve diferença estatística entre os valores das propriedades mecânicas em uma mesma coluna pelo teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$).

Ao se observar a especificação técnica dos *pellets* de PELBD (Anexo A), observa-se que análises mecânicas foram realizadas em filmes de 38 μm obtidos por extrusão. Os valores de tensão no *yield point* e na ruptura são próximos, porém o alongamento se apresenta inferior em relação a especificação, estas diferenças provavelmente ocorreram devido às diferenças de processos de obtenção dos filmes.

Em filmes multicamadas que combinam polímeros sintéticos com biopolímeros, as propriedades mecânicas geralmente são determinadas pelos polímeros sintéticos. Devido a menor resistência mecânica dos biopolímeros, estes acabam se rompendo antes dos outros.

4.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.4.1 Teste de diluição em caldo para os filmes de PELBD com NPs-ZnO

Os testes de diluição em caldo dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão para *L. sakei* e para *S. aureus* não apresentaram efeito bacteriostático ou bactericida. O

crescimento nos tubos contendo os filmes com as NPs foi semelhante ao crescimento das bactérias nos tubos onde estava presente o filme de PELBD puro (Figuras 33 e 34).

A ausência de ação antimicrobiana frente a essas bactérias pode ter ocorrido pela falta de contato entre as bactérias com as nanopartículas, uma vez que, estas não haviam sido liberadas para o meio neste período de 24 h. Para esta confirmação, fez-se uma leitura da absorbância em espectrofotômetro de uma amostra de caldo com inóculo, sem filme e outra leitura de uma amostra contendo o caldo com inóculo e o filme. Após 24 horas, realizou-se uma nova leitura em espectrofotômetro nos dois tubos. Ambas amostras apresentaram valores de absorbância semelhantes entre si, indicando que não havia ocorrido a migração das NPs-ZnO para o caldo. Este fato pode explicar a ausência de inibição de crescimento das bactérias.

Figura 33. Média dos dados experimentais do crescimento microbiano de *L. sakei* na presença dos filmes: (o) PELBD puro; (□) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm² NPs-ZnO) e (△) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm² NPs-ZnO).

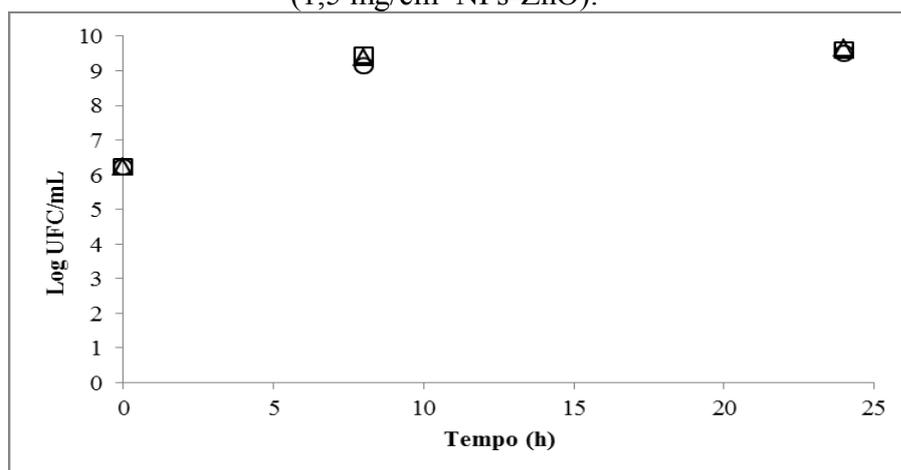
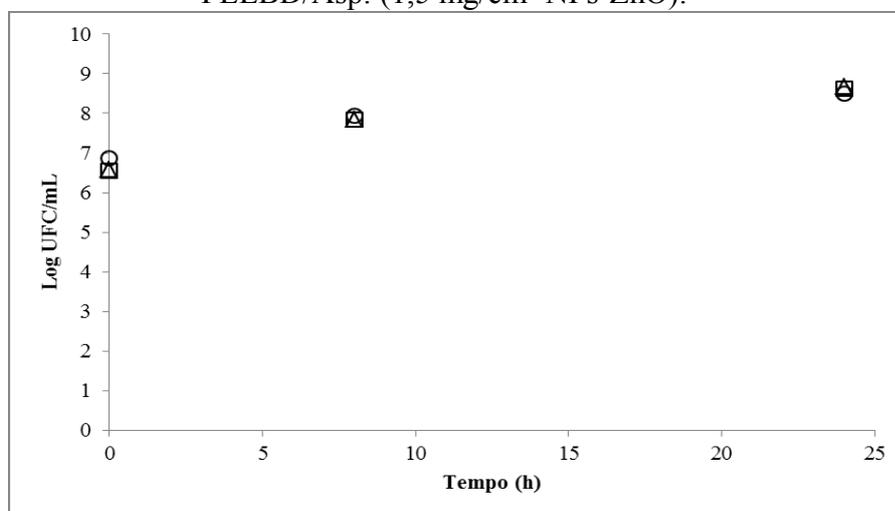


Figura 34. Média dos dados experimentais do crescimento microbiano de *S. aureus* na presença dos filmes: (o) PELBD puro; (□) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm² NPs-ZnO) e (Δ) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm² NPs-ZnO).



4.4.2 Teste antimicrobiano de acordo com a NORMA JIS Z 2801:2000

Devido às hipóteses levantadas no item anterior, pesquisou-se na literatura uma metodologia que proporcionasse maior contato entre inóculo e nanopartículas. O método da Norma JIS Z 2801:2000 foi encontrado em diversos trabalhos para avaliação da atividade antimicrobiana de embalagens (SEYFRIEDSBERGER; RAMETSTEINER; KERN, 2006; HAUSER; WUNDERLICH, 2011; LONGANO et al., 2012; SAORIN, 2015; TANG et al., 2016). Utilizando este método, investigou-se o efeito bactericida dos filmes contendo as NPs-ZnO e dos filmes controle frente às bactérias *L. sakei*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*.

4.4.2.1 Ação antimicrobiana dos filmes contendo NPs-ZnO frente *L. sakei*

Todos os filmes com NPs-ZnO e os de quitosana sem NPs apresentaram ação antibacteriana frente à bactéria *L. sakei* (Figuras 35, 36 e 37). As amostras dos filmes de PELBD/Asp. NPs-ZnO (Figura 35), que continham maiores concentrações de NPs que os demais filmes, 0,9 e 1,5 mg/cm², apresentaram menor ação contra a BAL, com uma redução bacteriana média, de 1,65 e 3,17 log UFC/mL, respectivamente, após 24 horas (Tabela 11). Sendo que, até 18 horas de análise, a redução bacteriana se encontrava semelhante para as duas concentrações (Figura 35). Provavelmente, esta maior quantidade de NPs teve um menor desempenho como antibacteriano devido aos visíveis aglomerados formados por este método

de obtenção dos filmes, reduzindo a área de contato superficial com o inóculo. Pode ter ocorrido também, o aprisionamento de parte destas nanopartículas na matriz polimérica no momento da aspersão das NPs no filme de PELBD parcialmente fundido, ou ainda, na etapa de evaporação da água na termoprensa a 130 °C.

Figura 35. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *L. sakei* na presença dos filmes: (◇◇) PELBD puro; (□■) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm² NPs-ZnO).

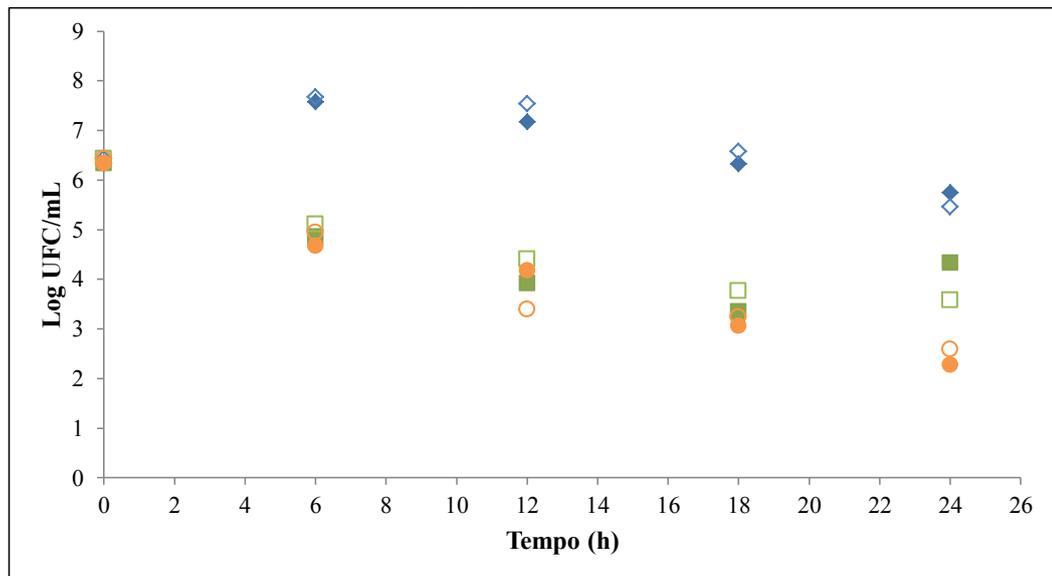


Figura 36. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *L. sakei* na presença dos filmes multicamadas com quitosana. (◇◇) PELBD puro; (△▲) PELBD/QTS; (□■) PELBD/QTS (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO).

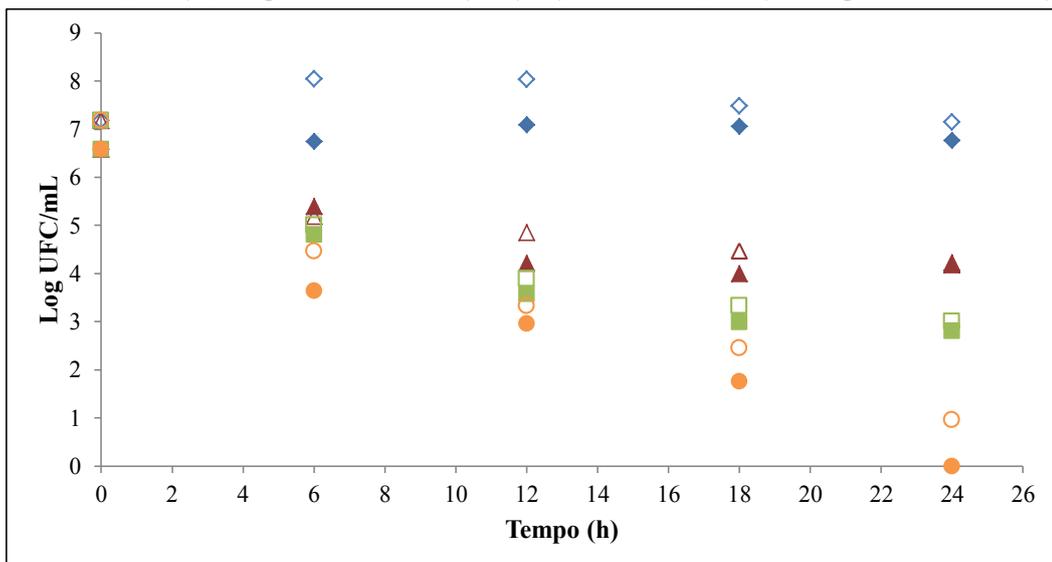


Figura 37. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *L. sakei* na presença dos filmes multicamadas com amido. (\diamond) PELBD puro; (\triangle) PELBD/Am; (\square) PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (\circ) PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO).

