

MIRIANE MARIA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO A BASE DE  
METIL CELULOSE INCORPORADO COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E  
NISINA**

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  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Sousa, Miriane Maria de, 1986-  
S725d            Desenvolvimento e caracterização de filme ativo a base de  
2015            metil celulose incorporado com nanopartículas de quitosana e  
                 nisina / Miriane Maria de Sousa. – Viçosa, MG, 2015.  
                 xvi, 99f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.85-99.

1. Alimentos - Embalagem. 2. Filmes plásticos.  
3. Nanotecnologia. 4. Materiais nanoestruturados. 5. Nisina.  
6. Quitosana. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.09

MIRIANE MARIA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME ATIVO A BASE DE  
METIL CELULOSE INCORPORADO COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E  
NISINA**

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: 23 de fevereiro de 2015.

---

Nélio José de Andrade  
(Coorientador)

---

Eber Antonio Alves Medeiros

---

Nilda de Fátima Ferreira Soares  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por permitir que eu chegasse até este momento, pois sem Ele este trabalho não seria possível.

Aos meus pais, Laene e Francisco, pelo amor, incentivo, sacrifício para tornar tudo possível, por todo apoio e fé.

Aos meus irmãos Sonaire e Laenderpela amizade, incentivo, paciência em me ouvir e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu Marido, Robson, pelo amor, compreensão e por estar sempre ao meu lado, me ensinando sempre a levantar.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, ensinamentos e orientação.

À Professora Jane Sélia dos Reis Coimbra pela co-orientação e apoio.

Ao Professor Nélio José de Andrade pela co-orientação e apoio.

Ao Dr. Eber Antonio Alves Medeiros pela amizade, ensinamentos, conselhos, apoio e preciosa participação como membro da banca.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica.

Aos colegas do Laboratório de Embalagens, pela contribuição, convívio e aprendizado.

À Mariana Lamas por sua amizade, companheirismo, conselhos, ensinamentos, grande ajuda e por toda paciência em me ouvir e por estar sempre presente em minha vida.

Aos estagiários Maria Adelaide e Gabriel, por toda ajuda, pois não mediram esforços para a realização deste trabalho, e a todos os estagiários e bolsistas que contribuíram.

Ao Cícero, pelos ensinamentos e sua grande contribuição nas análises.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela convivência, aprendizado e apoio.

Ao funcionário do Laboratório de Embalagens, Fernando Antônio Rodrigues, pela contribuição e amizade.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela grande ajuda com as análises demicroscopia de força atômica.

A todos os meus amigos pelo apoio e incentivo.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigado!

## CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1. Biopolímeros Biodegradáveis.....	3
1.1. Filme de Metil celulose.....	4
2. Embalagem ativa.....	6
2.1. Embalagem antimicrobiana.....	7
3. Nisina.....	8
4. Nanotecnologia.....	12
4.1. Nanocompósitos poliméricos.....	13
5. Quitosana.....	15
5.1. Nanopartícula de quitosana.....	17
CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA.....	21
1. Introdução.....	21
2. Material e Métodos.....	22
2.1. Delineamento experimental.....	22
2.2. Material.....	22
2.3. Síntese da Nanopartícula de Quitosana.....	23
2.3.1. Avaliação da razão de QTS:TPP na formação de nanopartículas.....	23
2.3.2. Avaliação da concentração de quitosana na formação de nanopartículas.....	23
2.3.3. Concentração e determinação do rendimento da nanopartícula selecionada.....	24
2.4. Caracterização das Nanopartículas de Quitosana.....	24

2.4.1. Tamanho médio das nanopartículas, potencial zeta ( $\zeta$ ) e índice de polidispersão .....	24
2.4.2. Microscopia de Força Atômica (MFA).....	25
2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas.....	25
2.5.1. Micro-organismos .....	25
2.5.2. Preparo do inóculo.....	25
2.5.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM).....	26
2.6. Análise estatística.....	26
3. Resultados e Discussão .....	27
3.1. Produção da Nanopartícula de Quitosana .....	27
3.1.1. Avaliação da razão de QT:TPP na formação de nanopartículas .....	27
3.1.2. Avaliação da concentração de quitosana na formação de nanopartículas.....	31
3.1.3. Obtenção de NPs concentradas e determinação do rendimento da nanopartícula selecionada .....	34
3.2. Caracterização da Nanopartícula de Quitosana .....	35
3.2.1. Microscopia de força atômica (MFA) .....	35
3.2.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM).....	37
4. Conclusão.....	38
<b>CAPÍTULO 3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E NISINA.....</b>	
1. Introdução.....	40
2. Material e Métodos .....	41
2.1. Delineamento experimental .....	41
2.2. Material .....	41
2.3. Produção do filme incorporado de nanopartícula de quitosana (Nanocompósito) e nisina.....	41
2.3.1. Produção do filme bionanocompósito .....	42
2.3.2. Produção de filme ativo antimicrobiano .....	42
2.3.3. Produção de filme com nanopartícula de quiosana e nisina .....	42
2.4. Atividade antimicrobiana “in vitro” dos filmes ativos com nisina. ....	42

2.5. Caracterização dos filmes incorporados com nanopartícula de quitosana e nisina .....	43
2.5.1. Espessura .....	43
2.5.2. Propriedades mecânicas .....	43
2.5.3. Determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) ...	44
2.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	44
2.5.5. Microscopia de Força Atômica.....	45
2.5.6. Propriedades ópticas .....	45
2.5.6.1. Transparência.....	45
2.5.6.2. Análise de cor .....	45
2.6. Análise estatística .....	46
3. Resultados e Discussão .....	46
3.1. Filme de Metil celulose incorporado com nanopartícula de quitosana.....	46
3.1.2. Desenvolvimento dos nanocompósitos.....	46
3.1.3. Espessura dos filmes.....	47
3.1.4. Propriedades mecânicas dos filmes .....	47
3.1.5. Taxa de permeabilidade ao vapor de água.....	51
3.1.6. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	54
3.1.7. Microscopia de Força Atômica.....	56
3.1.8. Propriedades ópticas .....	59
3.2. Filme de metil celulose incorporado com nisina .....	60
3.2.1. Desenvolvimento do filme de MC com nisina .....	60
3.2.2. Espessura .....	61
3.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes adicionado com nisina .....	61
3.2.4. Propriedades mecânicas .....	64
3.2.6. Taxa de permeabilidade ao vapor de água.....	67
3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	69
3.2.8. Microscopia de Força Atômica.....	71
3.2.9. Propriedades ópticas .....	73
3.3. Filme de metil celulose incorporado com nanopartícula de quitosana e nisina.....	74
3.3.1. Desenvolvimento do filme .....	74

3.3.1. Espessura .....	75
3.3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes adicionado com NPQ e Nisina .....	75
3.3.3. Propriedades mecânicas e TPVA .....	77
3.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura e Força atômica .....	78
3.3.5. Propriedades ópticas .....	81
4. Conclusão .....	82
CONCLUSÕES GERAIS .....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## LISTA DE TABELAS

1	Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e valor do potencial zeta para as diferentes razões de massa entre QT:TPP.....	28
2	Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e valor do potencial zeta em função do aumento da concentração de quitosana .....	32
3	Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e o valor do potencial zeta antes e após a centrifugação das nanopartículas .....	34
4	Valores médios da CMI e da CBM ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> da NPQ, QT e TPP em $\text{pH}=4,6$ .....	37
5	Rugosidade ( $R_a$ ) dos filmes de MC incorporados com 0%, 1%, 5% e 10% de NPQ. ( $2\times 2\ \mu\text{m}$ ) .....	57
6	Valores médios da análise de colorimetria dos filmes de metil celulose incorporados com NPQ nas concentrações de 0, 1, 5 e 10% nas coordenadas de cor $L^*$ e $b^*$ e valores médios de índice de amarelamento (YI E313) e transmitância dos filmes .....	59
7	Diâmetro médio dos halos de inibição para <i>Listeria</i> e <i>S.aureus</i> .....	61
8	Rugosidade ( $R_a$ ) dos filmes de MC incorporados com 0%, 1%, 5% e 10% de nisina. ( $2\times 2\ \mu\text{m}$ ) .....	72
9	Valores médios das coordenadas cor $L^*$ e $b^*$ e valores médios de índice de amarelamento (YI E313) e transparência dos filmes de metil celulose (MC) incorporados com nisina nas concentrações de 0, 1, 5 e 10% .....	74
10	Diâmetro médio dos halos de inibição para <i>Listeria</i> e <i>S. aureus</i> .....	76
11	Propriedades físico-mecânicas (resistência à tração, alongamento e módulo de elasticidade e TPVA) do filme MC filme de MC incorporados com NPQ a 5%, MC com nisina a 10% e filme de MC com NPQ 5% e NS10% .....	78
12	Valores médios das coordenadas cor $L^*$ e $b^*$ e valores médios de índice de amarelamento (YI E313) e transparência dos filmes de metil celulose (MC), MC incorporado com 5% de NPQ, MC com 10% de NS e MC com 5% de NPQ e 10% de NS .....	80

## LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da metil celulose .....	5
2	Esquema da molécula de nisina .....	9
3	Estrutura primária da quitosana, sendo n, o grau de polimerização .....	15
4	Interação da quitosana com tripolifosfato de sódio .....	18
5	Solução de quitosana a $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A) e suspensão de NPQ (B) formadas após a adição do TPP, razão de massa QT:TPP (3:1) .....	27
6	Suspensão opalescente com nanopartículas aglomeradas e sedimentadas, na razão de massa de QT:TPP em 1:1 .....	27
7	Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de QT:TPP, 2:1 (A), 3:1 (B), 4:1 (C) e 5:1 (D) .....	28
8	Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de QT:TPP (3:1) .....	30
9	Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à concentração de QT ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D) .....	32
10	Distribuição de tamanho das NPs suspensas em água, antes (A) e após centrifugação (B) .....	34
11	NPQ dispersas em água, em concentração de 1% (m/v) após centrifugação e agitação ultrassônica .....	35
12	Topografia (2D) das NPs de QT com diâmetro variando de 40 a 80 nm .....	35
13	Topografia (3D) da NP de QT NPs de QT com altura até 30 nm .....	36
14	Filmes de MC (A), MC incorporado com NPQ: 1% (B), 5% (C) e 10% (D) .....	47
15	Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na resistência a tração (MPa) de filme de MC, por análise e regressão com a equação ajustada .....	48
16	Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no alongamento (%) de filme de MC por análise e regressão com a equação ajustada .....	49
17	Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no módulo de elasticidade de filme de MC por análise de regressão com a equação ajustada .....	50
18	Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na TPVA de filme de MC por análise de regressão com a equação ajustada .....	52

19	Filmes de MC incorporados com NPQ: 0% (A); 1% (B); 5% (C) e 10% (D) (superfície) e 0% (E); 1% (F); 5% (G) e 10% (H) (corte transversal) (1000 X)....	55
20	Topografia em 2D dos filmes: MC (A), e filmes de MC adicionado de 1%(B), 5%(C) e 10% (D) de NPQ. (10 x 10 µm) .....	56
21	Fotomicrografias em 3D dos filmes obtidas por MFA: filme de MC (A), e filmes de MC incorporados com 1% (B), 5% (C) e 10% (D) de NPQ. (2 x 2 µm).....	57
22	Fotomicrografias em 2D do filme incorporado com 10% de NPQ. (2µm x 2 µm)	58
23	Filmes produzidos, MC (A), MC incorporado com 1% (B), 5 (C) e 10% (D) de NS .....	60
24	Halos de inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> pelos filmes de MC (A) e MC incorporados com 1% (B), 5% (C) e 10% (D) de nisina. ....	62
25	Halos de inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> pelos filmes de MC (A) e MC incorporado com 1% (B), 5% (C) e 10% (D) de nisina .....	62
26	Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na resistência mecânica de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada	64
27	Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no alongamento de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada .....	65
28	Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no módulo e elasticidade de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada .....	65
29	Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na TPVA de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada .....	67
30	Filmes de MC incorporados com nisina: 0% (A); 1% (B); 5% (C) e 10% (D) (superfície) e 0% (E); 1% (F); 5% (G) e 10% (H) (corte transversal) (1000 X) ..	70
31	Fotomicrografias em 2D dos filme de MC incorporados com 0%,1%, 5% e 10% de nisina.(10 x 10 µm) .....	71
32	Fotomicrografias em 3D do filme de MC (A) e filmes de MC adicionado de nisina a 10% (B) (2 x 2 µm) .....	72
33	Filmes produzidos: MC (A), MC incorporado com 5% de NPQ (B), MC com 10% de nisina (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de nisina (D).....	75

34	Formação de halos de inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> pelos filmes de MC (A); MC incorporado com 5% de NPQ (B); MC com 10% de nisina (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de nisina (D) .....	76
35	Formação de halos de inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> pelos filmes de MC (A); MC incorporado com 5% de NPQ (B); MC com 10% de nisina (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de nisina (D) .....	77
36	Fotomicrografias do Filmes de MC (A); MC incorporado com 5% de NPQ (B); MC com 10% NS (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de NS (D) (superfície) e filmes de MC (E); MC incorporado com 5% de NPQ (F); MC com 10% NS (G) e MC com 5% de NPQ e 10% de NS (H) (corte transversal). (1000X) .....	79
37	Topografia em 2D dos filmes MC (A), e filme de MC incorporado com 5% de NPQ (B), filme de MC com 10% de NS (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de NS (D) (10 x 10 µm) .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM: American society for testing and materials

CLSI: Clinicallaboratorystandardsinstitute

FDA: Food and drug administration

HPMC: hidroxil propil metil celulose

MC: Metil celulose

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MFA: Microscopia de força atômica

MMT: Montmorillonita

MWM: nanotubo de carbono de múltipla camada

NS: Nisina

NPQ: Nanopartícula de Quitosana

NPQs: Nanopartículas de quitosana

NPs: Nanopartículas

QT: Quitosana

TPP: Tripolifosfato de Sódio

TPVA: taxa de transmissão ao vapor de água

UR: Umidade relativa

IPD: índice de polidispersão

## RESUMO

SOUSA, Miriane Maria de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Desenvolvimento e caracterização de filme ativo a base de metil celulose incorporado com nanopartículas de quitosana e nisina.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Nélio José de Andrade.

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade e com a segurança microbiológica dos alimentos. Desta forma, as embalagens ativas têm atraído muito a atenção das indústrias de alimentos e dos pesquisadores desta área. Aliado à preocupação com qualidade dos alimentos, tem-se preocupado também com a contaminação ambiental, devido ao acúmulo de resíduos não biodegradáveis no meio ambiente. Neste contexto surge o interesse pela produção de embalagens a partir de materiais biodegradáveis e de recursos renováveis. No entanto, o seu uso como embalagem de alimentos ainda é restrito devido ao fato de apresentarem limitações quanto as suas propriedades mecânicas e de barreira e estabilidade térmica. Neste contexto estudos têm demonstrado que novos materiais em tamanho nano tem sido utilizados para produção de filmes nanocompósitos revelando surpreendentes propriedades. Diante disso, objetivou-se desenvolver e caracterizar um nanomaterial a partir da quitosana, nanopartícula de quitosana, para produção de nanocompósito à base de metil celulose e também desenvolver e caracterizar o filme de metil celulose incorporado com nisina e posteriormente avaliar o efeito em conjunto do melhor tratamento obtido pela incorporação de quitosana e nisina nas propriedades mecânicas, barreira ao vapor de água e antimicrobianas *in vitro* do filme de metil celulose. As Nanopartículas produzidas exibiram forma esférica com distribuição de tamanho médio de  $284,7 \pm 24,3$  nm por meio da técnica de DLS e de 40 a 70 nm na análise de MFA, e superfície carregada positivamente com um potencial zeta de valor  $36,3 \pm 3,6$ mV. Os resultados indicaram que a adição de NPQ (5 e 10% m/m) proporcionou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na resistência a tração e no módulo de elasticidade, enquanto diminui o alongamento do filme de MC. Além disso, o aumento da concentração de NPQs (5 e 10%) contribuiu para a redução da permeabilidade ao vapor de água (TPVA) de forma significativa ( $p < 0,05$ ). Os filmes ativos com adição de nisina, apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. No entanto, o aumento

da concentração de nisina (1, 5 e 10% m/m) provocou diminuição na resistência à tração e no módulo de elasticidade de forma significativa ( $p < 0,05$ ), enquanto o alongamento aumentou. O filme de MC adicionado a 10% m/m de nisina provocou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) cerca de 11,9% na TPVA dos filme. O tratamento que melhor contribuiu para o reforço do filme de MC foi o com adição de 5% de NPQ e a adição de 10% de nisina apresentou maior atividade antimicrobiana *in vitro* contra as bactérias avaliadas. No filme de MC produzido com a mistura de nanopartícula de quitosana (10%) e nisina (5%), observou-se que a atividade antimicrobiana *in vitro*, não diferiu do filme de MC com 10% de nisina, e que a propriedade mecânica e a permeabilidade diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do filme de MC com 10% de nisina, apresentando melhoria na resistência a tração e TPVA sugerindo que as NPQs ajudaram no aumento destas propriedades. No entanto, apresentaram propriedades físico-mecânicas inferiores ao MC adicionado de 5% de NPQ e não diferiram do filme de MC. Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que as NPQs apresentaram potencial para produção de bionanocompósitos como uma tecnologia para melhorar as propriedades dos filmes de MC e que o filme nanocompósito ativo produzido com nisina apresenta-se promissor para estender a vida de prateleira e para assegurar a segurança microbiana dos alimentos.

## ABSTRACT

SOUSA, Miriane Maria de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2015. **Development and active film featuring the basis of methyl cellulose embedded with nanoparticles of chitosan and nisin.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-Advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Nélio José de Andrade.

Consumers are increasingly worried concerning the quality and the microbiological safety of food. In this way, the active package has very attracted the attention of food industries and of researchers in this area. Allied to concerns about food quality, there is also concern about environmental contamination due to accumulation of non-biodegradable waste into the environment. In this context it appears interest in the production of packaging materials from biodegradable and renewable resources. However, their use as food packaging is still limited due to limitations in presenting its mechanical and barrier properties and thermal stability. In this context new studies have shown that nano-sized materials have been used for the production of nanocomposite films revealing surprising properties. Therefore, it aimed to develop and to characterize a nanomaterial from the chitosan, chitosan nanoparticle, to produce nanocomposite on the basis of methyl cellulose and also to develop and to characterize methyl cellulose film embedded with nisin and then evaluate the effect together the best treatment obtained by incorporation of chitosan and nisin in mechanical properties, water vapor barrier and antimicrobial in vitro methyl cellulose film. The nanoparticles produced exhibited spherical shape with average size distribution of  $284.7 \pm 24.3$  nm by DLS technique and from 40 to 70 nm on AFM analysis, and positively charged surface with a zeta potential value  $36.3 \pm 3.6$  mV. The results indicated that the addition of NPQ (5 and 10% w/w) provided a significant increase ( $p < 0.05$ ) in tensile strength and modulus, while decreasing elongation MC film. Furthermore, the concentration of NPQs (5 and 10%) contributed to the reduction of permeability to water vapor (WVTR) significantly ( $p < 0.05$ ). The active films with the addition of nisin showed antimicrobial in vitro activity on the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. However, the increasing of the concentration of nisin (1, 5 and 10% w / w) resulted in lower tensile strength and modulus of elasticity significantly ( $p < 0.05$ ), while the elongation increased. The MC film added to 10% w/w of nisin resulted in a significant increase ( $p < 0.05$ ) about 11,9% WVTR of the film. The treatment that best contributed to the

enhancement of the MC film was with addition of 5% of NPQ and the addition of 10% of nisin showed higher in vitro antimicrobial activity against bacteria evaluated. In the MC film produced with the mixture of chitosan nanoparticles (10%) and nisin (5%), it was observed that the in vitro antimicrobial activity did not differ from the MC film with 10% of nisin, and that the mechanical property and permeability differed significantly ( $p < 0.05$ ) from the MC film with 10% of nisin, showing improvement in tensile strength and WVTR suggesting that NPQs helped in increasing in these properties. However, it showed inferior physical and mechanical properties to the film MC added and 5% of NPQ and did not differ from MC film. The results of this study demonstrated that NPQs showed potential for producing bionanocomposites as a technology to improve the properties of the MC film and the active nanocomposite film produced presents promising to extend the shelf life and ensure microbial food safety.

## INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade e segurança alimentar dos alimentos, buscando por produtos nutritivos, mais próximos ao natural, convenientes, com maior vida de prateleira e que não ofereçam riscos à saúde. Desta forma, as embalagens ativas têm atraído muito a atenção das indústrias de alimentos e pesquisadores desta área como uma forma de estender a vida de prateleira e de garantir a segurança dos alimentos (RHIM, 2013).

Dentro do âmbito da conservação de alimentos, a aplicação de peptídeos antimicrobianos de bactérias lácticas em embalagens de alimentos para produção de filmes bioativos tem recebido grande atenção. A nisina tem sido cada vez mais utilizada como “bio-conservante” para incorporação direta em filmes ativos de forma eficaz contribuindo para o aumento da vida de prateleira dos alimentos (KHAN *et al.*, 2015).

Além da preocupação com a qualidade dos alimentos, tem-se preocupado também com as questões ambientais, pois o aumento do uso de embalagens plásticas traz uma série de preocupações quanto à contaminação ambiental, devido ao acúmulo de resíduos. Neste contexto surge o interesse pela produção de embalagens a partir de materiais biodegradáveis e de recursos renováveis. No entanto, o seu uso como embalagem de alimentos ainda é restrito devido às limitações quanto as suas propriedades mecânicas e de barreira e estabilidade térmica.

Hoje em dia, a aplicação da nanotecnologia para filmes biopolímeros podem abrir novas possibilidades para melhorar não só as suas propriedades, mas também a eficiência de custo-preço (CHAUDHRY e CASTLE, 2011). Assim, diferentes nanopartículas têm sido usadas como reforço para a preparação de filmes nanocompósito e tem atraído um interesse significativo como potenciais nanopreenchedores durante a última década (CHAUDHRY e CASTLE, 2011). Devido ao reforço fornecido pelas nanopartículas dispersas na matriz de polímero, os filmes nanocompósitos exibem propriedades mecânicas, físicas, térmicas e ópticas melhoradas acentuadamente, em comparação aos filmes à base de biopolímeros puros (TEIXEIRA, 2010).

Estudos têm revelado que a quitosana, um polímero obtido de fontes naturais renováveis, pode ser produzido em tamanho nano, e desta forma ser incorporado em matrizes poliméricas promovendo melhorias nas propriedades mecânicas, de barreira e térmicas (MOURA *et al.*, 2009).

Até agora, um grande número de estudos têm sido publicados sobre a preparação de filmes nanocompósitos; mas, apenas alguns estudos têm sido realizados sobre a incorporação de nanopartículas de quitosana em biopolímeros. Além disso, nenhuma pesquisa estudou o efeito da incorporação de nanopartícula de quitosana em filme de metil celulose e sua ação com o antimicrobiano, nisina, em filme de metil celulose.

Nesse contexto, objetivou-se com este trabalho desenvolver e caracterizar filme nanocompósito de metil celulose incorporado com nanopartícula de quitosana e nisina.

Para melhorar apresentação e discussão dos resultados obtidos, o trabalho foi dividido em capítulos:

Capítulo 1: Revisão de literatura sobre os principais temas abordados no trabalho;

Capítulo 2: Produção e caracterização de nanopartículas de quitosana;

Capítulo 3: Produção e caracterização de nanocompósito com nanopartícula de quitosana à base de metil celulose e filme ativo antimicrobiano de metil celulose incorporado com nisina.

## CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

### 1. BIOPOLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

As embalagens exercem papel fundamental, na manipulação e comercialização de produtos alimentícios para oferecer os níveis requeridos de qualidade e segurança (LAGARÓN *et al.*, 2005). Elas têm como principais funções proteger os alimentos contra contaminação microbológica, contra danos mecânicos e apresentar informações para comercialização e ao consumidor (ALMEIDA, 2010).

Dentre os materiais utilizados para produção de embalagens, os polímeros apresentam características desejáveis para uma embalagem como transparência, maciez, termossoldabilidade e boa resistência (ALMEIDA, 2010). Os plásticos obtidos a partir de recurso fóssil são amplamente utilizados como embalagens para alimentos, no entanto, nas últimas décadas do século 20, estes polímeros trazem uma série de preocupações quanto à contaminação ambiental, causando riscos à saúde humana e ao meio ambiente (OJIJO e RAY, 2013).

Devido a estas preocupações o interesse crescente pela pesquisa por biopolímeros biodegradáveis têm sido crescente (MAHALIK e NAMBIAR, 2010; IMRE e PUKÁNSZK, 2013; PEELMAN *et al.*, 2013). Estes são materiais produzidos a partir de recursos alternativos, com menor consumo de energia e biodegradável (IMRE e PUKÁNSZK, 2013). Dessa forma eles auxiliam na redução no volume de resíduos no meio ambiente, visto que apresentam rápida degradabilidade biológica, reduzem a quantidade de dióxido de carbono lançado no meio ambiente uma vez que são obtidos a partir de recurso natural, podem ser utilizados como substituto para os polímeros petroquímicos (OJIJO e RAY, 2013).

Os polímeros biodegradáveis são materiais que se degradam completamente ao ataque dos micro-organismos naturais no meio ambiente tais como fungos, bactérias e algas (AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2000). Os micro-organismos, quando em contato com os plásticos biodegradáveis, secretam enzimas que quebram o material em segmentos cada vez menores, facilitando a sua degradação (OJIJO e RAY, 2013).

Pesquisas sobre filmes transparentes renováveis para aplicações em embalagens de alimentos vêm crescendo a cada ano, e grande número de biopolímeros estão sendo desenvolvidos e estudados, como a celulose (metil

celulose, carboximetil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropilmetil celulose, e os ésteres de celulose como o acetato de celulose, propionato acetato de celulose, e butirato acetato de celulose); o amido; a quitosana; o poli-beta-hidroxiacanoatos (PHA) e o poli (ácido láctico) (PLA) (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006; ALMEIDA, 2010; MAHALIK e NAMBIAR, 2010; PEELMAN *et al.*, 2013).

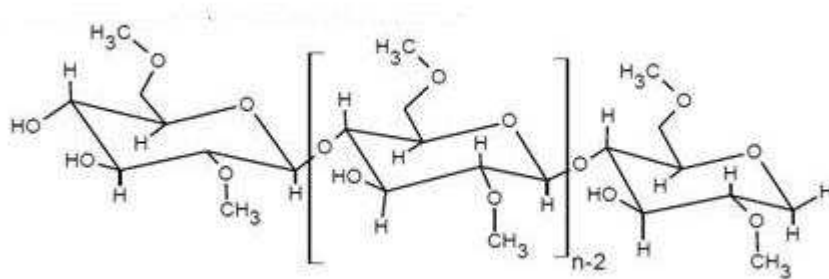
Estes polímeros podem ser utilizados como substituto para os polímeros petroquímicos, sendo esta uma perspectiva interessante, o que fornece uma alternativa a produtos não degradáveis, e aumentos na renda do setor agrícola (SOUZA *et al.*, 2010).

### **1.1.FILME DE METIL CELULOSE**

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza, que ocorre principalmente na parede celular de plantas superiores como um material estrutural (QUIROZ *et al.*, 2013). Ela é formada por unidades repetidas do monômero de moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ , e cada anidroglicose contém três grupos funcionais de hidroxila nos átomos de carbono 2, 3 e 6, apresentando uma cadeia muito regular, rígida e reta, sem qualquer ramificação (JUNQUEIRA, 1997; BAYER e KNARR, 2013).

Devido às fortes e muitas ligações de hidrogênio que se formam entre as cadeias de celulose em fibrilas, a celulose apresenta-se insolúvel em água, no entanto, a modificação da cadeia de celulose por ligação de pequenos substituintes podem resultar na solubilidade em água e propriedades de resposta térmica diferenciadas dando origem aos polímeros derivados da celulose (éteres de celulose) como a metil celulose, a carboximetil celulose e hidroxipropilmetil celulose (PSOMIADOU *et al.*, 1996).

A metil celulose (MC), é o derivado mais simples da celulose, o mais resistente à água e, o menos hidrofílico entre eles. Ela é formada pelo tratamento alcalino da celulose seguido por reação de cloreto de metil, no qual os hidrogênios e os grupos hidroxilas da celulose são parcialmente substituídos por grupos alquila (metil), formando grupos éter metílicos (celulose-O-CH<sub>3</sub>) (Figura 1) (PERESSINI *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2010, LINO, 2012), obtendo um polímero viscoso transparente num meio aquoso (QUIROZ *et al.*, 2013)



**Figura 1:** Estrutura química da metilcelulose  
**Fonte:**Lino, 2012.

A metilcelulose em solução aquosa ocorre o mecanismo de geleificação térmica, na faixa de temperatura de 50°C a 70°C, que são promovidas pelas associações hidrofóbicas intermoleculares entre os grupos metila nas moléculas de MC, ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas não modificados das cadeias de celulose e pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas da celulose e moléculas de água (LINO, 2012).

A metilcelulose vem sendo pesquisada para grande variedade de aplicações, devido ao seu baixo custo e sua capacidade para gelificar a temperaturas elevadas; sendo utilizada em muitas indústrias como alimentícia, médica, cosmética e farmacêutica (LINO, 2012). Tendo aplicação na área de alimentos como espessante, ligante de água e agente de formação de película (DHAR; AKHLAGHI; TAM, 2012).

A metilcelulose (MC), apresenta excelentes propriedades de formação de filmes, sendo um material promissor para a preparação de filmes para alimentos, considerando sua característica biodegradável, não tóxica, biocompatível, hidrofílica, gelificante e propriedades reológicas (RIMDUSIT *et al.*, 2008). Os filmes produzidos com metilcelulose são geralmente inodoro e sem sabor, são flexíveis e de força moderada, transparentes, solúveis em água, e apresentam eficientes barreiras ao oxigênio, dióxido de carbono, lipídeos e aromas, mas com alta permeabilidade ao vapor de água (KROCHTA e MULDER-JOHNSON, 1997, MAMANI, 2009).

Este polímero vem sendo amplamente pesquisado e documentado em várias publicações para produção de filmes para conservação de alimentos. Além de funcionar como barreira protetora, estes filmes têm sido utilizados como veículos de compostos bioativos, tais como agentes antimicrobianos (TUNÇ e

DUMAN, 2011; MAITY *et al.*, 2012; ESPITIA *et al.*, 2013; TAKALA *et al.*, 2013) e antioxidantes (LINO, 2012; NORONHA *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2015). No entanto, este biopolímero tem sua aplicação limitada devido as suas propriedades mecânicas, estabilidade térmica e propriedade de barreira ao vapor de água, que são inferiores quando comparados aos polímeros obtidos a partir de recurso fóssil.

Diante disso, estudos vêm sendo realizados com objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas dos biopolímeros biodegradáveis por meio da mistura de dois ou mais polímeros (PINOTTI *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2009, BODVIK *et al.*, 2010) da adição de agentes plastificantes (DEBEAUFORT e VOILLEY, 1997) e utilização de preenchedores inorgânicos ou nanopartículas (RIMDUSIT *et al.*, 2008; SONG e ZHENG, 2009; TUNÇ e DUMAN, 2010; TUNÇ e DUMAN, 2011; SILVA, 2012).

## **2. EMBALAGEM ATIVA**

Os consumidores estão cada vez mais exigentes, e sua preocupação não se restringe somente a problemas ambientais e de sustentabilidade, mas também a melhoria da qualidade do produto a ser consumido. Nas últimas décadas, conceitos inovadores e uma nova linha de pesquisa para embalagem de alimentos têm sido introduzidos, em resposta às demandas atuais dos consumidores por produtos seguros, com maior vida de prateleira, melhor relação de custo-benefício e conveniência (AHVENAINEN, 2003).

Neste contexto, surgem as embalagens ativas e inteligentes que apresentam novas funções, trazendo benefícios adicionais sem relação às embalagens convencionais, que vão além da função de proteção. As embalagens inteligentes são capazes de monitorar o produto embalado e informar ao consumidor as condições do alimento contido, já as embalagens ativas interagem com o alimento ou com o *headspace* da embalagem, liberando ou absorvendo substâncias dos alimentos (AHVENAINEN, 2003; RESTUCCIA *et al.*, 2010; SADAKA *et al.*, 2014).

As embalagens ativas interagem com o produto alimentício com o objetivo de controlar os mecanismos de deterioração (microbiológica, enzimática, oxidativa e bioquímicos) dos alimentos, modificando de maneira desejável, características sensoriais, nutricionais e de segurança microbiológica, estendendo, assim, sua vida de prateleira e mantendo sua qualidade (SUNG *et al.*, 2013; SADAKA *et al.*, 2014).

As regulamentações 1935/2004/EC e 450/2009/EC da União Européia, definem a embalagem ativa como materiais ativos em contato com os alimentos com capacidade de alterar a composição do alimento ou a atmosférica de seu armazenamento (RESTUCCIA *et al.*, 2010).

As embalagens ativas podem ser classificadas de acordo com suas funções em antimicrobianas, antioxidantes, aromatizantes, sequestradoras (adsorvedoras de etileno, absorvedoras de umidade, oxigênio, odores, dióxido de carbono e luz ultravioleta) e emissoras (oxigênio e etileno) (VERMEIREN *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2009). As técnicas de embalagens ativas têm sido aplicadas em uma variedade de produtos alimentícios, e cada produto tem mecanismos diferentes de deterioração, sendo necessário seu conhecimento para que a embalagem ativa adequada possa ser selecionada (VERMEIREN *et al.*, 1999).

## **2.1. EMBALAGEM ANTIMICROBIANA**

Dentre as alterações que ocorrem no alimento, a microbiológica é uma das principais, uma vez que compromete a vida de prateleira do produto, devido à deterioração microbiana e pode afetar diretamente a saúde do consumidor devido às doenças veiculadas pelos micro-organismos contaminantes dos alimentos podendo causar intoxicações ou infecções aos consumidores (SILVEIRA, 2005). A crescente preocupação dos consumidores com a qualidade microbiológica dos alimentos tem aumentado o interesse pelas embalagens antimicrobianas, sendo esta uma forma promissora de embalagem ativa (SOARES *et al.*, 2009; SADAKA *et al.*, 2014).

Essas embalagens apresentam substâncias antimicrobianas que podem estar incorporados ou imobilizados na matriz da embalagem ou podem estar contidos em sachês que são introduzidos no interior do sistema de embalagem. O sistema embalagem-agente antimicrobiano tem como objetivo reduzir, inibir ou retardar o crescimento de micro-organismos que podem estar presentes nos alimentos acondicionados, visando estender a vida de prateleira do produto e obter produtos mais seguros (SOARES *et al.*, 2009).

Diversos estudos vêm demonstrando a eficiência e a aplicabilidade desse sistema de embalagem, sendo capaz de destruir ou inibir os micro-organismos deterioradores e patogênicos que contaminam a superfície dos alimentos, contribuindo para a melhoria da segurança e extensão da vida útil do alimento

embalado (SOARES *et al.*, 2009; SUNG *et al.*, 2013; RHIM *et al.*, 2013; SADAKA *et al.*, 2014).

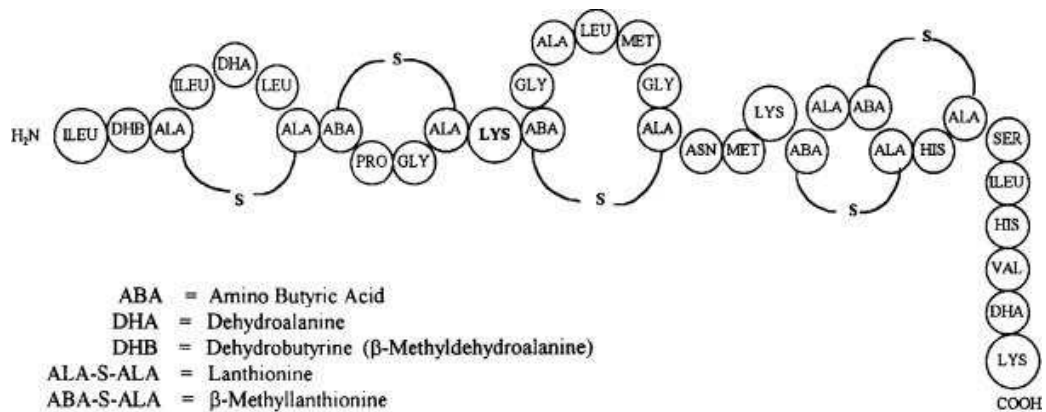
Vários estudos vêm sendo realizados envolvendo o uso de agentes antimicrobianos para produção de embalagem ativa, dentre eles podemos citar os ácidos orgânicos (ácido acético, ácido benzóico e outros), sais de ácidos (sorbato de potássio), enzimas (lisozima, lactoferrina), natamicina, os peptídeos, bacteriocinas (nisina, pediocina, lacticina), óleos essenciais, e o polímero quitosana (SUNG *et al.*, 2013; RHIM *et al.*, 2013; SADAKA *et al.*, 2014).

### **3. NISINA**

O uso de agentes antimicrobianos naturais, como a nisina, representa uma abordagem eficaz para biopreservação de produtos alimentícios devido a preocupações crescentes dos consumidores quanto a adição de aditivos químicos nos alimentos (KHAN *et al.*, 2015).

A nisina é uma bacteriocina que pertence à classe de substâncias antimicrobianas conhecida como lantibióticos (CHA, *et al.*, 2003). A bacteriocina é definida como sendo proteínas biologicamente ativas, ou complexo proteico que tem ação bacteriocida exclusivamente em bactérias gram-positivas. Os lantibióticos são os peptídeos que contêm de 19 a 50 aminoácidos e, geralmente, contêm lantionina, meillantionina, deidrobutirina e deidroalanina em sua estrutura, que sofrem modificação após a síntese para adquirir sua forma ativa. A classe IA dos lantibióticos é composta por peptídeos catiônicos e hidrofóbicos que têm como mecanismo de ação a formação de poros na membrana de bactérias (MELO *et al.*, 2005).

A Nisina é uma proteína de baixa massa molecular (cerca de 3,5 KDa) ou uma bacteriocina produzida por cepas de *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis*, ela é um polipeptídeo, composto por 34 aminoácidos, tendo como aminoácidos terminais a isoleucina e a lisina com NH<sub>2</sub> e COOH, respectivamente (Figura 2) (MELO *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Esquema da molécula de nisina  
**Fonte:** ZHANG *et al.* (2011).

