

GERMANNA WILK REIS DE ALMEIDA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME
NANOCOMPÓSITO DE BASE CELULÓSICA E SUA AVALIAÇÃO
COMO EMBALAGEM ATIVA ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

GERMANNA WILK REIS DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME
NANOCOMPÓSITO DE BASE CELULÓSICA E SUA AVALIAÇÃO COMO
EMBALAGEM ATIVA ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2010.

Prof^ª. Nathália Ramos de Melo
(Coorientadora)

Prof. Paulo César Stringheta

Prof^ª. Ana Clarissa dos Santos Pires

Prof. Efraim Lázaro Reis

Prof^ª. Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio, amor, dedicação e constante sacrifício para realização do meu sonho. À minha irmã Eliza pela amizade, paciência e companheirismo. Motivo de orgulho. Devo tudo a vocês.

A toda minha maravilhosa família, Reis e Almeida, pelo amor, apoio e incentivo constantes. Meu porto seguro.

Ao Davi, por estar sempre ao meu lado, tornando os meus dias melhores.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar meus estudos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e pela competência que sempre nos motiva a seguir em frente.

Às professoras Nathália Ramos de Melo e Jane Sélia dos Reis Coimbra pelo aconselhamento, pela disposição, amizade e confiança.

Aos professores Ana Clarissa dos Santos Pires e Efraim Lázaro Reis pela participação na banca e pelas preciosas sugestões.

Ao professor Fabyano Fonseca e Silva pelos conselhos no planejamento estatístico, e ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela disponibilidade e atenção na realização das análises de AFM.

A toda equipe do Laboratório de Embalagens (LABEM) pelo auxílio e pela convivência, boas risadas e pelas novas e verdadeiras amizades que ali surgiram.

À Geany pelo grande auxílio, companheirismo e as inúmeras dicas.

À Rêmili, Hiasmyne e Laura pela grande e preciosa ajuda, pelo companheirismo e dedicação.

Às amigas de república, atuais e que já se mudaram, mas continuam sempre presentes pela forte amizade (Bárbara, Amanda, Fernanda e Tássia).

Ao Fernando pelo auxílio no laboratório, sempre prestativo e aos funcionários do DTA, pela contribuição em vários momentos.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

GERMANNA WILK REIS DE ALMEIDA, filha de Geraldo Magela de Almeida e Maria das Graças Reis de Almeida, nasceu em Itaúna, Minas Gerais, em 24 de outubro de 1984.

Em março de 2004, iniciou o Curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 2010.

CONTEÚDO

NOMENCLATURA	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Embalagens de Alimentos	3
2.1.1. Embalagens ativas	5
2.1.1.1. Embalagens antimicrobianas	7
2.2. Nanotecnologia	9
2.2.1. Nanotecnologia e a indústria de alimentos	10
2.2.2. Nanocompósitos	13
2.2.2.1. Argilas Montmorillonita (MMT)	14
2.2.2.2. Nanocompósitos antimicrobianos	18
2.2.2.2.1. Nanopartículas de prata	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Desenvolvimento dos nanocompósitos	23
3.2. Caracterização dos filmes e avaliação da interação dos nanocompostos com a matriz polimérica	24
3.2.1. Espessura	24
3.2.2. Microscopia de força atômica (MFA)	25
3.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	25
3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26
3.2.5. Propriedades mecânicas	26
3.2.6. Determinação da taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) ..	27
3.2.7. Determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO)	27
3.2.8. Voltametria por redissolução anódica (ASV)	28
3.3. Avaliação das características antimicrobianas dos nanocompósitos ..	28
3.3.1. Método de difusão em ágar	28
3.3.2. Método de difusão em meio líquido	29

3.4. Delineamento experimental.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Desenvolvimento dos nanocompósitos	31
4.2. Caracterização dos filmes e avaliação da interação dos nanocompostos com a matriz polimérica	31
4.2.1. Espessura	31
4.2.2. Microscopia de força atômica (MFA).....	32
4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	36
4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
4.2.5. Propriedades mecânicas.....	44
4.2.6. Determinação da taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) ..	46
4.2.7. Determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO).....	48
4.2.8. Voltametria por redissolução anódica	50
4.3. Avaliação das características antimicrobianas dos nanocompósitos ..	51
4.3.1. Método de difusão em ágar	51
4.3.2. Método de difusão em meio líquido	55
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	74

NOMENCLATURA

AC	Acetato de celulose
ASTM	American society for testing and materials
ASV	Voltametria por redissolução anódica
ATBC	Citrato de acetil-tributila
ATCC	American type culture collection
BOPP	Polipropileno biorientado
CLSI	Clinical laboratory standards institute
DO	Densidade óptica
EFSA	European food safety authority
FDA	Food and drug administration
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
MMT	Montmorillonita
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PET	Poli(etileno tereftalato)
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVdC	Poli(cloreto de vinilideno)
Ra	Rugosidade média
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
TTO	Taxa de transmissão ao oxigênio
TTVA	Taxa de transmissão ao vapor de água
UR	Umidade relativa

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura da Montmorillonita.....	15
2	Modificação química da MMT por troca iônica de cátions Na ⁺	16
3	Tipos de estruturas formadas resultantes da interação entre argilas e polímeros.....	17
4	Diagrama empregado no preparo dos filmes nanocompósitos utilizando-se o método <i>casting</i>	23
5	Procedimento empregado no preparo dos filmes nanocompósitos para observação ao microscópio eletrônico de transmissão.	25
6	Amostras dos filmes produzidos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (A) ; tratamento B (5 % Cloisite 10A) (B) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (C) ; tratamento D (5 % Cloisite 30B) (D) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (E) ; tratamento F (5 % Nanofil) (F) ; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (G) e tratamento H – controle (H)	31
7	Fotomicrografias em 2D dos filmes obtidas por MFA: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento B (5 % Cloisite 10A) (b) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (c) ; tratamento D (5 % Cloisite 30B) (d) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (e) ; tratamento F (5 % Nanofil) (f) ; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (g) e tratamento H – controle (h) . (60 x 60 μm).....	33
8	Fotomicrografias em 3D dos filmes obtidas por MFA: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento B (5 % Cloisite 10A) (b) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (c) ; tratamento D (5 % Cloisite 30B) (d) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (e) ; tratamento F (5 % Nanofil) (f) ; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (g) e tratamento H – controle (h) . (60 x 60 μm).....	34

9	Fotomicrografias dos filmes sem adição de prata, obtidas por MET: tratamento B (5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento D (5 % Cloisite 30B) (b) e tratamento F (5 % Nanofil) (c) . (50.000 x).....	37
10	Fotomicrografias dos filmes com adição de prata, obtidas por MET: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (b) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (c) e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) (d) . (50.000 x).....	38
11	Fotomicrografias superficiais dos filmes obtidas por MEV: tratamento B (5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento D (5 % Cloisite 30B) (b) ; tratamento F (5 % Nanofil) (c) e tratamento H - controle (d) . (1.000 x).....	40
12	Fotomicrografias superficiais dos filmes obtidas por MEV: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (b) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (c) e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) (d) . (1.000 x).....	41
13	Fotomicrografias do corte transversal dos filmes obtidas por MEV: tratamento B (5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento D (5 % Cloisite 30B) (b) ; tratamento F (5 % Nanofil) (c) e tratamento H - controle (d) . (5.000 x).....	42
14	Fotomicrografias do corte transversal dos filmes obtidas por MEV: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (b) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (c) e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) (d) . (5.000 x).....	43
15	Voltamogramas demonstrando a liberação de íons de prata dos nanocompósitos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (a) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (b) ; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (c) e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) (d)	50
16	Formação de zonas de redução de células de <i>Listeria innocua</i> pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (A) ; tratamento B (5 % Cloisite 10A) (B) ; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (C) ;	53

- tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**.....
- 17 Formação de halos de inibição de *Staphylococcus aureus* pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(A)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(B)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(C)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**..... 54
- 18 Formação de halos de inibição de *Escherichia coli* pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(A)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(B)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(C)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**..... 54
- 19 Formação de halos de inibição de *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(A)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(B)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(C)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**..... 55
- 20 Curvas de crescimento de *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis em meio TSB, na presença dos diferentes nanocompósitos produzidos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (—◆—); tratamento B (5 % Cloisite 10A) (—■—); tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (—▲—); tratamento D (5 % Cloisite 30B) (—■—); tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (—■—); tratamento F (5 % Nanofil) (—●—); tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (—■—); tratamento H (controle) (—■—) e branco - sem filme (—■—)..... 56

21 Curvas de crescimento de *Listeria innocua* em meio TSB, na presença dos diferentes nanocompósitos produzidos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (-◆-); tratamento B (5 % Cloisite 10A) (-■-); tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (-▲-); tratamento D (5 % Cloisite 30B) (-■-); tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (-■-); tratamento F (5 % Nanofil) (-●-); tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (-■-); tratamento H (controle) (-■-) e branco - sem filme (-■-).

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Exemplos de embalagens ativas e suas aplicações.....	6
2	Valores médios de Ra obtidos para os diferentes tratamentos.....	35
3	Rugosidade média (Ra) dos filmes contendo diferentes argilas, com a adição de prata.....	36
4	Rugosidade média (Ra) dos filmes contendo diferentes argilas sem a adição de prata.....	36
5	Propriedades mecânicas de resistência à tração dos nanocompósitos.....	44
6	Resistência à tração dos nanocompósitos AC / MMT.....	45
7	Influência da adição de prata nas características de resistência à tração dos nanocompósitos.....	45
8	Taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) em filmes simples.....	47
9	Valores médios da TTO para os nanocompósitos.....	48
10	TTO dos filmes contendo diferentes argilas, com adição de prata.....	49
11	TTO dos filmes contendo diferentes argilas, sem adição de prata.....	49
12	Diâmetro médio dos halos de inibição para <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> e <i>S. aureus</i>	52
13	Influencia da adição de prata no diâmetro dos halos de inibição dos nanocompósitos para <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> e <i>S. aureus</i>	53
14	Resumo da análise de variância para espessura dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	75

15	Resumo da análise de variância para rugosidade média dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	75
16	Resumo da análise de variância para a rugosidade média dos nanocompósitos comparando-se os tratamentos entre si.....	75
17	Resumo da análise de variância para a resistência à tração (MPa) dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	75
18	Resumo da análise de variância para a resistência à tração dos nanocompósitos comparando-se os tratamentos entre si.....	76
19	Resumo da análise de variância para a porcentagem de alongamento dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	76
20	Resumo da análise de variância para o módulo de elasticidade (MPa) dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	76
21	Resumo da análise de variância para a taxa de transmissão ao vapor de água dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	76
22	Resumo da análise de variância para a taxa de transmissão ao oxigênio dos nanocompósitos comparados ao filme controle.....	77
23	Resumo da análise de variância para a taxa de transmissão ao oxigênio dos nanocompósitos comparando-se os tratamentos entre si.....	77
24	Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para <i>E. coli</i> comparando-se os nanocompósitos ao filme controle.....	77
25	Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para <i>E. coli</i> comparando-se os tratamentos entre si.....	77
26	Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para <i>S. entérica</i> comparando-se os nanocompósitos ao filme controle.....	78

27	Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para <i>S. enterica</i> comparando-se os tratamentos entre si.....	78
28	Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para <i>S. aureus</i> comparando-se os nanocompósitos ao filme controle.....	78
29	Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para <i>S. aureus</i> comparando-se os tratamentos entre si.....	78
30	Resumo da análise de variância para curva de crescimento de <i>S. enterica</i> na presença dos diferentes nanocompósitos em comparação ao filme controle.....	79
31	Resumo da análise de variância para curva de crescimento de <i>L. innocua</i> na presença dos diferentes nanocompósitos em comparação ao filme controle.....	79

RESUMO

ALMEIDA, Germanna Wilk Reis de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Desenvolvimento e caracterização de filme nanocompósito de base celulósica e sua avaliação como embalagem ativa antimicrobiana.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-orientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Nathália Ramos de Melo.

A produção de alimentos com qualidade e segurança microbiológica é o objetivo constante das indústrias alimentícias. Neste contexto, estudos têm demonstrado a eficiência e a aplicabilidade das embalagens ativas antimicrobianas, capazes de inibir micro-organismos deterioradores e/ou patogênicos. Além disso, a preservação ambiental e a necessidade de se utilizar novas fontes de matéria-prima para diminuir a dependência do petróleo, são um incentivo para o desenvolvimento e utilização de embalagens obtidas a partir de materiais renováveis. O desenvolvimento de nanocompósitos pode melhorar as propriedades físicas e mecânicas de polímeros biodegradáveis, e dessa forma a nanotecnologia representa a possibilidade de obtenção de centenas de novos materiais para a indústria de embalagens de alimentos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanocompósitos de base celulósica adicionados de nanopartículas de prata e diferentes argilas montmorillonita (MMT), avaliar suas propriedades físicas e mecânicas e características microscópicas, e testar sua eficiência antimicrobiana *in vitro* sobre micro-organismos contaminantes de alimentos. As características dos filmes de acetato de celulose de espessura e taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) não foram alteradas pela adição dos nanocompostos. Porém, as nanopartículas de prata interagiram de forma desfavorável com a argila Nanofil, provocando um aumento nos valores de rugosidade média (R_a), taxa de transmissão ao oxigênio (TTO), e uma diminuição da resistência à tração dos nanocompósitos quando incorporados com a argila. Uma estrutura intercalada no interior do polímero foi observada para as argilas Cloisite 10A[®] e Cloisite 30B[®] por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), que evidenciou também a formação de estruturas tactóides da argila Nanofil[®]. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a formação de galerias no interior dos polímeros incorporados com os diferentes MMT's, e a formação de grandes estruturas na superfície dos nanocompósitos acetato /

Nanofil[®]. Ação antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis e *Staphylococcus aureus* foi observada pela formação de halos de inibição quando incubados a 7 °C. Porém, a velocidade específica de crescimento dos micro-organismos *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis e *Listeria innocua* não foi alterada pelos nanocompósitos. O método *casting* foi capaz de produzir nanocompósitos a partir do biopolímero acetato de celulose e argilas Cloisite 10A[®] e Cloisite 30B[®], porém a obtenção de uma estrutura intercalada das argilas organofílicas não é suficiente para a melhoria das propriedades de filmes biopoliméricos de acetato de celulose. Seu uso como embalagem ativa antimicrobiana deve ser otimizado para a liberação dos íons de prata.

ABSTRACT

ALMEIDA, Germanna Wilk Reis de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Development and characterization of cellulose based nanocomposite film and its evaluation as antimicrobial active food package.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-Advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Nathália Ramos de Melo.

The quality and microbiological safety of food products are priority for food industries. In this context, many reports have shown the applicability and efficiency of antimicrobial active food package in the inhibition of foodborne microorganisms. Further environment preservation and the need for new renewable sources to reduce use of petrochemical-based plastic packaging materials have increased the interest in biodegradable packaging materials. Nanocomposites exhibit significant improvements in the mechanical and physical properties of natural biopolymer films. Therefore nanotechnology represents a good possibility for generate new materials for food package applications. The objective of this work is to develop and character cellulose based nanocompósitos containing silver nanoparticles and montmorillonite (MMT) clays, evaluating its physical, mechanical and microscopes properties, and to test its in vitro antimicrobial efficiency against foodborne microorganisms. Cellulose acetate films thickness and water vapor transmission rate (WVTR) was not affected by the nanomaterials addition. However silver nanoparticles did not have a good interaction with Nanofil[®] clay, increasing the average roughness (Ra) and oxygen transmission rate (OTR), and decreasing tensile strength of Nanofil[®] charged nanocomposites. An intercalated form in the polymer was observed for Cloisite 10A[®] and Cloisite 30B[®] clays by transmission electronic microscopy (TEM), also showing tactoids structures for Nanofil[®] clay. Surface electronic microscopy (SEM) had shown the galleries structure of the polymer matrix containing MMT clays, and the presence of aggregates on acetate / Nanofil[®] nanocomposites surface. The antimicrobial action against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorotype Choleraesuis and *Staphylococcus aureus*, was observed by inhibition zones formed around the nanocomposites circles in disc diffusion tests, when incubated at 7 °C. The specific growth rate of *S. enterica* and *L. innocua* was not affected by

nanocomposites. The solvent casting method was able to produce cellulose acetate / clay bio-based nanocomposites with Cloisite 10A[®] and Cloisite 30B[®] clays, but the organoclays intercalated structure is not adequate for improving cellulose acetate based nanocomposites. Its use as antimicrobial active food package should be optimized for silver ions release.

1. INTRODUÇÃO

A provisão de alimentos seguros é de grande importância para atender a demanda dos consumidores cada vez mais preocupados com a inocuidade dos alimentos, buscando produtos de qualidade, nutritivos, mais próximos ao natural, convenientes e com maior vida de prateleira. Dessa forma, as embalagens têm sido desenvolvidas como uma tecnologia essencial para a manipulação e comercialização de alimentos. O uso de embalagens que possam interagir diretamente com o produto alimentício, no sentido de modificar aspectos desejáveis para a melhoria da qualidade do produto embalado tem sido sugerido nas últimas décadas. Essas embalagens são denominadas embalagens ativas e, como exemplos, podem ser citados os filmes antimicrobianos, filmes antioxidantes, sachês absorvedores de etileno, de oxigênio, de umidade e indicadores de controle de temperatura.

O elevado uso de polímeros na produção de embalagens para alimentos tem gerado preocupações sobre os problemas ambientais que podem ser causados pelo descarte e acúmulo de materiais não degradáveis no meio ambiente. Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de estender a vida de prateleira, a qualidade dos alimentos e ao mesmo tempo reduzir os prejuízos ao meio ambiente, utilizando embalagens produzidas a partir de materiais biodegradáveis de recursos renováveis. No entanto, o uso destas embalagens biodegradáveis é restrito uma vez que apresentam limitações quanto suas propriedades mecânicas e de barreira. Um dos caminhos mais promissores para se contornar estes problemas, é o desenvolvimento de novos materiais por meio da nanotecnologia.

O conceito de nanotecnologia tem se difundido amplamente no meio científico. Atualmente, a embalagem e o monitoramento de alimentos são o foco principal de pesquisa e desenvolvimento (P&D) nanotecnológico da indústria de alimentos. Na área de embalagens ativas a nanotecnologia é utilizada no desenvolvimento de materiais com objetivos de melhorar suas propriedades, assegurando melhor proteção dos alimentos contra efeitos microbiológicos, mecânicos, térmicos ou químicos, além de estender a vida de prateleira. Alguns dos usos potenciais da nanotecnologia em embalagens de alimentos incluem a modificação de características de permeabilidade em filmes, aumento das propriedades de barreira, melhoria das propriedades de

resistência mecânica e térmica, ação antimicrobiana, marcadores para rastreabilidade e uso de nanosensores para detecção de patógenos e contaminantes. Deste modo, o uso da nanotecnologia em embalagens ativas para alimentos constitui-se também de uma importante ferramenta para a indústria com o propósito de garantir a segurança microbiológica.

Nesse contexto, o objetivo principal deste trabalho foi, utilizando-se o método de *casting*, desenvolver e caracterizar filmes de base celulósica incorporados de nanopartículas de prata e diferentes argilas montmorillonita (MMT), e avaliar sua eficiência como embalagem ativa antimicrobiana para alimentos.

Objetivos específicos:

1. Desenvolver nanocompósitos biopoliméricos a base de acetato de celulose contendo nanopartículas de prata e MMT (Cloisite 10A[®], Cloisite 30B[®] e Nanofil[®]).
2. Avaliar o efeito da adição das diferentes argilas MMT e das nanopartículas de prata nas características estruturais, mecânicas e microscópicas dos filmes.
3. Avaliar capacidade de liberação de íons de prata pelos filmes.
4. Avaliar as características antimicrobianas dos filmes contra diferentes micro-organismos patogênicos contaminantes de alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Embalagens de Alimentos

Os alimentos, industrializados ou não, mantêm-se em constante atividade, manifestada por alterações de natureza química, física, microbiológica ou enzimática, perdendo em qualidade e vida útil. Com o propósito de evitar estas perdas, as embalagens exercem um papel fundamental, tornando-se uma tecnologia essencial na manipulação e comercialização de produtos alimentícios para oferecer os níveis requeridos de qualidade e segurança (LAGARÓN et al., 2005).

As embalagens têm como principais funções proteger os alimentos contra contaminação microbiológica, contra danos mecânicos e apresentar informações para comercialização e ao consumidor. A proteção é devida à barreira que a embalagem confere, por meio da impermeabilidade do material e sistemas de fechamento hermético, que impedem a entrada de micro-organismos.

As principais embalagens utilizadas são as metálicas (latas), frascos de vidro, papel, papelão e plásticos, na forma de garrafas, caixas, potes ou filmes para formação de sacos. Os papéis são flexíveis, leves e podem ser facilmente reciclados. Vidros e metais têm sido utilizados para produtos de alto valor agregado, sendo resistentes à corrosão e à tração, respectivamente (MAHALIK & NAMBIAR, 2010). Os polímeros apresentam muitas das características desejáveis para uma embalagem como transparência, maciez, termossoldabilidade e boa resistência (BOHLMANN, 2006). Sua extensa aplicação na indústria de embalagens (produção anual mundial aproximada de 200 MT e consumo médio per capita de 100 Kg) deve-se ao baixo peso e conseqüente menor custo, boas propriedades mecânicas como resistência ao rasgo e à tração, assim como boa barreira ao oxigênio e capacidade de vedação térmica. Os plásticos mais comumente utilizados na indústria de embalagens são derivados de produtos petroquímicos, entre eles o poli(etileno tereftalato) (PET), poli(vinilcloro) (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliamidas. Entretanto, estes materiais, por não serem nem totalmente recicláveis nem biodegradáveis, causam efeitos adversos ao meio ambiente, trazendo riscos à saúde humana e aos ecossistemas. Além disso, o

consumo de combustíveis fósseis (mais de 99% dos plásticos originam-se de combustíveis fósseis), a poluição ambiental, o esgotamento de aterros, o elevado consumo de energia nos processos de produção e a difusão de polímeros e alguns aditivos tóxicos em produtos alimentícios são alguns dos sérios problemas enfrentados pela indústria de embalagens. Portanto, uma forte tendência para o aumento do uso de materiais renováveis tem sido observada ultimamente (MAHALIK & NAMBIAR, 2010).