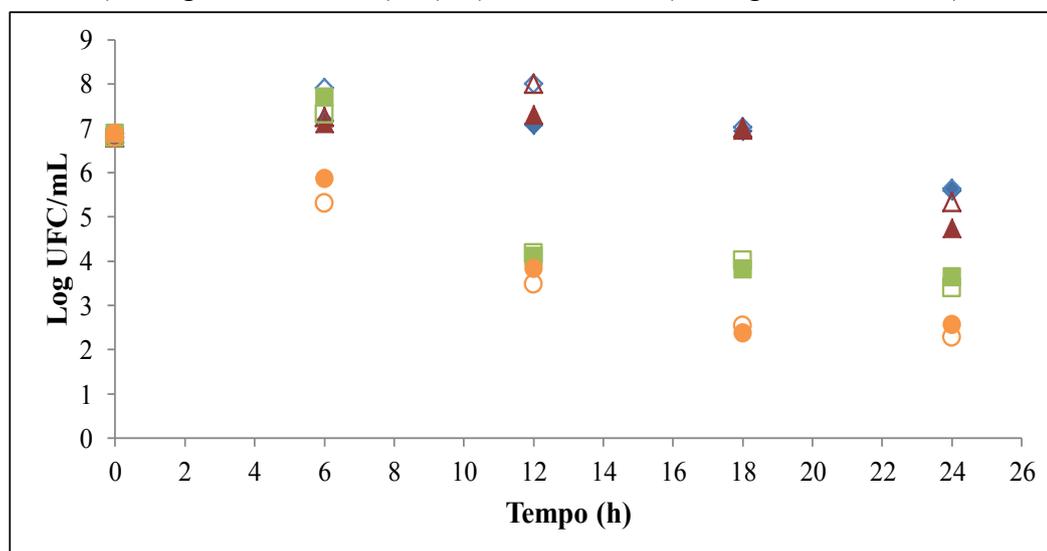


Tabela 11. Ação antimicrobiana dos filmes frente *L. sakei* após 24 horas.

| Amostra de filme | Redução bacteriana (log UFC/mL) |
|---|---------------------------------|
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 1,65 ± 0,23 |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 3,17 ± 0,30 |
| PELBD/QTS | 2,75 ± 0,22 |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 4,05 ± 0,03 |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,48 ± 0,23 |
| PELBD/Am | 0,56 ± 0,28 |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 2,09 ± 0,14 |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 3,19 ± 0,17 |

Os filmes de PELBD/QTS apresentaram efeito inibitório constante a partir de 12 horas de análise (Figura 36). Os filmes de PELBD/QTS (0,2 mg/mL NPs-ZnO) apresentaram estabilidade no efeito a partir de 18 horas de acompanhamento. E por fim, os filmes de PELBD/QTS (0,5 mg/mL NPs-ZnO), ao final das 24 horas de análise, ainda estavam agindo contra a população bacteriana e causando a morte celular.

Os filmes multicamadas PELBD/QTS apresentaram efeito inibitório contra *L. sakei* com uma redução média de 2,75 log UFC/mL (Tabela 11) em relação aos filmes de PELBD puro, evidenciando o efeito antibacteriano da quitosana. Possivelmente, a presença da

quitosana potencializou o efeito antimicrobiano das NPs-ZnO, resultando maior ação contra *L. sakei* dos filmes multicamadas PELBD/QTS (NPs-ZnO) em relação aos demais filmes. Para o filme multicamada de PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) em um dos testes atingiu-se a eliminação total ao final das 24 horas. Enquanto que, na duplicata do experimento se observou a presença de 09 UFC/mL na média das placas (inoculação em duplicata), correspondendo a 0,95 log UFC/mL (Figura 36), a redução média deste filme foi de 6,48 UFC/mL. Enquanto que, para os filmes multicamadas PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO), a redução média foi menor, de 3,19 log UFC/mL.

Os filmes multicamadas com QTS na menor concentração, 0,2 mg/cm² NPs-ZnO, atingiram a redução média de 4,05 log UFC/mL em relação ao filme de PELBD puro ao final das 24 horas. Uma redução inferior foi obtida nos filmes multicamada de amido com NPs-ZnO na mesma concentração, com média de 2,09 log UFC/mL (Tabela 11).

Os filmes multicamadas de PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) apresentaram efeito inibitório constante a partir de 12 horas de teste. E na maior concentração, 0,5 mg/cm² NPs-ZnO, o efeito foi constante a partir de 18 horas de análise.

Todos os filmes com a presença das NPs-ZnO apresentaram redução na população de células viáveis da BAL ao longo das 24 horas de teste em relação ao filme de PELBD puro. Porém, de acordo com a norma JIS Z 2801:2000, apenas os filmes que apresentam um valor de ação antimicrobiana superior a 2,0 log UFC/mL podem ser considerados como superfícies antimicrobianas efetivas (Tabela 11). Assim, os filmes de PELBD/Am, como já se esperava, não podem ser considerados superfícies antimicrobianas contra *L. sakei*, por apresentar média de redução de 0,56 log UFC/mL, bem como os filmes de PELBD/Asp. (0,9 mg/cm² NPs-ZnO) com média de inibição de 1,65 log UFC/mL, também não podem ser considerados como antimicrobianos efetivos.

Os demais filmes podem ser considerados como superfícies antimicrobianas efetivas para *L. sakei*. Sendo que, os filmes com os maiores resultados de ação contra essa BAL, são os filmes multicamadas PELBD/QTS (0,2 e 0,5 mg/cm² NPs-ZnO), em que na maior concentração o efeito é notoriamente superior a todos os demais, chegando a 6,48 log UFC/mL (Tabela 11).

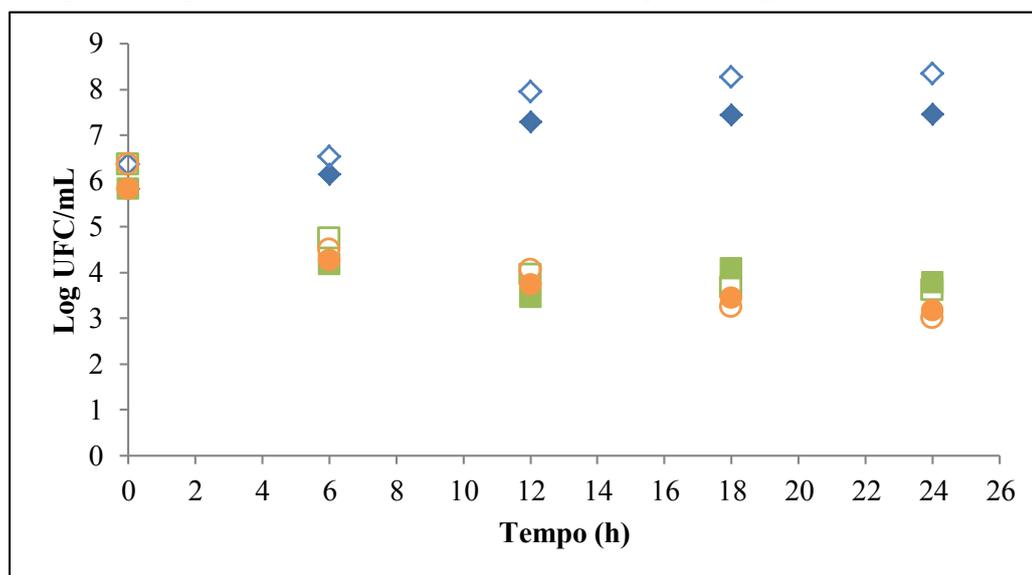
Na literatura não foram encontrados estudos a respeito do efeito antibacteriano de filmes contendo NPs-ZnO e nem das nanopartículas frente a *L. sakei*. Porém, Emamifar et al. (2011) investigaram o efeito antimicrobiano de filmes de PELBD com dióxido de titânio

(TiO₂)/NPs-Ag e com NPs-ZnO frente a BAL *L. plantarum*, a qual foi inoculada em suco de laranja esterilizado e avaliada por 112 dias. As embalagens contendo TiO₂ e NPs-Ag apresentaram efeito antimicrobiano superior as com NPs-ZnO. A amostra com 0,25% de NPs-ZnO reduziu em cerca de 0,5 log UFC/mL contagem do micro-organismo, enquanto, ao aumentar a concentração para 1% o efeito antimicrobiano reduziu, não apresentando diferença significativa em relação ao filme de PELBD puro. Os autores atribuíram este comportamento aos aglomerados de NPs-ZnO formados, causando menor interação entre o ZnO e a superfície bacteriana e, conseqüentemente, resultando em uma menor quantidade de espécies ROS, especialmente de H₂O₂.

4.4.2.2 Ação antimicrobiana dos filmes contendo NPs-ZnO frente *S. aureus*

A avaliação da sensibilidade da bactéria *S. aureus* aos filmes de PELBD/Asp. NPs-ZnO (Figura 38) indica que as duas concentrações de NPs-ZnO apresentaram efeito antimicrobiano frente ao *S. aureus* de acordo com a JIS Z 2801:2000 (Tabela 12).

Figura 38. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. aureus* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. (◇◇) PELBD puro; (□■) PELBD/Asp. (0,9 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Asp. (1,5 mg/cm² NPs-ZnO).



Ambas concentrações de ZnO apresentaram efeito semelhante, com redução média de 4,20 e 4,82 para a menor e maior concentração, respectivamente. Esta proximidade nos

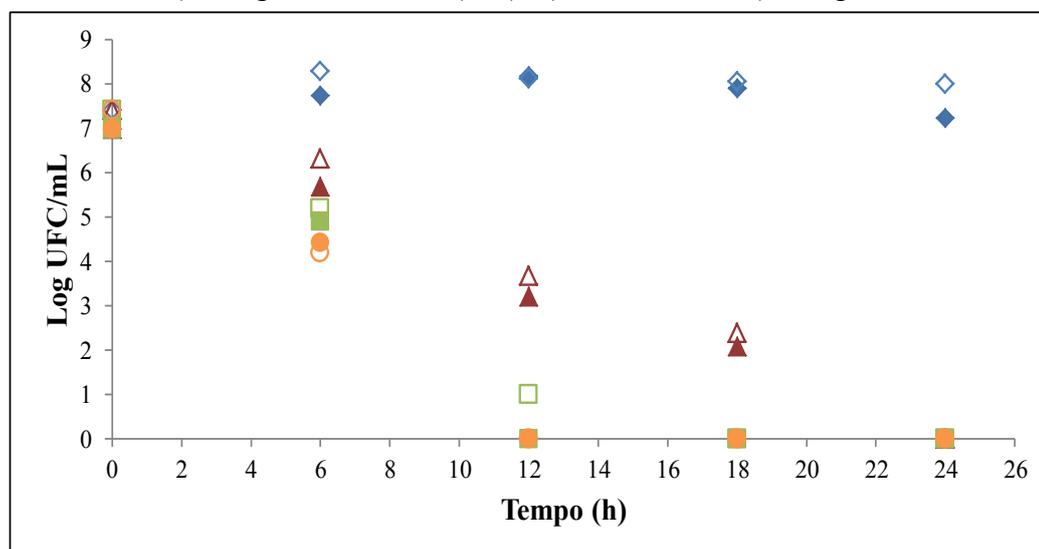
resultados, possivelmente esteja associada à presença dos aglomerados. Pois, a maior concentração (1,5 mg/cm² NPs-ZnO) gerou agregados de nanopartículas de tamanho maior e conseqüentemente reduziu a área de contato das NPs com o inoculo.