Geralmente, a nisina tem duas variantes A e Z, que diferem em um único resíduo de aminoácido na posição 27, na nisina A é histidina e na nisina Z é a asparagina (MULDERS *et al.*, 1991; ARAUZ *et al.*, 2009, SCHNEIDER *et al.*, 2011). Estas duas nisinas parecem apresentar a mesmas atividades biológicas, no entanto a nisina Z apresenta propriedades de difusão diferentes (MELO *et al.*, 2005).

A estabilidade, a atividade biológica e solubilidade da nisina depende altamente do pH, da temperatura e da natureza do substrato. À medida que o pH aumenta a sua solubilidade diminui. A solubilidade da nisina em pH 2,5 é de 12%, já em pH 5 a solubilidade desce para 4% e em pH neutro ou alcalino é praticamente insolúvel. Sendo portanto pouco solúvel em meio aquoso neutro e moderadamente alcalino e insolúvel em solventes apolares. A sua solubilidade também é influenciada pelo aumento da concentração de fosfato e aumento de proteína no meio (MELO *et al.*, 2005).

Em pH 2,5 a nisina suporta autoclavagem (121°C/15 min), sem sofrer perda de atividade, porém quando, em pH 5 ela perde 40% de sua atividade, e em pH acima de 6,8 a perda é de 90% (MELO *et al.*, 2005). A nisina apresenta carga líquida positiva e ponto isoelétrico em 10,5, devido à alta proporção de aminoácidos básicos (LIU e HANSEN, 1990).

Ela é reconhecida como GRAS (geralmente considerado como seguro) pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o seu uso permitido como aditivo alimentar seguro, em mais de 50

países em todo o mundo, particularmente em produtos lácteos, alimentos enlatados, alimentos de proteína vegetal e carne curada (FDA,1988; TONG *et al.*, 2014).

A atividade antimicrobiana da nisina está, geralmente, limitada a bactérias Gram-positivas (HUQ *et al.*, 2014), sendo altamente ativa contra as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavus* e *Clostridium botulinum* (SEVERINA *et al.*, 1998; HAMPIKYAN, 2009; TONG *et al.*, 2014) uma vez que, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que age como uma barreira de permeabilidade para a célula e impede a nisina de atingir a membrana citoplasmática (HUQ *et al.*, 2014).

As bactérias Gram-negativas apresentam uma camada de lipopolissacarídeo que possui compostos de caráter aniônico, gerando uma superfície hidrofílica, sendo assim a membrana externa repulsa substâncias hidrofóbicas e, macromoléculas, como a nisina. A membrana pode liga-se à molécula da nisina que tem caráter catiônico, formando uma estrutura estável, por interações eletrostáticas, mas mesmo assim, a nisina não conseguiria alcançar a membrana citoplasmática (MELO *et al.*, 2005).

A atividade antibacteriana da nisina é atribuída à sua interação com os lípidos aniônicos na membrana citoplasmática de células bacterianas, resultando numa perturbação da membrana plasmática. Uma vez que a nisina carregada positivamente com partes hidrofóbicas interage eletrostaticamente com o grupos fosfatos da membrana celular, carregados negativamente, promovendo o início da ligação da bacteriocina com a célula alvo. A nisina aumenta a permeabilidade da membrana pela formação de poros, provocando o efluxo do material intracelular, componentes essenciais, adenosina trifosfato (ATP), aminoácidos, íons K<sup>+</sup> conduzindo uma série de alterações que termina em morte celular (BREUKINK *et al.*, 2003).

A nisina vem sendo utilizada em inúmeras aplicações como conservante de alimentos naturais, incluindo os produtos lácteos, alimento sem conserva, saladas e queijo processado e diversos outros alimentos (GYAWALI e IBRAHIM, 2014).

No entanto, tem sido relatado que a atividade antimicrobiana da nisina pode ser rapidamente diminuída quando utilizada diretamente no alimento, devido a sua ligação e interação com componentes alimentares, tais como proteínas, lípidos,

enzimas, o que leva a menor acessibilidade para atingir bactérias (AASEN *et al.*, 2003). A diminuição ou a perda de sua atividade antimicrobiana também pode ocorrer devido à distribuição não uniforme do aditivo no alimento, ou por inibição de enzimas proteolíticas, visto que a nisina é sensível a elas (SUN *et al.*, 2009).

Perda de atividade antimicrobiana também pode ser induzida por digestão com enzimas proteolíticas ou distribuição não uniforme em sistemas de alimentos (SUN *et al.*, 2009). Além disso, com a diminuição da atividade da nisina, as bactérias podem voltar a crescer em produtos alimentares (MANSOUR *et al.*, 1999). Assim, uma quantidade excessiva de nisina é necessária para obter uma inibição antimicrobiana eficaz.

Para superar estes problemas, diferentes estratégias têm sido investigadas para aumentar a estabilidade e eficácia na inibição do crescimento microbiano da nisina. A adição direta de nisina nos filmes e revestimentos tem sido cada vez mais pesquisadas em aplicações de embalagem de alimentos como uma tecnologia de obstáculos para a conservação de alimentos (JI *et al.*, 2014). Antimicrobianos naturais como a nisina vêm provando ser eficazes contra o crescimento microbiano, quando adicionados aos alimentos através de sistemas de embalagem (COMA *et al.*, 2001; MARCOS *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Barbosa *et al.* (2013), eles verificaram que o filme de celulose incorporado com nisina (7500 e 15000 UI) apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* e *Bacillus cereus*. Observaram que o filme ativo foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *L. Monocytogenes* nas mangas minimamente processada a baixo do nível de detecção após 4 dias, e que após seis dias houve redução de seis unidades de log para *S. Aureus*. Concluindo que a nisina apresentou atividade antimicrobiana, em mangas, sem interferir nas características organolépticas do fruto. Este resultado sugere que a nisina poderia potencialmente ser usada em embalagem ativa para melhorar a segurança de mangas minimamente processadas.

#### 4. NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia é uma tecnologia emergente, que constitui um dos principais focos da pesquisa, desenvolvimento, inovação e atividade industrial. Avanços rápidos em nanociência e nanotecnologia nos últimos anos abriram novas perspectivas para o desenvolvimento de novos produtos e aplicações para uma variedade de setores industriais e de consumo (MOURA, 2009).

A nanotecnologia pode ser definida com sendo a fabricação, manipulação e estudo de materiais e estruturas em que pelo menos uma de suas dimensões esteja em tamanho nano, com o objetivo de entender, criar, caracterizar e utilizar materiais, dispositivos e sistemas com novas propriedades derivadas de sua nanoestrutura (MIYAZAKI e ISLAM, 2007).

Devido ao seu tamanho nano, os materiais e estruturas podem apresentar novas e aprimoradas propriedades físicas, químicas e biológicas (MIYAZAKI e ISLAM, 2007), obtendo novas e melhores funcionalidades quando comparado com o material em maior tamanho (BOCCUNI *et al.*, 2008).

Devido ao potencial desta nova tecnologia para proporcionar desenvolvimento de materiais de alto desempenho a nanotecnologia têm, atraído a atenção de pesquisadores, envolvendo aplicações em diferentes áreas do conhecimento, como a química, física, biologia, engenharias, ciência dos materiais, medicina, eletrônica, dentre outras (FERNANDES e FILGUEIRAS, 2008).

Assim como nos outros setores, a nanotecnologia promete revolucionar área de alimentos, entretanto seu atual aproveitamento nos setores de alimentos é relativamente pequeno, pois se trata de uma ciência ainda recente.

Dentre as potenciais aplicações da nanotecnologia na área de alimentos o desenvolvimento de embalagens e materiais de contato com alimentos (nanocompósitos poliméricos) constituem a principal parcela, sendo umas das mais promissoras neste campo de estudo (CHAUDHRY e CASTLE, 2011), que estão rapidamente se tornando uma realidade comercial.

#### 4.1. NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

Compósitos são misturas de polímeros e preenchedores inorgânicos ou orgânicos, separados entre si por uma interface e exibindo propriedades únicas, as quais não são observadas nos componentes individualmente. E os nanocompósitos são definidos como materiais híbridos em que pelo menos um dos componentes tem dimensões nano sendo combinações entre uma matriz e partículas em tamanho nano que atuam como enchimento (TEIXEIRA, 2010). Estes materiais apresentam alguma diferenciação em suas propriedades se comparados com os compósitos tradicionais (PEACOCK *et al.*, 2000).

Nanocompósitos têm sido explorados para o desenvolvimento de biopolímeros e filmes biodegradáveis, materiais que tem o seu uso limitado devido a problemas relacionados ao seu desempenho (baixa barreira a umidade e a gases) baixa resistência mecânica processamento (baixa estabilidade térmica) e custo. 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, visto que, o incremento das propriedades é obtido a concentrações muito baixas dos preenchedores (SORRENTINO *et al.*, 2007). Na tentativa de melhorar e/ou controlar as propriedades físicas e funcionais de biopolímeros e/ou filmes biodegradáveis o emprego de materiais em tamanho nano nas matrizes surge como alternativa do ponto de vista tecnológico (RHIM *et al.*, 2013).

Diversos nanocompósitos têm sido desenvolvidos pela incorporação de cargas (partículas) inorgânicas aos polímeros para melhorar suas propriedades térmicas (aumento da estabilidade térmica), mecânicas (resistência, módulo de elasticidade, estabilidade dimensional), diminuição da permeabilidade a gases e água (PEÓN *et al.*, 2003), e ópticas (MOLY *et al.*, 2006) quando comparado aos polímeros puros ou compósitos convencionais.

As nanocargas são classificadas de acordo com o número de dimensões que ela possui em tamanho nanométrico, como, as isodimensionais ou esféricas no qual todas as dimensões encontram-se em tamanho nanométrica (nanopartículas metálicas, negro de fumo e nanocarga de sílica, nanopartícula de quitosana), fibrosas, que possuem duas dimensões nanométricas (nanocristais de celulose e

nanotubos de carbono) e os grupos lamelares, no qual uma das três dimensões da partícula de reforço é em tamanho nanométrico (grafeno e argila montmorilonita) (AZEVEDO, 2013).

A incorporação das nanocargas ao polímero proporciona características únicas à matriz em função de sua adesão interfacial matriz-reforço, orientação na matriz, seu grau de dispersão, sua morfologia controlada e pequeno volume, por consequência grande área superficial (AZEREDO, 2013).

Estudos têm demonstrado que a aplicação da nanotecnologia a biopolímeros biodegradáveis, como a metil celulose, pode disponibilizar novas possibilidades no melhoramento das propriedades deste material.

No estudo realizado por Rimdusit *et al.* (2008), os filmes de metil celulose incorporado com MMT apresentaram melhoria significativa no módulo de elasticidade, cerca de 65%, aumento na temperatura de transição vítrea (4°C) e diminuição nas propriedades de absorção de umidade (19%).

Além das argilas, MMT, outros materiais nanométricos, podem ser utilizados para proporcionar melhorias as filme de metil celulose como por exemplo, nanocristais de celulose, nanotubos de carbono, sílica e nanopartículas de quitosana.

Estudos apontam que nanopartículas de quitina e quitosana podem ser utilizadas para produção de nanocompósitos atuando como reforço em matrizes poliméricas, proporcionando melhoria nas propriedades mecânicas e de barreira. (LU *et al.*, 2004; SRIUPAYO *et al.*, 2005; MOURA, 2009; CHANG *et al.*, 2010)

Lu *et al.* (2004) desenvolveram filme termoplástico biodegradável de isolado protéico de soja com uma suspensão coloidal de nanopartículas (filamentos de quitina com diâmetro nanométrico) e observaram que os filamentos de quitina contribuíram para o aumento da resistência à tração e do módulo de Young e melhor resistência dos filmes à água, sem contudo afetar a biodegradabilidade do filme.

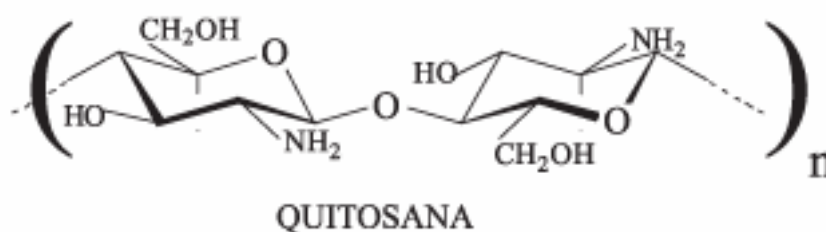
No estudo realizado por Sriupayo *et al.* (2005) filamentos de quitina foram incorporados em filme de quitosana e foi observado que houve melhoria na resistência a tração e resistência à água dos filmes adicionados de filamentos de quitina.

As nanopartículas de quitosana além de apresentarem capacidade de atuar como reforço em matrizes poliméricas, também vem sendo investigada quanto a sua

propriedade antimicrobiana (QUI *et al.*, 2004; NEVES, 2013). No entanto elas têm sido pouco exploradas para aplicação de embalagens e conservação de alimentos.

## 5. QUITOSANA

A quitosana (QS) é um polissacarídeo constituído de unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina unidas por ligações  $\beta$ -1,4, formando uma longa cadeia linear. A quitosana tem importantes grupos funcionais reativos, um grupo amino e dois grupos hidroxilas primário e secundário nas posições dos carbonos C-2, C-3 e C-6 respectivamente (Figura 3), (CHANTARASATAPORN *et al.*, 2014).



**Figura 3:** Estrutura primária da quitosana, sendo n, o grau de polimerização  
**Fonte:** MOURA, 2009.

A quitosana pode ser obtida por meio da hidrólise alcalina (NO *et al.*, 2007) ou hidrólise enzimática dos grupos N-acetil-D-glicosamina (N-desacetilação) da quitina, mas também pode ser encontrada na natureza, como constituinte da parede celular de alguns fungos (NEVES, 2013).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza depois da celulose, encontrada no exoesqueleto de diversos invertebrados, tais como crustáceos, insetos e moluscos, e na parede celular de algumas algas, fungos e leveduras (ARVANITTOYANNIS, 1999).

A quitosana deve ser caracterizada de acordo com suas propriedades intrínsecas como pureza, massa molar, viscosidade e grau de desacetilação, pois conferem a este polímero diversas funções para aplicações em diferentes áreas (NEVES, 2013).

Em soluções aquosas de ácidos diluídos, a quitosana adquire maior número de cargas positivas devido à protonação dos grupos aminos de suas cadeias e passa a exibir o comportamento de um polieletrólito catiônico. Devido a esse

comportamento é possível utilizar a quitosana nas mais diversas formas: como membranas, esferas, microesferas e até mesmo géis (NEVES, 2013). No entanto, esta funcionalidade tem mostrado ser dependente, não apenas da sua estrutura química, mas também do seu tamanho molar, pois muitas das propriedades físico-químicas e funcionais de cadeia polimérica são definidas pela sua massa molar.

A quitosana é uma base fraca insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas diluídas abaixo do seu pKa (6,3), onde as unidades de glucosamina (-NH<sub>2</sub>) podem ser convertidas na sua forma protonada e solúvel (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), tornando o polissacarídeo solúvel na faixa de pH entre 2,0 e 6,0. Para solubilizar o polímero soluções aquosas de ácido acético entre 1 e 3% são utilizadas (NEVES, 2013). A solubilidade da quitosana depende da sua origem biológica, massa molar e grau de acetilação e isso afeta diretamente suas aplicações (GOMES, 2007).

Ela é um polímero biocompatível, biodegradável, obtido de recursos naturais renováveis, além disso, ela tem sido provada ser não-tóxica, e geralmente considerado como seguro (GRAS) pelo FDA nos EUA (2001) (CHANTARASATAPORN *et al.*, 2014). Ela apresenta numerosas aplicações em várias áreas (agricultura, alimentos, biomedicina, odontologia, medicina farmácia e outras), sendo muito explorada na área de embalagens para desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis para conservação de alimentos.

A quitosana tem sido investigada como agente antimicrobiano contra bactérias (DOULABI *et al.*, 2013), e fungos (AVILA- SOSA *et al.*, 2012), e devido a esta propriedade ela tem recebido atenção considerável nos últimos anos (LACETA *et al.*, 2013).

A quitosana pode ser utilizada em várias aplicações para conservação de alimentos, tais como, na adição direta de quitosana no produto, na aplicação direta do filme ou revestimentos comestível no alimento (ELSABEE *et al.*, 2013; LACETA, *et al.*, 2013; KANATT *et al.*, 2014), ou incorporado na embalagem (BIE *et al.*, 2013; ELSABEE e ABDOU, 2013; LOPEZ *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados na tentativa de potencializar as propriedades da quitosana (CHANTARASATAPORN *et al.*, 2014). Neste contexto, modificações tem sido realizadas para melhorar a suas propriedades. O uso da nanotecnologia tem sido uma forma utilizada para obter a quitosana em tamanho nano com propriedades melhoradas (QI *et al.*, 2004; MOURA, 2009; NEVES, 2013).

## 5.1. NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA

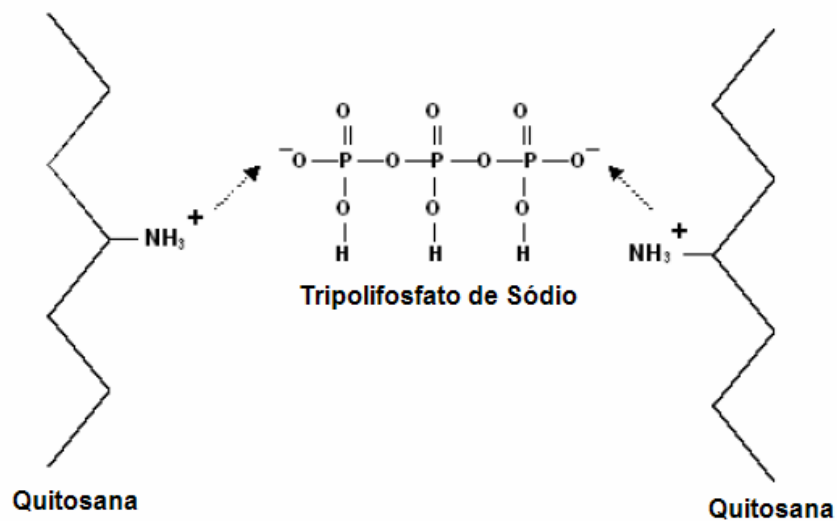
Dentre os materiais poliméricos pesquisados para produção de nanopartículas, a quitosana tem sido explorada, devido às suas propriedades biodegradáveis e não tóxicas (PHAECHAMUD, 2008). A busca pela obtenção de nanopartículas de quitosana com tamanhos menores e propriedades diferenciadas e potencializadas é um ramo em crescimento e merece atenção no campo da nanotecnologia.

Na literatura encontra-se grande variedade de métodos que tem sido desenvolvido para a produção de nanopartícula de quitosana (NPQ), incluindo, gelificação iônica (CALVO *et al.*, 1997; FAN *et al.*, 2012); coservação/precipitação (LOPEZ *et al.*, 2005) emulsão por reticulação (BODNAR *et al.*, 2006); emulsão por coalescência (JIN *et al.*, 2011); formulações que utilizam glutaraldeído (LIU *et al.*, 2005); síntese com carboximetil celulose; síntese com alginato (GUPTA e KARAR, 2011) e polimerização em molde (MOURA, 2009).