O mercado global para polímeros biodegradáveis excede 51 milhões de Kg e espera-se que esse valor aumente, a uma taxa de crescimento anual média de 12,6 %, para 93 milhões de Kg em 2010 (ARUAS et al., 2003; SCHLECHTER, 2005; MAHALIK & NAMBIAR, 2010).

Alguns dos bioplásticos mais utilizados são listados a seguir (GRIFFIN & TURNER, 1978; JAMSHIDDI et al., 1988; CHANDRA & RUSTGI, 1998; PARK et al., 2001; JAMES et al., 2005; PLASTICS TASK FORCE, 2008):

- Celulose: a celulose é isolada em seu estado cristalino na forma de microfibrilas por extração química. É solúvel em solventes como N-óxido de N-metilmorfolina. Devido à sua infusibilidade é normalmente convertida em seus derivados para torná-la mais processável. Tais derivados incluem os éteres de celulose como a metilcelulose (MC), carboximetil celulose (CMC), hidroxipropil celulose (HPC), hidroxipropil metilcelulose (HPMC), e os ésteres de celulose como o acetato de celulose (CA), propionato acetato de celulose (CAP), e butirato acetato de celulose (CAB).
- Amido: o amido normalmente consiste de uma mistura de 20 a 30 % de amilose, e 70 a 80 % de amilopectina. A biodegradabilidade de polímeros a base de amido é devido ao ataque enzimático às ligações glicosídicas entre os grupos de açúcares, levando a uma redução no comprimento da cadeia e liberação de unidades de açúcar de baixo peso molecular. Pode ser utilizado em sua forma nativa ou em misturas, adicionado a outros polímeros.
- Poli-beta-hidroxi alcanoatos (PHA): o PHA é facilmente degradado na presença de diversos micro-organismos que, quando em contato com o polímero, secretam enzimas que quebram suas cadeias em pequenas partes. Suas propriedades mais importantes são a característica termoplástica, 100 % de resistência à água e 100 % biodegradável.

- Ácido poliláctico (PLA): o PLA emerge como um dos materiais de embalagem mais atrativos devido a sua excelente biodegradabilidade, capacidade de processamento e biocompatibilidade. É um termoplástico, que pode ser processado por moldagem por injeção, sopro, termoformagem e extrusão. Filmes de PLA apresentam melhores propriedades de barreira à luz ultravioleta do que o polietileno de baixa densidade.

2.1.1. Embalagens ativas

Embalagem ativa é um conceito que combina avanços em tecnologia e segurança microbiológica dos alimentos, embalagens e materiais, esforçando-se para melhor atender às demandas de consumidores por alimentos mais frescos e seguros (SCANNEL et al., 2000). Estas visam interagir com o produto alimentício, modificando, de maneira desejável, características sensoriais, nutricionais e de segurança microbiológica, estendendo, assim, sua vida de prateleira e mantendo sua qualidade (VERMEIREN et al., 1999; VERMEIREN et al., 2002; DEVLIEGHERE et al., 2004).

As principais técnicas de embalagens ativas estão voltadas para a capacidade de absorção ou liberação de substâncias e têm sido utilizadas em uma variedade de produtos alimentícios (Tabela 1). Cada um destes produtos tem mecanismos diferentes de deterioração, sendo necessário seu conhecimento para que a embalagem ativa adequada possa ser selecionada (VERMEIREN et al., 1999; BERTAN, 2008; BRAGA & PERES, 2010).

Tabela 1. Exemplos de embalagens ativas e suas aplicações.

Embalagens Ativas	Principais Componentes	Aplicações
Absorvedor de oxigênio	Pós de ferro, ácido ascórbico, compostos organometálicos, glicose-oxidase, etanoloxidase	Produtos de panificação, café, chá, leite em pó, queijos, produtos cárneos
Absorvedor de etileno	Permanganato de potássio, carvão ativado, sílica gel, zeólito, argila	Frutas e hortaliças
Absorvedor de umidade	Propilenoglicol, poli (álcool vinílico), sílica gel, terra diatomácea, argila	Frutas, vegetais, produtos congelados e de panificação
Absorvedor de dióxido de carbono	Hidróxido de cálcio + hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, óxido de cálcio e sílica gel	Café torrado, produtos desidratados
Emissores de etanol	Etanol	Produtos de panificação, peixe
Liberadores e conservantes antimicrobianos	Sorbatos, benzoatos, propionatos, etanol, ozônio, peróxido, dióxido de enxofre, antibióticos, zeólito de prata, enzimas	Carne, peixe, queijo, frutas secas e produtos de panificação
Emissores de dióxido de carbono	Ácido ascórbico, carbonato de ferro + haleto metálico	Frutas e hortaliças, peixes, carnes e aves

Fonte: BRAGA & PERES, 2010.

Um agente ativo pode ser incorporado no interior do material da embalagem ou em sua superfície, em estruturas multicamadas ou em determinados elementos associados à embalagem como sachês, rótulos ou tampas de garrafas. A natureza dos compostos ativos que podem ser incorporados é muito diversificada (ácidos orgânicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extratos naturais, íons, etanol, etc.), assim como a natureza dos materiais onde serão incorporados, como papéis, plásticos, metais ou suas combinações (DAINELLI et al., 2008).

De acordo com SARANTÓPOULOS et al. (1996), a embalagem ativa deve atender aos seguintes requisitos: (a) ser segura em termos de saúde pública; (b) absorver/emitir o gás ou vapor de interesse em velocidade

apropriada; (c) apresentar alta capacidade de absorção do gás ou vapor de interesse; (d) não acarretar reações paralelas desfavoráveis; (e) não causar alterações sensoriais indesejáveis no produto; (f) manter-se estável durante a estocagem; (g) ser compacta; e (h) apresentar custo compatível com a aplicação.

Diversas publicações e revisões científicas têm se dedicado à pesquisa em tecnologias de embalagens ativas para alimentos (AHVENAINEN, 2003; BRODY et al., 2001; HAN, 2005; OZDEMIR & FLOROS, 2004; MELO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007; SILVA et al., 2007; PIRES et al., 2008; DAINELLI et al., 2008; SANTIAGO-SILVA et al., 2009).

Nos EUA, Japão e Austrália, o conceito de embalagens ativas está sendo aplicado com sucesso. Na Europa, o desenvolvimento e a aplicação desse tipo de embalagem são limitados devido a restrições de legislação, medo ou resistência do consumidor, necessidade de maior conhecimento sobre a efetividade e impacto econômico e ambiental (VERMEIREN et al., 2002; DAINELLI et al.; 2008).

A pesquisa e o desenvolvimento no campo de embalagens ativas são dinâmicos e desenvolvem-se em relação com a busca por soluções em embalagens ecologicamente corretas. Neste contexto, o design de embalagens é um desafio real e implicará no uso de uma abordagem de engenharia reversa baseada nas necessidades alimentares e não apenas na disponibilidade de materiais.

2.1.1.1. Embalagens antimicrobianas

Como um dos métodos inovadores em embalagens ativas, as embalagens antimicrobianas, desenvolvidas pela aplicação de compostos antimicrobianos em combinação com materiais de embalagens de alimentos, tem recebido atenção considerável com potencial aplicação para uma variedade de alimentos incluindo carnes, peixes, aves, pães, queijos, frutas e vegetais (LABUZA & BREENE, 1989; HAN, 2000; CHA & CHINNAN, 2004; CAGRI et al., 2004; RHIM & NG, 2007).

As embalagens antimicrobianas são capazes de eliminar ou inibir micro-organismos deterioradores e/ou patogênicos. Estas embalagens são utilizadas sendo uma barreira microbiológica às tradicionais barreiras físicas de oxigênio

e umidade (HAN, 2003). Nas embalagens antimicrobianas, a liberação dos aditivos aumenta a segurança para o consumidor, uma vez que esses compostos, ao invés de diretamente adicionados ao alimento, são liberados de maneira controlada em sua superfície; com isso, estão presentes em menor quantidade e, apenas onde sua presença é requerida, a saber, na superfície do produto, onde a maior parte das deteriorações ocorre e onde se encontra uma maior contaminação microbiana (GONTARD, 1997; APPENDINI & HOTCHKISS, 2002; MELO, 2006).

O sistema de embalagem pode inibir o crescimento microbiano em alimentos não esterilizados ou pasteurizados, prevenindo contaminação pós-processo. De acordo com HAN (2002), a embalagem antimicrobiana deve ser planejada considerando: (1) o tipo de agente antimicrobiano a incorporar e que atuará como mecanismo de inibição; (2) a natureza química do agente antimicrobiano; (3) as características físico-químicas do alimento; (4) a fisiologia do micro-organismo alvo e a microbiota do alimento; (5) a cinética de migração do agente antimicrobiano ao alimento; (6) o ambiente e temperatura de estocagem; (7) o processo de fabricação do filme; (8) a toxicidade e aspectos regulatórios; (9) as propriedades sensoriais do agente antimicrobiano; e (10) a adequação ao processo da embalagem antimicrobiana.

A substância antimicrobiana pode ser incorporada à embalagem através da simples mistura com o material de embalagem, imobilização ou recobrimento, dependendo das características do sistema de embalagem, agente antimicrobiano e alimento. De acordo com Han (2003), a função antimicrobiana pode ser obtida por três formas: por migração/difusão ou evaporação do agente antimicrobiano ao alimento ou espaço livre; pela absorção de um ou mais fatores essenciais ao crescimento do micro-organismo, como no caso de absorvedores de oxigênio, que previne o crescimento de fungos filamentosos; e pela imobilização, em que o agente antimicrobiano não migra para o alimento, mas impede o crescimento de micro-organismos na superfície de contato.

As substâncias antimicrobianas que podem ser incorporadas aos materiais de embalagem são os aditivos de grau alimentício, as substâncias naturais presentes em alimentos, os produtos de biotecnologia, os polímeros antimicrobianos ou outros que tenham autorização de uso (YAMADA, 2004).

A atividade antimicrobiana de uma substância ativa incorporada a um polímero pode ser reduzida em decorrência das condições de processo de fabricação do filme, de estocagem e distribuição do material de embalagem. Entre os processos de fabricação são utilizados os processos de extrusão ou termo-compressão, e moldagem por solventes (*solvent casting*). O processo de extrusão é o maior fator de perda de atividade antimicrobiana. Devido às condições de alta temperatura, tensão de cisalhamento e pressão, a estabilidade química ou bioquímica é afetada, reduzindo a atividade antimicrobiana residual (HAN & FLOROS, 1999; BRODY et al., 2001).

A manutenção da ação antimicrobiana, a homogeneidade na distribuição, compatibilidade química, integridade, propriedades físico-mecânicas e óticas do filmes devem ser consideradas. Estudos morfológicos dos polímeros são importantes para predizer a perda de integridade causada pela adição do agente antimicrobiano. Segundo Han (2003), antimicrobianos na forma de pequenas partículas podem ser misturados ao material polimérico e posicionados em regiões amorfas da estrutura, se grandes quantidades forem usadas, após saturação dos espaços amorfos a substância começa a interferir nas interações polímero-polímero na região cristalina, reduzindo a integridade do material de embalagem.

2.2. Nanotecnologia

Nanotecnologia é a habilidade de se trabalhar em uma escala de 1 a 100 nm com o objetivo de entender, criar, caracterizar e utilizar materiais, dispositivos e sistemas com novas propriedades derivadas de sua nanoestrutura (ROCO, 2003).

As principais vantagens que as nanotecnologias oferecem em relação às outras tecnologias existentes surgem das novas ou melhores funcionalidades dos materiais e substâncias (coletivamente denominados nanomateriais) em escala nanométrica. Devido ao seu tamanho, as nanopartículas têm uma área superficial proporcionalmente maior e, conseqüentemente, mais átomos em sua superfície do que suas contrapartes em microescala. Na faixa da nanoescala, os materiais podem apresentar diferentes propriedades eletrônicas, afetando suas propriedades ópticas, catalíticas e outras propriedades reativas (BOCCUNI et al., 2008; KAHN, 2006).

O advento da nanotecnologia desencadeou grandes prospectos para o desenvolvimento de novos produtos e aplicações para uma variedade de setores industriais e de consumo. Os novos desenvolvimentos tecnológicos iniciaram uma indústria multibilionária, e espera-se que seu impacto no mercado mundial alcance US\$ 1 trilhão em 2015, com aproximadamente 2 milhões de trabalhadores (ROCO & BAINBRIDGE, 2001). Enquanto a maioria da produção e uso de nanomateriais ocorre nos Estados Unidos, a União Européia, com aproximadamente 30 % da parcela global do setor, não fica muito atrás neste campo (AITKEN et al., 2006; CHAUDHRY et al., 2005).

Como nos outros setores, a nanotecnologia promete revolucionar toda a cadeia de alimentos, desde a produção até o processamento, armazenamento, e desenvolvimento de novos materiais, produtos e aplicações. Embora as potenciais aplicações da nanotecnologia sejam amplas, seu atual aproveitamento nos setores de alimentos e agricultura é relativamente pequeno, pois trata-se de uma ciência ainda recente e emergente. Uma visão geral sobre os mais de 800 produtos de consumo desenvolvidos com nanotecnologia atualmente disponíveis em todo o mundo (WWICS, 2009), sugere que apenas em torno de 10 % sejam de alimentos, bebidas e embalagens para alimentos. Entretanto, produtos e aplicações derivados da nanotecnologia nestes setores têm aumentando continuamente nos últimos anos, e a previsão é de rápido crescimento no futuro. Isto porque as novas tecnologias têm um grande potencial para corresponder a muitas das atuais necessidades das indústrias (FAO/WHO, 2010).

2.2.1. Nanotecnologia e a indústria de alimentos

Como em qualquer outro setor, a indústria de alimentos é direcionada por inovações, competitividade e rentabilidade. Por esse motivo, está sempre buscando por novas tecnologias para oferecer produtos com melhores propriedades sensoriais, maior vida-de-prateleira, segurança microbiológica e rastreabilidade. Outros fatores decisivos, como a crescente preocupação dos consumidores com a saúde e medidas de controle e regulamentação mais rigorosas, direcionam a indústria na procura por novas maneiras de se reduzir a quantidade de sal, açúcar, gordura, corantes e conservantes artificiais em seus produtos, e a abordar certas doenças relacionadas aos alimentos como

obesidade, hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, desordens digestivas, alguns tipos de câncer e alergias. As necessidades relacionadas às embalagens de alimentos também passaram por modificações e atualmente exigem materiais mais fortes, porém leves, recicláveis e funcionais. Fatores que também estão moldando a indústria de alimentos são aqueles relacionados à necessidade de se controlar patógenos e toxinas em alimentos, reduzir o desperdício de embalagens e alimentos, e minimizar a emissão de carbono (CO₂) no ciclo de vida de produtos e processos alimentícios. Neste contexto, o advento da nanotecnologia traz esperanças para a solução de muitas das necessidades da indústria de alimentos (FAO/WHO, 2010).

Uma avaliação das pesquisas realizadas demonstra que a aplicação da nanotecnologia em alimentos é liderada pelos EUA, seguido do Japão e China (HELMUT KAISER CONSULTANCY, 2004). Existe ainda um grande potencial de crescimento deste setor nos países em desenvolvimento. Índia, Coreia do Sul, Irã e Tailândia estão focados em aplicações específicas da nanotecnologia para o crescimento econômico e necessidades de seus países. O Irã, por exemplo, desenvolve um programa de nanotecnologia para o uso na agricultura e indústria de alimentos (JOSEPH & MORRISON, 2006). Pesquisadores de universidades do México e da Índia estão trabalhando, em conjunto, no desenvolvimento de herbicidas em nanoescala não tóxicos. O foco deste trabalho é procurar um caminho para atacar a cobertura das sementes de ervas daninhas e prevenir a sua germinação (GARBER, 2007).

Apesar da pouca idade do setor de nanoalimentos, a dimensão total de seu mercado global em 2006 foi estimada em aproximadamente US\$ 7 bilhões, e espera-se crescer ainda mais, acima dos US\$ 20 bilhões em 2015 (HELMUT KAISER CONSULTANCY, 2004). Outro estudo desenvolvido pela empresa de consultoria CIENTÍFICA, estimou que, em 2006, aplicações de nanotecnologias em alimentos estariam em torno de US\$ 410 milhões (US\$ 100 milhões no processamento de alimentos, US\$ 100 milhões em ingredientes para alimentos e US\$ 210 milhões para embalagens de alimentos). De acordo com a informação, as aplicações existentes são, em sua maioria, voltadas para a melhoria de materiais de embalagens e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de compostos bioativos e nutrientes. O relatório prediz que em 2012 o valor de mercado geral alcançará US\$ 5,8 bilhões (US\$ 1303 milhões no processamento de alimentos, US\$ 1475 milhões na formulação de

ingredientes, US\$ 97 milhões em segurança alimentar e US\$ 2,93 bilhões em embalagens de alimentos) (CIENTIFICA, 2006).

Diversos autores relatam as aplicações que já estão sendo utilizadas e aquelas projetadas para uso em curto prazo (BOUWMEESTER et al., 2007; CHAUDHRY et al., 2008; FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND, 2008; GROVES, 2008; MORRIS, 2008). De acordo com Chaudhry et al. (2008), as principais categorias de aplicações na área de alimentos são aquelas onde:

- ingredientes para alimentos são formulados e processados para formar nanoestruturas;
- aditivos nanoparticulados ou nanoencapsulados são incorporados ao alimentos;
- nanopartículas são incorporadas em revestimentos e embalagens, e nanobiosensores para embalagens inteligentes;
- nanomateriais são utilizados em nanofiltração para a remoção de componentes indesejáveis nos alimentos;
- nanopartículas são incorporadas em pesticidas, drogas veterinárias e outros agroquímicos para a melhoria dos sistemas de produção de alimentos.

Os mecanismos comumente utilizados na produção de alimentos nanoestruturados incluem nano-emulsões, micelas surfactantes, emulsões duplas ou múltiplas, e micelas reversas (WEISS et al, 2006). E como exemplo de aplicação são os chamados alimentos nanotexturizados, que incluem maionese, cremes, iogurtes, sorvetes, etc. O objetivo da nanotexturização de alimentos é desenvolver novos sabores, melhorar a textura, consistência e estabilidade de emulsões.

A nanoencapsulação na forma de micelas, lipossomas ou partículas biopoliméricas tem sido utilizada para desenvolver sistemas de liberação de aditivos e suplementos para uso em alimentos e bebidas. É uma extensão tecnológica da microencapsulação comumente utilizada na indústria de ingredientes e aditivos para alimentos. Os benefícios oferecidos pela nanoencapsulação estão relacionados à preservação dos compostos durante o processamento e armazenamento, liberação controlada, melhor dispersão de ingredientes e aditivos insolúveis em água, bem como a melhoria da absorção e biodisponibilidade de nutrientes e suplementos encapsulados (FAO/WHO, 2010).

Das atuais e potenciais aplicações da nanotecnologia no setor alimentício, àquelas relacionadas às embalagens e materiais de contato com alimentos constituem a principal parcela (CHAUDHRY et al., 2008; CIENTIFICA, 2006). Enquanto a maioria das aplicações em agricultura e alimentos encontra-se em fase de pesquisa e desenvolvimento ou em estágios próximos do mercado, as aplicações em embalagens de alimentos estão rapidamente se tornando uma realidade comercial. Os fatores que contribuem para estes desenvolvimentos incluem benefícios em termos de materiais mais resistentes porém leves e aumento da vida útil de alimentos embalados. Dentre as tecnologias atualmente disponíveis, as principais estão relacionadas às seguintes categorias: (a) materiais incorporados de nanopartículas para melhoria de propriedades como flexibilidade, barreira a gases e estabilidade à temperatura e umidade; (b) materiais ativos incorporados de nanopartículas com propriedades antimicrobianas ou de degradação de oxigênio; (c) embalagens inteligentes, incorporadas de nanosensores para monitoramento e informação das condições do alimento; (d) nanocompósitos biodegradáveis com melhores propriedades mecânicas e funcionais (FAO/WHO, 2010).

2.2.2. Nanocompósitos

Compósitos poliméricos são misturas de polímeros e compostos orgânicos ou inorgânicos de diferentes geometrias (fibras, flocos, esferas, partículas). Diversos compósitos têm sido desenvolvidos pela adição de compostos de reforço aos polímeros para melhorar suas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira. O uso de compostos que possuem pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, produz nanocompósitos poliméricos (ALEXANDRE & DUBOIS, 2000).

Atualmente, as principais pesquisas e aplicações comerciais de nanocompósitos são na área automobilística e de materiais de embalagem, onde oferecem transparência, baixa permeabilidade e maior resistência (COLLISTER, 2002; PATIL, 2005; RAY et al., 2006).

Nanocompósitos têm sido explorados para o desenvolvimento de filmes e revestimentos biodegradáveis com o objetivo de reduzir a deposição e acúmulo de materiais como embalagens de alimentos, copos, garrafas e sacolas plásticas, descartadas no meio ambiente (THARANATHAN, 2003),

uma vez que a maioria dos materiais utilizados para embalagens de alimentos não são biodegradáveis, representando um problema ambiental global.

O uso de polímeros biodegradáveis é limitado devido a problemas relacionados ao seu desempenho, processamento e custo. O amido, por exemplo, tem recebido atenção para seu uso como polímero termoplástico biodegradável (SOUZA & ANDRADE, 2000; MALI & GROSMANN, 2003; MALI et al., 2002, 2004a, 2005, 2006; GODBILLOT et al., 2006; ALVES et al., 2007; SHIMAZU et al., 2007), entretanto, sozinho, possui baixo desempenho devido a sua sensibilidade à água e propriedades mecânicas, como resistência à tração e módulo elástico, limitadas (VAIDYA & BHATTACHARYA, 1994; DUFRESNE & VIGNON, 1998). A aplicação da nanotecnologia a estes polímeros por meio do desenvolvimento de nanocompósitos abre novas possibilidades para a melhoria não apenas das suas propriedades, mas também do custo-benefício (SORRENTINO et al., 2007).