Ainda ao observar a Figura 38, nota-se que, nas primeiras 6 horas de observação, os filmes contendo as NPs-ZnO ainda não haviam apresentado efeito inibitório suficiente de 2 log UFC/mL para serem consideradas superfícies antimicrobianas efetivas. A ação efetiva foi observada após 12 horas de análise, com redução média de 3,9 log UFC/mL e 3,73 log UFC/mL para o filme com 0,9 e 1,5 mg/cm² NPs-ZnO, respectivamente.

De modo geral, para os filmes multicamadas com QTS (Figura 39), percebe-se que, nas primeiras 6 horas, os filmes multicamadas apresentaram significativa inibição de *S. aureus*, já sendo consideradas superfícies efetivas como antibacterianas. A redução média para PELBD/QTS sem NPs-ZnO e com 0,2 e 0,5 mg/cm² NPs-ZnO foi de 2,09, 2,97 e 3,7 log UFC/mL, respectivamente.

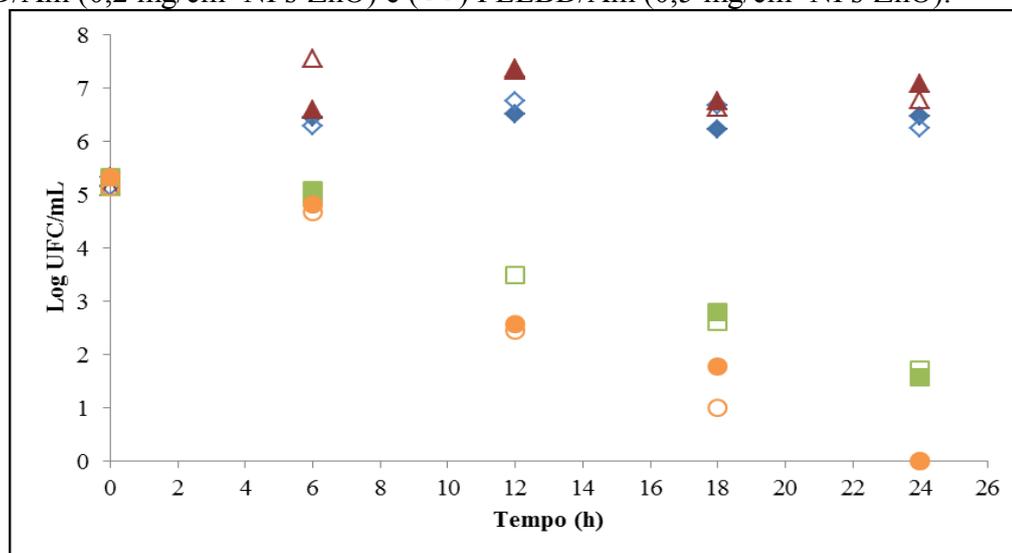
Nos filmes multicamadas PELBD/QTS, percebeu-se mais uma vez, o efeito antibacteriano da quitosana, atingindo a inativação total do *S. aureus* ao final das 24 horas de análise (Figura 39). Sendo que, entre as amostras multicamadas de PELBD/QTS (0,2 mg/cm² NPs-ZnO), uma delas teve sua eliminação total com 12 horas e na duplicata do experimento, o crescimento médio foi de 1 log UFC/mL. Em 18 horas de análise, as duas amostras atingiram a inativação total das células viáveis de *S. aureus*. As amostras PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) inativaram totalmente essa bactéria em apenas 12 horas.

Figura 39. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. aureus* na presença dos filmes multicamadas com quitosana. (◇◇) PELBD puro; (△△) PELBD/QTS; (□■) PELBD/QTS (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO).



Para os filmes multicamadas de PELBD/Am (Figura 40), percebe-se um pequeno aumento do crescimento de *S. aureus* em relação ao filme de PELBD puro, resultando em uma redução bacteriana negativa dessas superfícies. Possivelmente, por ser um carboidrato, pode ter servido de substrato para *S. aureus*, ou então, alterou o meio tornando-o mais adequado para o crescimento desta bactéria.

Figura 40. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. aureus* na presença dos filmes multicamadas com amido. (◇◇) PELBD puro; (△△) PELBD/Am; (□■) PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO).



Os filmes multicamadas de amido com NPs-ZnO (Figura 40), em 6 horas de análise ainda não haviam apresentado efeito inibitório como os filmes multicamadas com QTS. Porém, em 12 horas de análise, estes filmes também se mostraram efetivos como superfície antimicrobiana, com uma redução média de 3 log UFC/mL para o filme de menor concentração e de 4,13 log UFC/mL para o de maior concentração.

Os filmes PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) atingiram a inibição de 4,72 log UFC/mL (Tabela 12). Enquanto que, os filmes PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) eliminaram totalmente a bactéria ao final das 24 horas. Deste modo, estes filmes de PELBD/Am contendo as NPs são classificados como superfícies antibacterianas efetivas contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* com uma média de redução na menor concentração, semelhante aos dos filmes com as NPs incorporadas por aspersão. Para os filmes de PELBD/Am na maior concentração a redução foi superior, de 6,37 log UFC/mL (Tabela 12).

Tabela 12. Ação antimicrobiana dos filmes frente *S. aureus* após 24 horas.

| Amostra de filme | Redução bacteriana (log UFC/mL) |
|---|--|
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 4,20 ± 0,53 |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 4,82 ± 0,36 |
| PELBD/QTS | 7,62 ± 0,39 |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 7,62 ± 0,39 |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 7,62 ± 0,39 |
| PELBD/Am | -0,57 ± 0,46 |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 4,72 ± 0,18 |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,37 ± 0,17 |

Assim como para a bactéria *L. sakei*, os filmes multicamadas com QTS contendo as NPs-ZnO, também apresentaram a maior ação antibacteriana contra o *S. aureus*. Na Tabela 12, observa-se que os valores são iguais para a ação antibacteriana dos três filmes multicamadas de QTS, isso porque, os três filmes eliminaram totalmente o micro-organismo investigado.

A BAL *L. sakei* e a patogênica *S. aureus* são bactérias Gram-positivas e apresentam uma espessa camada de peptídeoglicanos em sua parede celular. Acredita-se que a ação das NPs-ZnO aconteça devido ao aprisionamento das mesmas nessa camada peptídeoglicana, onde produzem as espécies ROS que acabam danificando a membrana celular e possibilitando

a entrada H_2O_2 ao citoplasma causando danos às proteínas, lipídios e síntese do DNA (SAWAI, 1996; ADAMS; LYON; ALVAREZ, 2006; ZHANG et al., 2009; XIA et al., 2008; GORDON et al., 2011; AAL, et al., 2015; KUMAR et al., 2017).

No trabalho de Souza (2015), os filmes de PEBD aspersos com NPs-ZnO apresentaram um efeito bacteriostático para *S. aureus*, enquanto que, fez-se a incorporação das mesmas NPs em PELBD e se observou um efeito bactericida frente ao mesmo micro-organismo em concentrações semelhantes e até em menores concentrações. Essa diferença nos resultados pode ter ocorrido devido à diferença na estrutura dos polímeros utilizados. Desta maneira, a incorporação das NPs também pode ter ocorrido de forma diferente, resultando em diferentes valores de área superficial total disponível das NPs. Pode ter ocorrido ainda, devido às diferenças (temperatura, pressão, tempos) no momento de produção das amostras. Mas, com certeza, o método de análise antimicrobiana teve influência nos resultados, já que, utilizando o método de diluição em caldo, o mesmo utilizado por Souza (2015), não foi possível se observar o efeito antimicrobiano das amostras.

Li et al. (2009) incorporaram a concentração de 93,7 e 187,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs-ZnO, com tamanho médio de 200 nm e formato irregular, à superfície de filmes de policloreto de vinila (PVC). Durante a avaliação antimicrobiana observaram efeito bactericida frente *S. aureus* e *E. coli*, e nenhum efeito frente aos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum*. Em testes de área de contato, o efeito frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus* foi superior a Gram-negativa e o efeito foi superior para a maior concentração de NPs-ZnO. Os autores também atribuem o efeito superior à bactéria Gram-positiva devido à composição e estrutura da parede celular composta majoritariamente por peptídeoglicanos. Por outro lado, as Gram-negativas possuem parede celular mais complexa com lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e lipoproteínas, podendo apresentar maior resistência a agentes antimicrobianos como ZnO.

A ação antimicrobiana da quitosana foi averiguada por diversos estudos. Theapsak, Watthanaphanit, Rujiravanit (2012) trataram embalagens de PE com plasma DBD, para posterior deposição de uma sobrecamada de QTS (grau de desacetilação (GD) de 97% e massa molecular de 807 kDa) nas concentrações de 0,25; 0,75 e 2,0% e avaliaram o efeito contra *S. aureus* e *E. coli* após 3 horas de contato entre o filme e o inóculo. Os filmes com 2% de QTS inativaram 100% de ambas bactérias, com 0,75% de QTS inativaram 97,57% dos *S. aureus* e 96,91% das *E. coli*, e com de 0,25% de QTS a inativação para *S. aureus* foi de 58,21% e para *E. coli* foi de 47,73%.

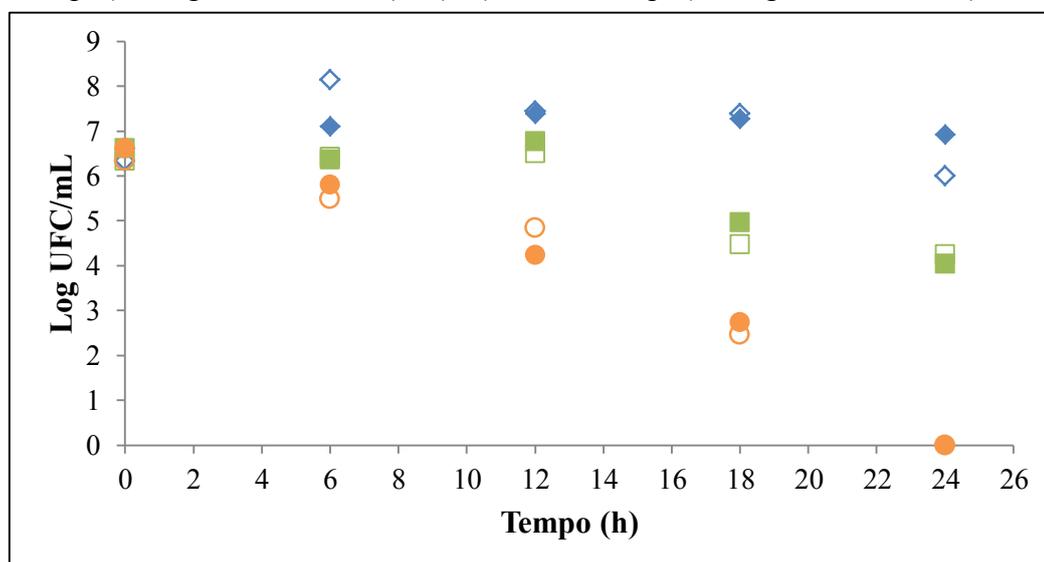
A QTS utilizada neste trabalho possui um GD de 81,9% e 111,01 kDa, resultando em uma solução menos viscosa, dessa forma, o efeito antimicrobiano pode ser devido a entrada deste polissacarídeo através da membrana celular, agindo na síntese de RNA (GOY; BRITO; ASSIS, 2009; GARCIA, 2011).