Um dos métodos mais utilizado na síntese de NPQ é o de gelificação iônica que tem sido reportado em diversos estudos como em Calvo *et al.* (1997), Qi *et al.* (2004), Gan *et al.* (2005), Tsai *et al.* (2011), Blanco (2011), Fan *et al.* (2012), Fabregas *et al.* (2013), Rampino *et al.* (2013), Neves *et al.* (2014) e Antoniou *et al.* (2015) produzindo NPs em tamanhos diferentes.

Este método é vantajoso em relação aos demais por ser baseado em um princípio simples, barato e não tóxico, em que as NPs são obtidas sob condições de controle amenas, que não utilizam solventes orgânicos e altas temperaturas (FERNADES *et al.*, 2005).

Este método consiste na dissolução da quitosana em ácido, para que ocorra a protonação do grupo amina, em seguida é adicionado a ela gradativamente solução de poliânion, sob agitação constante à temperatura ambiente. As NPs são formadas imediatamente após a mistura das duas fases através de ligações intermoleculares e intramoleculares formadas entre o poliânion e os grupos amino da quitosana (NEVES, 2013). O poliânion mais utilizado é o tripolifosfato de sódio ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) (TPP), que possui baixa toxicidade, baixo custo e não apresenta graves restrições de manuseio e armazenamento (AJUN *et al.*, 2009) (Figura 4).



**Figura 4:** Interação da quitosana com tripolifosfato de sódio  
**Fonte:** MOURA, 2009

O tripolifosfato de sódio é derivado do ácido fosfórico e foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) como sendo uma substância GRAS (“geralmente reconhecido como seguro”) que foi aprovado para ser utilizado como aditivo alimentar em diversos alimentos na Europa e nos Estados Unidos da América (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Utilizando o método de gelificação iônica, NPs em diferentes tamanhos e potencial zeta podem ser obtidas variando os parâmetros críticos do processamento como: variação entre a concentração da quitosana e Tripolifosfato de sódio (QT:TPP), pH da solução, tempo gasto na reação, velocidade de agitação e taxa de adição de TPP (FÁBREGAS *et al.*, 2013). Todos estes parâmetros são importantes, pois permitem encontrar os parâmetros ótimos para obter nanopartículas com tamanho e potencial zeta adequados com o propósito de otimizar as propriedades e o campo de aplicação dessas nanopartículas.

A nanopartículas de quitosana vem sendo estudada por vários pesquisadores com aplicação em diferentes áreas, farmacêuticas, biomédicas, odontológicas, alimentícia e agrícola, e descobertas inovadoras na área de nanotecnologia utilizando a quitosana vem crescendo no meio científico.

Na área de alimentos estas, vêm sendo pesquisadas para nanoencapsulamento de compostos bioativos com intuito de obter melhorias como: maior estabilidade, proteção contra oxidação, retenção de ingredientes voláteis,

liberação controlada, melhoria da solubilidade de ingredientes e hidrofóbicos em água. Estudos como encapsulamento de vitaminas de óleo essenciais (WORANUCH e YOKSAN, 2013 (a e b), e de proteínas (CHEN *et al.*, 2006) têm sido realizados.

E na área de embalagens as NPQ têm sido estudadas para formação de nanocompósitos como agente de reforço, conforme já relatado no item 3.2.1 (Nanocompósitos Poliméricos) desta revisão.

De acordo com os estudos, as nanopartículas de quitosana tem revelado maior potencial antimicrobiano em relação a quitosana, que tem sido explicado pelas NPs apresentarem maior área superficial do que a QT, que devido ao seu tamanho reduzido pode interagir com a superfície da célula bacteriana carregada negativamente de forma mais eficaz, podendo ser fortemente adsorvida na superfície da parede celular, e, por conseguinte, este irá romper a membrana celular e destruir as bactérias (QI *et al.*, 2004; ING *et al.*, 2012).

Na literatura, encontram-se trabalhos a respeito da produção de nanopartículas de quitosana, e sua atividade antimicrobiana e sua aplicação em algumas matrizes poliméricas. No entanto, ainda não existem trabalhos sobre a incorporação de nanopartícula de quitosana em filme de metil celulose.

## **CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA**

### **1. INTRODUÇÃO**

As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas a partir de polímeros sintéticos, semisintéticos ou naturais (SCRAMIN *et al.*, 2013). Dentre os materiais naturais pesquisados para produção de nanopartículas, a quitosana, vem sendo muito utilizada, visto que ela apresenta propriedades muito interessantes, tais como, o baixo custo, a origem natural, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, a baixa toxicidade e a alergenicidade, as propriedades cicatrizantes, as atividades antimicrobiana e antifúngica, a capacidade de regeneração de tecidos e também a facilidade de formação de filmes (SCRAMIN *et al.*, 2013).

Descobertas inovadoras na área de nanotecnologia utilizando a quitosana vêm crescendo no meio científico. Existem vários métodos de síntese de NPQ encontrados na literatura. No entanto, o método de gelificação iônica vem sendo descrito como um dos mais utilizados e preferidos (CALVO *et al.*, 1997; ANTONIOU *et al.*, 2015), pois este método é baseado em um princípio simples, barato e não tóxico, em que as NPs são obtidas sob condições de controle amenas, que não utilizam solventes orgânicos e altas temperaturas (LOPEZ *et al.*, 2005; FERNADES *et al.*, 2005; NEVES, 2013).

Nanopartículas de quitosana podem ser produzidas com base na gelificação iônica como resultado de ligações intermoleculares e intramoleculares formadas entre os grupos amino da quitosana (carregados positivamente) e poliânions polivalentes (carregados negativamente) (NEVES, 2013). O tripolifosfato de sódio (TPP) é o poliânion mais utilizado porque ele não é tóxico e forma géis com propriedades desejáveis (AJUN *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2009).

Apesar do método de gelificação iônica, ser relativamente simples, o controle do processo para a produção sistemática, com reprodutibilidade para obter nanopartículas com menor distribuição de tamanho, menor índice de polidispersão, e que, ainda, apresente um bom rendimento é uma prática difícil, devido ao grande número de fatores que influenciam no processo de produção (ABDEL-HAFEZ *et al.*, 2014).

Diferentes tamanhos de nanopartículas podem ser obtidos devido ao controle das variáveis do processo tais como: o peso molecular, a concentração e o grau de desacetilação da quitosana; a razão de massa entre quitosana para TPP; o pH da solução, a temperatura da solução, os métodos de misturas, a velocidade de agitação e o uso de técnica de ultrassom. Diversos estudos relatam a influência destes fatores no tamanho, na carga superficial, no índice de polidispersão (PDI) e na morfologia das nanopartículas (NEVES *et al.*, 2014; ANTONIOU *et al.*, 2015).

Estudos vêm demonstrando que nanopartículas de quitosana quando incorporados em filmes promove melhorias notáveis nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira dos mesmos, atuando como agente de reforço (HOSSEINI *et al.*, 2015).

Diante disso, objetivou-se produzir nanopartícula de quitosana destinada a aplicação de filme nanocompósito, alterando parâmetros, como, razão de massa de QT:TPP e a variação de concentração de QT:TPP de forma a produzir nanopartículas com menor distribuição de tamanho e melhor rendimento.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. E foram realizados no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

### **2.2. MATERIAL**

- ✓ Quitosana comercial (QT) indústria Polymar (Fortaleza-Brasil), com massa molar em torno de 75 kDa, grau de desacetilação de 95%, viscosidade de 74,03 cps e grau de pureza de 92% obtido do fabricante.
- ✓ Tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, grau de pureza 85%);
- ✓ Ácido acético glacial (Vetec Química Fina Ltda),
- ✓ Hidróxido de sódio (Vetec Química Fina Ltda).

## **2.3. SÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA**

As nanopartículas foram produzidas pelo método da gelatinização iônica de grupamentos da quitosana (QS) com tripolifosfato de sódio (TPP) de acordo com o procedimento, descrito por Calvo *et al.* (1997) com modificações realizadas conforme Neves *et al.* (2014) e com algumas adaptações.

### **2.3.1. Avaliação da razão de QTS:TPP na formação de nanopartículas**

Primeiramente, solubilizou-se a quitosana em solução de ácido acético a 1% na concentração de  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a solução de quitosana permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 12 h. Em seguida a solução foi filtrada (filtro qualitativo, seguido de filtro quantitativo com poros variando de 7 a  $12 \mu\text{m}$ ) e o pH foi ajustado para 4,5 com NaOH 10 M.

Para obter NPs em diferentes tamanhos nano foram produzidas NPs em diferentes razões de massa QT:TPP, variando o volume de quitosana, a fim de obter variação de massa de 1:1 até 5:1, para avaliar a influência destas proporções sobre a formação da NPs.

Foram lentamente adicionados 10 mL de TPP ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) com auxílio de pipetador automático, a 15 mL de solução de quitosana (esta corresponde à variação de massa de QT: TPP de 3:1) com taxa de adição de 1mL por minuto sob agitação magnética, a 1000 rpm e temperatura ambiente ( $23\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 1 h. As nanopartículas formadas correspondem à zona de suspensão opalescente, que apareceu no sistema após a adição do TPP.

### **2.3.2. Avaliação da concentração de quitosana na formação de nanopartículas**

Utilizando as mesmas condições anteriores, e razão de massa de QT: TPP de 3:1, foram produzidos nanopartículas a partir das concentrações de 2,3, 4 e  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de QT para  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de TPP. Este procedimento foi realizado com a finalidade de produzir NPs de menor tamanho e com melhor rendimento.

### **2.3.3. Concentração e determinação do rendimento da nanopartícula selecionada**

A avaliação do rendimento foi realizada para as NPs selecionadas, que posteriormente foram utilizadas na produção do bionanocompósito. Foram produzidas NPQ a partir de 1 g de quitosana solubilizada em 500 mL de ácido acético a 1%, utilizando o mesmo procedimento anterior, com razão de massa de QT:TPP de (3:1).

As NPs foram separadas por centrifugação a 11000g durante 30 minutos à temperatura de 23-25 °C (NEVES, 2013). O sobrenadante foi descartado e as NPs foram lavadas abundantemente com água deionizada e novamente centrifugadas por mais 1 hora. Após centrifugação os peletes de NPs foram resuspensores em 50 mL de água deionizada e submetida à agitação ultrasônica (200 W, 20 kHz) por 10 minutos em banho de gelo (para evitar o aquecimento das NPs) para promover a desaglomeração das partículas.

A quantificação das NPs foi realizada por gravimetria após secagem das NPs centrifugadas em estufa a 50 °C durante 24 horas (NEVES, 2013). Este procedimento foi realizado com três repetições em duplicata. O rendimento foi determinado conforme equação 1, em função da massa de quitosana inicial.

$$R(\%) = \frac{P_{ca} - P_c}{P_q} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

R: Rendimento em percentagem;

P<sub>ca</sub>: Peso do cadinho com amostra após secagem em gramas;

P<sub>c</sub>: Peso do cadinho em gramas;

P<sub>q</sub>: Peso da quitosana utilizada na síntese em gramas.

## **2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA**

### **2.4.1. Tamanho médio das nanopartículas, potencial zeta (ζ) e índice de polidispersão**

A suspensão de NPs de QT foi diluída (1:5 v/v) em água desionizada quando necessário e analisadas quanto ao seu tamanho médio e distribuição de tamanho e medida de potencial elétrico superficial (potencial zeta) com auxílio de um Zetasizer

(NanoZS, Malvern, UK). As análises foram realizadas a temperatura ambiente de 25 °C, usando ângulo de detecção de 173°. As análises foram realizadas em triplicada (NEVES, 2013).

#### **2.4.2. Microscopia de Força Atômica (MFA)**

A microscopia de força atômica foi utilizada para a determinação do tamanho das NPQ. Uma gota da suspensão de NPQ diluída ( $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi espalhada sobre a superfície de mica, secou-se à temperatura ambiente, e após a evaporação do solvente, a amostra foi analisada por microscopia de força atômica (NT-MDT, modelo NTEGRA PRIMA, Rússia) realizada no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa. Foram realizadas varreduras com áreas de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  e  $2 \times 2 \mu\text{m}$ , com resolução de  $512 \times 512$  pontos. A velocidade de varredura foi entre 1 e 3 linhas por segundo. As medidas foram feitas no modo de contato intermitente, utilizando sonda com raio de curvatura de 10 nm, constante de força de 10 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 280 kHz.

### **2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS**

#### **2.5.1. Micro-organismos**

Culturas puras *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram utilizadas para testar a atividade antimicrobiana *in vitro* das NPQ.

#### **2.5.2. Preparo do inóculo**

Ambos os micro-organismos foram ativados a partir de cepas congeladas, das quais foram retiradas com alça de platina (2X) e colocadas em tubos contendo 5 mL de meio MH (Cado Mueller-Hinton, Difco Laboratories). Após 24 horas de incubação a  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , uma alíquota de cada bactéria foi aplicada, com alça de platina, em placa contendo ágar MH (Ágar Mueller-Hinton, MHA; Difco Laboratories), e incubada novamente por 24 horas. A seguir, uma colônia isolada de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio MH e encaminhada à estufa de incubação durante 24 horas. Após este período, várias colônias de cada uma das cepas foram suspensas em solução salina 0,9%, utilizando-se como padrão a escala de 0,5 de McFarland (concentração

final de aproximadamente  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>). Em seguida, várias diluições foram realizadas até chegar à concentração final de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

### **2.5.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM)**

As análises de CMI e CBM foram realizadas para nanopartículas de quitosana, quitosana e TPP no pH=4,6 sobre os micro-organismos do item 2.5.1. A análise foi realizada por meio do método de microdiluição em caldo conforme padronizado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2003). A CMI foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir a multiplicação visível de cada micro-organismo.

Amostras de  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de NPs em suspensão foram diluídas, a fim de obter suspensões com concentrações variando de 50; 40; 45; 35; 30; 25; 20; 10; 5 e 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O inóculo de cada bactéria, foi adicionado a 100 $\mu\text{L}$  em tubos contendo 5 mL de caldo MH, em seguida 1 mL de cada concentração de NP foi adicionada. Posteriormente, o conjunto foi incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a avaliação visual do teste.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada, tomando-se alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  dos tubos aplicando em placas de Petri com meio de cultura PCA, utilizando-se alça de Drigalski. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$ °C durante 24 horas, e após este período, realizou-se a determinação do número de colônias por placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

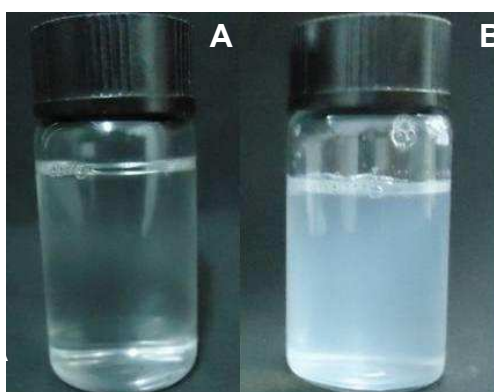
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.4. (SAS). A avaliação da topografia foi realizada por meio de análise descritiva.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. PRODUÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA

##### 3.1.1. Avaliação da razão de QT:TPP na formação de nanopartículas

As nanopartículas de quitosana foram facilmente preparadas mediante a mistura de solução TPP com a solução de quitosana. Após a adição de TPP foi possível observar a formação de nanopartículas devido à zona de suspensão opalescente que apareceu no sistema após a adição do TPP (Figura 5).



**Figura5:** Solução de quitosana a  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (A) e suspensão de NPQ (B) formadas após a adição do TPP, razão de massa QT:TPP (3:1).

Na proporção de 1:1 ocorreu aglomeração rápida e drástica das partículas, (Figura 6). Já na proporção de 2:1 (QT:TPP) observa-se que o tamanho foi significativamente maior do que a de 3:1, e a partir da razão 3:1 houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no tamanho das partículas (Tabela 1, Figura7) .



**Figura 6:** Suspensão opalescente com nanopartículas aglomeradas e sedimentadas, na razão de massa de QT:TPP em 1:1.

Observou-se que entre as proporções de QT:TPP testadas, a de 3:1 foi a que proporcionou, com um nível de significância de 5%, o menor tamanho médio de

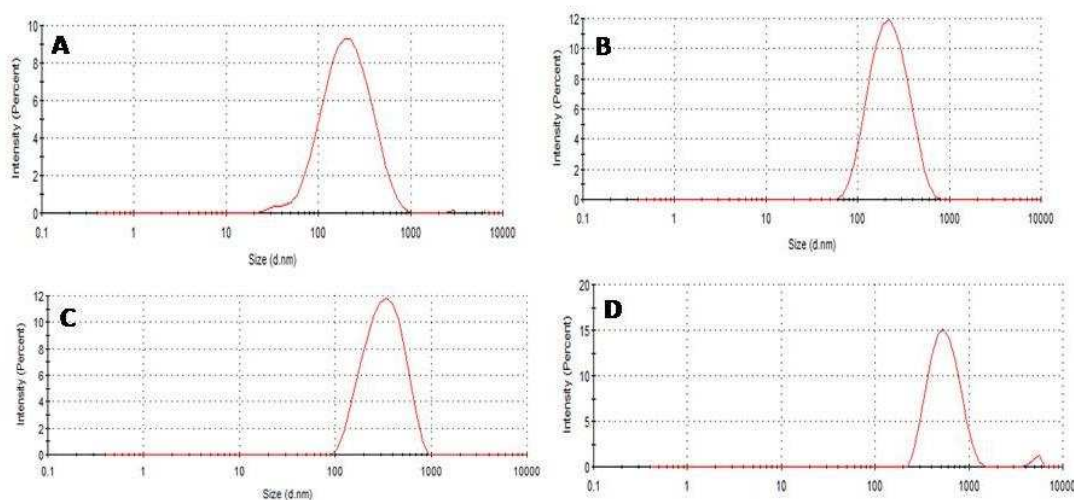
partículas, de 218,9 nm devido ao aumento da densidade de reticulação entre a QT e TPP.

**Tabela 1:** Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e valor do potencial zeta para as diferentes razões de massa entre QT:TPP.

QT:TPP	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
01:01	Formação de agregado	-----	15,0 ± 3,5 e
02:01	262,7 ± 14,6 d	0,302 ± 0,0243 b	21,0 ± 1,2 d
03:01	218,9 ± 9,40 c	0,238 ± 0,0067 c	35,3 ± 1,7 c
04:01	355,3 ± 16,0 b	0,348 ± 0,0485 b	40,6 ± 1,8 b
05:01	453,8 ± 35,0 a	0,479 ± 0,0356 a	43,7 ± 2,0 a

\*Médias de três repetições, letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

A proporção de QT:TPP na razão de 1:1 e 2:1 apresentou maior tamanho médio das NPQ quando comparado com à razão de 3:1 (QT:TPPP), que pode explicado pela maior quantidade de polianiões, TPP, presente na mistura. No sistema com quantidade maior de TPP para QT pode ocorrer mais ligações intermoleculares entre a QT e TPP, responsáveis pela formação das nanopartículas de quitosana, aumentando a capacidade das moléculas de se ligarem formando agregados (razão 1:1) (GAN *et al.*, 2005; RAMPINO, 2013).