O interesse em melhorar as propriedades mecânicas e estruturais de biopolímeros tem crescido muito nas últimas décadas. Os materiais de reforço devem ser inertes e podem estar em diversas formas, dependendo da aplicação desejada (SOUZA, 2007). Dentre os diversos tipos de materiais de reforço pode-se citar nanopartículas esféricas de sílica, nanotubos de carbono, nanofibras (wiskers) de celulose, argilas e silicatos (AZEREDO, 2009).

Apesar das diversas nanopartículas reconhecidas como aditivos para melhorar o desempenho de polímeros, a indústria de embalagens tem concentrado sua atenção principalmente em sólidos inorgânicos como argilas e silicatos. O tipo mais amplamente estudado de argila para reforço de polímeros é a montmorillonita (MMT).

2.2.2.1. Argilas Montmorillonita (MMT)

A montmorillonita é um argilomineral formado essencialmente de silicatos de alumínio hidratados. Possui uma estrutura na qual os átomos de silício e alumínio se dispõem em forma de tetraedros e octaedros, respectivamente, arranjados em lâminas (Figura 1) (GOMES, 1986). As principais razões que levaram à popularização do emprego da MMT na obtenção de nanocompósitos são: sua origem natural (originária da alteração das cinzas vulcânicas), poder de intumescimento, capacidade de troca

catiônica, plasticidade, resistência mecânica e capacidade de delaminação (separação das camadas de argila) (KIM & WHITE, 2006).

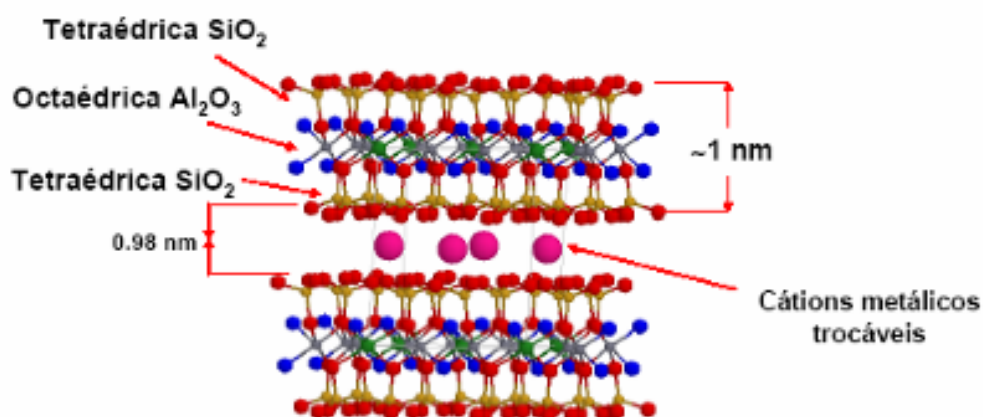


Figura 1. Estrutura da Montmorillonita. (SANTOS, 2007).

Por apresentar um caráter hidrofílico, as argilas MMT naturais são incompatíveis com polímeros apolares (caráter hidrofóbico) e quando misturados geram aglomerados de argila (separação de fase). Assim, é necessário realizar uma modificação em sua superfície para torná-las mais organofílicas. A modificação mais comum para argilas é a troca iônica dos cations presentes dentro das galerias por cations orgânicos (organofilização) de amônio, fosfônio, imidazol, fluoro, anilina, além de líquidos iônicos e oligômeros (Figura 2). Essa modificação pode ser ainda através da graftização de hidrocarbonetos por plasma e reações químicas com silanos ou por adsorção em sua superfície de moléculas menores que podem modificá-la quimicamente (SANTOS, 2007).

2008) e ao vapor de água (BHARADWAJ, 2001; JAWAHAR & BALASUBRAMANIAN, 2006; LOTTI et al., 2008; MANGIACAPRA et al., 2006). Argilas também têm sido utilizadas para melhorar a resistência mecânica de biopolímeros, viabilizando seu uso em diferentes aplicações (PARK et al., 2003; WEISS et al., 2006; XU et al., 2006; DEAN et al., 2007).

Quando argilas MMT são adicionadas a um polímero, três tipos de compósitos podem ser obtidos: estruturas tactóides, intercaladas e esfoliadas (Figura 3). Na forma tactóide, as partículas de argila estão dispersas na matriz polimérica, porém suas camadas não se separam, formando microcompósitos. Neste formato, a argila serve apenas como um enchimento convencional. A intercalação e esfoliação produzem nanocompósitos ideais. Em um nanocompósito intercalado, a cadeia polimérica é conduzida entre as camadas de silicato da argila, mas o sistema continua a ser ordenado em um tipo de arranjo empilhado. Em um nanocompósito esfoliado as camadas de silicato estão completamente delaminadas umas das outras e bem dispersas. O nanocompósito esfoliado apresenta as melhorias mais significativas nas propriedades físicas de polímeros (USUKI et al., 1993). A obtenção da intercalação ou esfoliação dependerá do tipo de argila utilizada e das condições de processamento (LI & HA, 2003).

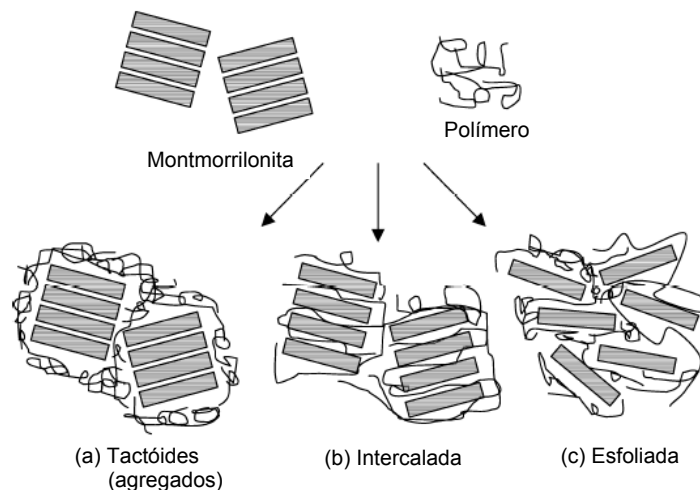


Figura 3. Tipos de estruturas formadas resultantes da interação entre argilas e polímeros. (Adaptado de RHIM & NG, 2007).

Muitos métodos podem ser utilizados na síntese de nanocompósitos polímero/argila, e, sendo suas propriedades dependentes do procedimento de preparo (WAN et al., 2003; SHEN et al., 2002; ARTZI et al., 2002; SUH et al.,

2000), a escolha deste método é de suma importância. Polimerização *in situ*, intercalação/esfoliação por solventes (método *solvent casting*) e intercalação/esfoliação por derretimento (método da extrusão, moldagem por injeção) são as três principais vias para a formação de nanocompósitos.

No método de solubilização por solventes, primeiramente a argila é intumescida em um solvente, o qual também é utilizado para a solubilização do polímero. Ambas as soluções são então combinadas, e as cadeias poliméricas se intercalam deslocando o solvente de dentro das camadas internas da argila (SHEN et al., 2002). É adequado para polímeros com baixa ou nenhuma polaridade na estrutura em camadas, e facilita a produção de filmes finos com o polímero orientado e intercalado nas camadas da argila. Esta técnica tem sido amplamente utilizada com polímeros solúveis em água para produzir nanocompósitos como poli(óxido de etileno) (PEO) (CHOI et al., 2001; OGATA et al., 1997) e poli(vinil álcool) (PVOH) (STRAWHECKER & MANIAS, 2000; OGATA et al., 1997), e também nanocompósitos de polímeros solúveis em outros tipos de solventes, como a policaprolactona (PCL) (JIMENEZ et al., 1997) e polilactona (PLA) (OGATA et al., 1997). É uma metodologia comumente utilizada no preparo de filmes biopoliméricos e, portanto, pode ser facilmente adotada no preparo de filmes nanocompósitos com biopolímeros naturais (RHIM & NG, 2007).

O mercado disponível para nanocompósitos de materiais biopoliméricos é bastante limitado, pois materiais preparados a partir de polímeros naturais apresentam baixo desempenho se comparados àqueles preparados a partir de polímeros sintéticos. Entretanto, pesquisas recentes (MCGLASHAN & HALLEY, 2003; GROSSMANN, 2007; KOH et al., 2008) indicam que as argilas apresentam-se como compostos promissores no desenvolvimento de nanocompósitos biopoliméricos em termos de melhorias em suas propriedades mecânicas, de barreira e estabilidade em relação às formulações convencionais (RHIM & NG, 2007).

2.2.2.2. Nanocompósitos antimicrobianos

Além das nanopartículas de reforço, existem diversos tipos de nanoestruturas (nanopartículas de quitosana, nanopartículas de prata e dióxido de titânio, nanovesículas lipídicas) responsáveis por outras funções como a de

conferir propriedades ativas ou inteligentes aos sistemas de embalagens: atividade antimicrobiana, imobilização enzimática, biosensores, etc. Algumas partículas podem apresentar múltiplas aplicações, e algumas vezes as aplicações podem se sobrepor, como algumas enzimas imobilizadas agindo como antimicrobianos ou biosensores (AZEREDO, 2009).

Materiais em nanoescala têm sido investigados com relação à sua atividade antimicrobiana para que possam ser utilizados como inibidores de crescimento microbiano (STOIMENOV et al., 2002; GU et al., 2003; QI et al., 2004; CIOFFI et al., 2005; HUANG et al., 2005; KUMAR & MUNSTEDT, 2005; LIN et al., 2005).

O desenvolvimento de filmes antimicrobianos auxilia no controle do crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes em produtos alimentícios (AZEREDO, 2009). Um filme nanocompósito antimicrobiano é particularmente desejável devido à sua melhor integridade estrutural e propriedades de barreira, transmitido pela matriz nanoestruturada, e pelas propriedades antimicrobianas conferidas pelos agentes antimicrobianos naturais impregnados na matriz polimérica (RHIM & NG, 2007). Materiais em escala nanométrica possuem uma maior superfície de contato do que quando em micro-escala, e isto permite que sejam capazes de tomar um maior número de moléculas biológicas, conferindo uma maior eficácia antimicrobiana às nanopartículas (LUO & STUTZENBERGER, 2008).

Os nanocompósitos mais comumente utilizados como filmes antimicrobianos para embalagens de alimentos são aqueles baseados em prata, a qual é conhecida por sua toxicidade a uma grande variedade de micro-organismos (LIAU et al., 1997), estabilidade em altas temperaturas e baixa volatilidade (KUMAR & MUNSTEDT, 2005).

2.2.2.2.1. Nanopartículas de prata

O uso da prata e seus sais vêm despertando grande interesse por suas aplicações antibacterianas e medicinais (MELAIYE & YOUNGS, 2005; KLASSEN, 2000). Sua atividade antimicrobiana é maior que de outros metais, como mercúrio, cobre, chumbo, cromo e estanho (CHEN et al., 2005). Íons de cobre, por exemplo, também podem eliminar micro-organismos, mas são considerados tóxicos quando em contato com alimentos, além de serem

catalisadores de reações de oxidação, podendo acelerar outras reações de degradação (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004). A prata não produz íons tão facilmente quanto o cobre, mas é considerada segura e relativamente inerte, sendo utilizada como agente antimicrobiano na indústria farmacêutica e em tratamento de água.

O uso de íons de prata como agente antimicrobiano encontra uma ampla gama de aplicações: materiais de construção, equipamentos médicos, sistemas de filtração de água, sistemas de distribuição, processamento de alimentos e embalagens (VIMALA et al., 2010). Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) acrescentou à sua lista de substâncias em contato com alimentos um sistema baseado em íons de prata (Agion®, da empresa Agion Technologies Inc., Wakefield, USA) como composto antimicrobiano para uso como aditivos em polímeros que estarão em contato com alimentos. O National Sanitation Foundation (NSF) certificou o mesmo sistema como seguro e aceitável para aplicações em alimentos. No European Food Safety Authority (EFSA), um processo está pendente para permitir que este sistema antimicrobiano seja utilizado em polímeros para contato com alimentos na União Européia (NOBILE et al., 2004). Muitos produtos comerciais como Acticoat™, Bactigrass®, Fucidin® (ULKUR, et al., 2005), SilvaSorb® (AcryMed/Medline, Mundelein, IL, USA), AQUACEL Ag (ConvaTec, Skillman, NJ, USA), SILVERCELL® (Johnson & Johnson Wound Management, Somerville, NJ, USA), PolyMem® Silver (Ferris Pharmaceuticals, Burr Ridge, IL, USA) foram aprovados pelo FDA e EFSA para aplicações como curativos e antibacterianos (ULKUR, et al., 2005).

O mecanismo antibacteriano da prata e seus íons envolve a interação com os grupos tiol das moléculas de proteínas presentes dentro ou fora da membrana celular e liga-se à membrana celular bacteriana, inibindo a capacidade de replicação da molécula de DNA e afetando assim a viabilidade celular (KLASEN, 2000; LANSDOWN, 2002; JUNG et al., 2008; LI et al., 2009). Como resultado, a importância de produtos comerciais contendo prata, incluindo pomadas tópicas, bandagens e géis, tem aumentado no sentido de melhorar o cuidado com a saúde pública (VIMALA et al., 2010).

Apesar de tóxica para uma ampla gama de bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus aureus*) (KLASEN, 2000), a prata é tolerada pelos seres humanos em

concentrações de íons Ag^+ abaixo de 10 mg.L^{-1} (FENG et al., 1998; SCHIERHOLZ et al., 1998; SCHIERHOLZ et al., 1999 (a); SCHIERHOLZ et al., 1999 (b); DAMM et al., 2008).

Recentemente, o uso da prata na forma de nanopartículas tem recebido maior atenção. Se comparadas com suas partículas em escala micrométrica, as nanopartículas de prata apresentam maior área superficial disponível para a interação com células microbianas, resultando em um melhor efeito bactericida (AN et al., 2008).

Nanocompósitos de prata foram produzidos por diversos pesquisadores, sendo reportada a sua eficiência antimicrobiana. Kumar & Munstedt (2005) afirmaram que a atividade antimicrobiana de polímeros contendo prata em sua matriz, depende da liberação de íons Ag^+ , o qual se liga a grupos doadores de elétrons nas moléculas biológicas contendo enxofre, oxigênio e nitrogênio. Damm et al. (2008), comparando a eficácia de micropartículas (diâmetro médio das partículas de 1 a $10 \mu\text{m}$) e nanopartículas (diâmetro médio entre 10 e 20 nm) de prata em compósitos de poliamida 6, reportaram que os nanocompósitos, apresentaram melhor eficácia contra *E. coli* do que os microcompósitos uma vez que foram necessários apenas 0,025 % (p/p) de nanopartículas de prata para redução de um ciclo log na contagem bacteriana, e 1,9 % (p/p) das micropartículas para se obter o mesmo efeito. Nanopartículas de prata também podem atuar na absorção e decomposição de etileno (HU & FU, 2003), contribuindo para a extensão da vida útil de frutas e vegetais. Li et al. (2009) reportaram que um filme nanocompósito de polietileno com nanopartículas de prata com um diâmetro médio de 300 a 500 nm, retardou a senescência de jujuba, uma fruta chinesa. An et al. (2008) reportaram que um revestimento contendo nanopartículas de prata com um diâmetro de 20 nm, foi eficiente na redução do crescimento microbiano e no aumento da vida útil de aspargos.

O uso de nanopartículas de prata em compósitos poliméricos ainda foi considerado vantajoso em inúmeras aplicações. Como exemplo, Del Nobile et al. (2004) testaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata depositadas via plasma em filmes de polietileno contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*, e encontraram resultados animadores em simulantes de alimentos e suco de maçã. Rhim et al. (2006) e Sanpui et al. (2008) demonstraram a eficácia de diversos nanocompósitos à base de quitosana

contendo prata contra diferentes micro-organismos. Nanopartículas de prata também foram reportadas por Mbhele et al. (2003) como sendo responsáveis pelo aumento do módulo de elasticidade e resistência de uma matriz de polivinil álcool (PVA), e melhoria de suas propriedades térmicas, reforçando sua estabilidade e aumentando sua transição vítrea (T_g).

O mecanismo de liberação dos íons de prata a partir de polímeros ainda não é conhecido detalhadamente. Este conhecimento é uma pré-condição necessária para o preparo de materiais que atuem como antimicrobianos, mas que não sejam tóxicos. Apenas em alguns poucos estudos de nanocompósitos polímero/prata, testes de eficiência antimicrobiana foram combinados com investigações sobre a liberação dos íons de prata.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

3.1. Desenvolvimento dos nanocompósitos

As soluções filmogênicas básicas foram produzidas pelo sistema *casting* (utilização de solvente), segundo metodologia descrita por Soares (1998), com algumas modificações. A resina de base celulósica foi dissolvida em acetona e adicionado o plastificante acetil tributil citrato (ATBC) na concentração de 10 % (p/v).

Para a produção dos nanocompósitos (Figura 4), foram adicionados 5 % (p/p, relativo à resina) de diferentes nano-argilas MMT disponíveis comercialmente, teor comumente utilizado para o preparo de nanocompósitos com biopolímeros (RHIM et al., 2006), e 5 % (p/p, relativo à resina) de nanopartículas de prata disponível comercialmente (Silver nanopowder, < 100 nm particle size – Sigma-Aldrich Co., USA). O teor de prata incorporado foi determinado em testes preliminares por meio de ensaios de difusão em ágar (CLSI, 2003), avaliando-se diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

Avaliou-se a adição de três tipos de nano-argilas MMT comerciais: Cloisite 10A[®], Cloisite 30B[®] e Nanofil[®], doadas pela empresa Southern Clay Products, TX – USA, e duas concentrações de prata (0 % e 5 %), totalizando oito tratamentos:

- Tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A);
- Tratamento B (5 % Cloisite 10A);
- Tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B);
- Tratamento D (5 % Cloisite 30B);
- Tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil);
- Tratamento F (5 % Nanofil);
- Tratamento G (5 % nanopartículas de prata);
- Tratamento H (controle - acetato de celulose + plastificante).

As misturas foram homogeneizadas utilizando-se homogeneizador ultraturrax por 10 minutos, deixadas em repouso por 10 minutos e espalhadas, com auxílio de aplicador (K Paint applicator) sobre placas de vidro de forma a obter a espessura desejada. Após evaporação do solvente em condições ambiente, os filmes foram retirados das placas e levados à secagem em estufa a vácuo por 1 hora a 60 °C, sob vácuo parcial (0,5 atm). Os filmes secos permaneceram acondicionados em embalagens de PE/Nylon até a sua utilização (BOTREL, 2008).

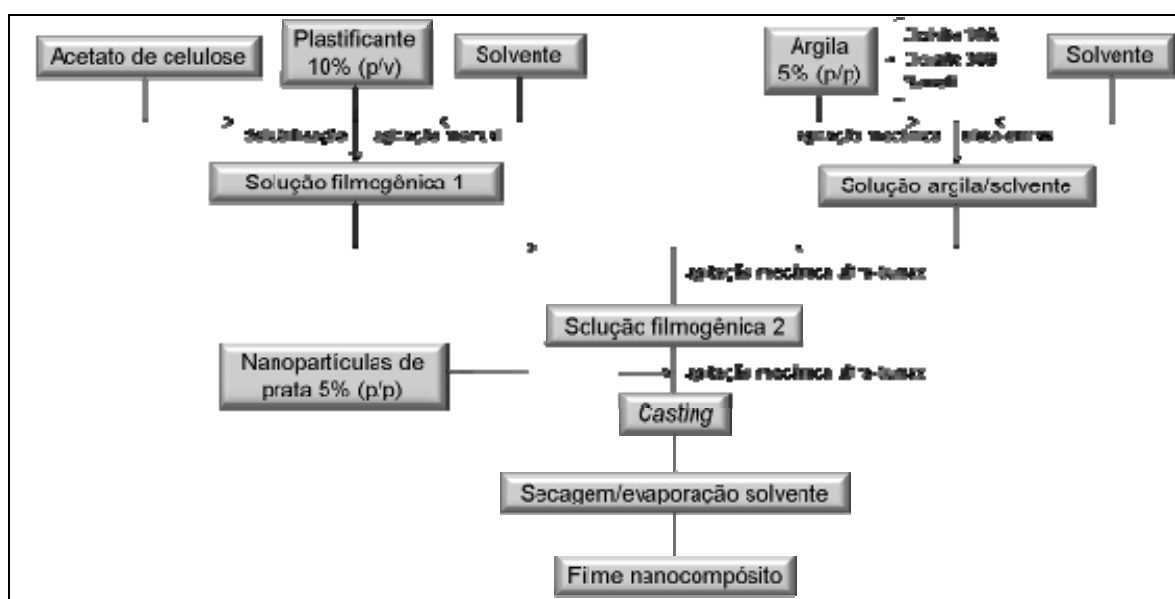


Figura 4. Diagrama empregado no preparo dos filmes nanocompósitos utilizando-se o método *casting*.

3.2. Caracterização dos filmes e avaliação da interação dos nanocompostos com a matriz polimérica

3.2.1. Espessura

A espessura média dos filmes (μm) foi medida com o auxílio de um micrômetro modelo Mitutoyo. Foram retiradas duas amostras de cada filme em três repetições, tomando-se as medidas em dez pontos diferentes em cada amostra, com um total de 60 medidas de cada tratamento (CAMILLOTO, 2009).

3.2.2. Microscopia de força atômica (MFA)

A microtopografia e a rugosidade da superfície dos diferentes filmes foram avaliadas utilizando-se o laboratório do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

Amostras dos filmes foram cortadas e fixadas no suporte de porta amostras do microscópio, com auxílio de fita dupla-face. Em seguida, cada amostra foi analisada no Microscópio de Força Atômica NT-MDT modelo NTEGRA PRIMA, utilizando o modo de contato intermitente com cantilever macio e constante de força $0,02 \text{ N.m}^{-1}$. Para cada tratamento, foram realizadas varreduras de $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$, onde determinou-se a rugosidade média e a rugosidade quadrática dos filmes, expressas em nanômetros (nm) (CAMILLOTO, 2009).