A ação antimicrobiana de nanocompósitos de quitosana/ZnO tem sido constatada e discutida por diversos estudos (ADAMS et al., 2006 ZHANG et al., 2007; NEVES, 2013). Li-Hua et al. (2010) prepararam filmes com 1% de quitosana e diferentes proporções de nitrato de prata e óxido de zinco e investigaram o efeito contra diferentes bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. O filme de quitosana puro (GD de 85,46%) apresentou efeito frente a *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *Penicillium*. Diante da adição de 5 e 10% de ZnO e 0,1% de Ag à QTS, a ação antimicrobiana ficou ainda mais evidente. O efeito frente *S. aureus* (Gram-positivo) foi inferior ao efeito contra *E. coli* (Gram-negativa) e a *B. subtilis* (Gram-positivo). O autor atribuiu o aumento do efeito bactericida as espécies ROS. O mecanismo de resistência do *S. aureus* às NPs-ZnO está relacionado a presença de antioxidantes, como carotenoides, e agentes de desintoxicação, como enzimas específicas, presentes nessa bactéria (APPLEROT et al., 2009). Entretanto, fica evidente que as características da parede celular dos micro-organismos não são os únicos fatores que determinam a ação do ZnO, visto que, diferentes bactérias Gram-positivas apresentaram diferentes sensibilidades ao antimicrobiano.

4.4.2.3 Ação antimicrobiana dos filmes contendo NPs-ZnO frente *S. Enteritidis*

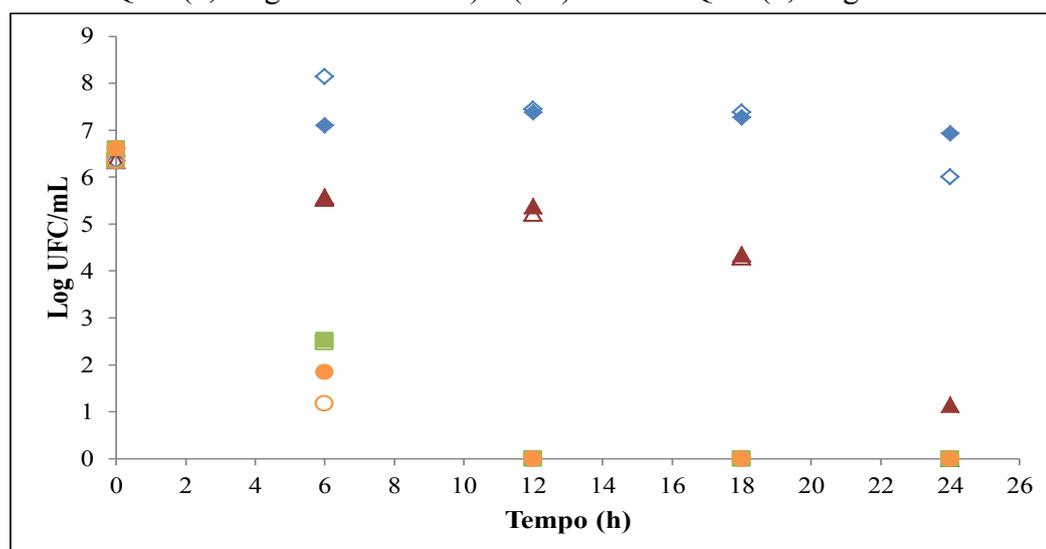
A partir dos testes baseados na norma JIS Z 2801:2000 foi possível atingir a inativação total da *S. Enteritidis* nos três grupos de filmes (Figuras 41, 42 e 43). Nas amostras de PELBD/Asp. NPs-ZnO, a inativação total da *S. Enteritidis* ocorreu na maior concentração de NPs com 24 horas de análise, com 12 horas, já se identificava uma redução média de 2,88 log UFC/mL. A menor concentração de NPs-ZnO nestes filmes, ao final das 24 horas, apresentou uma redução média de 2,31 log UFC/mL, próxima à mínima exigida pelo método de 2,0 UFC/mL (Figura 41 e Tabela 13). Ou seja, ambos filmes apresentaram efetividade antimicrobiana contra esta bactéria Gram-negativa.

Figura 41. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. Enteritidis* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. (\diamond) PELBD puro; (\square) PELBD/Asp. ($0,9 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO) e (\circ) PELBD/Asp. ($1,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO).



Para os filmes multicamadas PELBD/QTS, observou-se mais uma vez, a ação bactericida da quitosana com redução de $5,89 \text{ log UFC/mL}$ (Figura 42 e Tabela 13). Nas primeiras 6 horas, a redução média foi de $2,06 \text{ log UFC/mL}$, evidenciando sua efetividade.

Figura 42. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. Enteritidis* na presença dos filmes multicamadas com quitosana. (\diamond) PELBD puro; (\triangle) PELBD/QTS; (\square) PELBD/QTS ($0,2 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO) e (\circ) PELBD/QTS ($0,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO).



O efeito antimicrobiano da quitosana diante de bactérias Gram-negativas está relacionado à interação que ocorre entre os grupos amino protonados (NH_3^+) da quitosana e grupos carregados negativamente na parede celular bacteriana, mais especificamente, os fosfatos presentes na camada fosfolipídica da membrana celular das bactérias Gram-negativas. Como resultado, tem-se a perturbação do funcionamento da membrana alterando o equilíbrio osmótico e permeabilidade celular ocasionando o vazamento de eletrólitos e outras substâncias de baixo peso molecular fundamentais para a manutenção da célula, acarretando a morte do micro-organismo (RABEA et al., 2003; GOY; BRITO; ASSIS, 2009). Porém, de acordo com Leceta et al. (2013), a ação antimicrobiana da QTS diminui com o tempo, por isso é importante o uso de nanopartículas ou outros materiais antimicrobianos para atuar junto com a quitosana.

Ainda na Figura 42, pode-se verificar que ambas as concentrações de NPs-ZnO nos filmes de PELBD/QTS eliminaram totalmente a bactéria Gram-negativa em apenas 12 horas de análise. Em 6 horas de análise ocorreu a redução média de 5,12 log UFC/mL para o filme PELBD/QTS (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e de 6,11 log UFC/mL para o filme PELBD/QTS (0,5 mg/cm² NPs-ZnO). Ou seja, estes filmes já apresentaram elevada efetividade como antimicrobianos. Nota-se ainda que (Figura 42), o filme multicamada PELBD/QTS, no período de 18 horas apresentava redução média de 3 log UFC/mL e esta redução aumentou até as 24 horas com redução média de 5,89 log UFC/mL.

Os filmes multicamada de PELBD/Am apresentaram redução na contagem em relação ao filme de PELBD puro (Figura 43). Porém, com redução média de 1,66 log UFC/mL (Tabela 13), não pode se considerar esta amostra como um filme antimicrobiano segundo a norma JIS Z 2801:2000. Por se tratar do filme mais hidrofílico, pode ter ocorrido a absorção da água disponível no inóculo dificultando a adaptação e crescimento desta bactéria, comportamento contrário ao que se observou para o *S. aureus*.

Os filmes PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) apresentaram redução média de 5,47 log UFC/mL de *S. Enteritidis* ao final das 24 horas (Figura 43 e Tabela 13). No entanto, nesse mesmo período de tempo as amostras de PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO) atingiram a inativação total. Sendo que, no tempo de 18 horas uma das amostras já havia causado a morte celular total, mas para o segundo experimento, a eliminação total foi observada ao final das 24 horas de análise.

Figura 43. Dados experimentais (em duplicata) do crescimento de *S. Enteritidis* na presença dos filmes multicamadas com amido. (◇◇) PELBD puro; (△△) PELBD/Am; (□□) PELBD/Am (0,2 mg/cm² NPs-ZnO) e (○●) PELBD/Am (0,5 mg/cm² NPs-ZnO).

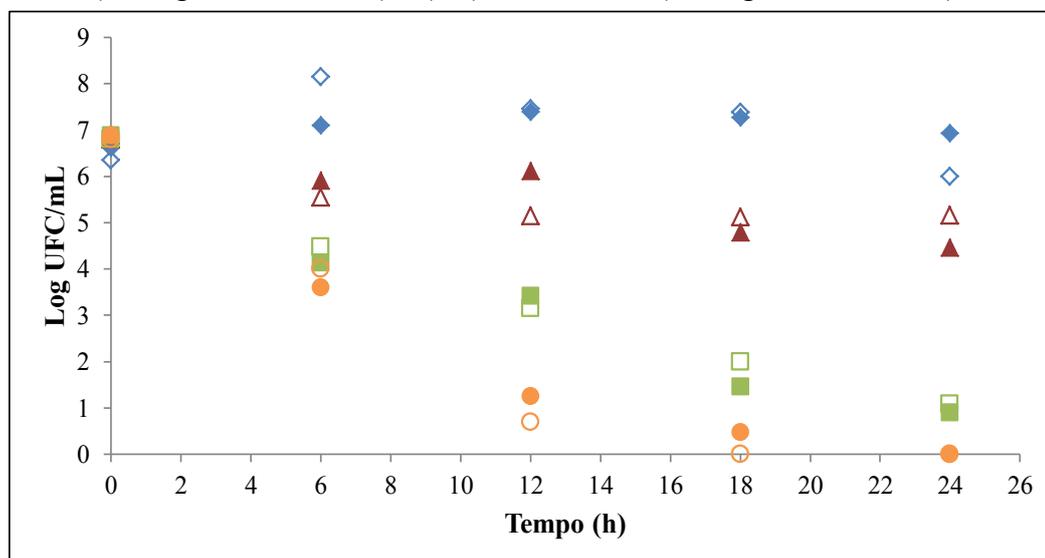


Tabela 13. Ação antimicrobiana dos filmes frente *S. Enteritidis* após 24 horas.

| Amostra de filme | Redução bacteriana (log UFC/mL) |
|---|---------------------------------|
| PELBD/Asp. (0,9 mg/cm ² NPs-ZnO) | 2,31 ± 0,57 |
| PELBD/Asp. (1,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,46 ± 0,46 |
| PELBD/QTS | 5,89 ± 0,11 |
| PELBD/QTS (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,46 ± 0,46 |
| PELBD/QTS (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,46 ± 0,46 |
| PELBD/Am | 1,66 ± 0,80 |
| PELBD/Am (0,2 mg/cm ² NPs-ZnO) | 5,47 ± 0,55 |
| PELBD/Am (0,5 mg/cm ² NPs-ZnO) | 6,46 ± 0,46 |

Referente ao valor da ação antibacteriana (Tabela 13), mais uma vez os filmes PELBD/QTS com NPs apresentam-se como superfícies com maior potencial antibacteriano, o mesmo ocorreu com as demais bactérias estudadas (*L. sakei* e *S. aureus*). De acordo com Al-Naamani, Dobretsov e Dutta (2016) a maior atividade antibacteriana de superfícies é possível devido às atividades antibacterianas sinérgicas da QTS e das NPs-ZnO. Os autores atribuem às NPs-ZnO a maior ação inibitória através da ruptura das membranas celulares bacterianas por íons de Zn e pelo estresse oxidativo gerado pela produção de espécies ROS.