**Figura 7:** Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à razão de QT:TPP, 2:1 (A), 3:1 (B), 4:1 (C) e 5:1 (D).

Este dado mostrou-se diretamente relacionado ao potencial zeta da partícula, que apresentou-se menor para as razões de 1:1, indicando que após a reação

houve menor quantidade de grupos aminas disponíveis, devido à neutralização de grupos amino protonados por aniões TPP. Dessa forma a baixa densidade de carga de superfície das partículas já não é capaz de manter a estabilidade destas partículas durante a agitação, resultando no aumento do tamanho das partículas (2:1) e precipitação das partículas (1:1).

A distribuição do tamanho das nanopartículas (Figura 7.B), comprova que a amostra com razão de massa QT:TPP, 3:1, apresentou um único pico mostrando que as estruturas tinham, em sua maioria, tamanho homogêneo. A uniformidade no diâmetro da maior parte das nanopartículas também se confirma pelo baixo índice de polidispersão (0,238), pois de acordo com Zhang e Kosaraju (2007), dispersões com índice de polidispersão (IPD) abaixo de 0,3 indicaram alta homogeneidade no tamanho das partículas presentes no meio. Enquanto as demais proporções estudadas, apesar de apresentarem um único pico, obtiveram maior valor médio de IPD, acima de 0,3.

O aumento nos valores de tamanhos obtidos com as formulações nas razões de 4:1 e 5:1, e está relacionado com a maior quantidade de quitosana presente no meio, formando nanopartículas com dimensões maiores e heterogêneas, pode ser observado na Tabela 1, que apresenta valores de IPD maiores que 0,3 para estas formulações. Acima da proporção de, 3:1, partículas grandes foram formadas, provavelmente devido à eficiência de reticulação das interações TPP com a QT, onde as moléculas de QT já estariam quase totalmente reticuladas, e o excesso de QT levaria a maior quantidade de QT envolvida em uma única partícula.

Os tamanhos médios das nanopartículas diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ), mostrando que a quantidade de quitosana presente no meio, influencia na distribuição do tamanho destas partículas.

Observou-se, ainda, que com o aumento da razão de massa QT:TPP, ocorreu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do valor do potencial zeta. Isto já era esperado uma vez que a formação das NPQ ocorre por meio da interação entre os grupos  $-NH_3^+$  protonados da quitosana e os fosfatos do TPP, portanto, quanto maior a quantidade de quitosana no meio, mais grupos  $-NH_3^+$  estão disponível no meio e maior é o potencial zeta da amostra (NEVES, 2013).

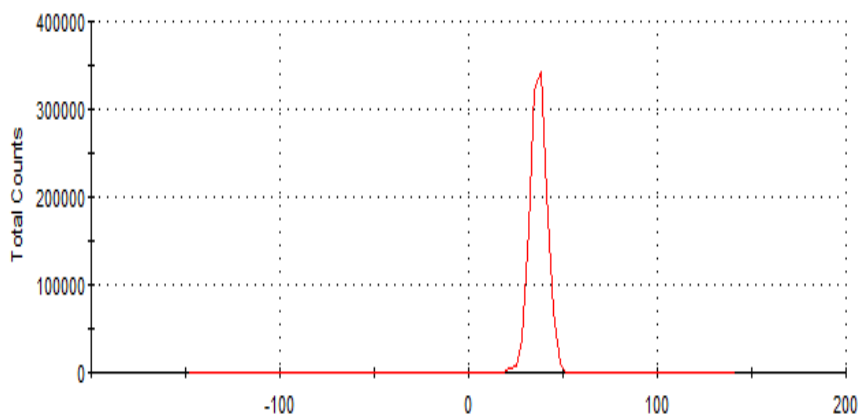
O potencial zeta é importante para a estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das

colisões ocasionais de NPs adjacentes. De acordo com Schaffazick *et al.* (2006), com potencial zeta acima de 20 mV, as partículas tendem estar mais estáveis. Segundo Müller *et al.* (2001), geralmente, um potencial zeta de 30 mV é requerido como o mínimo necessário para que uma nanosuspensão seja fisicamente estável e estabilizada por suas repulsões eletrostáticas.

Pela análise de potencial zeta, verificou-se que as NPQ têm carga superficial positiva, devido às características catiônicas das cadeias de quitosana (LOREVICEL *et al.*, 2012), que está relacionado com o valor do pH (ácido) da solução, próximo a 4,6 neste estudo.

O menor tamanho médio de NPs obtido foi de 218,9 nm, e o seu potencial zeta correspondente foi de +35,3 mV (Figura 8) o que indica que as NPs produzidas apresentaram estabilidade promovidas pela repulsão eletrostática entre as partículas.

Gan *et al.* (2005) avaliaram o tamanho de nanopartículas em função da razão de QT:TPP variando de 3:1 a 7:1, e verificaram que tanto o tamanho quanto o potencial zeta das partículas aumentaram linearmente com o acréscimo na quantidade de quitosana.



**Figura 8:** Distribuição do potencial zeta das nanopartículas referente à razão de QT:TPP (3:1)

Neves *et al.*(2014) também avaliaram diferentes razões de QT:TPP para a formação de nanopartículas, variando de 2:1 até 6:1, e demonstraram que quanto maior a concentração de quitosana no meio, maior é o tamanho e o potencial zeta das partículas formadas. Com estas diferentes proporções, os autores obtiveram

partículas com tamanho médio variando entre 99,9 a 508,1 nm e potencial zeta de 21,7 a 57,3 mV.

Grenha *et al.* (2005) também testaram diferentes razões de QT:TPP para a formação de nanopartículas, variando de 3,6:1 até 6:1, e demonstraram que quanto maior a quantidade de quitosana no meio, maior é o tamanho e o potencial zeta das partículas formadas. Com estas diferentes proporções, os autores obtiveram partículas com tamanho médio variando entre 300 e 390 nm e potencial zeta de 34 a 45 mV.

Na literatura encontra-se diversos estudos referente à produção de nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica e diferentes valores de distribuição de tamanho são relatados. Moura *et al.* (2009) produziram NPQ com variação de tamanho de 85 e 221nm, Chang *et al.*, (2010) com valores variando de 50 a 100 nm, Hosseini *et al.* (2015) produziram NPs com diâmetro médio de  $259 \pm 17,9$ nm.

Esta diferença de resultados encontrados entre os autores está relacionada às características da quitosana utilizada para a síntese (massa molar, grau de desacetilação, viscosidade) e com os parâmetros de controle do processo de síntese.

A variação na proporção entre os reagentes QT:TPP foi importante para definir as proporções ideais para a formação das NPQ. Quando a quantidade de QT era mais baixa obtiveram-se agregados instantâneos e com aumento da quantidade de QT, também houve o aumento do tamanho das partículas. Este fenômeno pode ser explicado pela modificação da carga de superfície das partículas, influenciada pela quantidade de quitosana e agente reticulador no sistema. Portanto a proporção ideal utilizada para seguir os estudos foi de 3:1.

### **3.1.2. Avaliação da concentração de quitosana na formação de nanopartículas**

Nesta etapa a concentração de TPP foi mantida constante e variou-se concentração de QT com intuito de obter diferentes tamanhos de NPQs, a partir de uma concentração maior de quitosana, mantendo o tamanho, com maior rendimento.

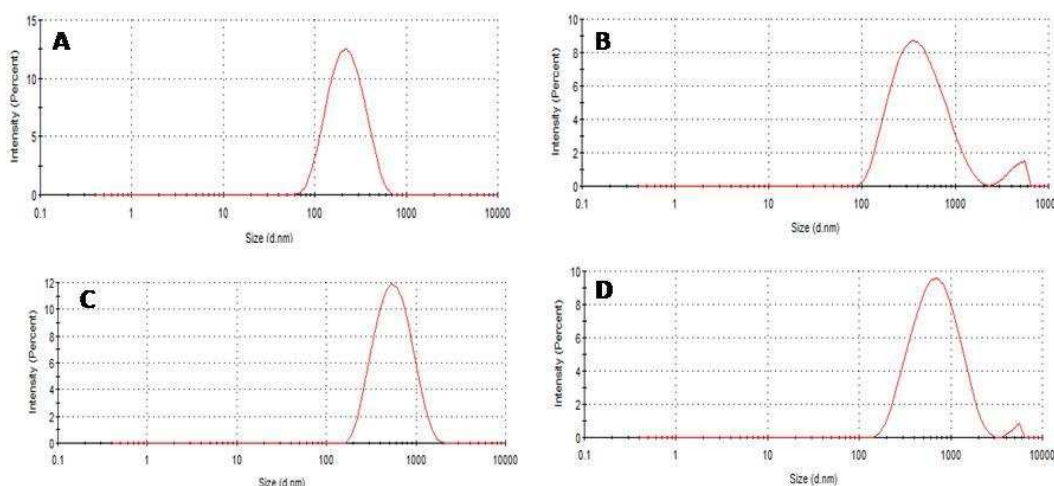
Foi possível observar que a distribuição de tamanho médio das NPQs aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ), com o aumento da concentração de QT no

meio (Tabela 2, Figura 9). Isto ocorre devido ao aumento da viscosidade da solução de quitosana que dificultou as interações entre os precursores das NPQs, permitindo, assim, a formação de partículas maiores, as quais não necessitam de alta energia favorável a formação (MOURA *et al.*, 2009).

**Tabela 2:** Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e valor do potencial zeta em função do aumento da concentração de quitosana.

Concentração de QT (mg.mL <sup>-1</sup> )	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
2	218,8 ± 9,40 d	0,238 ± 0,0255 c	35,3 ± 1,7 c
3	461,0 ± 23,7 c	0,462 ± 0,0330 b	38,2 ± 0,7 bc
4	557,3 ± 64,9 b	0,517 ± 0,0575 b	40,3 ± 3,5 b
5	673,2 ± 53,6 a	0,721 ± 0,1190 a	44,1 ± 2,4 a

\*Médias de três repetições. Letras iguais em uma mesma coluna não diferem entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura.9:** Distribuição de tamanho das nanopartículas de quitosana referente à concentração de QT (mg.mL<sup>-1</sup>), 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D).

Em condições ácidas, ocorre a protonação dos grupos amina da molécula de quitosana, que provoca repulsão eletrostática entre as moléculas. Além disso, também existem ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana. Abaixo de certa concentração de quitosano as ligações de hidrogênio, as ligações intermoleculares e a repulsão eletrostática estão em equilíbrio, sendo possível a formação de NPs de menor tamanho. No entanto, com o aumento da concentração de QT as moléculas se aproximam uma das outras, conduzindo a um aumento das interações entre as moléculas de quitosana, produzindo NPs maiores devido às

fortes ligações de hidrogénio que conduzem a uma quantidade alta de moléculas de quitosana envolvida na reticulação de uma única partícula. (FAN *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013).

O potencial zeta também aumentou com o aumento do tamanho das NPQs, já que o tamanho está relacionado à concentração de QT. Um aumento da concentração de QT aumenta a quantidade de íons  $\text{NH}^{3+}$  disponíveis, aumentando também o potencial zeta da superfície das NPQs (LOREVICE *et al.*, 2012) (Tabela 2)

O índice de polidispersão também aumentou com o aumento da concentração de quitosana, demonstrando que concentrações de QT acima de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  apresentam baixa homogeneidade no tamanho das partículas presentes no meio, uma vez que os valores de IPD encontrados foram maiores que 0,3 (Tabela 2).

O mesmo comportamento encontrado no presente trabalho, foi observado em vários estudos (NASTI *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012; LI *et al.* 2012.,NEVES *et al.*, 2014), porém cada autor obteve uma variação nos valores de distribuição de tamanho, de IPD e de potencial zeta, que está relacionado à matéria-prima (massa molar, grau de desacetilação, grau de pureza e viscosidade) e às condições utilizadas por cada autor: pH, temperatura, concentração e tipo de ácido utilizado para solubilizar a QT, velocidade e tempo de agitação, taxa de adição de TPP, equipamento utilizado para a agitação, agitador magnético, agitador ultrassônico, sendo necessário para cada estudo, definir os padrões e parâmetros da síntese das NPs.

No estudo realizado por Li *et al.* (2012) os tamanhos das partículas de QT variou de 180nm a 360nm, quando se aumentou a concentração de quitosana obteve-se NPs com maior tamanho. Resultados semelhantes também foram relatados por Hu *et al.* (2008) que mostraram que o tamanho das partículas aumentou linearmente com o aumento da concentração de quitosana, atribuindo este comportamento ao aumento da viscosidade da solução de QT com aumento da concentração que influencia na distância entre partícula-partícula.

Portanto, os resultados indicaram que a formação de NPQ está diretamente relacionada à concentração de quitosana no meio, e que concentrações acima de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  não são indicadas para a produção de NPs nas condições utilizadas neste trabalho. A concentração de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de QT foi a que apresentou menor

distribuição de tamanho, sendo esta formulação selecionada para os estudos posteriores.

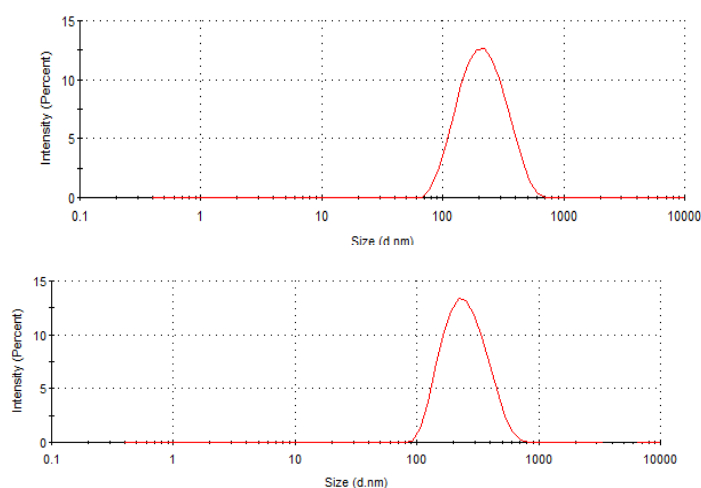
### 3.1.3. Obtenção de NPs concentradas e determinação do rendimento da nanopartícula selecionada

Após centrifugação as nanopartículas apresentaram distribuição de tamanho médio 284,7 nm. Apesar de este valor estar acima dos valores encontrados antes da centrifugação, a distribuição ainda se encontram na mesma faixa de variação, e o valor do índice de polidispersão e potencial zeta apresentaram praticamente o mesmo valor. As amostras em suspensão apresentaram-se monodispersas e distribuição homogênea, justificado pelo baixo valor de IPD (<0,300) (Tabela 3 e Figura 10).

**Tabela 3:** Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e o valor do potencial zeta antes e após a centrifugação das nanopartículas.

Centrifugação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
<b>Antes</b>	218,8 ± 9,40 b	0,238 ± 0,0255 a	35,3 ± 1,7 a
<b>Após</b>	284,7 ± 24,3 a	0,284 ± 0,0540 a	36,3 ± 3,6 a

\*Médias de três repetições, letras iguais em uma mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 10:** Distribuição de tamanho das NPs suspensas em água, antes (A) e após centrifugação (B).

O processo de produção selecionado gerou rendimento de  $49,8 \pm 0,32\%$  de NPs produzidas em função da quantidade de quitosana inicial utilizada para a síntese (1g). A partir disso foi possível produzir suspensões concentradas de NPs de quitosana a 1% (m/m) com tamanho médio de  $284,3 \pm 24,3$  nm e valor de potencial

zeta de  $36,3 \pm 3,6\text{mV}$  que foram caracterizadas e adicionadas ao filme de metil celulose para produção de nanocompósitos (Figura 11).

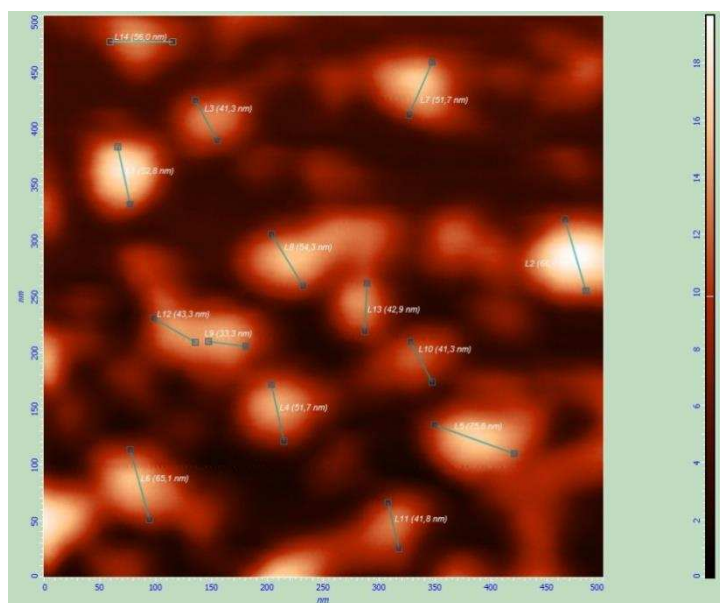


**Figura 11:** NPQ dispersas em água, em concentração de 1% (m/v) após centrifugação e agitação ultrassônica.

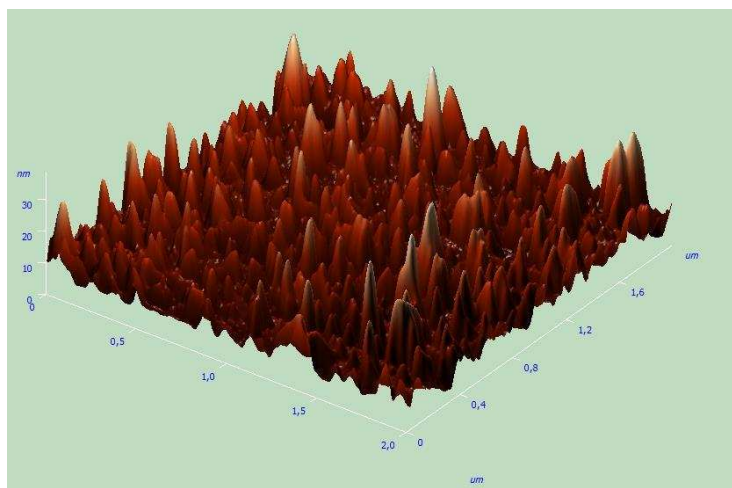
## 3.2. CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA

### 3.2.1. Microscopia de força atômica (MFA)

As topografias confirmam a formação de NPs, em tamanho nano, em que as NPQ apresentaram diâmetro em sua maioria em torno de 40 a 80 nm e altura cerca de 20 a 30 nm (Figura 12 e 13).



**Figura 12:** Topografia (2D) das NPs de QT com diâmetro variando de 40 a 80 nm.



**Figura 13:** Topografia (3D) da NP de QT NPs de QT com altura até 30 nm.

A distribuição de tamanho das NPQ obtidos pela técnica de MFA foi relativamente menor do que o obtido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Valor médio  $262,3 \pm 8,6$  nm). Isto está relacionado, principalmente, à diferença nos estados da amostra (YOKSAN *et al.*, 2010), uma vez que a MFA fornece imagens das partícula sem estado seco ,enquanto o DLS fornece o tamanho médio de partícula em solução. O diâmetro calculado da partícula por DLS, contém camadas hidratadas vizinhas às NPs que desaparecem nas partículas secas na medição por MFA. Além disso, a existência de NPs agregadas também contribui para o maior valor no DLS (LI *et al.*, 2012; YOKSAN *et al.*, 2010, HOSSEINI *et al.*, 2015).