3.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A observação da estrutura e esfoliação das argilas bem como sua interação e das nanopartículas de prata no interior do polímero foi realizada utilizando Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss, modelo EM 109 a 120 kV, disponibilizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

O preparo das amostras, demonstrado de forma simplificada na Figura 5, foi realizado pela adição de amostras dos filmes em blocos de resina 'Spurr'. Este procedimento foi realizado partindo-se de um processo de infiltração, onde as amostras permanecerem em contato com a resina em diferentes concentrações por determinados períodos de tempo. Após estes procedimentos, as amostras foram distribuídas em um molde próprio que foi então preenchido com a resina não diluída e levado à estufa de secagem a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após a secagem, os blocos formados foram submetidos ao ultramicrotomo operando com navalha de vidro para obtenção de cortes com espessura entre 50 a 90 nm. Os cortes ultrafinos foram coletados em grids de cobre de 300 mesh e levados para observação ao microscópio (DAMM et al., 2008).

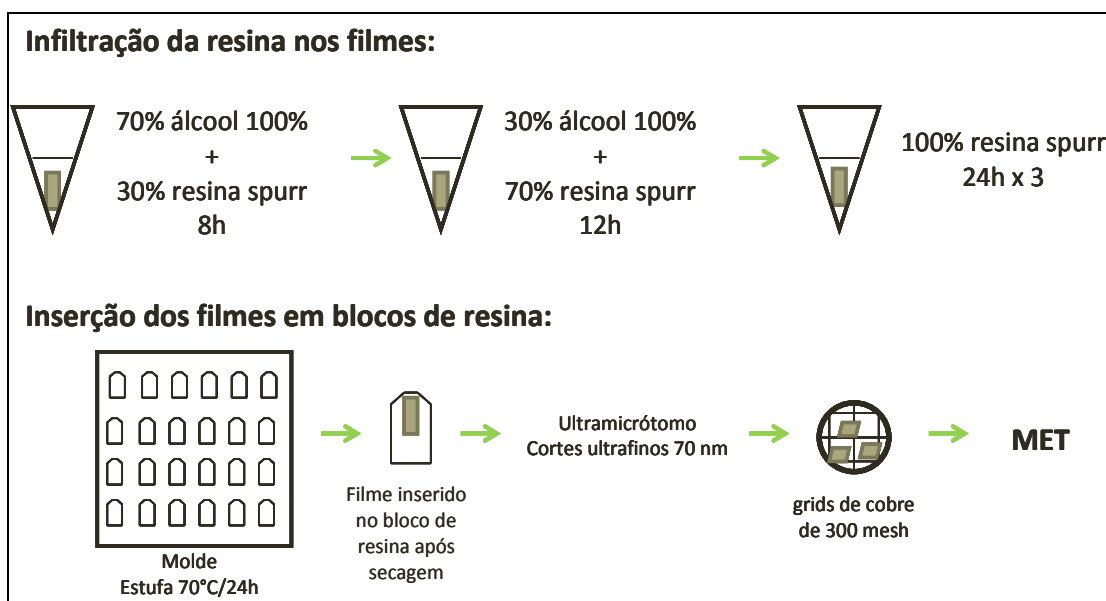


Figura 5. Procedimento empregado no preparo dos filmes nanocompósitos para observação ao microscópio eletrônico de transmissão.

3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica da superfície e da fratura dos filmes foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física de São Carlos IFSC / FCM / USP, São Carlos - SP, Brasil, utilizando-se Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss, modelo DSM 960.

Para a análise dos nanocompósitos, dois cupons retangulares (8 mm x 2 mm) de cada filme foram cortados e fixados no suporte porta amostras (stub) do microscópio, de forma a permitir a visualização da superfície e do corte transversal (fratura) do filme. Posteriormente realizou-se um revestimento da superfície com uma fina camada de ouro e as micrografias foram registradas em várias magnificações utilizando o modo de elétrons secundários e uma voltagem de aceleração de 20 kV.

3.2.5. Propriedades mecânicas

Os ensaios mecânicos foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária (EMBRAPA / CNPDIA), São Carlos – SP, Brasil.

As propriedades mecânicas de resistência à tração (MPa), alongamento (%) e módulo elástico (MPa) dos filmes foram determinadas de acordo com a norma ASTM D882-02 utilizando-se uma máquina universal de testes EMIC DL-3000 com célula de carga de 50 Kgf e velocidade de 25 mm.min⁻¹. Para cada filme, foram analisados cinco corpos de prova com dimensões de 25 mm x 100 mm em três repetições. Os valores médios das propriedades mecânicas foram obtidos, portanto, a partir de um total de 15 corpos-de-prova para cada material (ASTM, 2002).

3.2.6. Determinação da taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA)

A taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, segundo a metodologia ASTM E 96-00, com algumas modificações. Utilizaram-se cápsulas circulares ($\varnothing = 82,3$ mm), com paredes impermeáveis, contendo 25 g de cloreto de cálcio anidro, granulometria entre 600 μ m e 2,36 mm. Os filmes foram vedados na junção filme/cápsula com auxílio de parafina. Após a montagem das cápsulas, estas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio em seu interior, de forma a manter a umidade relativa de 75 %. Por meio de pesagens diárias até peso constante, avaliou-se o ganho de peso associado à umidade permeada pelo filme. Os dados de ganho de peso e tempo foram representados em gráfico e, a partir do período em que os pontos formaram uma reta, foi calculado o ganho de peso por dia, sendo então convertida para a unidade relativa à taxa de transmissão ao vapor de água (g.m⁻².dia⁻¹) (ASTM, 2000). Para cada tratamento os filmes foram avaliados em duplicata e três repetições.

3.2.7. Determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO)

A taxa de transmissão ao oxigênio (TTO) dos filmes foi determinada sob umidade relativa (UR) de 87 % e temperatura de 23 °C, utilizando-se equipamento OX-TRAN[®] 2/20 MH (Mocon, Minneapolis, MN).

Devido ao fato do equipamento operar com oxigênio a concentração de 100 % e dos filmes apresentarem uma taxa de transmissão ao oxigênio maior que 200 cc.m⁻².dia⁻¹, amostras de 25 cm² de cada um dos filmes foram

colocadas em máscaras de alumínio adesivas antes de serem acopladas ao equipamento (MOCON®; ASTM, 2005; ASTM, 2007). Estas máscaras reduzem a área de permeação do filme de 50 cm² para 5 cm², impedindo assim a saturação do sensor coloumétrico por elevadas concentrações de oxigênio. Para cada tratamento os filmes foram avaliados em três repetições.

3.2.8. Voltametria por redissolução anódica (ASV)

A análise foi conduzida no Laboratório de Instrumentação e Quimiometria do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

A técnica de ASV foi utilizada para a quantificação do teor de íons de prata liberado dos filmes de acordo com Kumar & Münstedt (2005).

Amostras retangulares de cada tratamento (8 cm x 5 cm x 0,005 cm) foram armazenadas em frascos contendo 100 mL de meio aquoso (95 mL de água destilada + 5 mL de HNO₃ 0,1 mol.L⁻¹) a temperatura ambiente (\pm 25 °C). A função do HNO₃ é proteger os íons de prata liberados da redução para prata metálica. Em um período final de 72 horas, o meio aquoso foi coletado (1 mL) e analisado quanto ao teor de íons de prata em equipamento analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA Computrance, operando com um eletrodo de mercúrio de gota pendente e eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Os resultados foram analisados por comparação com uma curva analítica gerada.

3.3. Avaliação das características antimicrobianas dos nanocompósitos

3.3.1. Método de difusão em ágar

Foram utilizadas culturas de *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria innocua* (ATCC 33090) e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 6539) por serem microorganismos patogênicos veiculados por alimentos e utilizados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a avaliação da eficiência de sanitizantes.

Inóculos de cada micro-organismo foram preparados por meio da suspensão direta, em solução salina esterilizada, de colônias isoladas, selecionadas de uma placa de meio não seletivo tryptic soy agar (TSA), inoculada com o micro-organismo e incubada a 35 °C por 18 - 24 horas. A suspensão foi ajustada até sua turbidez coincidir com a da solução padrão de McFarland 0,5 (correspondente a uma concentração bacteriana de 10^8 UFC.mL⁻¹). Placas contendo ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com os micro-organismos friccionando-se um swab de algodão esterilizado umedecido com a solução do inóculo previamente preparado. Sobre a superfície do ágar inoculado foram colocados discos ($\varnothing = 1$ cm) dos filmes nanocompósitos com os diferentes tratamentos.

As placas foram incubadas utilizando-se duas temperaturas diferentes, 35 °C e 7 °C, e após 16 - 18 horas e 10 dias, respectivamente, os halos de inibição formados foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco (CLSI, 2003).

3.3.2. Método de difusão em meio líquido

Dentre os micro-organismos utilizados no item 3.3.1, culturas puras de *L. innocua* (ATCC 33090) e *S. enterica* (ATCC 6539) foram selecionadas como representantes do grupo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.

Dessa forma, as culturas puras foram ativadas duas vezes consecutivamente, em meio tryptic soy broth (TSB) líquido com incubação a 37 °C por 12 e 24 horas. Em seguida, suspensões de cada micro-organismo contendo 10^4 UFC.mL⁻¹ foram preparadas em meio TSB por meio da diluição das culturas ativadas. As suspensões foram mantidas em erlenmeyers com capacidade para 150 mL, à temperatura de 37 °C, sob agitação a 250 rpm com uso de shaker em banho-maria, para a realização da curva de crescimento do micro-organismo inoculado em cada frasco. Aos frascos, foram adicionados os filmes nanocompósitos, e, em um frasco não foi adicionado filme, sendo, portanto, o controle. A relação entre suspensão bacteriana e os filmes foi de 1 mL para 1 cm² de filme, considerando os dois lados do filme (150 mL de suspensão para 75 cm² de área de filme).

Amostras da suspensão de micro-organismo foram retiradas a intervalos regulares de tempo (30 minutos) e o crescimento microbiano avaliado por densidade ótica (DO) do meio de cultura, utilizando espectrofotômetro (Analítica GBC UV/VIS 918) no comprimento de onda 640 nm. As leituras foram realizadas até que o crescimento microbiano atingisse a fase estacionária. Nos casos em que o valor lido de absorvância apresentou-se maior que 0,6, a alíquota foi diluída com o meio TSB e efetuou-se a correção da leitura, uma vez que a relação de linearidade entre o crescimento de células e a absorvância ocorre entre 0,1 e 0,69 de absorvância. Os dados de absorvância foram transformados para logaritmo neperiano (\ln) e plotados em gráfico \ln (DO) versus tempo de incubação (MELO, 2003). A eficiência dos filmes na inibição do crescimento do micro-organismo foi avaliada pela comparação das velocidades específicas de crescimento (μ) e do aumento da fase lag (adaptação do micro-organismo ao meio, antes do crescimento exponencial).

3.4. Delineamento experimental

De uma forma geral empregaram-se dois delineamentos estatísticos diferentes.

Para testar a eficiência das melhorias nas propriedades físicas e antimicrobianas dos tratamentos propostos em relação ao filme controle (filme contendo apenas resina e plastificante) foi conduzida análise em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. As médias foram comparadas utilizando-se teste de Dunnett ao nível de 5 % de probabilidade.

Para testar a eficiência das melhorias nas propriedades físicas e antimicrobianas dos tratamentos propostos entre si, foi conduzido um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, sendo três tipos de argilas (Cloisite 10A, Cloisite 30B e Nanofil) e duas concentrações de prata (0 % e 5 %). As médias foram comparadas utilizando-se teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.1.

A avaliação das fotomicrografias foi realizada por meio de análise descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento dos nanocompósitos

Os filmes produzidos por *casting* apresentaram-se uniformes sem a formação de agregados visíveis, ou seja, tanto as argilas Cloisite 10A, Cloisite 30B e Nanofil, como as nanopartículas de prata em pó obtiveram uma boa dispersão no polímero.

Os filmes adicionados de nanopartículas de prata apresentaram uma coloração escura (cinza) translúcida, enquanto os tratamentos contendo apenas argila e o tratamento controle produziram filmes transparentes (Figura 6).

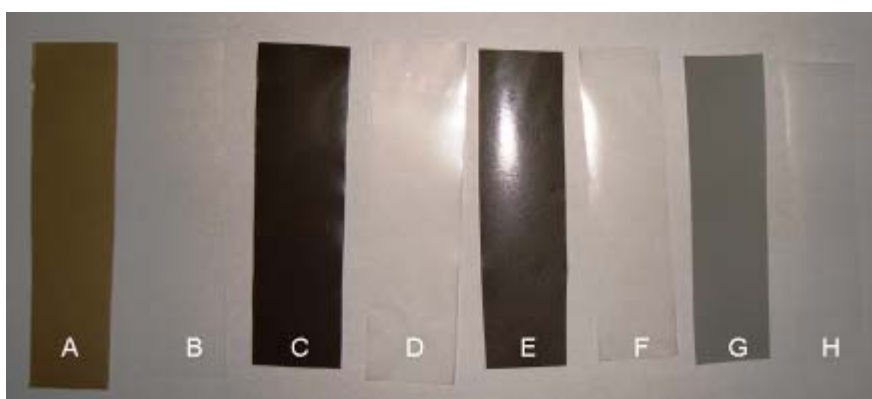


Figura 6. Amostras dos filmes produzidos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(A)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(B)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(C)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**.

4.2. Caracterização dos filmes e avaliação da interação dos nanocompostos com a matriz polimérica

4.2.1. Espessura

A espessura dos filmes não variou ($p > 0,05$) em função dos tratamentos, sendo a espessura média dos filmes de $40,97 \pm 4,11 \mu\text{m}$. O desvio padrão relativamente alto é associado ao processo de *casting*, em que ocorre variação da espessura em função do seu ajuste manual.

4.2.2. Microscopia de força atômica (MFA)

As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica permitiram avaliar a microtopografia da superfície dos filmes em duas e três dimensões e ainda determinar a rugosidade média dos filmes (Figuras 7 e 8).

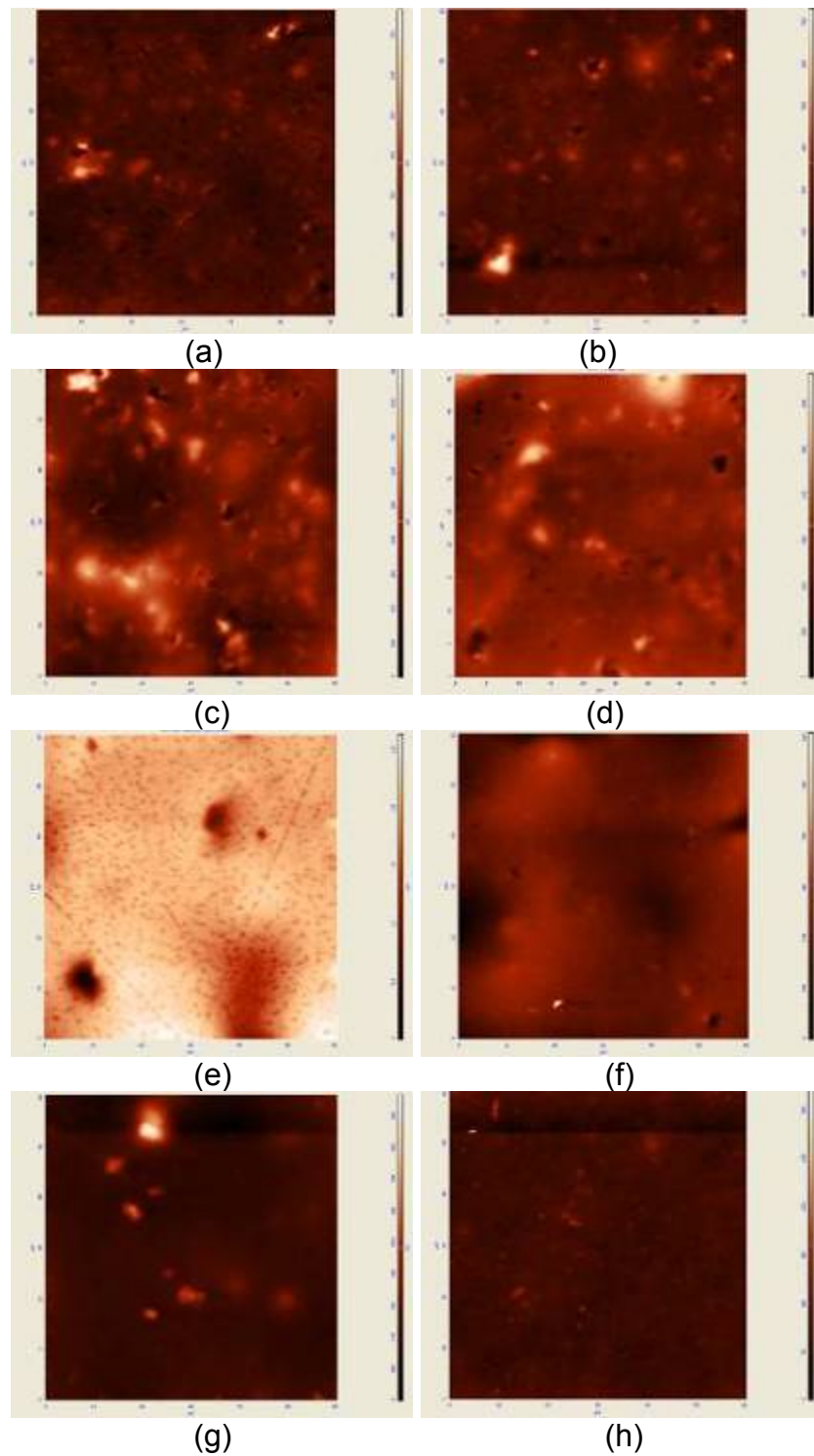


Figura 7. Fotomicrografias em 2D dos filmes obtidas por MFA: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(b)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(c)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(d)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(e)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(f)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(g)** e tratamento H – controle **(h)**. (60 x 60 μm).

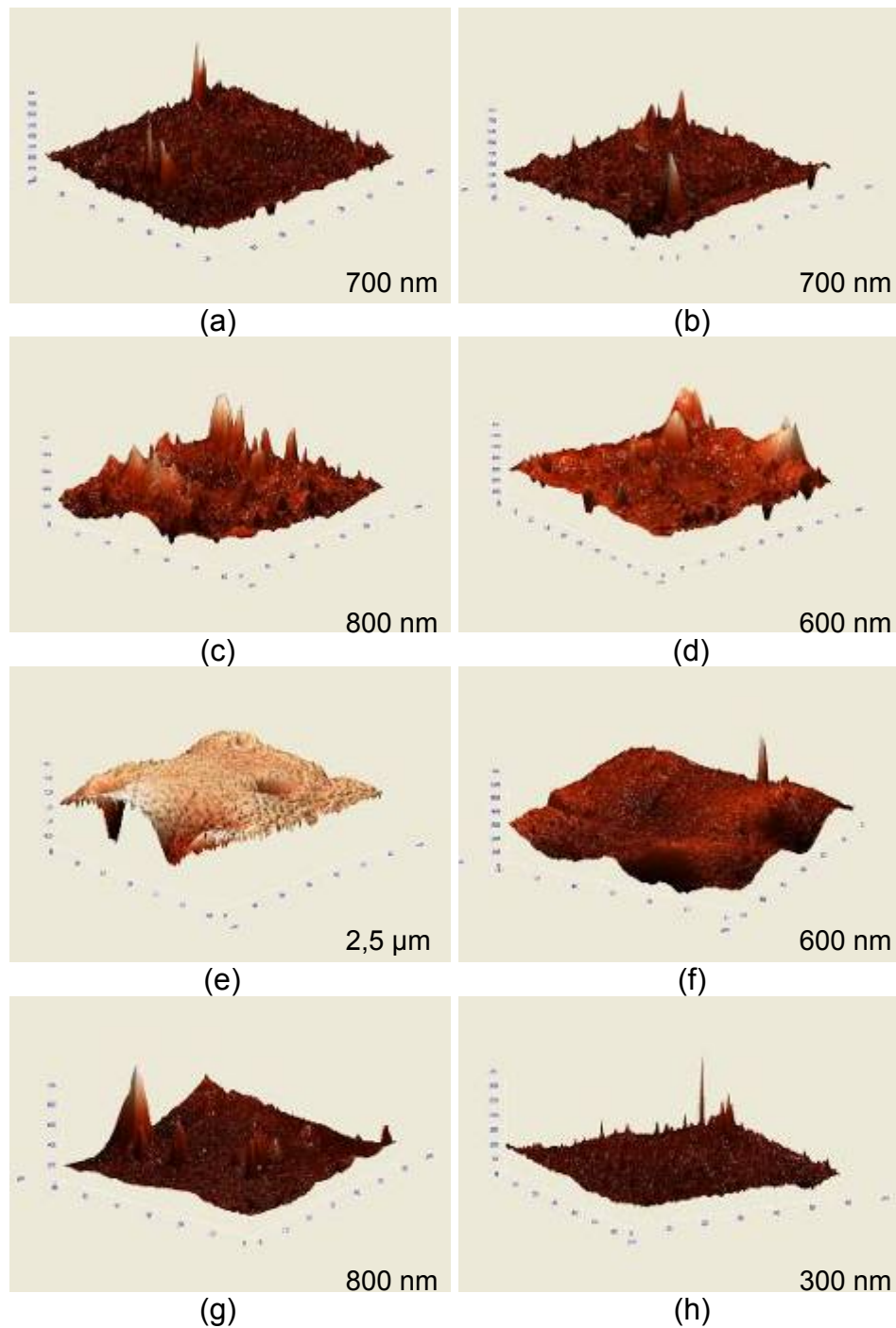


Figura 8. Fotomicrografias em 3D dos filmes obtidas por MFA: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(b)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(c)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(d)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(e)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(f)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(g)** e tratamento H – controle **(h)**. (60 x 60 μm).

Pela análise das figuras em 3D, observa-se que os tratamentos E e F diferenciam-se dos demais por apresentar uma superfície mais irregular e porosa. Uma avaliação das micrografias em 2D apontam para uma maior

irregularidade na superfície dos filmes contendo as argilas Cloisite 30B (Figura 7 c; Figura 7 d) e Nanofil (Figura 7 e; Figura 7 f), sendo observados alguns agregados, representados pelas áreas mais claras, e poros, representados pelos pontos escuros.