Os resultados de efeito inibitório contra *S. aureus* e *S. Enteritidis* corroboram com o estudo de Tayel et al. (2011). No qual, tanto as NPs-ZnO quanto as micropartículas apresentaram significativa ação antibacteriana frente *S. aureus* e *S. Enteritidis* pelo método de microdiluição em poços. Os pesquisadores também obtiveram como resultado maior sensibilidade as NPs-ZnO do *S. aureus* com CIM de 0,81 mg/mL em comparação à *S. Enteritidis* que apresentou uma CIM de 2,10 mg/mL.

A ação das NPs-ZnO contra as bactérias Gram-negativas está associada à permeação das NPs e das espécies reativas ROS através da membrana celular, justamente por ela apresentar uma camada menos robusta e espessa quando comparadas às Gram-positivas (WANG et al., 2007; TAWALE et al., 2010).

Assim como no estudo de Al-Naamani, Dobretsov e Dutta (2016) e Li-Hua et al. (2010), neste estudo não se identificou um efeito inibitório superior para bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Pois, os filmes apresentaram maiores valores para o efeito antimicrobiano para *S. aureus* (Gram-positiva), seguido da *S. Enteritidis* (Gram-negativa) e por último de *L. sakei* (Gram-positiva). Este menor efeito dos filmes ao *L. sakei* pode ser interessante, pois, muitas vezes as BAL são usadas para inibir outros micro-organismos principalmente pela competição pelo substrato (KRÖCKEL, 2013). Assim, a eliminação total das BAL pode viabilizar o desenvolvimento dessas bactérias patogênicas. No entanto, a redução do seu desenvolvimento é importante para o aumento da vida útil dos alimentos. Levando estes aspectos em consideração, esta embalagem pode ser interessante para alimentos como presunto ou demais produtos cárneos, onde o desenvolvimento da bactéria *L. sakei* é um micro-organismo deteriorante que acaba limitando a vida útil destes produtos.

Além da classificação da bactéria quanto à membrana celular outros fatores influenciam na atividade antibacteriana. Deve-se levar em consideração a matriz polimérica onde as NPs estão incorporadas, o método de incorporação, a concentração destas NPs bem como a disponibilidade das mesmas para estabelecerem contato com o inoculo e as diferentes sensibilidades apresentadas pelas diferentes bactérias.

5 CONCLUSÃO

Para a realização deste estudo, um reator e uma fonte pulsada foram construídos, utilizando o ar atmosférico como gás ionizante e distância do eletrodo ao dielétrico, a formação de plasma se iniciou na frequência 30 Hz em diferentes pressões e tensões. Constatou-se que, quanto mais próxima à pressão atmosférica, maior a tensão necessária para formar plasma.

Para a modificação superficial do PELBD com plasma frio, as condições de pressão atmosférica e ar como gás ionizante foram escolhidas visando um sistema simples e de menor custo para aplicação industrial. Diante da estabilidade do plasma formado, determinou-se as demais condições da fonte em tensão de 32 kV e frequência de 132 Hz. Os tempos de 30, 60, 120 e 180 s diminuíram significativamente o ângulo de contato e aumentaram a energia livre de superfície total. Porém, as superfícies de PELBD tratadas por 120 s demoraram mais tempo para reverter sua hidrofobicidade, sendo este o tempo de exposição selecionado para o trabalho.

A aplicação do plasma frio atmosférico causou uma redução do ângulo de contato da água de 95,79° até 48,41° e proporcionou ao aumento da energia livre de superfície total de 30,87 para 53,34 mN/m, viabilizando a adesão das camadas de quitosana e amido para a obtenção dos filmes multicamadas carregadas com 0,2 e 0,5 mg/cm² de NPs-ZnO. A presença das NPs-ZnO e as camadas biodegradáveis não alteraram as propriedades de resistência à tração do polímero base de PELBD.

Os filmes contendo as NPs-ZnO apresentaram diferentes efeitos frente às três bactérias testadas. A BAL Gram-positiva, *L. sakei*, apresentou menor sensibilidade diante dos filmes. O filme de PELBD com camada de quitosana e 0,5 mg/cm² NPs foi o mais efetivo com redução de 6,48 log UFC/mL. Sendo que, os filmes de PELBD com quitosana, PELBD com quitosana e 0,2 mg/cm² de NPs-ZnO, de PELBD com camada de amido nas duas concentrações de NPS, e o filme de PELBD com aspersão de 1,5 mg/cm² de NPS-ZnO também se mostraram efetivos contra a BAL.

Em relação às bactérias *S. aureus* e *S. Enteritidis*, todos os filmes de PELBD contendo NPs-ZnO foram efetivos como antibacteriano. Os filmes multicamadas com quitosana com e sem as NPS inibiram totalmente a *S. aureus* ao final de 24 horas e apresentaram os maiores valores de redução, 7,45 log UFC/mL. Para a bactéria *S. Enteritidis*.

os filmes de PELBD com camada de quitosana com as NPs-ZnO, com camada de amido com $0,5 \text{ mg/cm}^2$ NPs-ZnO e os com aspersão de $1,5 \text{ mg/cm}^2$ de NPs-ZnO atingiram os maiores valores de redução bacteriana, de $6,48 \text{ log UFC/mL}$.

Os três tipos de filmes (aspersão, multicamada com quitosana, multicamada com amido) apresentaram resultados interessantes para aplicação em alimentos. Sendo que a escolha do filme depende das características do produto, por exemplo, para alimentos líquidos como sucos o filme de PELBD com a adição das NPs-ZnO por aspersão é o mais indicado, visto que dentre os filmes, é o único com superfície hidrofóbica. Para produtos como queijos, bacon e presunto, por exemplo, a embalagem multicamada com quitosana e NPs-ZnO é interessante, já que, a adição das nanopartículas resultou na diminuição da hidrofiliabilidade da quitosana. Além de que, nessas superfícies o efeito antibacteriano do ZnO está combinado ao efeito da quitosana. E por fim, o filme multicamada com amido e NPs-ZnO, devido a sua maior hidrofiliabilidade, é uma opção barata e que pode apresentar bons resultados no aumento da vida útil de alimentos com menor teor de umidade, como biscoito e pão.

Desta maneira, este trabalho demonstrou que é viável a produção de filmes ativos antibacterianos pela aspersão de nanopartículas de ZnO nas concentrações de $0,9$ e $1,5 \text{ g/cm}^2$ em PELBD parcialmente fundido e pela incorporação das NPs nas concentrações de $0,2$ e $0,5 \text{ mg/cm}^2$ em uma sobrecamada biodegradável de quitosana ou amido aderidas ao PELBD pela aplicação de plasma frio DBD a partir do ar atmosférico. Assim, estes materiais podem ser considerados potenciais para o uso como embalagens ativas para o aumento da vida útil, da segurança de alimentos e consequentemente reduzir desperdícios.

REFERÊNCIAS

- AAL, N. A.; AL-HAZMI, F.; AL-GHAMDI, A. A.; AL-GHAMDI, A. A.; EL-TANTAWY, F.; YAKUPHANOGLU, F. Novel rapid synthesis of zinc oxide nanotubes via hydrothermal technique and antibacterial properties. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 871-877, 2015.
- ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, and SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**, v. 40, n. 19, p. 3527-3532, 2006.
- AL-NAAMANI, Laila; DOBRETSOV, Sergey; DUTTA, Joydeep. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 231-237, 2016.
- ALMEIDA, T. L. **Desenvolvimento de membrana de quitosana composta de PVAI e quitosana compatível com sistema dermo-epidérmico**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo – SP, 2009.
- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 10 screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, n. 3, p. 454-461. 2006.
- AN, D. S.; KIM, Y. M.; LEE, S. B.; PAIK, H. D.; LEE, D. S.J. Antimicrobial low-density polyethylene film coated with bacteriocins in binder medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 4-20, 2000.
- APPLEROT, G.; LIPOVSKY, A.; DROR, R.; PERKAS, N.; NITZAN, Y.; LUBART, R.; GEDANKEN, A. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 6, p. 842-852, 2009.
- ARIMA, Y.; IWATA, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. **Biomaterials**, v. 28, p. 3074-3082, 2007.
- ASPERGER, H., ZANGERL, P. Pathogens in milk. *Staphylococcus aureus* – Dairy. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, v. 2, p. 111 – 116, 2011.
- ASSIS, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 603-606, 2010.
- Associação Brasileira de Embalagens – ABRE. (2018). **Estudo macroeconômico da embalagem** ABRE/FGV. Disponível em < <http://www.abre.org.br/setor/dados-de-mercado/dados-de-mercado/>>. Acesso em: 27 jul 2019.

Associação Brasileira de Embalagem – ABRE. (2015) **O valor das embalagens flexíveis no aumento da vida útil e na redução do desperdício de alimentos**. Disponível em < www.abre.org.br – 11 3060-5510>. Acesso em: 26 junho 2017.

AVÉROUS, L. Polylactic acid: synthesis, properties and applications. In: **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Elsevier, 2008. p. 433-450.

AVÉROUS, L.; HALLEY, P. J. Biocomposites based on plasticized starch. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 3, p.329-343, 2009.

AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F., AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 20, n. 3, p. 337-341, 2000.

AZEREDO, H. M. C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, p. 56-69, 2013.

BANOEE, M.; SEIF, S.; NAZARI, Z. E.; JAFARI-FESHARAKI, P.; SHAHVERDI, H. R.; MOBALLEGH, A.; MOGHADAAM, K. M.; SHAVERDI, A. R. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 93, n. 2, p. 557–561, 2005.

BARÃO, M. Z. **Dossiê Técnico (Embalagens para produtos alimentícios)**. Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR, 2011. Disponível em < <http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTY0MQ> => Acesso em: 09 fev 2018.

BATT, C. A. TORTORELLO, M. L. *Lactobacillus*. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2.ed. Academic Press: Elsevier, 2014.

BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. The State of the Art. In: **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Oxford: Elsevier, 2008.

BELIBI, P. C. *et al.* A comparative study of some properties of cassava and tree cassava starch films. **Physics Procedia**, v. 55, p. 220–226, 2014.

BENHABILES, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUICHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 48–56, 2012.

BERG, J. C. - **Wettability** - Surfactant Science Series, Volume 49, Dekker, 1993.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química de processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, cap. 4, p.65-70, 2001.

BOGAERTS, A.; NEYTS, E.; GIJBELS, R.; DER MULLEN, J. V. Gas discharge plasmas and their applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 4, p. 609-658, 4/5/ 2002.

BRAGA, L. R.; PERES, L. Novas Tendências em Embalagens para Alimentos: Revisão. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 69-84, 2010.

BRANDELERO, R. P. H.; BRANDELERO, E. M.; DE ALMEIDA, F. M. Biodegradable films of starch/PVOH/alginate in packaging systems for minimally processed lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. v. 40, n. 5, p. 510-521, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2011). Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Disponível em < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>. Acesso em: 05 jul 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil - Informe 2018. São Paulo, SP, 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 24 junho 2019.