Após a evaporação da água em suspensão, as NPs sofrem um processo de murchamento, pois certa quantidade de água é retida pela partícula em suspensão, causando uma diminuição de tamanho em relação ao tamanho normal dessa em solução (MOURA *et al.*, 2009).

De acordo com Li *et al.* (2012) os tamanhos das partículas calculadas apartir de MFA também foram menores do que os de DLS, sendo 20 a 30 nm por MFA e 170 nm por DLS. Wu *et al.* (2005) constataram que os tamanhos das nanopartículas de quitosana (20-80 nm) determinada por TEM foram menores do que aqueles determinados pela DLS (>120nm). Hossini *et al.*, (2015) verificaram que pela MFA as NPs apresentaram tamanho de 20 a 40 nm, enquanto por DLS o tamanho foi de  $259 \pm 17.9$  nm. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com o comportamento identificado por outros autores.

Quanto à morfologia, a imagem indica que as nanopartículas apresentam forma e estrutura esférica (Figura 12), corroborando com os estudos realizados por Moura *et al.* (2009), Hosseini *et al.*(2015), Li *et al.* (2012); Blanco *et al.* (2011) nos quais as NPS produzidas também apresentaram forma esférica.

### 3.2.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM)

De acordo com os resultados a quitosana apresentou atividade antimicrobiana e bactericida inferior a NPQ para as duas bactérias testadas. Isto provavelmente ocorreu devido a maior área superficial das nanopartículas e maior afinidade com células bacterianas devido ao seu menor tamanho (Qi *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2010). Observou-se também que o TPP não influenciou na atividade antimicrobiana das NPs visto que o mesmo não apresentou atividade nas concentrações utilizadas (Tabela 4).

**Tabela4:**Valores médios da CMI e da CBM ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* da NPQ, QT e TPP em pH=4,6.

Amostras	S. aureus		E. coli	
	CMI	CBM	CMI	CBM
QT	40	40	45	50
TPP	----	----	----	----
NPQ	25	30	35	35

AS NPs apresentaram diferença entre os valores obtidos de CMI e CBM, que significa que em cada ensaio, foi necessário quantidades diferentes de amostra tanto para inibir o crescimento do micro-organismo quanto para reduzir a contagem bacteriana em 99,9%.

A atividade antimicrobiana da quitosana é um processo complexo que difere entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido às diferentes características de cada superfície celular (CRUZ-ROMERO *et al.*, 2013). Tanto para as NPQ quanto para a quitosana, a ação inibitória e bactericida foi distinta para as duas bactérias, sendo que, a *S. aureus* mostrou-se menos resistente do que a *E. coli*. No caso das NPQ, a concentração de  $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi capaz de inibir a *S. aureus*, enquanto a concentração para a *E. Coli* foi maior. Apesar do espectro de ação da quitosana abranger fungos filamentosos, leveduras e bactérias, este

polímero mostrou-se mais eficaz contra bactérias Gram-positivas (TAVARIA *et al.*; 2013).

Outros autores também demonstraram em seus experimentos que este biopolímero e seus derivados apresentam maior eficiência para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus* (FU *et al.*, 2011; NO *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2002).

Neves, (2013) produziu NPQ, e observou a mesma tendência em seus resultados, onde as NPQ apresentaram atividade antimicrobiana com CMI de 5 mg·mL<sup>-1</sup> para *S.aures* e 26 mg·mL<sup>-1</sup> para a *E.coli* enquanto a quitosana *in natura* não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana nas condições avaliadas. Os resultados obtidos por este autor é inferior aos resultados obtidos no presente trabalho, o que pode estar relacionado com a distribuição de tamanho das NPQs produzidas que foram menores do que 100 nm enquanto que o diâmetro das NPQs aqui encontrados apresentou tamanho médio de 262,3 ± 8,60 nm.

Apesar de apresentarem maior atividade antimicrobiana que a QT, as NPQ produzidas neste trabalho, ainda apresentaram uma atividade com concentração alta, superior aos resultados encontrados na literatura (QUI *et al.*, 2004, BLANCO, 2010; NEVES, 2013), o que inviabiliza o uso destas NPQ produzidas como agente antimicrobiano em embalagens ativas.

#### **4. CONCLUSÃO**

As nanopartículas de quitosana foram produzidas pelo método de gelificação iônica com sucesso. Foi possível verificar que o tamanho médio das partículas e o valor de potencial zeta é fortemente dependente da razão de massa QT:TPP e da concentração de QT e TPP utilizada na síntese. A melhor razão de massa de QT:TPP que proporcionou o menor tamanho do diâmetro das NPQ foi a de 3:1, utilizando concentração de QT a 2 mg·mL<sup>-1</sup>e TPP a 1 mg·mL<sup>-1</sup>, obtendo tamanho médio de 284,7 ± 24,3 nm e valor do potencial zeta com carga positiva de 36,3 ± 3,6 mV.

O rendimento obtido foi 49,8% de NPs produzidas em relação a massa inicial quitosana.

As micrografias de MFA indicaram que as NPs apresentam forma esférica, e tamanho médio variando de 40 a 80 nm e altura cerca de 20 a 30 nm

As nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana superior à atividade da quitosana sobre a *S.aureus* e a *E.coli*.

Devido ao seu tamanho nano as NPQ produzidas apresentam potencial para serem estudadas em diversas áreas de aplicação da quitosana, a fim de potencializar sua funcionalidade.

## **CAPÍTULO 3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E NISINA.**

### **1. INTRODUÇÃO**

Filmes biodegradáveis e revestimentos ativos antimicrobianos têm recebido cada vez mais atenção ao longo das últimas duas décadas devido ao seu potencial para retardar a deterioração microbiana dos alimentos e reduzir o risco de contaminação da superfície dos alimentos por micro-organismos patogênicos e deterioradores (SUNG *et al.*, 2013).

Os consumidores estão cada vez mais exigindo produtos naturais, neste contexto, a utilização de compostos naturais como a nisina, parece ser uma opção atraente. A fim de controlar os micro-organismos indesejáveis nas superfícies de alimentos, agentes antimicrobianos naturais ou sintéticos podem ser incorporados em filmes.

Há uma tendência de substituir plásticos derivados do petróleo por embalagens plásticas obtidas a partir de matéria-prima renovável com impacto ambiental menor. Em embalagens de alimentos, a MC é um material muito promissor para preparação de filmes para alimentos, devido às excelentes propriedades de formação de filmes, ser biodegradável, não tóxica, biocompatível, hidrofílica, gelificante e propriedades reológicas (RIMDUSIT *et al.*, 2008). No entanto, algumas de suas propriedades, ainda são inferiores aos polímeros sintéticos e, neste contexto, a adição de aditivos nos polímeros como nanopartículas contribui para aumentar as propriedades de biopolímeros.

O desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos tem atraído considerável atenção nos últimos anos, como resultado de seu bom desempenho, melhoria nas propriedades mecânicas, barreira, estabilidade térmica e outras.

Alguns estudos revelam que nanopartículas de quitosana têm sido reconhecidas como agentes de enchimento de base biológica para aumentar o desempenho do biopolímero, em termos de propriedades térmicas, mecânica e de barreira (MOURA, 2009; HOSSINI *et al.*, 2015). A quitosana tem sido explorada para produção de nanomateriais, devido às suas propriedades biodegradáveis, não tóxicas, biocompatibilidade, comestibilidade, abundância na natureza e baixo custo (PHAECHAMUD, 2008).

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 de forma a produzir uma embalagem ativa com excelente propriedade antimicrobiana, combinada com segurança ambiental, com propriedades mecânicas, de barreiras, térmicas e ópticas que apresentem competitividade comercial.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

O experimento foi realizado no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, e conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

### **2.2. MATERIAL**

- ✓ Nanopartículas de quitosana sintetizadas
- ✓ Polímero metil celulose (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Glicerol (Labsynth, Brasil);
- ✓ Nisina A ultrapure Nisin ® (Handary S.A, Bélgica).

### **2.3. PRODUÇÃO DO FILME INCORPORADO DE NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA (NANOCOMPÓSITO) E NISINA**

Os filmes foram produzidos pelo método “*casting*”, de acordo com Espitia *et al.* (2013) com algumas modificações. Para preparar a solução filmogênica foram aquecidos 100 mL de água destilada à temperatura  $80 \pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida dissolveu-se 3g de metil celulose na água aquecida, e posteriormente a solução foi submetida à agitação por 30 minutos, e logo após foi adicionado glicerol (10% m/m) em função da massa do polímero e agitou-se por mais 5 minutos.

### **2.3.1. Produção do filme bionanocompósito**

Para a preparação do filme bionanocompósito, as NPs previamente preparadas (CAPÍTULO 2) suspensas em água desionizada foram diluídas em 50 mL de solução para obter NPs com concentração final no filme de 1, 5 e 10% (m/m). Após a diluição as NPs foram submetidas à agitação ultrassônica por 2 minutos (200 W, 20 kHz) e, lentamente adicionadas a solução filmogênica de metilcelulose sob agitação (500 rpm) por 2 horas. Após a agitação, a solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente,  $25 \pm 2$  °C, para remoção de bolhas de ar. A solução filmogênica foi vertida em placas de vidro com bordas, de dimensões 20 x 32 cm, e foram secas por 48 horas em condições ambientais ( $23 \pm 2$ °C e 60 % UR). Após a secagem, os filmes foram retirados das placas, armazenados em sacos de Polietileno-Náilon. Em seguida os filmes foram selados à vácuo até ser utilizados nas análises de caracterização.

### **2.3.2. Produção de filme ativo antimicrobiano**

A nisina em diferentes concentrações (1, 5 e 10% m/m) foi previamente solubilizada em 50 mL de ácido acético (pH=4,6) e, posteriormente foram adicionadas à solução filmogênica de MC, utilizando o mesmo procedimento que o utilizado para as NPQ.

### **2.3.3. Produção de filme com nanopartícula de quiosana e nisina**

O melhor tratamento de filme de MC com NPQ (quanto à capacidade de reforçar o filme) e filme de MC com nisina (quanto à atividade antimicrobiana) foi selecionado e, produziu-se o filme de MC com NPQ e nisina. A nisina foi dispersa na suspensão de NPQ (50 mL) e submetida à agitação ultrassônica por 2 minutos (200 W, 20 kHz) mantendo o mesmo procedimento de preparo.

## **2.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DOS FILMES ATIVOS COM NISINA.**

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes com nisina foi aplicado o método de difusão em ágar sobre os micro-organismos, *Staphylococcus aureus*

(ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) em conformidade com o método desenvolvido pelo clínico e Instituto Laboratory Standards (CLSI 2003), com algumas modificações.

Inóculos de cada micro-organismo foram preparados conforme o Cap. 2, item 2.5.2. As bactérias ( $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>) *S. aureus*, foram inoculadas (100 µL) sobre a superfície da placa contendo ágar MH (Ágar Mueller-Hinton, MHA; Difco Laboratories) e a *Listeria monocytogenes* em placa com meio oxford (Listeria Oxford Medium). Sobre a superfície do ágar inoculado foram colocados discos ( $\varnothing = 1$  cm) dos filmes com nisina com os diferentes tratamentos.

As placas foram incubadas a 7°C por 10 horas e posteriormente incubadas a 35°C $\pm$ 2, por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi determinada através da medição da zona de inibição em torno dos filmes (cm). Todas as amostras foram avaliadas com três repetições em triplicata.

## **2.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA E NISINA**

### **2.5.1. Espessura**

A espessura média dos filmes foi mensurada com auxílio de micrômetro (Mitutoyo, modelo 547-401, Japão). As medidas foram realizadas em dois corpos de prova de cada tratamento em três repetições, realizando-se as medidas em dez pontos aleatórios. As medidas de espessura foram expressas em micrômetros (µm) (CAMILLOTO *et al.*, 2010).

### **2.5.2. Propriedades mecânicas**

Os nanocompósitos produzidos foram submetidos aos testes mecânicos para avaliação da resistência à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo elástico (MPa) de acordo com a norma ASTM D882–09 (ASTM, 2009 a), utilizando a máquina Universal de Testes Mecânicos (modelo 3367, INSTRON Corporation, Norwood, MA, USA). Foram testados cinco corpos de prova de cada tratamento em três repetições em duplicata, com dimensões de 15 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A máquina foi operada com célula de carga de 1kN, velocidade de separação das garras de 50 mm·min<sup>-1</sup> e distância inicial entre as garras de 50 mm.

### 2.5.3. Determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)

A TPVA dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, seguindo a ASTM E 96/ E 96M – 05 (ASTM, 2010) com algumas modificações.

Foram utilizadas cápsulas circulares ( $\varnothing = 82,3$  mm) com paredes impermeáveis, contendo 25 g de cloreto de cálcio anidro (MERCK®) com granulometria entre 600  $\mu\text{m}$  e 2,36 mm. Os filmes foram vedados com parafina na junção filme/cápsula. As cápsulas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio, com o objetivo de manter a umidade relativa em torno de  $75 \pm 2$  % e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. O ganho de massa associando a umidade permeada pelo filme foi avaliado por meio de pesagens diárias até massa constante. A TPVA foi expressa em  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$  e as análises foram realizadas com três repetições em duplicata.

Os dados de ganho de peso (g) e tempo de condicionamento (dias) de cada cápsula foram representados em gráfico e, a partir do intervalo em que os pontos formaram uma reta, foi calculado o coeficiente angular da curva. A taxa de permeabilidade ao vapor de água foi obtida pela divisão do coeficiente angular pela área dos filmes exposta no corpo de prova, de acordo com a equação 2.

$$TPVA = \frac{G}{t \times A} \text{ Equação 2}$$

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ );

G/t = coeficiente angular da reta ( $\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ );

A = área de permeação do corpo de prova ( $\text{m}^2$ ).

### 2.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias da superfície dos filmes foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV / LEO – Modelo 1430VP, Inglaterra) com aumentos de 500 X, 1000 X.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para avaliar os diferentes tipos de estruturas formadas na superfície e no corte transversal (fratura) dos filmes. Foram preparadas amostras de 0,5 cm<sup>2</sup> de cada filme. Em seguida, foram fixadas em *stubs* e cobertas com uma camada de ouro (entre 20 nm e 30 nm) com auxílio de um metalizador Sputter Coater (Balzers - Modelo SCD 010), para aumentar a condutividade da superfície das amostras (CAMILLOTO, 2009).

### **2.5.5. Microscopia de Força Atômica**

A microtopografia da superfície dos diferentes filmes foi realizada no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil e avaliada utilizando-se o Microscópio de Força Atômica (NT-MDT modelo NTEGRA PRIMA).

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 utilizando o modo de contato intermitente com cantilever macio e constante de força 10N·m<sup>-1</sup> e frequência de ressonância de aproximadamente 280 kHz. Para cada tratamento, foram realizadas varreduras com áreas de 10 µm x 10 µm e 2 µm x 2 µm (CAMILLOTO, 2009).

### **2.5.6. Propriedades ópticas**

#### **2.5.6.1. Transparência**

A transparência dos filmes foi medida através do uso de espectrofotômetro UV/VIS (Modelo UV-18000, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) no intervalo de comprimento de onda de 210 nm (região ultravioleta) e 600 nm (região visível). Amostras dos filmes foram cortadas de forma retangular e posicionadas diretamente no suporte para filmes do equipamento. A transparência relativa foi medida pela % de transmitância a 500 nm. O suporte vazio foi utilizado como controle, conforme metodologia proposta por Tang et al. (2005).

#### **2.5.6.2. Análise de cor**

A cor dos filmes foi analisada em colorímetro XE Color Quest Hunter lab (Reston, Virgínia, EUA), em amostras os filmes retangulares de 2,5 cm x 15 mm. As

medições foram realizadas na Escala CIELAB, em que cada medição é expressa como L\* (indicando a luminosidade), e b\* (no sentido negativo ao positivo, azul na direção amarelo). Para cálculo dos parâmetros de cor foi estabelecido o iluminante D-65 e o ângulo de 10° para o observador. Além disso, o índice de amarelamento (YI E313) dos filmes foi obtido de acordo com Espitia *et al.* (2013). Para cada filme, utilizou-se a média de cinco determinações em zonas aleatórias de cada amostra com três repetições.

## **2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para avaliar a eficiência nas propriedades físicas e mecânicas foi utilizada análise de regressão e para as propriedades ópticas as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade.

Para avaliar o efeito em conjunto da NPQ e nisina em filmes de MC, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.4. (SAS)

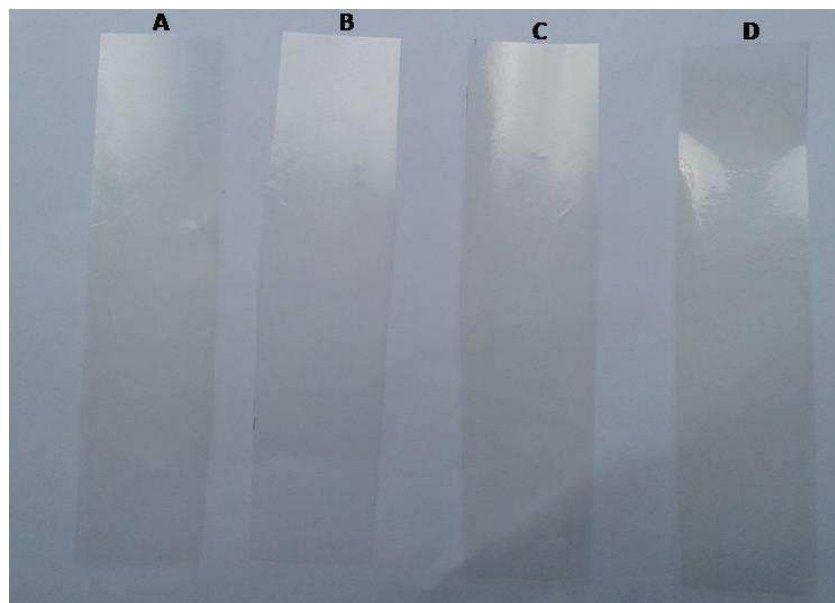
A avaliação das fotomicrografias foi realizada por meio de análise descritiva.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. FILME DE METIL CELULOSE INCORPORADO COM NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA**

#### **3.1.2. Desenvolvimento dos nanocompósitos**

Os filmes produzidos por *casting* adicionados de NPQ apresentaram-se uniformes sem a formação de agregados visíveis e, aparentemente, obtiveram uma boa dispersão no polímero e apresentaram-se transparentes (Figura 14).