A rugosidade média (Ra) dos filmes contendo a argila Cloisite 10A, com e sem prata, não diferiu em relação ao filme controle. Para os demais tratamentos observou-se diferença significativa, sendo que estes apresentaram uma rugosidade média maior que a do filme controle (Tabela 2). A não alteração da microtopografia dos filmes que continham Cloisite 10A comparada ao filme controle pode ser explicada pela maior intercalação do polímero entre as lamelas da argila, em função de uma interação favorável entre estes.

Tabela 2. Valores médios de Ra obtidos para os diferentes tratamentos.

Tratamentos	Ra (nm)
Filme A (Cloisite 10A + prata)	28,6219 ^b
Filme B (Cloisite 10A)	24,5977 ^b
Filme C (Cloisite 30B + prata)	55,8116 ^a
Filme D (Cloisite 30B)	63,0502 ^a
Filme E (Nanofil + prata)	132,8910 ^a
Filme F (Nanofil)	41,0379 ^a
Filme G (prata)	42,3825 ^a
Filme H (controle)	8,3050 ^b

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Dunett ($p < 0,05$).

Observou-se interação significativa entre a adição ou não de prata e os diferentes tipos de MMT. De acordo com a Tabela 3, observa-se que a presença de nanopartículas de prata provocou um aumento na rugosidade média do filme contendo a argila Nanofil. Provavelmente, o aumento da rugosidade foi provocado pela baixa interação entre prata / Nanofil / polímero, permitindo a formação de agregados que alteraram a rugosidade do filme. A argila Nanofil é uma argila natural hidrofílica, e por isso apresenta menor interação com o solvente utilizado. A adição de prata nos tratamentos contendo as demais argilas (Cloisite 10A e 30B) não influenciou a rugosidade,

possivelmente devido a uma maior interação das argilas organofílicas com o sistema solvente / polímero / nanopartículas de prata.

Tabela 3. Rugosidade média (Ra) dos filmes contendo diferentes argilas, com a adição de prata.

Tratamentos	Ra (nm)
Filme A (Cloisite 10A + prata)	28,62 ^b
Filme C (Cloisite 30B + prata)	55,81 ^b
Filme E (Nanofil + prata)	132,89 ^a

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na ausência de nanopartículas de prata, não houve diferença na rugosidade média dos filmes (Tabela 4), indicando que as diferentes argilas se arranjam de maneira similar no polímero.

Tabela 4. Rugosidade média (Ra) dos filmes contendo diferentes argilas sem a adição de prata

Tratamentos	Ra (nm)
Filme B (Cloisite 10A)	24,5977 ^a
Filme D (Cloisite 30B)	63,0502 ^a
Filme F (Nanofil)	41,0379 ^a

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão foi utilizado para a observação microscópica da morfologia interna dos filmes nanocompósitos.

Nas Figuras 9 e 10, observa-se a estrutura dos nanocompósitos sem adição de prata e com adição de prata, respectivamente.

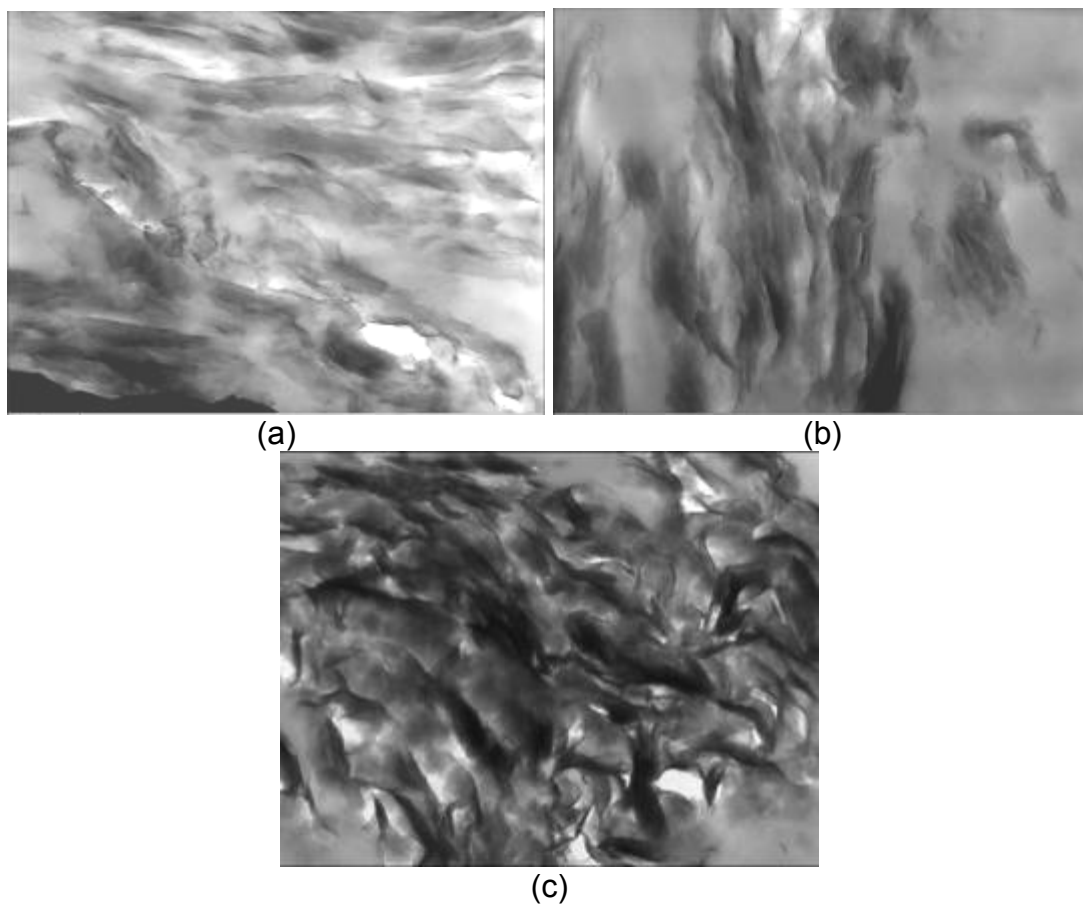


Figura 9. Fotomicrografias dos filmes sem adição de prata, obtidas por MET: tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(b)** e tratamento F (5 % Nanofil) **(c)**. (50.000 x)

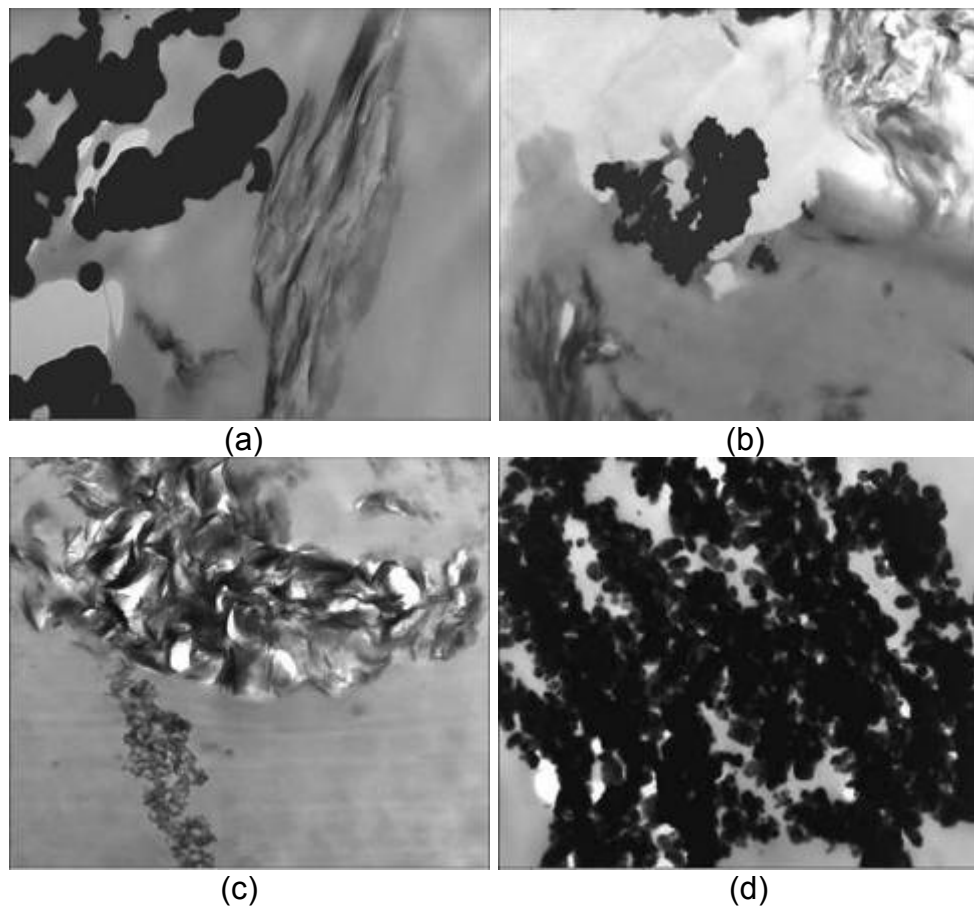


Figura 10. Fotomicrografias dos filmes com adição de prata, obtidas por MET: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(b)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(c)** e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) **(d)**. (50.000 x)

Análises de MET são utilizadas na caracterização da estrutura de filmes nanocompósitos com o objetivo de se avaliar o grau de esfoliação de argilas, tamanho e formato de nanopartículas, formação de agregados, etc (TUNÇ & DUMAN, 2010).

As micrografias obtidas dos tratamentos contendo apenas MMT em sua composição evidenciam que as argilas Cloisite 10A e Cloisite 30B encontram-se intercaladas no polímero. Por outro lado, a presença de estruturas tactóides é observada na Figura 9 c, comprovando a menor interação da argila Nanofil no filme.

Na Figura 10 observa-se que a adição das nanopartículas de prata não alterou a estrutura das argilas no polímero. É possível confirmar o formato esférico das nanopartículas e também a formação de agregados de

nanopartículas de prata entre 500 nm e 1 µm de tamanho, caracterizados pelos pontos pretos na figura. Não foi observada interação da prata com as argilas.

Estes resultados estão relacionados à composição das argilas e sua interação com o solvente e o polímero. Por se tratar de uma argila natural, a Nanofil é composta por cátions Na^+ , apresentando um comportamento hidrofílico, e dessa forma, oferece menor interação com o solvente e o polímero. As argilas Cloisite 10A e 30B são modificadas pela substituição dos cátions Na^+ por sais quaternários de amônio, tornando-as mais organofílicas. O procedimento de organofilização da argila é uma das etapas chave para que ocorra uma dispersão e esfoliação bem sucedida das partículas da argila na matriz polimérica. A natureza organofílica reduz a energia superficial e torna a argila, mais compatível com polímeros orgânicos e o aumento no espaçamento basal facilita a intercalação das cadeias poliméricas entre as camadas da argila (PAIVA et al., 2008). Para que a melhoria das propriedades dos nanocompósitos seja evidente, uma estrutura esfoliada é preferida à estrutura intercalada (TUNÇ & DUMAN, 2010). Romero et al., 2009 produziram nanocompósitos de acetato de celulose e montmorillonita sódica (MMT-Na^+) pelo método *casting* utilizando diferentes solventes: acetona, ácido acético, uma mistura de acetona e água, e uma mistura de ácido acético e água. Ao avaliarem a influência do tipo de solvente na estrutura e propriedades dos nanocompósitos, observaram que o intumescimento da argila pela solução polimérica foi mais efetivo na presença de água, especialmente quando a mistura com ácido acético foi utilizada. Este efeito é atribuído a interações polares específicas, ligações de hidrogênio e à formação de um complexo entre as cadeias do acetato de celulose e as moléculas do solvente. Dessa forma, é possível concluir que a dispersão e delaminação da argila são alcançadas quando solvente e argila apresentam interações favoráveis.

4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias dos filmes obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram observar a topografia da superfície e dos cortes transversais dos filmes. Nas Figuras 11 e 12, observa-se a estrutura da superfície dos filmes nanocompósitos sem adição de prata e com adição de prata, respectivamente.

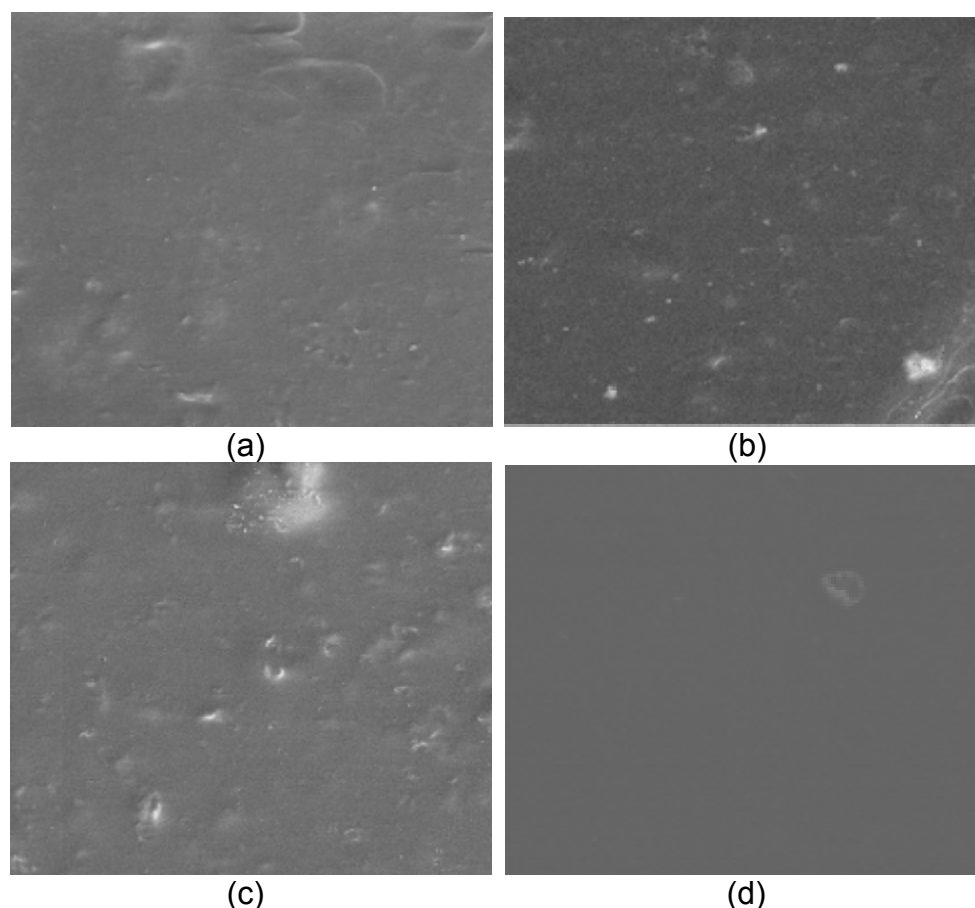


Figura 11. Fotomicrografias superficiais dos filmes obtidas por MEV: tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(b)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(c)** e tratamento H - controle **(d)**. (1.000 x)

Comparando-se os nanocompósitos com o filme controle é possível constatar uma alteração da estrutura superficial, com a presença de agregados internos. Observa-se uma maior irregularidade na superfície do nanocompósito contendo a argila Nanofil, o que evidencia sua maior imiscibilidade com o polímero. Conforme demonstrado nas micrografias obtidas por MET, não houve esfoliação, mas sim a formação de estruturas tactóides da argila Nanofil. De acordo com os resultados de MFA, este tratamento apresentou maior rugosidade, o que justifica a aparência mais irregular observada por MEV.

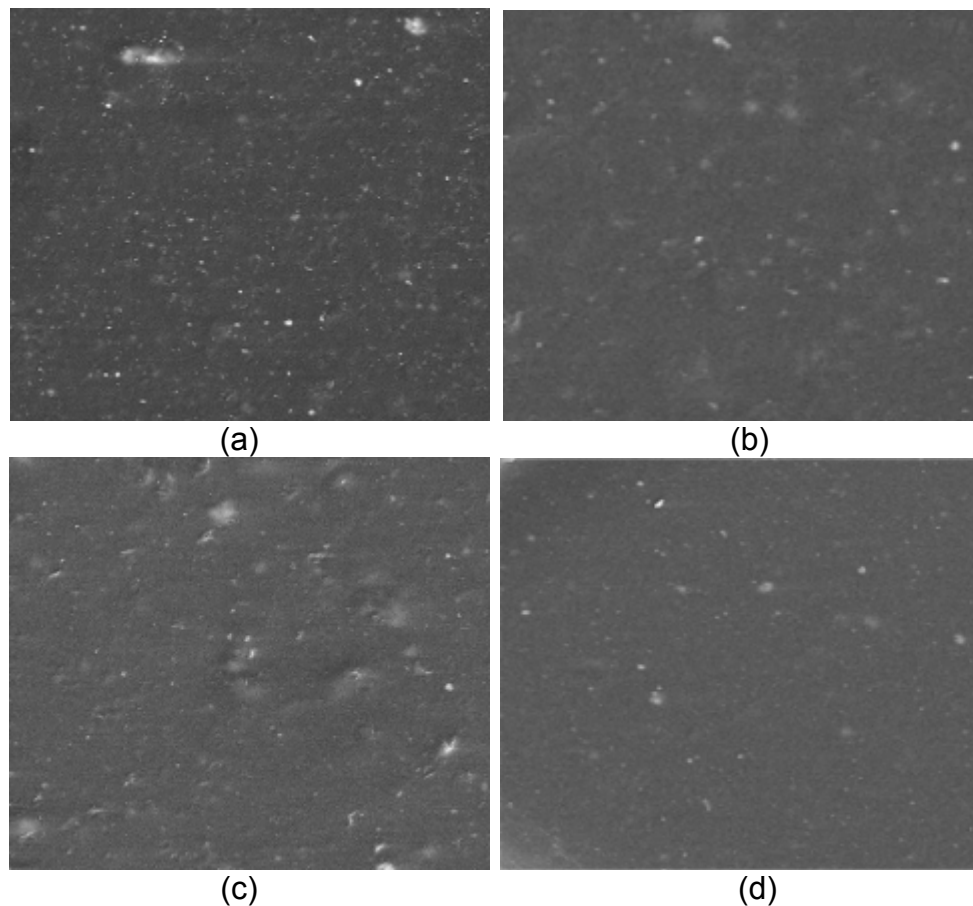


Figura 12. Fotomicrografias superficiais dos filmes obtidas por MEV: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(b)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(c)** e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) **(d)**. (1.000 x)

Nos nanocompósitos contendo prata em sua composição nota-se a presença de alguns pontos brancos em sua superfície, caracterizando as nanopartículas de prata. O mesmo resultado foi observado por Rhim et al. (2006). Com relação à irregularidade da superfície dos filmes, a adição de nanopartículas de prata não alterou de forma perceptível a superfície dos diferentes tratamentos se comparado àqueles contendo apenas argila, exceto do filme controle, onde é possível observar uma superfície menos lisa. A estrutura apresentada pelo nanocompósito contendo a argila Nanofil manteve-se mais irregular. A formação de agregados de nanopartículas de prata foi comprovada nas micrografias obtidas por MET e pode estar relacionada ao processo de evaporação do solvente durante a secagem dos filmes. Sánchez-Valdes et al. (2009), comparando a fabricação de nanocompósitos polietileno/prata utilizando-se diferentes métodos (laminação, *casting* e

spraying), observou por meio de MEV que, quando os filmes eram produzidos pelo sistema *casting*, sua superfície apresentava-se mais rugosa e irregular, devido à formação de agregados de nanopartículas de prata durante o processo de evaporação do solvente.

Nas Figuras 13 e 14, observa-se a estrutura dos cortes transversais dos filmes nanocompósitos sem adição de prata e com adição de prata, respectivamente.

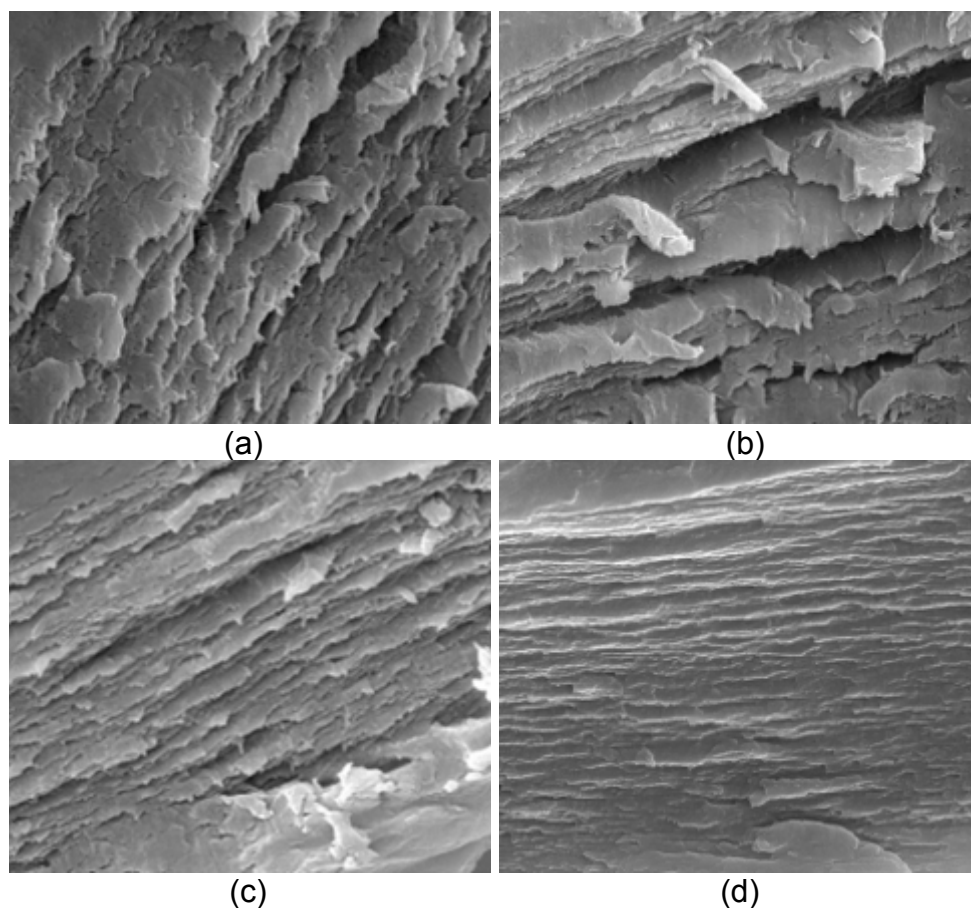


Figura 13. Fotomicrografias do corte transversal dos filmes obtidas por MEV: tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(b)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(c)** e tratamento H - controle **(d)**. (5.000 x)

Na observação dos cortes transversais dos diferentes nanocompósitos nota-se a formação de galerias, com um aumento no espaçamento interno da estrutura polimérica. Contrariamente, o filme controle apresenta-se mais uniforme e compactado. Este comportamento está relacionado à estrutura lamelar das argilas, além da presença de estruturas tactóides e agregados imiscíveis ao polímero, que contribuem para o aumento do espaçamento das

camadas internas do polímero. Rhim et al. (2006) observou a mesma morfologia espaçada ao analisar a fratura de filme nanocompósito de quitosana e argila natural MMT- Na^+ , concluindo se tratar da estrutura lamelar da argila intercalada no interior do polímero.