BRASIL, Resolução RDC. nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**.

BRASIL. Regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais (Resolução RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0269_22_09_2005.html >. Acesso em 17 junho de 2017.

BRIASSOULIS, D.; PIKASI, A.; HISKAKIS, M. End-of-waste life: Inventory of alternative end-of-use recirculation routes of bio-based plastics in the European Union context. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, p. 1-58, 2019.

BUTLER, B. L.; VERGANO, P. J.; TESTIN, R. F.; BUNN, J. M.; WILES, J. L. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 953-96, 1996

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.

CAMILO, A. N. **Embalagens - Design, Materiais, Processos: Máquinas e Sustentabilidade**. 2. ed. Barueri: Instituto de Embalagens. p.400, 2011.

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. **Química Nova**, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006.

CARLSTEDT, J.; WOJTASZ, J.; FYHR, P.; KOCHERBITOV, V. Understanding starch gelatinization: the fase diagram approach. **Carbohydrate polymers**. v. 129, p. 62-69, 2015.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Efeito do transporte térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p.495-500, 2006.

CENCI-GOGA, B. T.; KARAMA, M.; SECHI, P.; IULIETTO, M. F.; NOVELLI, S.; MATTEI, S. Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of Mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6708-6718, 2014.

CHA, D. S.; COOKSEY, K.; CHINNAN, M. S.; PARK, H. J. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 209-213, 2004.

CHUNG, Y. C.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G.; WANG, H. L.; WU, J. C. G.; LIN, J. G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta pharmacologica sinica**, v. 25, n. 7, p. 932-936, 2004.

CHUNG, Y. L.; ANSARI, S.; ESTEVEZ, L.; HAYRAPETYAN, S.; GIANNELIS, E. P.; LAI, H. M. Preparation and properties of biodegradable starch-clay nanocomposites. **Carbohydrate polymers**. v. 79, n. 2, p. 391-396, 2010.

COLTRO, L.; ALVES, R. M. V. Tratamento superficial de filmes flexíveis por plasma. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 13, p. 708-714, 2001.

COSTA JÚNIOR, E. S. **Desenvolvimento de matriz quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2008.

COUPLAND, J. N.; SHAW, N. B.; MONAHAN, F. J.; DOLORES, F. J.; O'RIORDAN, E.; O'SULLIVAN, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. **Journal of food engineering**, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2000.

COUTINHO, F. M. B., MELLO I. L., SANTA MARIA, L. C. Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

CUI, N. Y.; UPADHYAY, D. J.; ANDERSON, C. A.; MEENAN, B. J.; BROWN, N. M. Surface oxidation of a Melinex 800 PET polymer material modified by an atmospheric

dielectric barrier discharge studied using X-ray photoelectron spectroscopy and contact angle measurement. **Applied surface science**, v. 253, n. 8, p. 3865-3871, 2007.

DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobial in food**. 3 ed. CRC press: New York, 2005.

DALCANTON, F.; PEREZ-RODRIGUEZ, F.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; ARAGÃO, G. M. F.; GARCÍA-GIMENO, R.M. Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* and shelf life of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 2580-2587, 2013.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat science**, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 246-253, 1998.

DOGUE, I. L. J.; MERMILLIOD, N.; BOIRON, G.; STAVERRIS, S. Improvement of polypropylene film adhesion in multilayers by various chemical surface modifications. **International journal of adhesion and adhesives**, v. 15, n. 4, p. 205-210, 1995.

ELIASSON, B.; KOGELSCHATZ, U. Nonequilibrium volume plasma chemical processing. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 19, n. 6, p. 1063-1077, 1991.

ELSABEE, M. Z.; ABDOUS, E. S. Chitosan based edible films and coatings: a review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1819– 184, 2013.

EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M. SOLEIMANIAN-ZAD, S. Evaluation of nanocomposite packing containing Ag and ZnO on shelf life of fresh Orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 742-748, 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 Control**, 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 nanorods arrays on the glass. **Physica B: Condensed 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 packing applications. **Food Bioprocess Technology**. v. 5. n. 5, p. 1447-1464, 2012.

European Food Safety Authority (EFSA). 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA J. 13:3991, 162 pp.

FENNEMA, O. R. (ED.). **Food Chemistry**. 3. ed. Madison, WI: Marcel Dekker, Inc., 1996.

FAO. **Food Wastage Footprint & Climate Change**. Disponível em <http://www.fao.org/fileadmin/templates/nr/sustainability_patways/doc/FWF_and_climate_change.pdf> Acesso em: 30 abr 2018.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação. **FAO desenvolve metodologia para mensurar desperdício de alimentos no mundo** (2018). Disponível em <<https://nacoesunidas.org/fao-desenvolve-metodologia-para-mensurar-desperdicio-de-alimentos-no-mundo/>>. Acesso em: 26 jul 2019.

FDA (1999). **Over-the-Counter Drug Products Containing Colloidal Silver Ingredients or Silver Salts**. Food and Drug Administration, Washington DC, USA. Disponível em <<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1999-08-17/pdf/99-21253.pdf>> . Acesso em: 17 jun 2017.

FDA (2016). 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: 17 jun 2017.

FERNÁNDEZ-BLÁZQUEZ, J. P., FELL, E. B., DEL CAMPO, A. Superhydrophilic and superhydrophobic nanostructured surfaces via plasma treatment. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 357, n. 1, p. 234–238, 2011.

Food and Drug Administration (FDA). Over-the-Counter Drug Products Containing Colloidal Silver Ingredients or Silver Salts. Federal Register, v. 61, p. 63685-53688, 1996.

FREITAS, D.; FERREIRA, T. R.; COSTA, T. H. C.; FEITOR, M. C.; BEZERRA, C. M.; ALVES JR, C. Tratamento em plasma de tecido 100% aramida para análise de molhabilidade. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v, 25, n. 4, p. 215-218, 2008.

GARCIA, S. J. F.; **Avaliação do efeito cicatrizando do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2011.

GEYTER, N., MORENT, R., LEYS, C., “Influence of ambiente conditions on the ageing behaviour of plasma treated PET surface”, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 266, n. 12-13, p. 3086-3090, 2008.

GHOSH, S. K.; PAL, S.; RAY, S. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 7, p. 4339-4355, 2013.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de Bacillus subtilis em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para o uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2007.

GONTARD, N. Active packaging. In: SOBRAL, P.J.A.; CHUZEL, G., eds. **Workshop sobre biopolímeros**. Pirassununga, FZEA, p. 23- 27, 1997.

GORDON, T.; PERLSTEIN, B.; HOUBARA, O.; FELNER, I.; BANIN, E.; MARGEL, S. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 374, n. 1–3, p. 1–8, 2011.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p.241-47, 2009.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A. B.; GIVSKOV, M. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 79-97, 2002.

HAN, J. H. Antimicrobial Food Packaging. **Food Technology**, v. 54, n. 3, p. 56-65, 2000.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. In: Ahvenainen R (Ed.) **Novel food packaging techniques**. Washington, CRC Press. p. 69-89, 2003.

HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. In: Han JH (Ed.) **Innovations in food packaging**. Baltimore, Elsevier Science & Technology Books. p. 80-107, 2005.

HAUSER, C.; WUNDERLICH, J. Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 197-202, 2011.

HIROTA, K.; SUGIMOTO, M.; KATO, M.; TSUKAGOSHI, K.; TANIGAWA, T.; SUGIMOTO, H. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. **Ceramics International**, v. 36, n. 2, p. 497-506, 2010.

HOLANDA, A. L. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB, 2011.

HOOVER, R.; HUNGHEES, T.; CHUNG, H. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulses starches: A review. **Food Research International**. v. 43, n. 2, p. 399-413, 2010.

HORCAS, I.; FERNÁNDEZ, R.; GOMEZ-RODRIGUEZ, J. M.; COLCHERO, J. W. S. X.; GÓMEZ-HERRERO, J. W. S. X. M.; BARO, A. M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of scientific instruments**, v. 78, n. 1, p. 013705, 2007.

HOWATSON, A. M. **An Introduction to Gas Discharges: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies**. Elsevier, 2013.

IULIETTO, M. F.; SECHI, P.; BORGOGNI, E.; CENCI-GOGA, B. T. Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. **Italian Journal of Animal Science**. v. 14, n. 3, p. 315-326, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2005. 1018p. JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products - test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association, Tokyo, Japan, 2000.

JAIN, A.; BHARGAVA, R.; PODDAR, P. Probing interaction of Gram-positive and Gram-negative bacterial cells with ZnO nanorods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1247-1253, 2013.

JAPANESE STANDARDS ASSOCIATION. Norma JIS Z 2801: 2000 - Antimicrobial products - Test for antimicrobial activity and efficacy. Tokyo, 2000.

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

JONES, R. J.; HUSSEIN, H. M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. Isolation of a lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 228-234, 2008.

JONES, N.; SUN, D.; SU, J. Y.; ZHANG, H.; SUE, H. J. Antimicrobial activity of ZnO nanoparticles suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. v. 279, n. 1, p. 71-76, 2008.

JUNG, B. O.; KIM, C. O.; CHOI, K. K.; LEE, Y. M.; KIM, J. J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 72, n. 13, p. 1713-1719, 1999.

KAMIŃSKA, A.; KACZMAREK, H.; KOWALONEK, J. The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 9, p. 1915-1919, 2002.

KARAM, L.; CASETTA, M.; CHIHIB, N. E.; BENTISS, F.; MASCHKE, U.; JAMA, C. Optimization of cold nitrogen plasma surface modification process for setting up antimicrobial low density polyethylene films. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 64, n. 299-305, 2016.

KARASKI, T. U.; RIBEIRO, F. M.; PEREIRA, B. R.; ARTEAGA, L. P. S. **Embalagem e Sustentabilidade: Desafios e Orientações no Contexto da Economia Circular**. São Paulo: CETESB, 2016. Disponível em: <http://www.abre.org.br/wp-content/uploads/2012/08/embalagem_sustentabilidade.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

KIM, S. W.; AN, Y. J. Effect of ZnO and TiO₂ nanoparticles preilluminated with UVA and UVB light on Escherichia coli and Bacillus subtilis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 243-253, 2012.