**Figura 14:** Filmes de MC (A), MC incorporado com NPQ: 1% (B), 5% (C) e 10% (D).

### 3.1.3. Espessura dos filmes

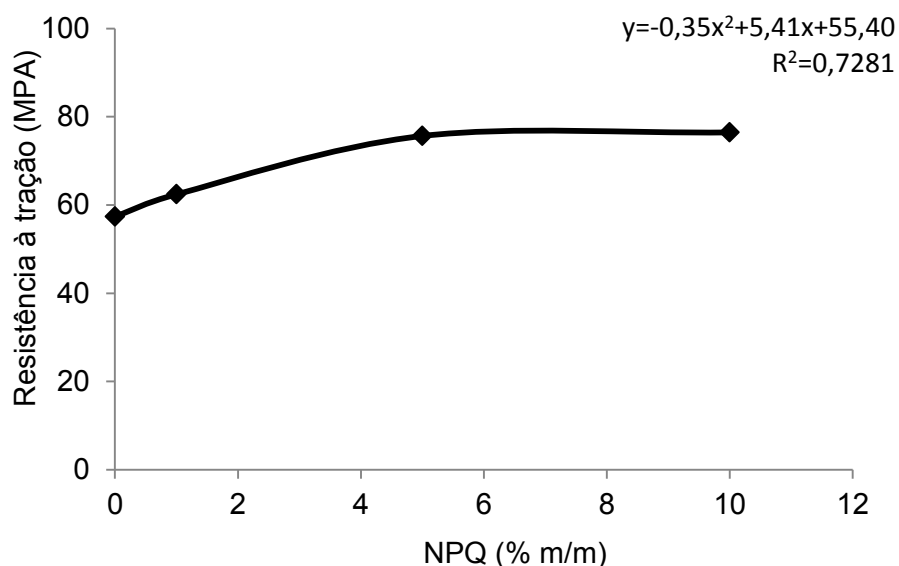
A espessura dos filmes não variou ( $p > 0,05$ ) em função dos tratamentos com NPQ apresentando espessura média de  $51,29 \pm 10,64 \mu\text{m}$ . O desvio padrão relativamente alto está relacionado ao processo de *casting*, em que ocorre variação da espessura em função do seu ajuste manual (ALMEIDA, 2010).

### 3.1.4. Propriedades mecânicas dos filmes

O efeito das concentrações de nanopartículas nas propriedades mecânicas do filme de MC pode ser explicado pela análise de regressão por meio da equação ajustada que explica a variação de  $y$  em função das diferentes concentrações de NPQ avaliadas. De acordo com a regressão, o aumento da concentração de NPs até 5% promoveu um aumento da resistência à tração dos filmes, de forma significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 15), enquanto o alongamento diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ).

Percebeu-se que quando a concentração de NPs variou de 0 a 5% (m/m) houve aumento crescente na resistência à tração dos filmes, e, acima de 5%, a resistência à tração permaneceu constante, indicando que a adição de 10% de NPs não proporcionou melhoria da resistência à tração e, sugerindo que 5% foram

concentrações ótimas do agente de enchimento para induzir o aumento máximo da resistência do filme de MC (Figura 15).



**Figura 15:** Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na resistência à tração (MPa) de filme de MC, por análise e regressão com a equação ajustada.

Nos filmes adicionados com 1 e 5% de NPQ, provavelmente as partículas estão distribuídas de forma homogênea havendo a inserção das partículas no interior da matriz de forma estabilizada. Observou-se que quando adicionadas 10% de NPQ, as NPs começaram a se aglomerar em alguns pontos no filme, sem promover melhoria adicional na resistência mecânica do filme. As regiões de aglomerados de nanopartículas distribuídos de forma não homogênea em filme formam sítios, que resulta em pontos concentrados de tensão e consequentemente tendem a reduzir a resistência à tração (LOREVICE *et al.*, 2014). Pela análise de microscopia eletrônica de varredura e força atômica foi possível identificar alguns pontos com presença de pequenos aglomerados no filme com 10% de NPs.

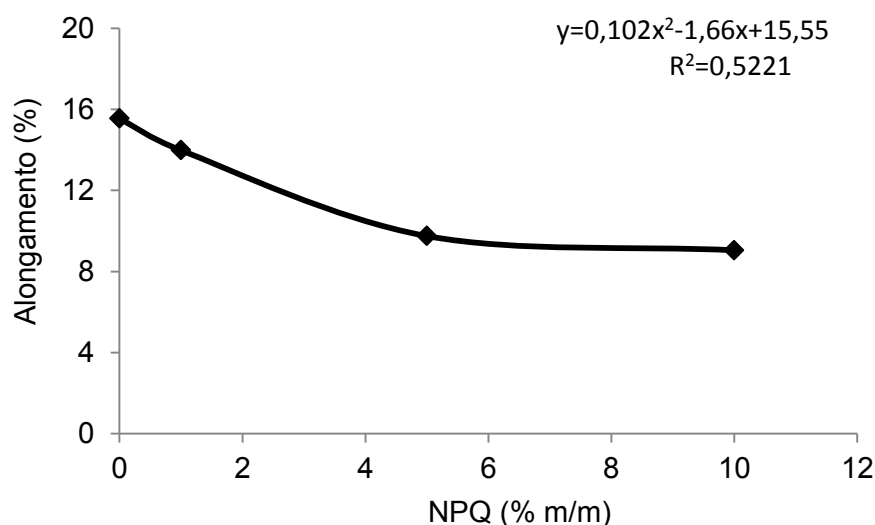
Os resultados confirmam o efeito de reforço das nanopartículas na matriz polimérica, o que é consistente com dados previamente relatados na literatura utilizando NPQ (CHANG *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2009; LOREVICE *et al.*, 2014, HOSSEINI *et al.*, 2015).

O aumento na resistência dos filmes, que contêm nanopartículas inclusas, acontece, devido à presença de NPQ na matriz polimérica que incrementa as

interações intermoleculares entre as cadeias do polímero, tornando assim a matriz compacta, resultando no reforço da sua matriz, obtendo um material mais resistente (MOURA *et al.*, 2009; LOREVICE *et al.*, 2014).

Pesquisadores explicam que, em filmes com polímeros solúvel em água, o aumento na concentração de solvente (água) provoca redução das interações moleculares entre as cadeias adjacentes, aumentando a interação entre as macromoléculas e o solvente. Dessa forma, com a adição de nanopartículas ocorre aumento das interações moleculares entre as cadeias adjacentes, devido à diminuição na concentração de solvente, com o aumento das interações entre as partículas e o material formador do filme. Um maior reforço do filme também é observado (MOURA, 2009).

Avaliando a análise de regressão para o alongamento (%) do filme percebe-se um comportamento decrescente quando 5% de NPs foram adicionadas e um comportamento constante a partir da adição de 5% (Figura 16).

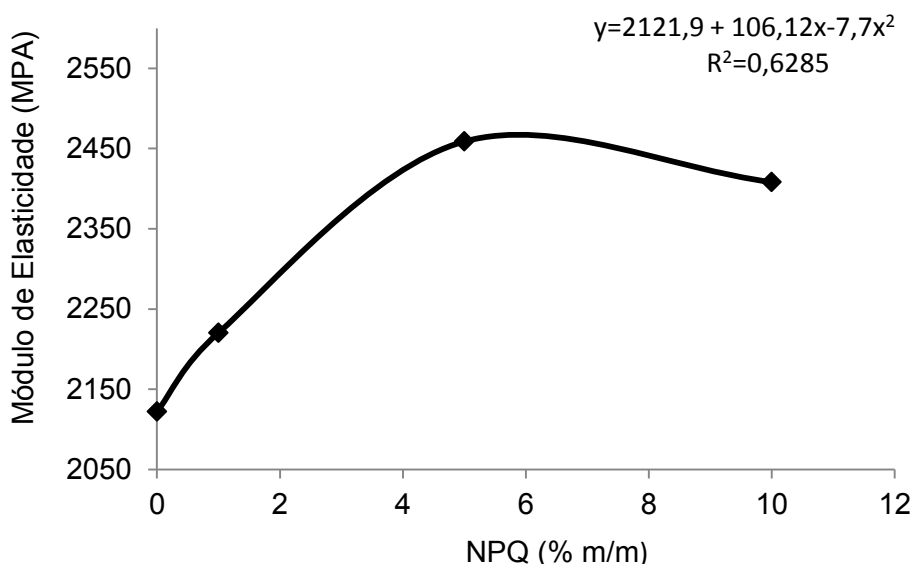


**Figura 16:** Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no alongamento (%) de filme de MC por análise e regressão com a equação ajustada.

A diminuição do alongamento (%) é uma indicação de uma diminuição da elasticidade do filme. Com a adição de NPQ, o alongamento diminui, pois as interações entre as cadeias aumentam, dificultando o escoamento e estiramento dessas cadeias, fraturando o filme sem que este se deforme e, tornando o filme mais rígido (LOREVICE *et al.*, 2014; HOSSEINI *et al.*, 2013).

Chang *et al.* (2010) estudaram o efeito da incorporação de NPQs (50 a 100 nm) em filme de amido nas concentrações de 1, 2, 4, 6 e 8%, e observaram que a adição de NPs até a concentração de 6% proporcionou melhoria na resistência a tração do filme (MPa), enquanto o alongamento até a ruptura diminuiu. Eles observaram ainda que, quando adicionaram mais NPs (adição de 8%) à matriz, houve uma pequena redução da resistência à tração que, segundo os autores, está relacionada à aglomeração das NPs no filme nesta concentração.

Por meio da análise de regressão foi possível observar que o módulo de elasticidade (ME) dos filmes adicionados de NPQ aumentou significativamente quando 5% de NPQ foram adicionadas e as concentrações acima de 5% provocaram um decréscimo no ME (Figura 17).



**Figura 17:** Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no módulo de elasticidade de filme de MC por análise de regressão com a equação ajustada.

De acordo com os resultados, a adição de 5% de NPs provocou aumento na rigidez do filme em torno de 14,4%. Da mesma forma, Moura *et al.* (2009) relataram que a mistura de NPQ em filmes de Hidroxipropilmetilcelulose (85nm) apresentaram aumentado módulo de elasticidade de 40% quando comparado ao filme controle.

Hosseini *et al.* (2013) incorporaram NPQ ( $259 \pm 17.9$  nm) nas concentrações de 2, 4, 6 e 8% em filme de gelatina de peixe e obtiveram melhoria de 60% no módulo de elasticidade quando 6% de NPs foram incorporadas.

Outros estudos foram realizados utilizando nanoestruturas com objetivo de proporcionar melhorias mecânicas ao filme de metil celulose. Rimdusit *et al.* (2008) produziram filme de metil celulose adicionado de MMT em diferentes proporções de peso MC:MMT (100:0, 100:1, 100:2, 100:3, 100:5 e 100:10). Avaliaram então que o módulo de elasticidade (GPa) do filme foi melhorado cerca de 65% para os nanocompósitos produzidos com a formulação 100:10. Estes pesquisadores observaram também que houve considerável melhoria na resistência à tração com uma ligeira diminuição no alongamento na ruptura (16%). De acordo com os autores supracitados este comportamento está relacionado ao reforço fornecido pela esfoliação de MMT na matriz e pela sua maior área superficial que conduz a uma melhoria da resistência.

Silva.(2012) avaliou o efeito da adição de MMT e nanotubo de carbono (MWNT) em filme de metil celulose, e verificou que a adição das nanoestruturas em diferentes concentrações não influenciou nas propriedades mecânicas do filme, e somente a adição de 3% de MMT proporcionou pequena melhoria na resistência à tração e módulo de elasticidade. Ele concluiu que o papel de reforço mecânico que os nanopreenchedores deveriam estar exercendo nos filmes foi mascarado pelo forte poder plastificante dos surfactantes utilizados, dificultando a avaliação de atuação de reforço do nanotubo de carbono e da MMT nos filmes. Silva (2012) concluiu ainda que, no estudo não se conseguiu obter uma estrutura completamente esfoliada da MMT na matriz, que pode ter ocorrido devido ao modo de preparo da solução. Com isso é importante ressaltar que o nanopreenchedor deve estar bem distribuído na matriz para que possa promover efeito de reforço.

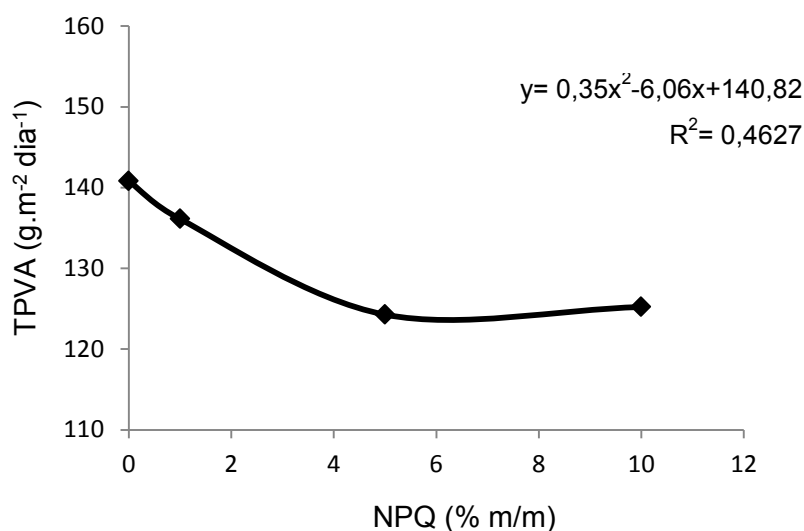
Com base nestes resultados, a adição de NPQ em 5% nos filmes de metilcelulose resultou em melhoria significativa das propriedades mecânicas do filme.

### **3.1.5. Taxa de permeabilidade ao vapor de água**

Oefeito da concentração de nanopartículas de quitosana na taxa de permeabilidade ao vaporde água (TPVA) no filme de MC pode ser explicado pela análise de regressão por meio da equação ajustada que explica a variação de y em função das diferentes concentrações de NPQ avaliadas. De acordo com a regressão o aumento da concentração de NPs promoveu uma diminuição da TPVA dos filmes,

de forma significativa ( $p < 0,05$ ) até a adição de 5% de NPs. Os filmes adicionados com concentrações acima de 5%, não apresentaram melhorias adicionais na TPVA e relação à adição de 5% (Figura 18).

A capacidade das NPQ em proporcionar melhoria na propriedade de barreira ao vapor de água tem sido explicada por alguns autores. De acordo com *Chang et al.* (2010), a adição de NPQ produz um caminho tortuoso que impede a passagem das moléculas de água através da matriz do filme devido à distribuição homogênea das NPs na matriz que, por sua vez, propicia um filme com uma estrutura mais compacta o que também dificulta a difusão do vapor através do filme. Além disso, relata-se que a redução da TPVA do filme adicionado de NPQ está relacionada também com a formação da ligação de hidrogênio entre as NPs e a matriz do filme estudado, que influencia na difusão de vapor.



**Figura 18:** Efeito das NPQs em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na TPVA de filme de MC por análise de regressão com a equação ajustada.

*Hosseini et al.* (2015) também explicam que este comportamento pode ser atribuído à mobilidade restrita das moléculas do polímero devido à incorporação de NPs e da sua interação com a matriz polimérica.

No estudo realizado por *Hosseini et al.* (2015), foi observado que a adição de 6% (m/v) de nanopartícula de quitosana proporcionou aumento de 50% na propriedade de barreira do filme de gelatina de peixe, demonstrando que a incorporação de NPs atuou na redução da velocidade de permeação de vapor de

água através do polímero, ao qual foi atribuída uma boa distribuição das NPs, preenchendo espaços vazios na matriz do polímero.

Lorevice *et al.* (2014 a) observaram a diminuição da TPVA dos filmes de hidroximetilcelulose com mamão quando NPs de diferentes tamanhos (250 e 351 nm) foram adicionadas à matriz e verificaram que as NPQ menores proporcionaram maior propriedade de barreira ao vapor de água que as maiores devido ao fato de essas preencherem mais facilmente os espaços entre as cadeias da matriz de hidroxipropilmetilcelulose. Da mesma, em outro estudo, Lorevice *et al.* (2014 b) produziram filme de hidroxipropilmetilcelulose e polpa de goiaba incorporado com NPQ e verificaram que NPs de menor tamanho (250 nm) apresentaram menor TPVA devido à maior homogeneidade na distribuição das NPQ na matriz de hidroxipropilmetilcelulose com polpa de goiaba.

Martelli *et al.* (2013) verificaram que uma pequena quantidade, 0,2 % (m/m) de NPQ (88,79 nm) incorporada em filme de purê de banana foi capaz de reduzir a TPVA do filme em cerca de 38%.

Antonίου *et al.* (2015) compararam a influência da adição de quitosana e NPQ em filme de gomas de galactomananas (endosperma moído de sementes da árvore de tara, *Cesalpinia spinosa*) e concluíram que as NPs proporcionaram uma maior redução na TPVA quando comparado à quitosana. Tal fenômeno está relacionado à capacidade das NPQ em ocupar espaços vazios, os poros, do filme, devido ao seu tamanho nano.

Diante disso, percebeu-se que as NPs têm demonstrado ser eficiente na redução da TPVA de filmes. De acordo com os resultados do presente trabalho o aumento das concentrações de NPQ foram eficientes em aumentar a propriedade de barreira do filme de MC, promovendo a redução máxima de TPVA em 10,24%.

Um dos pontos críticos quanto à aplicação dos filmes biodegradáveis na indústria de alimentos está relacionado à alta permeabilidade ao vapor de água. Com o crescimento da área de nanotecnologia novas nanoestruturas vêm sendo utilizadas para prevenir a difusão de vapor de água através do polímero. No entanto o estudo sobre a incorporação de nanoestrutura em filme de metil celulose e sua avaliação nas propriedades de barreiras ainda são carentes, o que torna o presente estudo ainda mais interessante e relevante.

### 3.1.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), dos filmes mostraram que o filme MC sem adição de nanopartículas apresenta uma superfície lisa, compacta, sem presença de poros. No entanto, o filme de MC apresentou alguns pontos com a presença de resina polimérica não dissolvida. Observou-se ainda que os filmes, adicionados de NPQ, também apresentaram pontos com presença de polímero não dissolvido, o que pode estar relacionado ao procedimento de produção do filme de MC utilizado (Figuras 19A a D).