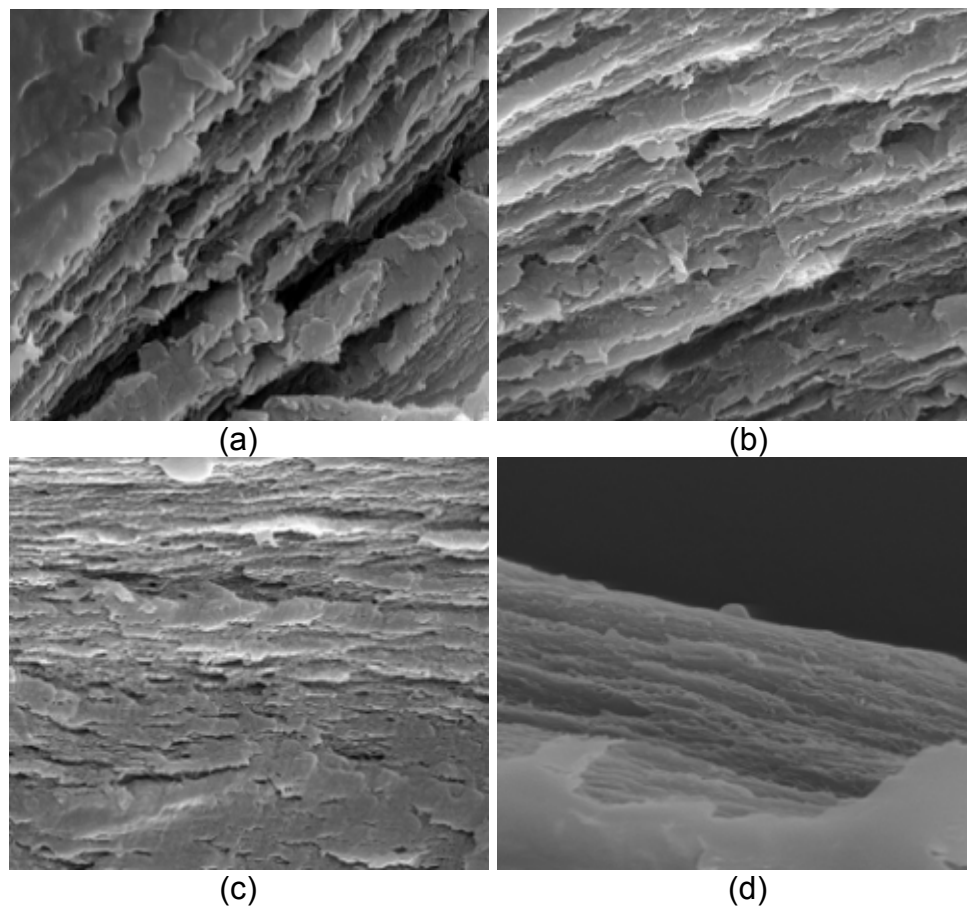


Figura 14. Fotomicrografias do corte transversal dos filmes obtidas por MEV: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(b)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(c)** e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) **(d)**. (5.000 x).

A adição de nanopartículas de prata aos nanocompósitos não ocasionou diferenças perceptíveis no interior dos diferentes nanocompósitos. Rhim et al. (2006) observou que as nanopartículas de prata apresentam-se na forma de pontos brilhantes em nanocompósitos de quitosana e prata. Kanna et al. (2005) também conseguiu visualizar a presença de nanopartículas de prata como pequenos pontos brilhantes de formato esférico.

4.2.5. Propriedades mecânicas

A presença dos diferentes tipos de argila MMT e nanopartículas de prata não influenciou ($p > 0,05$) a porcentagem de alongamento e o módulo de elasticidade dos filmes, que apresentaram valores médios de $9,15 \% \pm 2,70 \%$ e $1991,68 \text{ MPa} \pm 254,80 \text{ MPa}$, respectivamente, em comparação ao tratamento controle. Para a resistência à tração houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os nanocompósitos e o filme controle. Os tratamentos E, F e G apresentaram uma redução nos valores máximos de tensão suportada em comparação ao filme controle. Os valores médios de resistência à tração (MPa) estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades mecânicas de resistência à tração dos nanocompósitos.

Tratamentos	Resistência à tração (MPa)
Filme A (Cloisite 10A + prata)	45,47 ^a
Filme B (Cloisite 10A)	50,80 ^a
Filme C (Cloisite 30B + prata)	44,74 ^a
Filme D (Cloisite 30B)	49,32 ^a
Filme E (Nanofil + prata)	40,81 ^b
Filme F (Nanofil)	43,63 ^b
Filme G (prata)	43,98 ^b
Filme H (controle)	50,53 ^a

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

A interação MMT e prata não foi significativa ($p > 0,05$), porém a adição de diferentes argilas MMT e a presença ou não de nanopartículas de prata, afetou de forma significativa a resistência à tração dos nanocompósitos. A adição da argila Nanofil reduziu a propriedade de resistência à tração do filme de acetato de celulose comparando-se às outras argilas (Tabela 6).

Tabela 6. Resistência à tração dos nanocompósitos AC / MMT.

Tratamentos	Resistência à tração (MPa)
Tratamentos com Cloisite 10A	48,135 ^a
Tratamentos com Cloisite 30B	47,028 ^a
Tratamentos com Nanofil	42,220 ^b

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A adição de nanopartículas de prata reduziu significativamente a resistência à tração dos nanocompósitos (Tabela 7).

Tabela 7. Influência da adição de prata nas características de resistência à tração dos nanocompósitos.

Tratamentos	Resistência à tração (MPa)
Filmes com prata	43,672 ^b
Filmes sem prata	47,917 ^a

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A baixa interação da argila Nanofil com o polímero e a formação de agregados de nanopartículas de prata, confirmados pelas microscopias eletrônicas, contribuíram para a redução da resistência à tração dos nanocompósitos. As demais argilas não diferiram do filme controle provavelmente devido à estrutura intercalada que assumiram no interior do polímero. Para a melhoria das propriedades mecânicas de biopolímeros, a ocorrência de uma estrutura esfoliada é mais vantajosa. Park et al. (2004), avaliando a produção de nanocompósitos de acetato de celulose com adição da argila Cloisite 30B e compatibilizante, obtiveram um aumento de 20 % e 60 % nos valores de resistência à tração e módulo elástico, respectivamente. Os autores concluíram que as propriedades mecânicas dos filmes foram melhoradas devido à boa esfoliação e dispersão da argila na matriz celulósica.

Wibowo et al. (2006) fabricaram nanocompósitos de acetato de celulose com plastificante a base de citrato e argilas organofílicas, utilizando dois métodos: extrusão seguida de moldagem por compressão, e extrusão seguida de moldagem por injeção. Um aumento de 60 % na resistência à tração e de 80 % no módulo elástico foi observado para os nanocompósitos produzidos pelo processo de extrusão seguida de moldagem por injeção, quando comparados

ao primeiro processo. O ganho foi atribuído à maior força de cisalhamento e à pressão mais elevada proporcionados pelo segundo processo, que contribuíram para a obtenção de uma mistura mais homogênea e um maior grau de esfoliação da argila. Considerando-se apenas o segundo processo, um aumento de 38 % na resistência à tração e de 30 % no módulo elástico foi observado para os nanocompósitos comparados à matriz celulósica pura. Esta melhoria foi devido à esfoliação e dispersão das argilas no polímero.

O preparo de nanocompósitos biopoliméricos de amido e argilas Cloisite Na⁺ e Cloisite 30B utilizando-se o método *casting* foi avaliado por Majdzadeh-Ardakani et al. (2010). Os autores concluíram que as propriedades mecânicas dos filmes são fortemente influenciadas pelo tipo de argila e pelo modo de agitação utilizado no processo de *casting*. A combinação entre os modos de agitação mecânica e ultrassônica levou à maior dispersão das camadas das argilas e conseqüentemente, um aumento no módulo dos nanocompósitos.

Dessa forma, modificações no processo de produção dos filmes, no sentido de melhorar a esfoliação e dispersão das argilas e das nanopartículas de prata na matriz celulósica, são necessárias. O uso de agitação por sonda ultrassônica é uma alternativa (RAJAGOPALAN et al., 2005; WEST e MALHOTRA, 2006; GEDANKEN, 2007; RADZIUK et al, 2010).

4.2.6. Determinação da taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA)

Os filmes produzidos sem adição dos nanocompostos apresentaram valor médio de TTVA de $165,83 \pm 36,82 \text{ g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ sob condições de 22 °C e 75 %UR, e esta propriedade não foi alterada em função dos tratamentos ($p > 0,05$).

Dentre os materiais plásticos utilizados na fabricação de embalagens flexíveis, os que apresentam maior barreira ao vapor de água são as poliolefinas (polietileno de alta e baixa densidade, e polipropileno). Valores típicos de TTVA são dados, para alguns filmes, na Tabela 8. Comparando-se o valor médio obtido para os filmes nanocompósitos produzidos, observa-se que estes apresentaram alta TTVA.

Tabela 8. Taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) em filmes simples.

Material	TTVA g água.m ⁻² .dia ⁻¹ *
PVdC	3,4
PEAD	4,7
BOPP	4,6 – 6,2
PP	11,0
PET	15,0 – 20,0
PEBD	15,5 – 23,0
PS	108,0 – 155,0

* ASTM E96 (38 °C/ 90 % UR)

Fonte: ITAL (1996)

Este resultado pode ser explicado pela estrutura intercalada das argilas na matriz celulósica. Boa dispersão e esfoliação são necessárias para que as propriedades de barreira dos filmes sejam melhoradas.

Contrário a estes resultados obtidos, diversos trabalhos reportam melhorias na propriedade de barreira a vapor de água de nanocompósitos produzidos com diferentes argilas. Park et al. (2004) preparou nanocompósitos biodegradáveis a partir de acetato de celulose e Cloisite 30B. A transmissão ao vapor de água dos filmes, determinada utilizando-se o método coulométrico (Permatran[®], Mocon), diminuiu até 100 % devido à adição da argila organifílica. Além disso, os autores concluíram que a transmissão é melhor ajustada com a adição de pequenas quantidades de MMT, devido aos agregados formados por maiores teores de argila. Este mesmo autor reportou em outro trabalho a melhoria da transmissão ao vapor de água de nanocompósitos obtidos a partir de amido e argilas MMT, e concluíram que esta propriedade é afetada pelo grau de dispersão e pelo tipo de argila empregada. A argila natural Cloisite Na⁺ obteve valores mais baixos para a transmissão ao vapor de água em comparação à adição da argila Cloisite 10A, devido à natureza hidrofílica do polímero e da argila (PARK et al., 2002).

Rhim et al. (2007) prepararam filmes nanocompósitos utilizando-se quitosana como matriz polimérica por meio do método *casting*, para testar o efeito de nanocompostos como Cloisite 30B, MMT-Na⁺, nanopartículas de prata e íons de prata nas propriedades mecânicas, de barreira à água bem como sua atividade antimicrobiana. Os autores concluíram que a dispersão dos

nanocompostos diminuiu significativamente a permeância ao vapor de água dos filmes.

4.2.7. Determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO)

Os filmes produzidos apresentaram alta TTO sob condições de temperatura de 23 °C e umidade relativa de 87 %, e esta propriedade foi significativamente maior para o tratamento E (Nanofil + prata) ($p < 0,05$) comparado ao filme controle. Os valores das médias para TTO dos filmes estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores médios da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO) para os nanocompósitos.

Tratamentos	Taxa de transmissão ao oxigênio, 23 °C, 87 % UR ($\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$)
Filme A (Cloisite 10A + prata)	1275,47 ^a
Filme B (Cloisite 10A)	1092,80 ^a
Filme C (Cloisite 30B + prata)	1117,35 ^a
Filme D (Cloisite 30B)	1210,49 ^a
Filme E (Nanofil + prata)	1964,10 ^a
Filme F (Nanofil)	1123,75 ^b
Filme G (prata)	1558,31 ^a
Filme H (controle)	1343,65 ^a

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Dunett ($p < 0,05$).

Observou-se interação significativa entre a adição de prata e os diferentes tipos de MMT. De acordo com a Tabela 10, nota-se que a adição de nanopartículas de prata provocou um aumento significativo ($p < 0,05$) na TTO média do filme contendo a argila Nanofil.

Tabela 10. Taxa de transmissão ao oxigênio dos filmes contendo diferentes argilas, com adição de prata.

Tratamentos	Taxa de transmissão ao oxigênio, 23 °C, 87 % UR (cm³.m⁻².dia⁻¹)
Filme A (Cloisite 10A + prata)	1275,47 ^a
Filme C (Cloisite 30B + prata)	1117,35 ^a
Filme E (Nanofil + prata)	1964,10 ^b

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Na ausência de nanopartículas de prata, não houve diferença (p>0,0,5) na TTO média dos filmes (Tabela 11).

Tabela 11. Taxa de transmissão ao oxigênio dos filmes contendo diferentes argilas, sem adição de prata.

Tratamentos	Taxa de transmissão ao oxigênio, 23 °C, 87 % UR (cm³.m⁻².dia⁻¹)
Filme A (Cloisite 10A)	1092,80 ^a
Filme C (Cloisite 30B)	1210,49 ^a
Filme E (Nanofil)	1123,74 ^a

^a Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Conforme observado nos resultados anteriores, a baixa dispersão e interação das nanopartículas de prata com a argila Nanofil na matriz celulósica justificam o aumento na taxa de transmissão ao oxigênio deste nanocompósito.

A melhoria da propriedade de barreira ao oxigênio que ocorre por meio da esfoliação de quantidades relativamente pequenas de argilominerais em escala nanométrica tem sido reportada. Outros dados revelam que a extensão e a forma na qual as argilas são incorporadas ao polímero, contribuem para o desempenho geral de barreira (KIM et al., 2006; XU et al., 2006; AKBARI, 2007)

4.2.8. Voltametria por redissolução anódica

A Figura 15 mostra os resultados do experimento voltamétrico, obtidos com o analito coletado dos nanocompósitos armazenados em solução aquosa por 3 dias.

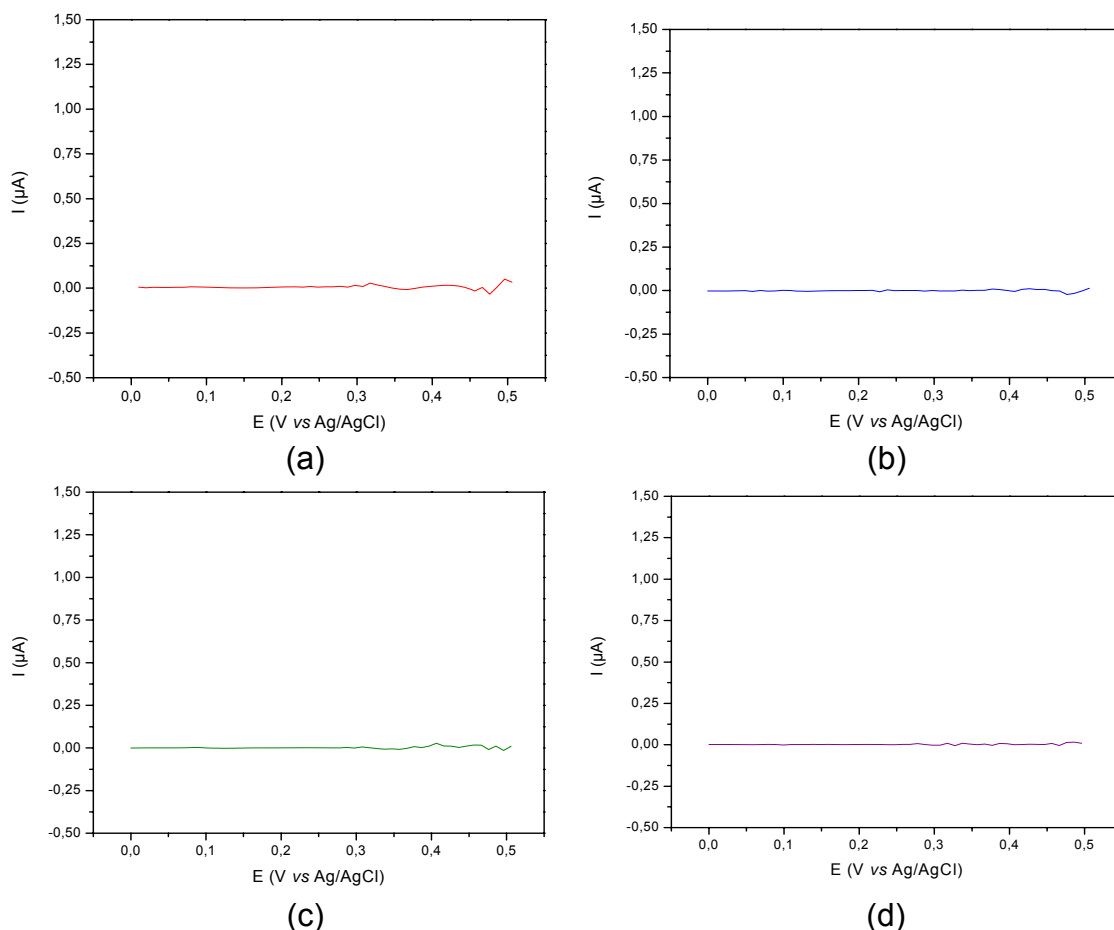


Figura 15. Voltamogramas demonstrando a liberação de íons de prata dos nanocompósitos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(a)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(b)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(c)** e tratamento G - (5 % nanopartículas de prata) **(d)**.

As linhas retas observadas nos voltamogramas demonstram que não houve migração de íons de prata dos nanocompósitos para a solução aquosa. Este resultado pode ser explicado pela formação de grandes agregados de nanopartículas de prata (Figuras 10, 12 e 14). A formação de agregados é influenciada pela área superficial das partículas. As nanopartículas utilizadas possuíam uma área superficial de $5,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, que é considerada alta e favorável à formação de agregados (KUMAR & MÜNSTEDT, 2005).

Kumar & Münstedt (2006) avaliaram nanocompósitos a base de polipropileno incorporado com nanopartículas de prata quanto à sua capacidade de liberação de íons de prata. Os autores concluíram que o polipropileno contendo nanopartículas de prata metálica em pó é capaz de liberar íons em ambiente aquoso, sendo efetivos como filmes antimicrobianos.

O tempo de dispersão, concentração da prata em pó, área superficial das nanopartículas, taxa de difusão da água no polímero e mudanças no estado físico do filme controlam a liberação de íons de prata.

Estes mesmos autores, ao avaliarem a capacidade de liberação de íons de prata de nanocompósitos de poliamida contendo nanopartículas de prata em pó com diferentes áreas superficiais, descobriram que a dispersão da prata em pó é fortemente dependente do tipo de pó utilizado. Os filmes incorporados com partículas de área superficial igual a $0,78 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ foram capazes de liberar uma maior quantidade de íons de prata durante o período de análise. Este resultado foi relacionado à dispersão fina e uniforme alcançada por estas partículas, que favorece a difusão das moléculas de água através dos canais do polímero e leva à oxidação e consequente liberação dos íons Ag^+ para o meio aquoso. Partículas com área superficial de $2,5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ formaram grandes agregados (KUMAR & MÜNSTEDT, 2005).

4.3. Avaliação das características antimicrobianas dos nanocompósitos

A avaliação da eficiência na ação antimicrobiana dos filmes nanocompósitos foi realizada por meio de métodos *in vitro* (halo de inibição e avaliação de alterações da curva de crescimento de micro-organismos em meio líquido).

4.3.1. Método de difusão em ágar

No experimento realizado a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, os nanocompósitos contendo prata não apresentaram ação antimicrobiana, pois não houve formação de halos de inibição. Apesar de a prata ser reconhecidamente um poderoso agente antimicrobiano para diversos micro-organismos (RAI et al., 2009), o resultado obtido pode ser explicado pelo fato de não ter havido migração de prata dos nanocompósitos em um período de três dias, conforme constatado na análise

de voltametria de redissolução anódica. Além disso, o inóculo utilizado continha uma grande quantidade de células (10^8 UFC.mL⁻¹), o que faz com que seu crescimento possa ter sido mais rápido que a velocidade de difusão da prata no meio.

Porém, ao se utilizar a temperatura de refrigeração, foi possível observar a formação de halos de inibição nas placas inoculadas com *E. coli*, *S. enterica* e *S. aureus* para os tratamentos contendo prata em sua composição. Os tratamentos B, D e F não diferiram do filme controle, pois não apresentaram halos de inibição para nenhum dos micro-organismos citados ($p > 0,05$). Os diâmetros médios dos halos de inibição para *E. coli*, *S. enterica* e *S. aureus* pelos filmes com adição de prata encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Diâmetro médio dos halos de inibição para *E. coli*, *S. enterica* e *S. aureus*.