- KLODZINSKA, E.; SZUMSKI, M.; DZIUBAKIEWICZ, E.; HRYNKIEWICZ, K.; SKWAREK, E.; JANUSZ, W.; BUSZEWSKI, B. Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. **Electrophoresis**, v. 31, n. 9, p. 1590-1596, 2010.
- KOGELSCHATZ, B. E. A. M. H. A. U. Ozone synthesis from oxygen in dielectric barrier discharges. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 20, n. 11, p. 1421-1437, 1987.
- KOSTOV, K. D.; DOS SANTOS, A. L. R.; HONDA, R. Y.; NASCENTE, P. A.; KAYAMA, M. E.; ALGATTI, M. A.; MOTA, R. P. Treatment of PET and PU polymers by atmospheric pressure plasma generated in dielectric barrier discharge in air. **Surface and Coatings Technology**, v. 204, n. 18-19, p. 3064-3068, 2010.
- KRÖCKEL, L., 2013. The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products. In: **Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. InTech, P. 129-152, 2013.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, n. 1, p.1-27, 2000.
- KUMAR, R.; UMAR, A.; KUMAR, G.; NALWA, H. S. et al. antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. **Ceramics International**, v. 43, n. 5, p. 3940-3961, 2017.
- KWOK, D. Y.; LAM, C. N. C.; LI, A.; LEUNG, A.; WU, R.; MOK, E.; NEUMANN, A. W. Measuring and interpreting contact angles: a complex issue. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 142, p. 219-235, 1998.
- KWOK D,Y.; NEUMANN, A.W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 81, p. 167-249, 1999.
- 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. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 13, n. 1, p. 1-69, 1989.
- LECETA I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; DE LA CABA, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 889-899, 2013.
- LEINSTER, L. **Basic aspects of food preservation by hurdle technology**. International Journal of Food Microbiology, v. 55, n. 1-3, p. 181-186, 2000.
- LEPOT, N.; VAN BAELE, M. K.; VAN DEN RUL, H.; D'HAEN, J.; PEETERS, R.; FRANCO, D.; MULLENS, J. Influence of incorporation of ZnO nanoparticles and biaxial orientation on mechanical and oxygen barrier properties of polypropylene films for food packing applications. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 120, n. 3, p. 1616-1623, 2011.
- LEROUX, F.; CAMPAGNE, C.; PERWUELZ, A.; GENGEMBRE, L. Polypropylene film chemical and physical modifications by dielectric barrier discharge plasma treatment at

atmospheric pressure. **Journal of colloid and interface science**, v. 328, n. 2, p. 412-420, 2008.

LI, L. H.; DENG, J. C.; DENG, H. R.; LIU, Z. L.; LI, X. L. Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 378-382, 2010.

LI, X.; XING, Y.; JIANG, Y.; DING, Y.; LI, W. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. **International journal of food science & technology**, v. 44, n. 11, p. 2161-2168, 2009.

LIANG, Y.; JENSEN, R. E.; PAPPAS, D. D.; PALMESE, G. R.; Toughening vinyl ester networks with polypropylene meso-fibers: interface modification and composite properties. **Polymer**, v. 52, n. 2, p. 510-518, 2011.

LIMA, P. S. **Estudos calorimétricos da adsorção e liberação da pirimetamina e sulfadiazina em matriz de quitosana quimicamente modificada**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão - SE, 2009.

LIN, D.; ZHAO, Y. Innovation in the development and application of edible coating for fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Comprehensive Reviews Science in Food and Food Safety**, v. 6, n. 3, p. 60-75, 2007.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 12, p. 1348-1368, 2009.

LONGANO, D.; DITARANTO, N.; CIOFFI, N.; DI NISO, F.; SIBILLANO, T.; ANCONA, A.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A.; SABBATINI, L.; TORSI, L. Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 4, p. 1179-1186, 2012.

LOPES, S. A. **Estudos de Propriedades de Não Tecidos de Polipropileno Tratados por Descarga Corona e Plasma de Rádio Frequência**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP, 2012.

LOPES, S. A. **Propriedades de superfície introduzidas por plasma de Rádio Frequência (RF), descarga corona e spin-coating nos polímeros= PVDF, PDMS e kapton= Surface properties introduced by radio frequency (RF) plasma, corona discharge and spin-coating in polymers: PVDF, PDMS and kapton**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP, 2017.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de Antimicrobianos Naturais na conservação de Alimentos**. Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos 145, 2011.

MACÊDO, M. D. O. C.; MACÊDO, H. R. A.; SILVA, G. C.; SILVA, M. A. M.; JÚNIOR, C. A.; Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 7. n 2, p. 95-103, 2012.

MANIOS, S. G.; LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N. A generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 1-11, 2014.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2004.

MARTIN, E.; LINA, G.; DUMITRESCU, O. Staphylococcus/Staphylococcus aureus. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. Ed. Academic Press: Elsevier, 2014

MARTINS, A. B. **Efeitos de ácidos carboxílicos em blendas de polipropileno e amido termoplástico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Minas e Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Porto Alegre - RS, 2015.

MEDEIROS, G. R. Impregnação de óleo essencial de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus*) em filmes de polietileno linear de baixa densidade utilizando dióxido de carbon em altas pressões. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis - SC, 2017.

MEDVEĎOVÁ, A.; VALÍK, L. SIROTNÁ, Z.; LIPTÁKOVÁ, D. Growth characterisation of *Staphylococcus aureus* in milk: A quantitative approach. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, n. 6, p. 443–453, 2009.

MEEMUSAW, M.; MAGARAPHAN, R. Surface and bulk properties improvement of HDPE by a batch plasma treatment. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 7, 2016.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de Salmonella com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. Tese (doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2016.

MEZAROBA, C. Esterilização por plasma do polímero PEAD através da descarga RF e N₂-O₂. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade do Estado de Santa Catarina/UEDESC, Joinville - SC, 2017.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2011.

MILOSAVLJEVIC, V.; KARKARI, S. K.; LLINGBOE, A. R. Characterization of the pulse plasma source. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 304 - 312, 20017.

MINGYU, C.; KAI, G.; JIAMOU, L.; YANDAO, G.; NANMING, Z.; XIUFANG, Z. Surface modification and characterization of chitosan film blended with poly-L-lysine. **Journal of biomaterials applications**, v. 19, n. 1, p. 59-75, 2004.

MISRA, N.; TIWARI, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; CULLEN, P. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 3-4, p. 159-170, 2011.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHSEN, G. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction**. In: Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MONTE, M. B. M.; PERES, A. E. C. Química de Superfície na Flotação. In: LUZ, A.B; SAMPAIO, J. A; FRANÇA, S. C. A. *Tratamento de Minérios*. 5. ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. p. 397-461.

MORTAZAVI, M.; NOSONOVSKY, M.; A model for diffusion-driven hydrophobic recovery in plasma treated polymers. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 18, p. 6876-6883, 2012.

MÜLLER, L. **Incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana e avaliação da atividade antimicrobiana e cicatrizante**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2013.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, n. 2, p.131-140, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M7-A6: metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada**. 6. ed. Anvisa, v. 23, n.2. Substitui a Norma M7-A5 v. 20, n. 2. Disponível em <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo3.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.

NEVES, A. L. DE P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2013.

NEHRA, V.; KUMAR, A.; DWIVEDI, H. K. Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. **International Journal of Engineering**, v. 2, n. 1, p. 53-68, 2008.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). **Improving the safety of fresh meat**, p. 461-502, 2005.

OBERDÖRSTER, G.; STONE, V.; DONALDSON, K. Toxicology of Nanoparticles: A Historical Perspective. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 2007.

OGIER, J.C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAIHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. **Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 286-290, 2008.

OHIRA, T.; YAMAMOTO, O.; IIDA, Y.; NAKAGAWA, Z. Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**. v. 19, n. 3, p. 1407-1412, 2008.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. **Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, M. H. **Espectroscopia de plasma frio**. Relatório final de atividades (Projeto de Instrumentação para ensino de Física) Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, 2002.

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

OUATTARA, B.; SIMARD, R. R.; PIETTE, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R. A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International journal of food microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 139-148, 2000.

PAISOONSIN, S.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; RUJIRAVANIT, R. Preparation and characterization of ZnO-deposited DBD plasma-treated PP packing film with antibacterial activities. **Applied Surface Science**. v. 273, p. 824-835, 2013.

PANKAJ, S. K.; BUENO-FERRER, C.; MISRA, N. N.; MILOSAVLJEVIC, V.; O'DONNELL, C. P.; BOURKE, P.; KEENER, K. M.; CULLEN, P. J. Applications of cold plasma technology in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-17, 2014.

PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 17-22, 2004.

PASCUAL, M.; BALART, R.; SANCHEZ L.; FENOLLAR, O.; CALVO, O. Study of the aging process of corona discharge plasma effects on low density polyethylene film surface. **Journal Materials Science**. v.43, p. 4901-4909, 2008.

PATIL, S.; MOISEEV, T.; MISRA, N. N.; CULLEN, P. J.; MOSNIER, J. P.; KEENER, K. M.; BOURKE, P. Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores inside a sealed package. **Journal of Hospital Infection**, v. 88, n. 3, p. 162-169, 2014.

PEACOCK, A. J. **Handbook of polyethylene: structure, properties and applications**. New York: Marcel Dekker, 2000.

PEREIRA DE ABREU, D. A.; CRUZ, J. M.; PASEIRO LOSADA, P. Active and intelligent packaging for the food industry. **Food Reviews International**, v. 28, n. 2, p. 146-186, 2012.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 32, p. 629- 640, 1995.

POPELKA, A.; NOVÁK, I.; LEHOCKY, M.; BÍLEK, F.; KLEINOVÁ, A.; MOZETIC, M.; CHODÁK, I. Antibacterial treatment of LDPE with halogen derivatives via cold plasma. **Express Polymers Letters**, v. 9, n. 5, p. 402-411, 2015.

PONS, J.; MOREAU, E.; GÉRARD, T. Asymmetric surface dielectric barrier discharge in air at atmospheric pressure: electrical properties and induced airflow characteristics. **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 38, n. 19 p. 3635- 3642, 2005.

PRATES, M. F. O. **Elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de fruta-de-lobo e sorbitol e aplicação da cobertura em frutos de morango**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis - GO, 2010.

PROKOPOVICH, Polina; PERNI, Stefano. An investigation of microbial adhesion to natural and synthetic polysaccharide-based films and its relationship with the surface energy components. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 195-202, 2009.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G. STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules – American Chemical Society**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAGHAVENDRA, G. M.; JUNG J.; KIM, D.; SEO, J. Microwave assisted antibacterial chitosan–silver nanocomposite films. **International journal of biological macromolecules**. v. 84, p. 281-288, 2016

RAGHUPATI, P. K.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependet bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p. 4020-4028, 2011.

RANCOURT, Y.; COUTURAUD, B.; MAS, A.; ROBIN, J. J. Synthesis of antibacterial surfaces by plasma grafting of zinco oxide based nanocomposites onto polypropylene. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 402, p. 320-326, 2013.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

RAY, B., BHUNIA, A. **Fundamental food microbiology**, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2013.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st century materials world. **Progress in materials science**, v. 50, n. 8, p. 962-1079, 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. **Applied physics letters**, v. 90, n. 21, p. 213902, 2007.

REDDY, L. S.; NISHA, M. M.; JOICE, M.; SHILPA, P. N. Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 11, p. 1388-1397, 2014.

ROACH, P.; SHIRTCLIFFE, N. J.; NEWTON, M. I. Progress in superhydrophobic surface development. **Soft matter**, v. 4, n. 2, p. 224-240, 2008.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. The Macmillan Press Ltd: London, 1992.

ROBERTSON, G. L. **Food Packaging: Principles and Practice**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2013.

ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G.; DE CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C. Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. **Polímeros**. v. 24, n. 5, 2014.

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

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. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, A. L. R. **Estudo de polímeros comerciais tratados a plasma em pressão atmosférica**. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Estadual Paulista – Campus Guaratinguetá - UNESP - SP, 2010.

SAORIN, F. **Estudo de vida útil de alimentos acondicionados em embalagens contendo partículas de pratas incorporado na estrutura do material**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis - SC, 2015.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens Plásticas Flexíveis: Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, p. 267, 2002.