Tratamentos	Diâmetro (cm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>
Filme A (Cloisite 10A + prata)	1,22 ^a	1,20 ^a	1,10 ^a
Filme B (Cloisite 10A)	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Filme C (Cloisite 30B + prata)	1,40 ^a	1,10 ^a	1,23 ^a
Filme D (Cloisite 30B)	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Filme E (Nanofil + prata)	1,43 ^a	1,20 ^a	1,27 ^a
Filme F (Nanofil)	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Filme G (prata)	1,30 ^a	1,28 ^a	1,20 ^a
Filme H (controle)	0 ^b	0 ^b	0 ^b

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

A interação MMT / prata não foi significativa ($p > 0,05$) e a adição de prata aos nanocompósitos favoreceu significativamente a formação de halo de inibição ($p < 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Influencia da adição de prata no diâmetro dos halos de inibição dos nanocomp ositos para *E. coli*, *S. enterica* e *S. aureus*

Tratamentos	Diâmetro (cm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>
Filmes com prata	1,35 ^a	1,17 ^a	1,20 ^a
Filmes sem prata	0 ^b	0 ^b	0 ^b

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Não houve formação de halo de inibição para *Listeria innocua*, no entanto, ocorreu a redução de densidade das col nias ao redor dos filmes que continham prata em sua composição. Isso demonstra que o micro-organismo foi menos susceptível   a o antimicrobiana da prata. Os nanocomp ositos constituídos apenas de argilas MMT não apresentaram a o antimicrobiana, assim como o filme controle (Figura 16).

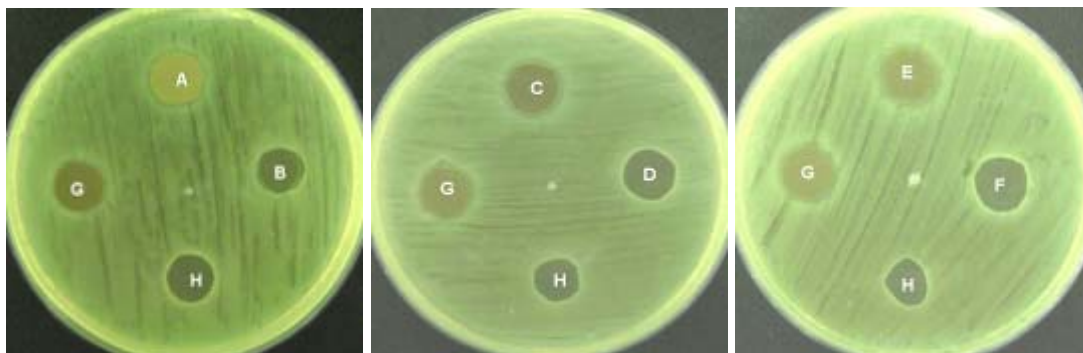


Figura 16. Formação de zonas de redução de células de *Listeria innocua* pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanop rticulas de prata + 5 % Cloisite 10A) (**A**); tratamento B (5 % Cloisite 10A) (**B**); tratamento C (5 % nanop rticulas de prata + 5 % Cloisite 30B) (**C**); tratamento D (5 % Cloisite 30B) (**D**); tratamento E (5 % nanop rticulas de prata + 5 % Nanofil) (**E**); tratamento F (5 % Nanofil) (**F**); tratamento G (5 % nanop rticulas de prata) (**G**) e tratamento H – controle (**H**).

De acordo com a Figura 17,   possível observar que todos os tratamentos contendo nanop rticulas de prata apresentaram halo de inibição ao seu redor para *S. aureus*. Os nanocomp ositos constituídos apenas de argilas MMT não apresentaram a o antimicrobiana, assim como o filme controle.



Figura 17. Formação de halos de inibição de *Staphylococcus aureus* pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(A)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(B)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(C)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**.

A Figura 18 ilustra os halos de inibição formados para *E. coli*. Todos os tratamentos contendo nanopartículas de prata obtiveram ação antimicrobiana.

A presença de MMT nos filmes não influenciou significativamente ($p > 0,05$) o diâmetro dos halos, Os nanocompósitos constituídos apenas de argilas MMT não apresentaram ação antimicrobiana, assim como o filme controle.



Figura 18. Formação de halos de inibição de *Escherichia coli* pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) **(A)**; tratamento B (5 % Cloisite 10A) **(B)**; tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) **(C)**; tratamento D (5 % Cloisite 30B) **(D)**; tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) **(E)**; tratamento F (5 % Nanofil) **(F)**; tratamento G (5 % nanopartículas de prata) **(G)** e tratamento H – controle **(H)**.

Os halos formados para *S. enterica* estão representados na Figura 19. Nota-se que os tratamentos contendo nanopartículas de prata obtiveram resultados de inibição. Os nanocompósitos constituídos apenas de argilas MMT não apresentaram ação antimicrobiana, assim como o filme controle, sendo observado o crescimento de colônias embaixo dos filmes.

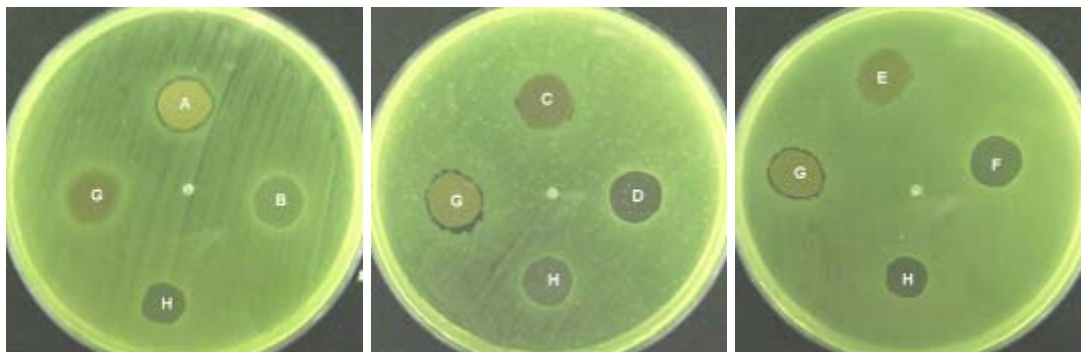


Figura 19. Formação de halos de inibição de *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (**A**); tratamento B (5 % Cloisite 10A) (**B**); tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (**C**); tratamento D (5 % Cloisite 30B) (**D**); tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (**E**); tratamento F (5 % Nanofil) (**F**); tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (**G**) e tratamento H – controle (**H**).

A formação de halo de inibição está relacionada à difusão do antimicrobiano e com a velocidade de crescimento do microrganismo. Esses parâmetros são influenciados pelo estado fisiológico da cultura indicadora, da composição do ágar (TOLEDO, 2000), da estrutura química e do nível de ligações cruzadas dos filmes (CAGRI et al., 2001). É possível que, além da influência destes fatores, a baixa temperatura utilizada para incubação das placas tenha favorecido a liberação da prata pelos nanocompósitos. A baixa temperatura também reduziu a velocidade de crescimento das bactérias, fazendo com que a prata tivesse mais tempo para se difundir no meio. Estudos de migração com os nanocompósitos empregando-se diferentes temperaturas e simulantes devem ser desenvolvidos.

4.3.2. Método de difusão em meio líquido

Os resultados obtidos nas curvas de crescimento foram avaliados pela alteração na velocidade de crescimento do micro-organismo (μ), utilizando

apenas os pontos que compõem a parte linear da fase exponencial. A aplicação de regressão linear a estes pontos permite a obtenção da inclinação desta reta e, quanto maior o valor, maior a velocidade de crescimento. O efeito inibidor do filme sobre a velocidade de crescimento do micro-organismo, diminui o valor de μ .

Comparando-se os nanocompósitos aos tratamentos controle e branco, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as velocidades específicas de crescimento dos micro-organismos avaliados, sendo encontrado valores médios de $2,46 \pm 0,28 \text{ h}^{-1}$ para *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis, e de $2,64 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$ para *Listeria innocua*.

Os gráficos permitem a comparação visual dos efeitos que os diferentes filmes provocam sobre as curvas de crescimento dos micro-organismos. Conforme os resultados obtidos para μ , por meio das Figuras 20 e 21, observa-se que os nanocompósitos não influenciaram no comportamento dos micro-organismos, que cresceram de forma semelhante em todos os tratamentos inclusive aquele utilizado como controle (filme H) e branco (sem adição de filme).

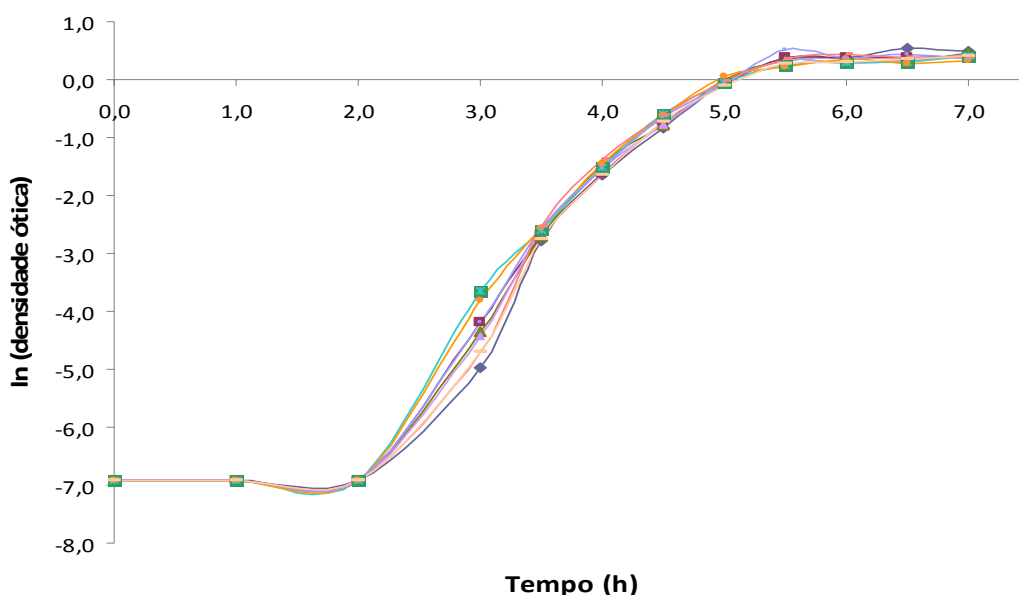


Figura 20. Curvas de crescimento de *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis em meio TSB, na presença dos diferentes nanocompósitos produzidos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (—◆—); tratamento B (5 % Cloisite 10A) (—■—); tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (—▲—); tratamento D (5 % Cloisite 30B) (—■—); tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (—■—); tratamento F (5 % Nanofil) (—●—); tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (—■—); tratamento H (controle) (—■—) e branco - sem filme (—■—).

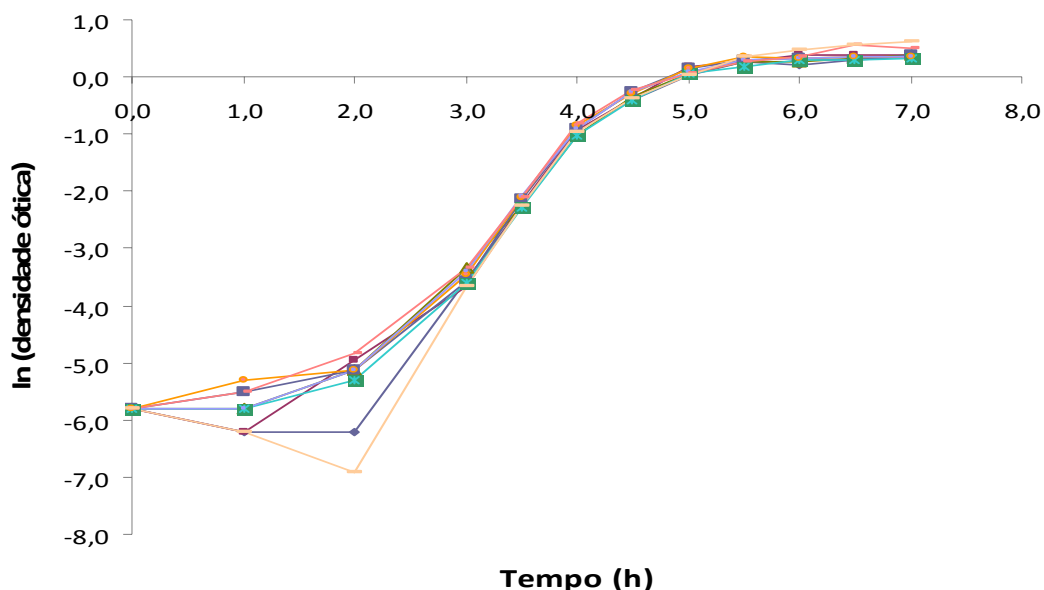


Figura 21. Curvas de crescimento de *Listeria innocua* em meio TSB, na presença dos diferentes nanocompósitos produzidos: tratamento A (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 10A) (—◆—); tratamento B (5 % Cloisite 10A) (—■—); tratamento C (5 % nanopartículas de prata + 5 % Cloisite 30B) (—▲—); tratamento D (5 % Cloisite 30B) (—■—); tratamento E (5 % nanopartículas de prata + 5 % Nanofil) (—■—); tratamento F (5 % Nanofil) (—●—); tratamento G (5 % nanopartículas de prata) (—■—); tratamento H (controle) (—■—) e branco - sem filme (—■—).

Conforme os dados obtidos por meio de voltametria de redissolução anódica, estes resultados podem ser explicados pelo fato da migração da prata não estar ocorrendo ou por estar acontecendo a concentrações e velocidade muito baixas, não atingindo a concentração mínima inibitória para estas bactérias. Segundo Rai et al. (2009), a propriedade antimicrobiana da prata está relacionada à sua quantidade e taxa de liberação. De acordo com Pinto et al. (2009), a prata, tanto na forma de nanopartículas como em sua forma iônica, exibe forte citotoxicidade para uma ampla variedade de micro-organismos. Shrivastava et al. (2007) sintetizaram nanopartículas de prata na faixa de 10 a 15 nm e avaliaram o efeito em micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, concluindo que o efeito antimicrobiano foi dependente da concentração de nanopartículas de prata, e mais efetivo contra bactérias Gram-negativas. A concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ prolongou a fase lag de crescimento de *E. coli*, só sendo observado algum crescimento após 8 horas. Em contraste, nenhuma redução no crescimento de *S. aureus* foi observada para esta

concentração de nanopartículas de prata, sendo necessários $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para uma inibição parcial em seu crescimento.

5. CONCLUSÕES

A espessura e a taxa de transmissão ao vapor de água dos filmes de acetato de celulose não foram influenciadas pela adição dos nanocompostos.

As nanopartículas de prata interagiram de forma desfavorável com a argila Nanofil na obtenção de nanocompósitos. A rugosidade média, taxa de transmissão ao oxigênio e a resistência à tração dos filmes foram influenciadas pela adição das nanopartículas de prata, sendo observado um aumento nos valores de Ra e TTO, e uma diminuição da resistência dos nanocompósitos incorporados com a argila Nanofil.

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão permitiram observar a estrutura intercalada das argilas Cloisite 10A e Cloisite 30B no interior do polímero, enquanto que a incorporação da argila Nanofil levou à formação de estruturas tactóides de baixa interação com a matriz celulósica. Observou-se também que as nanopartículas de prata não foram dispersadas de maneira uniforme e tenderam à formação de agregados. A análise de microscopia eletrônica de varredura, por meio da visualização dos cortes transversais dos filmes, revelou a formação de galerias no interior dos polímeros incorporados com os diferentes MMT's. Observou-se também que a adição das argilas alterou a morfologia da superfície dos filmes, sendo possível notar a presença de nanopartículas de prata e a maior irregularidade da superfície dos nanocompósitos contendo a argila Nanofil.

A dispersão e delaminação da argila MMT são alcançados somente quando ocorrem interações favoráveis entre o solvente, a argila e o polímero. As argilas organicamente modificadas (Cloisite 10A e Cloisite 30B) foram mais compatíveis com os filmes de acetato de celulose, sendo necessários mais estudos sobre os métodos de dispersão utilizados para que uma estrutura esfoliada seja alcançada, com a conseqüente melhoria das propriedades deste biopolímero.

Os filmes incorporados com nanopartículas de prata apresentaram ação antimicrobiana em meio de cultura sólido, sendo observada a formação de halos de inibição para os micro-organismos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis e *Staphylococcus aureus*, quando incubados a 7°C. Porém, a velocidade específica de crescimento dos micro-organismos

Salmonella enterica sorotipo Choleraesuis e *Listeria innocua* não foi alterada pelos nanocompósitos.

Não ocorreu liberação de íons de prata pelo polímero, dessa forma, sua eficiência como embalagem ativa antimicrobiana deve ser avaliada com mais estudos, modificando-se parâmetros como a dispersão dos nanocompostos e assim, otimizar sua capacidade de liberação de prata.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEN, R. Introduction. In: (Ed.) **Novel Food Packaging Techniques**, cap.1, p. 1 - 2, Washington: CRC Press, 2003.

AITKEN, R. J.; CHAUDHRY, M. Q.; BOXALL, A. B. A.; HULL, M. In-depth review: Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational Medicine – Oxford**, 56, 300-306, 2006.

AKBARI, Z.; GHOMASHCHI, T.; MOGHADAM. S.; Improvement in Food Packaging Industry with Biobased Nanocomposites. **International Journal of Food Engineering**. 3, 4, 2007.

ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**, 28, 1–63, 2000.

ALVES, V .D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of glycerol and amylose enrichment on cassava starch films properties. **Journal of Food Engineering**, 78, 2, 941-946, 2007.

AN, J.; ZHANG, M.; WANG, S.; TANG, J. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. **LWT – Food Science and Technology**, 41, 1100–1107, 2008.

APPENDINI, P., HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 3 (2), 113–126, 2002.

ARTZI, N.; NIR, Y.; NARKIS, M. Melt blending of ethylene vinyl alcohol copolymer/clay nanocomposites: effect of the clay type and processing conditions. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, 40, 1741–1753, 2002.

ARUAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. Effect of water on the oxygen barrier properties of poly(ethylene terephthalate) and polyactide films. **Journal of applied polymer science**. 92, 1790-1803, 2004.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for water vapor transmission of materials**. E 96-00. Philadelphia: ASTM, 2000, 8 p.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. D 882-02. Philadelphia: ASTM, 2002, 10 p.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor**. D3985-05. Philadelphia: ASTM, 2005, 7 p.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector.** F1927-07. Philadelphia: ASTM, 2007, 6 p.

AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, 42, 1240–1253, 2009.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma.** 2008. 203 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BHARADWAJ, R. K. Modeling the barrier properties of polymer-layered silicate nanocomposites. **Macromolecules**, 34, 9189–9192, 2001.

BHARADWAJ, R. K.; MEHRABI, A. R.; HAMILTON, C.; TRUJILLO, C.; MURGA, M.; FAN, R.; CHAVIRA A.; THOMPSON, A. K. Structure-property relationships in crosslinked polyester–clay nanocomposites. **Polymer**, 43(13), 3699–3705, 2002.

BOCCUNI, F.; RONDINONE, B.; PETYX, C.; IAVICOLI, S. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. **Journal of Cleaner Production**, 16, 949–956, 2008.

BOHLMANN, G. (2006). Biodegradable polymers. Sri consulting. <http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/580.0280/>. Acessado em 16.06.09.

BOTREL, D. A. **Desenvolvimento e caracterização de filme ativo adicionado de nanopartículas de ferro e avaliação da sua eficiência na absorção de oxigênio e na inibição do crescimento de fungos em amendoim.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 76 p., 2008.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M.; HAGENS, W.; BULDER, A.; HEER, C.; VOORDE, S. **Health impact of nanotechnologies in food productions. Report 2007.014.** Wageningen, UR, RIKLT – Institute of Food Safety, and National Institute of Public Health & Environment; Center for Substances and Integrated Risk Assessment, 2007.

BRAGA, L.; PERES, L. NOVAS TENDÊNCIAS EM EMBALAGENS. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, América do Sul, 28 1 07 2010.

BRODY, A.L. What's the hottest food packaging technology today? **Food Technology**, 55, 1, 82-84, 2001.

CABEDO, L.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M.; GAVARA, R.; SAURA, J. J. Development of EVOH–kaolinite nanocomposites. **Polymer**, 45(15), 5233–5238, 2004.

CAGRI, A. et al. Antimicrobial edible films and coatings. **Journal of Food Protection**, 67, 833–848, 2004.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial, mechanical and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acid. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6. p. 865–870, 2001.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 81 p., 2009.

CAVA, D.; GIMENEZ, E.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Comparative performance and barrier properties of biodegradable thermoplastics and nanobiocomposites versus PET for food packaging applications. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, 22, 265–274, 2006.

CHA, D. S.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44, 223–237, 2004.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, 23, 1998.

CHAUDHRY, M. Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A. B. A.; CASTLE, I.; AITKEN, R. J.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants**. 25, 241–258, 2008.

CHAUDHRY, M. Q.; BOXALL, A. B. A.; AITKEN, R. J.; HULL, M. **A scoping study into the manufacture and use of nanomaterials in the UK**. York, Central Science Laboratory. 2005.

CHEN, S.; WU, G.; ZENG, H. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag⁺ complex. **Carbohydrate Polymers**. 60, 33–38, 2005.

CHOI, H. J.; KIM, S. K.; HYUN, Y. H.; JHON, M. S. Preparation and rheological characteristics of solvent-cast poly(ethylene oxide)/montmorillonite nanocomposites. **Macromolecular Rapid Communications**, 22, 320–325, 2001.

CIENTIFICA. **Nanotechnologies in the food industry**. Publicado em Agosto de 2006. Disponível em: www.cientifica.com/www/details.php?id=47.

CIOFFI, N.; TORSI, L.; DITARANTO, N.; TANTILLO, G.; GHIBELLI, L.; SABBATINI, L. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, 17, 5255–5262, 2005.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Norma aprovada - Oitava Edição. M2- A8, 23, 1, 2003.

COLLISTER, J. Commercialisation of polymer nanocomposites. In R. KRISHNAMOORTI & R. A. VAIA (Eds.), **Polymer nanocomposites: Synthesis, characterisation and modelling**. Washington: American Chemical Society, 2002.

DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; BEUKEN, E. Z.; TOBBAK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, s. 1, p. S103 - S112, 2008.

DAMM, C.; MÜNSTEDT H.; RÖSCH A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. **Materials Chemistry and Physics**. 108, 61–66, 2008.

DEAN, K.; YU, L.; WU, D. Y. Preparation and characterization of meltextruded thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Composites Science and Technology**, 67, 413–421, 2007.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. **Critical Reviews in Food Science**, 38, 299-313, 1998.