SAWAI, J.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, A.; KOKUGAN, T.; SHIMIZU, M. Effect of particle size and heating temperature of ceramic powders on antibacterial activity of their slurries. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 29, p. 251–256, 1996.

SEYFRIEDSBERGER, G.; RAMETSTEINER, K.; KERN, W. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. **European polymer journal**, v. 42, n. 12, p. 3383-3389, 2006.

SEYMOUR, R. B.; CARRAHER, C. E. **Seymour/Carraher's polymer chemistry: an introduction**. 6. ed. New York: CRC Press, 2003.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008.

SHAO, T.; ZHANG, C.; LONG, K.; ZHANG, D.; WANG, J.; YAN, P.; ZHOU, Y. Surface modification of polyimide films using unipolar nanosecond-pulse DBD in atmospheric air. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 12, p. 3888-3894, 2010.

SHENTON, M. J.; LOVELL-HOARE, M. C.; STEVENS, G. C. Adhesion enhancement of polymer surfaces by atmospheric plasma treatment. **Journal Physics D: applied Physics**, v. 34, n. 18, p. 1754–2760, 2001.

SHIN, G. H.; LEE, Y. H.; LEE, J. S.; KIM, Y. S.; CHOI, W. S.; PARK, H. J. Preparation of plastic and biopolymer multilayer films by plasma source ion implantation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 16p. 4608-4614, 2002.

SILVEIRA, M. R. DA S. **Funcionalização do Polietileno Linear de Baixa Densidade para promover adesão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2012.

SIRA, M.; TRUNEC, D.; ST'ACHEL, P.; BURSIKOVÁ, V.; NAVRÁTIL, Z. Surface modification of polycarbonate in homogeneous atmospheric pressure discharge, **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 41, n. 1, p.1-7, dec. 2008.

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

SOUZA, A. C.; BENZE, R.; FERRÃO, E. S.; DITCHFIELD, C.; COELHO, A. C. V.; TADINI, C. C.; Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 110–117, 2012.

SOUZA, A.C.; GOTO, G.E.O.; MAINARDI, J.A.; COELHO, A.C.V.; TADINI, C.C. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. **LWT- Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 346-352, 2013.

SOUZA, I. A. **Descarga em barreira dielétrica: construção de um reator DBD e caracterização mediante análises ópticas e elétricas do plasma produzido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte- RN, 2013.

SOUZA, R. C. **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**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2015.

ŠVORČÍK, V.; KOLÁROVÁ, K.; SLEPIČKA, P.; MACKOVÁ, A.; NOVOTNÁ, M.; HNATOWICZ, V. Modification of surface properties of high and low density polyethylene by Ar plasma discharge. **Polymer degradation and stability**, v. 91, n. 6, p. 1219-1225, 2006.

TANG, R.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHIMING, Y. Synthesis and characterization of chitosan based dye containing quaternary ammonium group. **Carbohydrate polymers**, v. 139, p. 191-196, 2016.

TALARO, K. P.; CHESS, B. **Foundations in microbiology**. McGraw-Hill Education, 2018.

TAM, K. H.; DJURISIC, A. B.; CHAN, C. M. N.; XI, Y. Y.; TSE, C. W., LEUNG, Y. H.; CHAN, W. K.; LEUNG, F. C. C. ; AU, D. W. T. Antibacterial activity of ZnO nanorods prepared by a hydrothermal method. **Thin Solid Films**, v. 516, n. 18, p. 6167–6174, 2008.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; da SILVA, L. C. C.; da ANGELA, H. L.; YOMADA, A. K.; BATAGLINI, A. P. P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A. A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1877-1886. 2012.

TANG, R.; DU, Y.; ZHENG, H.; FAN, L. Preparation and characterization of soy protein isolate–carboxymethylated konjac glucomannan blend films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 5, p. 1095-1099, 2003.

TAWALE, J. S.; DEY, K. K.; PASRICHA, R.; SOOD, K. N.; STRIVASTAVA, A. K.; Synthesis and characterization of ZnO tetrapods for optical and antibacterial applications. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1244–1247, 2010.

TAYEL, A. A. ; EL-TRAS, W. F. ; MOUSSA, S. ; EL-BAZ, A. MAHROUS, H. ; SALEM, M. F. ; BRIMER, L. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 211–218, 2011.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. F. Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2003.

THEAPSAK, S.; WATTHABAPHANIT, A.; RUJIRAVANIT, R. Preparation of chitosan-coated polyethylene packaging films by DBD plasma treatment. **Applied Materials and Interfaces**. v. 4, n. 5, p. 2474-2482, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N.

Microbiologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRINDADE NETO, C. G. **Membranas de quitosana micro e macroporosas: preparo, caracterização e estudos de permeabilidade**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2008.

TUOMINEN, M.; LAHTI, J.; LAVONEN, J.; PENTTINEN, T.; RÄSÄNEN, J. P.;

KUUSIPALO, J. The influence of flame, corona and atmospheric plasma treatments on surface properties and digital print quality of extrusion coated paper. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 471-492, 2010.

ULBIN-FIGLEWICZ, N.; ZIMPOCH-KORZYCKA, A.; JARMOLUK, A. Antibacterial activity and physical properties of edible chitosan films exposed to low-pressure plasma. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3646-3654, 2014.

VIDAURRE CASTRO, E. F.; ACHETE, C. A.; GALLO, F. GARCIA, D. SIMÃO, R.

HABERT, A. C. Surface Modification of Polymeric Materials by Plasma Treatment.

Materials by Plasma Treatment. **Materials Research**, v. 5, n. 1, p. 37-41, 2002.

WAGNER, H.E.; BRANDERBURG, R.; KOSLOV, K.V.; SONNENFELD, A.; MICHEL, P.;

BEHNKE, J.F. The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment, **Vacuum**, v. 71, n. 3, p. 417-436, may 2003.

WANG, X.; DU, Y.; LIU, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 2004.

WANG, X.; YANG, F.; YANG, W.; YANG, X. A study on the antibacterial activity of one-dimensional ZnO nanowire arrays: Effects of the orientation and plane surface. **Chemical Communication**, v. 42, p. 4419–4421, 2007.

WIACEK, A. E. Effect of surface modification on starch biopolymer wettability. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 228–237, 2015.

WONG, D. W. S.; GASTINEAU, F. A.; GREDORSKI, K. S.; TILLIN, S. J.; PAVLATH, A.

E. Chitosan-lipid films: Microstructure and surface energy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 540-544, 1992.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; LIONG, M.; MADLER, L.; GILBERT, B.; SHI, H.; YEH, J. I.;

ZINK, J. I.; NEL, A. E. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. **ACS nano**, v. 2, n. 10, p. 2121-2134, 2008.

XU, Xueji. Dielectric barrier discharge—properties and applications. **Thin solid films**, v. 390, n. 1-2, p. 237-242, 2001.

YAN, X.; YANG, L.; NA, Y.; JIN, W.; LI, Y.; LI, B. Surface roughness and hydrophilicity enhancement of polyolefin-based membranes by three kinds of plasma methods. **Surface and Interface Analysis**, v. 47, n. 4, p. 545-553, 2015.

YU, L.; CHEN, L. **Polymeric materials from removable Resources**. Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources: John Wiley & Sons, 2008.

ZANGHELINI, G. **Elaboração de filmes multiamadas de polietileno linear de baixa densidade e amido de mandioca com incorporação de nanopartículas de óxido de zinco**. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis - SC, 2017.

ZHANG, C.; SHAO, T.; LONG, K.; YU, Y.; WANG, J.; ZHANG, D.; ZHOU, Y. Surface treatment of polyethylene terephthalate films using DBD excited by repetitive unipolar nanosecond pulses in air at atmospheric pressure. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 38, n. 6, p. 1517-1526, 2010.

ZHANG, G.; HOLLEY, R. A. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 633-644, 1999.

ZHANG, H.; LV, X.; LI, Y.; WANG, Y.; LI, J. P25-graphene composite as a high performance photocatalyst. **ACS nano**, v. 4, n. 1, p. 380-386, 2009.

ZHANG, L.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 8, p. 939-944, 2008.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527-530, 2003.

ANEXO A – Especificação técnica dos *pellets*

Informação técnica



DOWLEX™ TG 2085B Polyethylene Resin

Descrição geral A Resina de Polietileno Linear de Baixa Densidade DOWLEX™ TG 2085B é produzida através do processo Solution. Esta resina oferece uma combinação exclusiva de excelentes propriedades mecânicas e ópticas, permitindo a redução de espessura com alta produtividade e velocidade.

Principais Características:

- Para aplicações de fina espessura e alta velocidade
- Laminação

Atende a:

- U.S. FDA 21 177 1520 (c) 3.2a

Consulte as regulamentações para obter mais detalhes.

Aditivo • Antibloqueio: 2500 ppm • Deslizamento: 1000 ppm • Auxiliar de Processamento: No

| Fisicas | Valor Típico (Inglês) | Valor Típico (Métrico) | Método |
|--|---------------------------|-------------------------|----------------|
| Densidade | 0,919 g/cm ³ | 0,919 g/cm ³ | ASTM D792 |
| Densidade base ¹ | 0,918 g/cm ³ | 0,918 g/cm ³ | Método Interno |
| Índice de fusão (190°C/2,16 kg) | 0,95 g/10 min | 0,95 g/10 min | ASTM D1238 |
| Filmes | Valor Típico (Inglês) | Valor Típico (Métrico) | Método |
| Espessura do filme | 1,5 mil | 38 µm | |
| Resistência à Perfuração (1,5 mil (38 µm)) | 109 ft-lb/in ² | 9,02 J/cm ² | Método Interno |
| Módulo Secante | | | ASTM D882 |
| 2% Secante, DM : 1,5 mil (38 µm) | 24700 psi | 170 MPa | |
| 2% Secante, DT : 1,5 mil (38 µm) | 30500 psi | 210 MPa | |
| Tensão | | | ASTM D882 |
| DM : Limite de elasticidade, 1,5 mil (38 µm) | 1450 psi | 10,0 MPa | |
| DT : Limite de elasticidade, 1,5 mil (38 µm) | 1450 psi | 10,0 MPa | |
| DM : Na Ruptura, 1,5 mil (38 µm) | 5370 psi | 37,0 MPa | |
| DT : Na Ruptura, 1,5 mil (38 µm) | 4640 psi | 32,0 MPa | |
| Alongamento | | | ASTM D882 |
| DM : Na Ruptura, 1,5 mil (38 µm) | 830 % | 830 % | |
| DT : Na Ruptura, 1,5 mil (38 µm) | 990 % | 990 % | |
| Resistência ao Impacto (1,5 mil (38 µm)) | 360 g | 360 g | ASTM D1709A |
| Resistência ao Rasgo Elmendorf ² | | | ASTM D1922 |
| DM : 1,5 mil (38 µm) | 700 g | 700 g | |
| DT : 1,5 mil (38 µm) | 920 g | 920 g | |
| Óticas | Valor Típico (Inglês) | Valor Típico (Métrico) | Método |
| Brilho (45°, 1,48 mil (37,5 µm)) | 57 | 57 | ASTM D2457 |
| Opacidade (1,48 mil (37,5 µm)) | 12 % | 12 % | ASTM D1003 |
| Extrusão | Valor Típico (Inglês) | Valor Típico (Métrico) | |
| Temperatura de Massa | 423 °F | 217 °C | |