DEL NOBILE, M.A.; CANNARSI, M.; ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; FAVIA, P.; IACOVIELLO, G.; D'AGOSTINO, R. J. Effect of Ag-containing Nano-composite Active Packaging System on Survival of *Alicyclobacillus acidoterrestri*. **Journal of Food Science**, 69, 8, 2004.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**. 14, 273 285, 2004.

DUFRESNE, A.; VIGNON, M. R. Improvement of starch film performances using cellulose microfibrils. **Macromolecules**, 31, 2693–2696, 1998.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2010. FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potencial Food Safety Implications: Meeting Report. Rome, 133 pp. 2010.

FENG, Q. L.; KIM, T. N.; WU, J.; PARK, E. S.; KIM, J. O.; LIM, D. Y.; CUI, F. Z. Antibacterial effects of Ag-Hap thin films on alumina substrates. **Thin Solid Films** 335, 214–9, 1998.

GODBILLOT, L.; DOLE, P.; JOLY, C.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Analysis of water binding in starch plasticized films. **Food Chemistry**, 96, 3, 380-386, 2006.

FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. The relevance for food safety of applications of nanotechnology in the food and feed industries. Dublin, Food Safety Authority Of Ireland. 88 pp., 2008.

GARBER, C. Nanotechnology food coming to a fridge near you, Nanowerk LLC, (2007) Disponível em: www.nanowerk.com/spotlight/spotid=1360.php

GEDANKEN A. Doping nanoparticles into polymers and ceramics using ultrasound radiation. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 14 (4), 418-430, 2007.

GOMES, C. F. **Argilas – O que são e para que servem**. Lisboa: Fundação Calouste Guilbenkian, 1986.

GONÇALVES, M. P. J. C., SOARES, N. F. F., PIRES, A. C. S., ARAÚJO, E. A. Uso de sachê antimicrobiano para conservação de queijo tipo cottage. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, (2007).

GONTARD, N. (2000). Panorama des emballages alimentaires actifs. In: GONTARD, N. (Ed.), **Les Emballages Actifs**, 1–29, Paris, France: Tec & Doc., 2000.

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

GRIFFIN, G. J. L.; TURNER, R. D. Macrobiodegradation of plastics. Proc. **4th International Biodeterioration Symposium**, Berlin-Dalhem, 33, 117-122, 1978.

GROVES, K. Potencial benefits of micro and nano technology for the food industry: does size matter? **New Food Magazine**. 4, 49-52, 2008.

GU, H. W.; HO, P. L.; TONG, E.; WANG, L.; XU, B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. **Nano Letters**, 3, 1261–1263, 2003.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, 54, (3), 56–65, 2000.

HAN, J.H. Antimicrobial Food Packaging. In: AHVENAINEN, R. (Ed). **Novel Food Packaging Techniques**, 50-65, Washington: CRC Press, 2003.

HELMUTH Kaiser Consultancy. **Nanotechnology in Food and Food Processing Industry Worldwide**. 2004.
Disponível em: www.hkc22.com/Nanofood.html

HU, A. W.; FU, Z. H. Nanotechnology and its application in packaging and packaging machinery. **Packaging Engineering**, 24, 22–24, 2003.

HUANG, L.; LI, D. Q.; LIN, Y. J.; WEI, M.; EVANS, D. G.; DUAN, X. Controllable preparation of nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 99, 986–993, 2005.

JAMES, K.; FITZPATRICK, L.; LEWIS, H.; SONNEVELD, K. **Sustainable packaging**. In W. Leal Filho (Ed.), Handbook of sustainability research. Frankfurt: Peter Lang Scientific Publishing, 2005.

JAMSHIDDI, K.; HYON, S. H.; IKADA, Y. Thermal characterization of polylactide. **Polymer**, 29, 2229-2234, 1988.

JAWAHAR, P.; BALASUBRAMANIAN, M. Preparation and properties of polyesterbased nanocomposite gel coat system. **Journal of Nanomaterials**, 4, 2006.

JIMENEZ, G.; Ogata, N.; Ogihara, T. Structure and thermal/mechanical properties of poly(caprolactone)-clay blend. **Journal of Applied Polymer Sciences**, 64, 2211–2220, 1997.

JOSEPH, T. e MORRISON, M. Nanoforum report: Nanotechnology in Agriculture and Food. **European Nanotechnology Gateway**, 2006. Disponível em: www.nanoforum.org.

JUNG, W.K.; KOO, H.C.; KIM, K.W.; SHIN, S.; KIM, S.H.; PARK, Y.H. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 2171–2178, 2008.

KAHN, J. Nano's big future – tiny technology promises big rewards. Some may already be in your closet. **National Geographic**, 209, 98–119, 2006.

KIM, Y.; WHITE, J. L. Modeling of polymer/clay nanocomposite formation. **Journal of Applied Polymer Science**, 101, 1657-1663, 2006.

KLASEN H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, 26,131–8, 2000.

KOH, H. C.; PARK, J. S.; JEONG, M. A.; HWANG, H. Y.; HONG, Y. T.; HA, S. Y.; NAM S.Y. Preparation and gas permeation properties of biodegradable polymer/layered silicate nanocomposite membranes. **Desalination**, 233, 201-209, 2008.

KOH, H. C.; PARK, J. S.; JEONG, M. A.; HWANG, H. Y.; HONG, Y. T.; HA, S. Y.; NAM S.Y. Preparation and gas permeation properties of biodegradable polymer/layered silicate nanocomposite membranes. **Desalination**, 233, 201-209, 2008.

KUMAR, R. C.; MÜNSTEDT, H. Antimicrobial polymers from polypropylene/silvercomposites—Ag⁺ release measured by anode stripping voltammetry. **Reactive and Functional Polymers**. v. 66 (7), 780-788, 2006.

KUMAR, R. C.; MÜNSTEDT, H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. **Biomaterials**, 26, 2081–2088, 2005.

LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Applications of active packaging for improvement of shel-life and nutritional quality of fresh and extended shelflife foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, 13, 1–69, 1989

LAGARON, J. M.; CABEDO, L.; CAVA, D.; FEIJOO, J. L.; GAVARA, R.; GIMENEZ, E. Improving packaged food quality and safety part 2: nanocomposites. **Food Additives and Contaminants**, 22, 994–998, 2005.

LANSDOWN, A. B. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of Wound Care**, 11, 125–130, 2002.

LI, H.; LI, F.; WANG, L.; SHENG, J.; XIN, Z.; ZHAO, L.; Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba Mill. var. inermis (Bunge) Rehd*). **Food Chemistry**, 114, 547–552, 2009.

LIAU, S. Y.; READ, D. C.; PUGH, W. J.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. **Letters in Applied Microbiology**, 25, 279–283, 1997.

LI, W-R.; XIE, X-B.; SHI, Q-S.; ZENG, H-Y.; YOU-SHENG, O-Y.; CHEN, Y-B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 85, 1115–1122, 2010.

LI, X. C.; HA, C. S. Nanostructure of EVA/organoclay nanocomposites: effects of kinds of organoclay and grafting of maleic anhydride onto EVA. **Journal of Applied Polymer Science**, 87:1901–1909, 2003.

LIN, Y. J.; LI, D. Q.; WANG, G.; HUANG, L.; DUAN, X. Preparation and bactericidal property of MgO nanoparticles on c-Al₂O₃. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 16, 53–56, 2005.

LOTTI, C.; ISAAC, C. S.; BRANCIFORTI, M. C.; ALVES, R. M. V.; LIBERMAN, S.; BRETAS, R. E. S. Rheological, mechanical and transport properties of blown films of high density polyethylene nanocomposites. **European Polymer Journal**, 44, 1346–1357, 2008.

LUDUEÑA, L. N.; ALVAREZ, V. A.; VASQUEZ, A. Processing and microstructure of PCL/clay nanocomposites. **Materials Science and Engineering: A**, 460–461, 121–129, 2007.

LUO, P. G.; STUTZENBERGER, F. J. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms. In A. I. Laskin, S. Sariaslani, & G. M. Gadd (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**, 63, 145–181. London: Elsevier, 2008.

MAHALIK, N. P.; NAMBIAR, A. N. Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. **Trends in Food Science & Technology**. 21, 117–128, 2010.

MAJDZADEH-ARDAKANI, K.; NAVARCHIAN, A. H.; SADEGHI, F. Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 79, 547–554, 2010.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 7055-7011, 2003.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, 50, 2, 379-386, 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, 56, 2, 129-135, 2004.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, 19, 157-164, 2005.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized fillms from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, 75, 4, 453-460, 2006.

MANGIACAPRA, P.; GORRASI, G.; SORRENTINO, A.; VITTORIA, V. Biodegradable nanocomposites obtained by ball milling of pectin and montmorillonites. **Carbohydrate Polymers**, 64, 516–523, 2006.

MBHELE, Z. H.; SALEMANE, M. G.; VAN SITTEERT, C. G. C. E. Fabrication and characterization of silver–polyvinyl alcohol nanocomposites. **Chemistry of Materials**, 15, 5019–5024, 2003.

MCGLASHAN, S. A.; HALLEY, P. J. Preparation and characterization of biodegradable starch-based nanocomposite materials. **Polymer International**, 52, 1767–1773, 2003.

MELAIYE, W.J.; YOUNGS, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 15, 125–130, 2005.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus* sp.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 88p, 2003.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; LIMA, D. V.; PIRES, A. C. S. Avaliação da eficiência de filme antimicrobiano incorporado com nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus* sp. **Alimentos e Nutrição**, 17, 91-95, 2006.

MOCON – OX-TRAN® Model 2/21 Modular System Operator's Manual. 202 p.p.

MORRIS, V. J. Nanotechnology in the food industry. **New Food Magazine**. 4, 53-55, 2008.

OGATA, N.; OGAWA, T.; IDA, T.; YANAGAWA, T.; OGI, T. Structure and thermal/mechanical properties of poly(lactide)-clay blend. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, 35, 389–396, 1997.

OGATA, N.; KAWAKAGE, S.; OGIHARA, T. Poly(vinyl alcohol)-clay and poly(ethylene oxide)-clay blend prepared using water as solvent. **Journal of Applied Polymer Science**, 66, 573–581, 1997.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Active food packaging technologies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44, 185-193, 2004.

OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, P. L. V.; Revisão: Principais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, 7, 161-165, 2004.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica** 54, 213-226, 2008.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; GUIMARÃES, T. R. Nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita: caracterização estrutural, morfológica e de opacidade. **17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

PARK, H. M.; LEE, W. K.; PARK, C. Y.; CHO, W. J.; HA, C. S. Environmentally friendly polymer hybrids: part I. Mechanical, thermal, and barrier properties of the thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Journal of Materials Science**, 38, 909–915, 2003.

PARK, H. M.; LIANG, X.; MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. Effect of Compatibilizer on Nanostructure of the Biodegradable Cellulose Acetate/Organoclay Nanocomposites. **Macromolecules**. 37, 9076-9082, 2004.

PARK, S. H.; LIM, S. T.; SHIN, T. K.; CHOI, H. J. Viscoelasticity of biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene oxide). **Polymer**, 42, 2001.

PATIL, N. V. Nanoclays Make Polymers Stronger. **Advanced Materials & Processes**, 163, 11, 2005.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, 21, 375-383, 2008.

PIRES, A.C.S. **Desenvolvimento e avaliação de filmes e sachê antimicrobianos na conservação de queijo mussarela fatiado**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 73p, 2006.

Plastics Task Force (2008).

<http://www.ecologycenter.org/ptf/misconceptions.html>. Acessado 20.09.08.

QI, L. F.; XU, Z. R.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, 339, 2693–2700, 2004.

QUINTAVALLA, S., VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373-380, 2002.

RADZIUK, D. V.; ZHANG, W.; SHCHUKIN, D.; MÖHWALD, H. Ultrasonic alloying of preformed gold and silver nanoparticles. **Small**. 22, 6(4), 545-53, 2010.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, 27, 76–83, 2009.

RAJAGOPALAN, S.; SHARMA, S. J.; NANOTKAR, V. Y. Ultrasonic Characterization of Silver Nanoparticles. **Journal of Metastable and Nanocrystalline Materials**, 23, 271-274, 2005.

RAVINDRA, S.; NARAYANA REDDY, N.; PADMA, Y.; SREEDHAR, B.; MOHANA RAJU, K. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 76, 248–258, 2010.

RAY, S.; EASTEAL, A.; QUEK, S. Y.; CHEN, X. D. The potential use of polymer-clay nanocomposites in food packaging. **International Journal of Food Engineering**, 2(4). art. 5, 2006.

RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; NG, P. K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 5814–5822, 2006.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47, 4, 411 — 433, 2007.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 337–346, 2003.

ROCO, M. G.; BAINBRIDGE, W. S. (eds) **Societal implications of nanoscience and nanotechnology**. Boston, Kluwer Academic Publishers. pp. 3-4, 2001.

ROLLER, S. (Ed.) **Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods**. England: Woodhead Publishing Limited, 2003.

ROMERO, R. B.; LEITE, C. A. P.; GONÇALVES, M. C. The effect of the solvent on the morphology of cellulose acetate/montmorillonite nanocomposites. **Polymer**, 50, 161–170, 2009.

SÁNCHEZ-VALDES, S.; ORTIZ, H. O.; VALLE, L. F. R.; RODRÍGUEZ, F. J. M.; MIRANDA, R. G. Mechanical and antimicrobial properties of multilayer films

with a polyethylene/silver nanocomposite layer. **Journal of Applied Polymer Science**, 111, 953–962, 2009.

SANPUI, P.; MURUGADOSS, A.; PRASAD, D. P. V.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY, A. The antibacterial properties of a novel chitosan Agnanoparticle composite. **International Journal of Food Microbiology**, 124, 142–146, 2008.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. S.; NOBREGA, J. E.; JUNIOR, M. A. W.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WURLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_ 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, 20, 85-89, 2009.

SANTOS, K. S. **Avaliação das propriedades finais dos nanocompósitos de polipropileno com diferentes argilas organofílicas**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; ALVES, R.V.; OLIVEIRA, L.M.; GOMES, T.C. **Embalagens com atmosfera modificada**. Campinas: CETEA/ITAL, 99-114, 1996.

SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. **International Journal of Food Microbiology**, 60, 241– 249, 2000.

SCHIERHOLZ, J. M.; BEUTH, J.; RUMP, A. F. E.; KÖNIG, D. P.; PULVERER, G. Anti- Infective catheters: A difficult search for effective slow delivery systems. **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, 30, 869-875, 1999. (a)

SCHIERHOLZ, J. M.; LUCAS, L.; PULVERER, G. Silver coating of medical devices – a review. **Journal of Hospital Infection**, 40, 257-262, 1998.

SCHIERHOLZ, J. M.; SEYFERT, U. T.; RUMP, A. F. E.; BEUTH, J.; PULVERER, G. Strategies for the Prevention of Catheter Material-Associated Thrombosis and Bloodstream Infections. **Infusionsther Transfusionsmed**, 26, 278-287, 1999. (b)

SHEN, Z.; SIMON, G. P.; CHENG, Y. B. Comparison of solution intercalation and melt intercalation of polymer-clay nanocomposites. **Polymers**, 43, 4251–4260, 2002.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina Ciências Agrárias**, 28, 1, 79 – 88, 2007.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T.; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, 18, 9pp., 2007.

SILVA, W. A.; SOARES, N.F.F.; PIRES, A.C.S.; PAULA, F. S. Inibição de *aspergillus flavus* em amendoim através de sachê antimicrobiano In: **Anais 7**

Congresso Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, SP, 2007.

SOARES, N. F. F.; HOTCHKISS, J. H. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. **Journal of Food Science**, 63, 61–65, 1998.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, 18(2), 84–95, 2007.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 10, 24-30, 2000.

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

STRAWHECKER, K. E.; MANIAS, E. Structure and properties of Poly(vinyl alcohol)/Na⁺ montmorillonite nanocomposites. **Chemistry of Materials**, 12, 2943–2949, 2000.

SUH, D. J.; LIM, Y. T.; Park, O. O. The property and formation mechanism of unsaturated polyester-layered silicate nanocomposite depending on the fabrication methods. **Polymers**, 41, 8557–8563, 2000.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, 14(3), 71–78, 2003.

TOLEDO, M.M. **Crescimento de Lactococcus lactis subsp. Lactis NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, 2000.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, 48, 414–424, 2010.

USUKI, A.; KOJIMA, Y.; KAWASUMI, M.; OKADA, A.; FUKUSHIMA, Y.; KURAUCHI, T.; KAMIGAITO, O. Synthesis of nylon 6-clay hybrid. **Journal of Materials Research**, 8, 1179–1184, 1993.

VAIDYA, U. R.; BHATTACHARYA, M. Properties of blends of starch and synthetic polymers containing anhydride groups. **Journal of Applied Polymer Science**, 52(5), 617–628, 1994.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEVEBERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, 19, 163-171, 2002.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN BEEST, M.; KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Development in the active packaging of Foods. **Trends in Food Science and Technology**, 10, 77-86, 1999.

VIMALA, K.; MURALI MOHANA, Y.; SAMBA SIVUDU, K.; VARAPRASAD, K.; WIBOWO, A. C.; MISRA, M.; PARK, H. M.; DRZAL, L. T.; SCHALEK, R.; MOHANTY, A. K.; Biodegradable nanocomposites from cellulose acetate: Mechanical, morphological, and thermal properties. **Composites: Part A**, 37, 1428–1433, 2006.

WAN, C.; QIAO, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Effect of different clay treatment on morphology and mechanical properties of PVC-clay nanocomposites. **Polymer Testing**, 22,453–461, 2003

WEISS, J.; TAKHINTOV, P.; McCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**. 71, R107-R116, 2006.

WEST, R. D.; MALHOTRA, V. M. Rupture of nanoparticle agglomerates and formulation of Al₂O₃-epoxy nanocomposites using ultrasonic cavitation approach: effects on the structural and mechanical properties. **Polymer Engineering & Science**. v. 46(4), 426-430, 2006.

WIBOWO, A. C.; MISRA, M.; PARK, H. M.; DRZAI, L. T.; SCHALEK, R.; MOHANTY, A. K. Biodegradable nanocomposites from cellulose acetate: Mechanical, morphological, and thermal properties. **Composites: Part A**, 37, 1428–1433, 2006.

WWICS (WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTRE FOR SCHOLARS). **The Nanotechnology Consumer Inventory**. Disponível em: www.nanotechproject.org/inventories/consumer/

XU, Y.; REN, X.; HANNA, M. A. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, 99(4), 1684–1691, 2006.

YAMADA, E. Desenvolvimento de sistema de embalagem antimicrobiana. In: **Boletim CTC TecnoCarnes**, Vol XIV. Ital, Campinas – SP, 2004.

ANEXOS

Tabela 14. Resumo da análise de variância para espessura dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	29.3671 ^{n.s}
Resíduo	16	11.4522

^{n.s} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 15. Resumo da análise de variância para rugosidade média dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	4308.3227*
Resíduo	16	172.5112

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 16. Resumo da análise de variância para a rugosidade média dos nanocompósitos comparando-se os tratamentos entre si.

Fontes de Variação	GL	QM
MMT	2	5477.9989*
Prata	1	3928.4007*
MMT*Prata	2	4414.9916*
Resíduo	12	199.0253

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 17. Resumo da análise de variância para a resistência à tração (MPa) dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	39.8112*
Resíduo	16	7.0632

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 18. Resumo da análise de variância para a resistência à tração dos nanocompósitos comparando-se os tratamentos entre si.

Fontes de Variação	GL	QM
MMT	2	59.332*
Prata	1	81.067*
MMT*Prata	2	2.474 ^{n.s.}
Resíduo	12	78.941

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 19. Resumo da análise de variância para a porcentagem de alongamento dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	0.0006848 ^{n.s.}
Resíduo	16	0.0007524

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 20. Resumo da análise de variância para o módulo de elasticidade (MPa) dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	83354.645 ^{n.s.}
Resíduo	16	56861.846

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 21. Resumo da análise de variância para a taxa de transmissão ao vapor de água dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	2065.4985 ^{n.s.}
Resíduo	16	1045.1342

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 22. Resumo da análise de variância para a taxa de transmissão ao oxigênio dos nanocompósitos comparados ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	263747.236*
Resíduo	16	15298.381

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 23. Resumo da análise de variância para a taxa de transmissão ao oxigênio dos nanocompósitos comparando-se os tratamentos entre si.

Fontes de Variação	GL	QM
MMT	2	274256.787*
Prata	1	432345.846*
MMT*Prata	2	345008.545*
Resíduo	12	19756.139

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 24. Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para *E. coli* comparando-se os nanocompósitos ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	1.53*
Resíduo	16	0.007

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 25. Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para *E. coli* comparando-se os tratamentos entre si.

Fontes de Variação	GL	QM
MMT	2	0.0204 ^{n.s.}
Prata	1	8.2012*
MMT*Prata	2	0.0204 ^{n.s.}
Resíduo	12	0.0061

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 26. Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para *S. entérica* comparando-se os nanocompósitos ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	1.2310*
Resíduo	16	0.0042

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 27. Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para *S. enterica* comparando-se os tratamentos entre si.

Fontes de Variação	GL	QM
MMT	2	0.0050 ^{n.s.}
Prata	1	6.1250 *
MMT*Prata	2	0.0050 ^{n.s.}
Resíduo	12	0.0050

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 28. Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para *S. aureus* comparando-se os nanocompósitos ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	7	1.240 *
Resíduo	16	0.0027

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 29. Resumo da análise de variância para o diâmetro médio dos halos de inibição para *S. aureus* comparando-se os tratamentos entre si.

Fontes de Variação	GL	QM
MMT	2	0.0116 ^{n.s.}
Prata	1	6.480*
MMT*Prata	2	0.0116 ^{n.s.}
Resíduo	12	0.0036

* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 30. Resumo da análise de variância para curva de crescimento de *S. enterica* na presença dos diferentes nanocompósitos em comparação ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	8	0.0623 ^{n.s}
Resíduo	18	0.0896

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 31. Resumo da análise de variância para curva de crescimento de *L. innocua* na presença dos diferentes nanocompósitos em comparação ao filme controle.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamentos	8	0.0110 ^{n.s}
Resíduo	18	0.0176

^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.