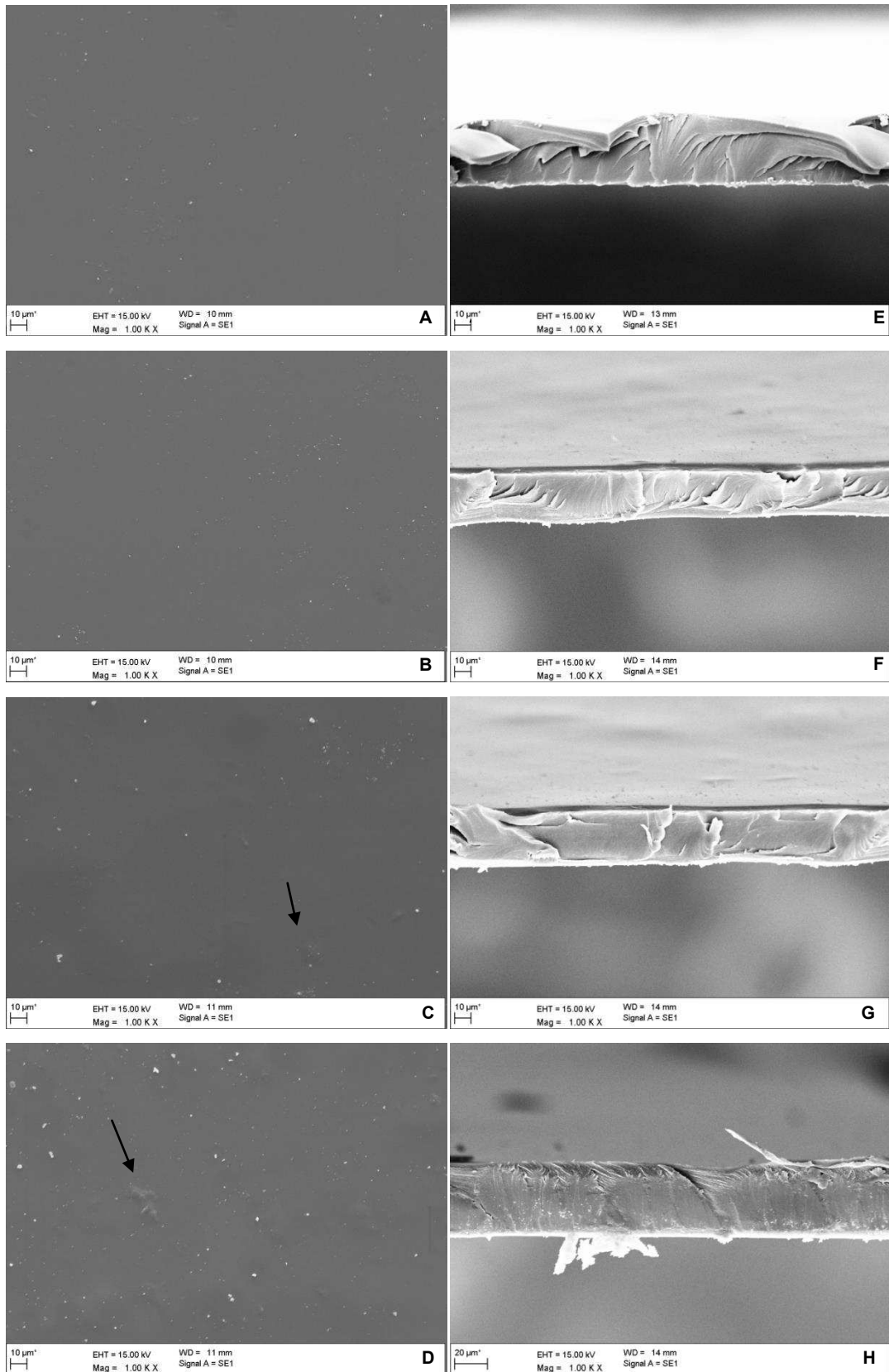
A estrutura dos filmes adicionados de 1% de NPQ apresentou-se similar ao filme de MC, não sendo possível observar a presença de NPQ na superfície do filme, uma vez que as partículas brancas que apareceram nas micrografias também foram encontradas no filme de metilcelulose.

Nos filmes com 5 e 10% de NPQ, além da presença da resina polimérica, percebeu-se alguns pontos irregulares, que interromperam a estrutura lisa do filme de MC, o que podem estar relacionados à presença de NPQs no filme. No filme com 10% de NPQ pontos com partículas agrupadas foram observados, podendo indicar a presença de aglomerações na matriz.

Avaliando-se o corte transversal, percebeu-se que os filmes de MC e os adicionados com 1 e 5% de NPs apresentaram-se uniformes, compactos e sem presença de poros. As fraturas que aparecem nos filmes estão relacionadas ao preparo da amostra, corte transversal do filme (Figuras 19 E, F e G).

Nos filmes com 10% de NPQ observou-se a presença de pontos brancos na região transversal, podendo ser atribuído a presença de NPQ na matriz, apresentando também estrutura compacta (Figura 19 H).

Hosseini *et al.* (2015) verificaram por MEV que concentrações de 2% de NPQ foram uniformemente dispersas na matriz de filme de gelatina de peixe, sem presença de aglomerados e foi constatado que concentrações mais altas (8%) de NPs levaram à aglomeração das mesmas na matriz. O mesmo comportamento foi observado por Chang *et al.* (2010) em filme de amido termoplástico com concentração de NPQ acima de 6% com presença de aglomerados de NPs na superfície do filme. De acordo com estes estudos a aglomeração de NPs ocasionou o enfraquecimento da matriz polimérica, diminuindo a resistência à tração do filme.



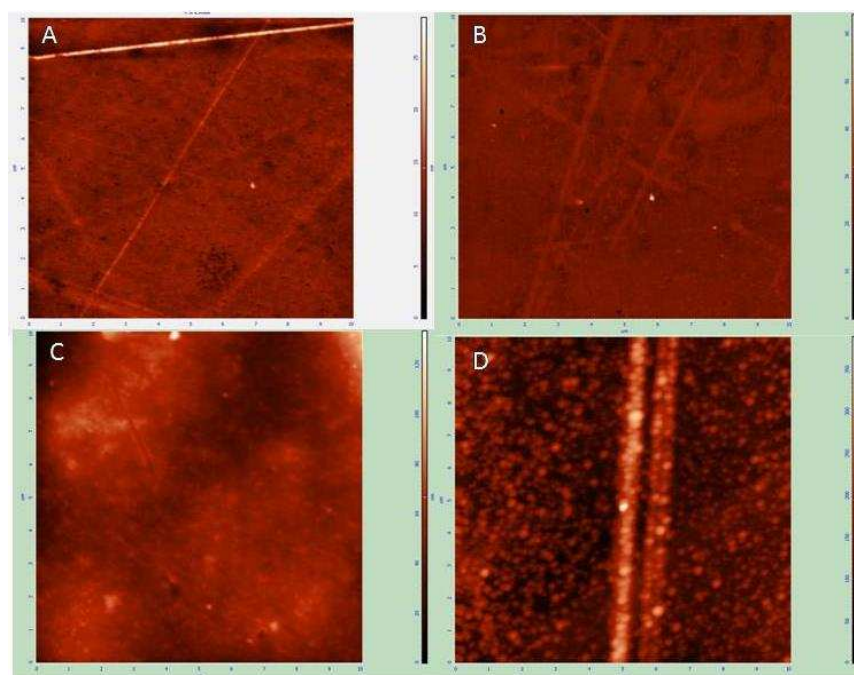
**Figura 19:** Filmes de MC incorporados com NPQ: 0% (A); 1% (B); 5% (C) e 10% (D) (superfície) e 0% (E); 1% (F); 5% (G) e 10% (H) (corte transversal) (1000 X).

No filme com 10% de NPQ observou-se no filme o aparecimento de pontos que podem indicar a presença de NPQ aglomeradas, que pode estar relacionado ao aumento da concentração de NPQ a 10% não ter provocado um aumento adicional na resistência à tração a partir da adição de 5% NPQ.

Relacionando a micrografia com a permeabilidade, a adição de maiores concentrações de NPs proporciona a aglomeração das mesmas na matriz e, conseqüentemente, a partir de determinada concentração provoca o aumento da permeabilidade do filme (CHANG *et al.*, 2010; HOSSEINI *et al.*, 2015; ANTONIOU *et al.*, 2015). Neste trabalho foi verificado que, apesar de ser identificada uma região com NPs aglomeradas na superfície do filme de MC com 10% de NPQ, esta não comprometeu a propriedade de barreira do mesmo. No entanto não proporcionou melhoria adicional a partir da adição de 5% de NPs.

### 3.1.7. Microscopia de Força Atômica

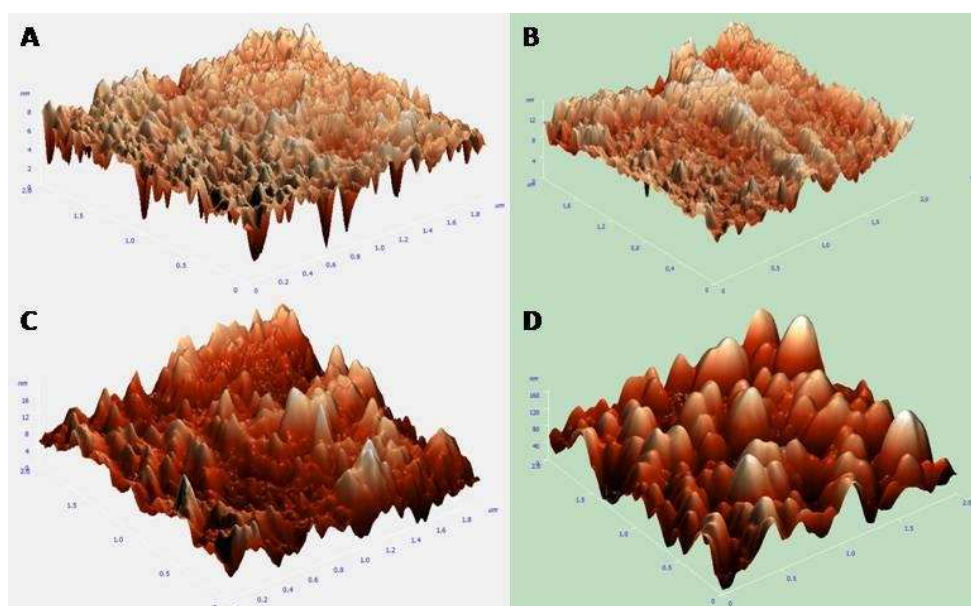
As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica permitiram avaliar a microtopografia da superfície dos filmes em duas e três dimensões e ainda determinar a rugosidade dos filmes (Figuras 20 e 21).



**Figura 20:** Topografia em 2D dos filmes: MC (A), e filmes de MC adicionado de 1%(B), 5%(C) e 10% (D) de NPQ. (10 x 10  $\mu\text{m}$ ).

Avaliando as topografias em 2D (Figura 20), percebeu-se claramente a presença das NPQ na superfície do filme com 10 % de NPs. No filme com 1% de NPs não observou presença de NPs na superfície, apresentando uma superfície similar ao filme controle.

Nos filmes com 5% de NPs, percebeu-se regiões mais claras podendo ser atribuídas à presença de NPQ na região interna do polímero. Da mesma forma, pela análise de MEV não foi possível identificar com clareza a presença de NPs na superfície dos filmes adicionados com 1 e 5% de NPQ, sugerindo que as NPs estão distribuídas no interior da matriz. Tal fenômeno é, evidenciado na Figura 21 e na Tabela 5 nas quais, pode ser observado que o aumento da concentração de NPs provocou aumento na altura e na rugosidade dos filmes, sendo possível perceber vários pontos pequenos (nm) agudos nos filmes com 5 e 10% de NPs, que provavelmente são atribuídos à presença das NPs.



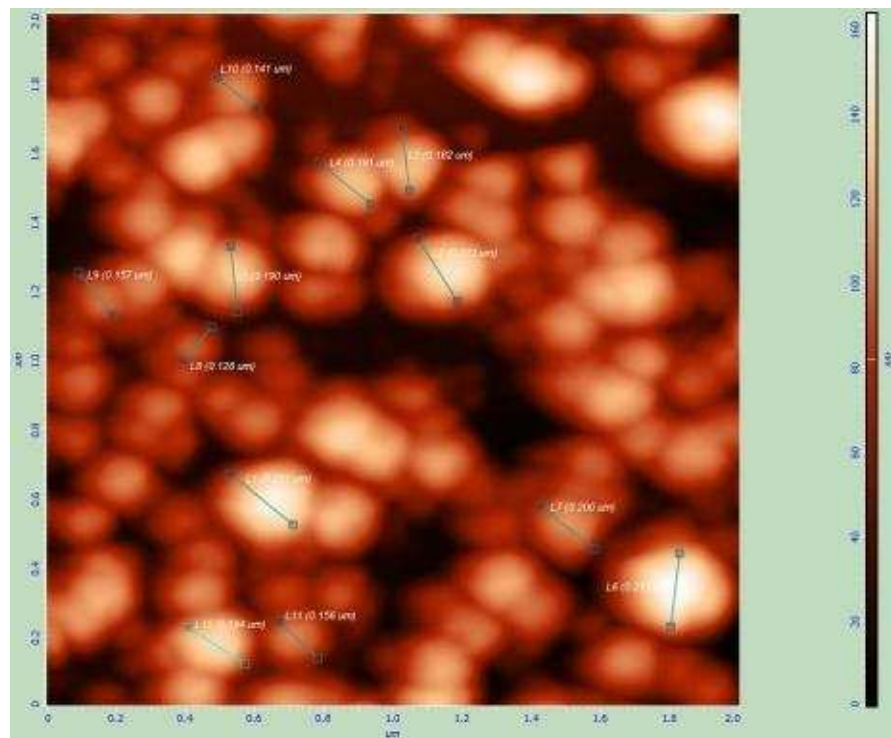
**Figura 21:** Fotomicrografias em 3D dos filmes obtidas por MFA: filme de MC (A), e filmes de MC incorporados com 1% (B), 5%(C) e 10% (D) de NPQ. (2 x 2  $\mu\text{m}$ ).

**Tabela 5:** Rugosidade (Ra) dos filmes de MC incorporados com 0%, 1%, 5% e 10% de NPQ. (2x2  $\mu\text{m}$ ).

Filme de MC incorporado com NPQ (%)	Ra (nm)
0	0,74
1	0,85
5	1,1
10	10,73

De acordo com as fotomicrografias a incorporação de NPs promoveu mudanças na morfologia do filme, o que pode ser percebido nitidamente na Figura 16, comparando o filme de MC ao filme adicionado de 10% de NPs, enquanto a adição de 1% de NPs praticamente não provocou alteração na sua morfologia.

De acordo com a fotomicrografia do filme de MC com 10 % de NPs, observou-se a presença das NPs distribuídas na superfície do filme com diâmetro cerca de 100 a 200 nm. Percebeu-se também que as NPs presentes no filme apresentam forma esférica e que algumas NPs estão aglomeradas, podendo estar relacionada com quantidade adicionada ao filme (Figura 22).



**Figura 22:**Fotomicrografias em 2D do filme incorporado com10% de NPQ. (2 $\mu$ m x 2  $\mu$ m).

Antouniou *et al.*(2015) verificaram que a incorporação das NPQ na matriz polimérica proporcionou o aumento da rugosidade do filme, e sugeriu que a presença dos pontos agudos presente na fotomicrografia era atribuído à presença das NPs, e atribuíram que o aumento da rugosidade contribui para a melhoria à barreira ao vapor de água e propriedades mecânicas do filme.Este mesmo comportamento foi observado por Azeredo *et al.*(2010) com adição de nanofibra de celulose em filme de quitosana plastificado com glicerol.

### 3.1.8. Propriedades ópticas

A Tabela 6 apresenta os valores para os parâmetros de cor ( $L^*$  e  $b^*$ ), o índice de amarelamento e a transmitância dos filmes de MC incorporado com diferentes concentrações de NPQ. O aumento da concentração de NPs não influenciou na luminosidade dos filmes, enquanto a adição de NPQ no filme proporcionou aumento significativo nos valores médios de  $b^*$  ( $p < 0,05$ ), que está relacionado à cor natural da quitosana. O índice de amarelamento dos filmes teve o mesmo comportamento da coordenada  $b^*$ , indicando que os filmes adicionados com NPQ tendem a estar com coloração amarela.

Antoniou *et al.* (2015) avaliaram a influência da adição de NPs de quitosana em filme de TG na coordenada  $b^*$  e, da mesma forma que no presente trabalho, verificaram que as NPs provocaram aumento do valor médio da coordenada  $b^*$ , indicando o amarelamento dos filmes, que está relacionado à fonte de obtenção e ao tipo de processamento da quitosana.

**Tabela 6:** Valores médios da análise de colorimetria dos filmes de metilcelulose incorporados com NPQ nas concentrações de 0, 1, 5 e 10% nas coordenadas de cor  $L^*$  e  $b^*$  e valores médios de índice de amarelamento (YI E313) e transmitância dos filmes.

Filme com NPQ (% m/m)	Parâmetros de cor			Transmitância (%)
	$L^*$	$b^*$	YI	
0	93,09 ± 0,63 a	1,07 ± 0,02 a	1,19 ± 0,06a	90,08 ± 0,87 a
1	92,83 ± 0,62 a	1,63 ± 0,09 b	2,47 ± 0,26 b	89,88 ± 0,34 a
5	93,21 ± 0,36 a	2,06 ± 0,11 b	3,26 ± 0,18 b	89,32 ± 0,18 a
10	93,27 ± 0,24 a	2,53 ± 0,14 b	3,99 ± 0,08 b	83,15 ± 4,28 b

\*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem do controle pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância.

De acordo com os resultados, somente a concentração de 10% provocou uma pequena diminuição significativa na transmitância dos filmes na região visível ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao filme de MC. Isto pode estar relacionado à maior quantidade de NPs adicionada e à presença de alguns pontos com pequenas NPs aglomeradas no filme que, por sua vez, tende a diminuir a transmissão da luz.

Hosseini *et al.* (2015) avaliaram que a adição de concentrações acima de 4% de NPs proporcionou a diminuição significativa na transparência do filme de gelatina

de peixe e atribuíram este comportamento à agregação de nanopartículas no filme, que, por sua vez, impedia a transmissão da luz.

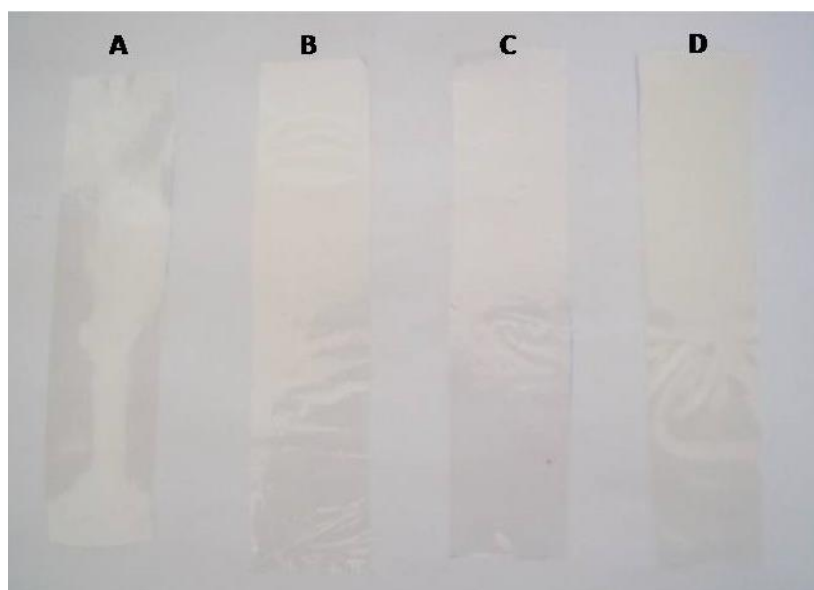
Apesar dos filmes adicionados com 10% apresentarem esta diferença, visualmente não foi possível detectar diferença na transparência dos filmes (Figura 10), o que sugere que as NPs apresentaram-se bem distribuídas na matriz do polímero, não apresentando grande influência na sua transparência.

A transparência e a cor dos filmes são muito relevantes para a funcionalidade de filmes devido ao seu grande impacto na aparência dos produtos (SAINZ *et al.*, 2011). Normalmente, maior transparência é considerada desejável para as embalagens de alimentos, filmes e revestimentos, uma vez que os consumidores preferem ver os alimentos. Assim, os filmes de MC adicionados de NPQ não impedem a visualização dos alimentos, neles embalados pelos consumidores.

### **3.2. FILME DE METIL CELULOSE INCORPORADO COM NISINA**

#### **3.2.1. Desenvolvimento do filme de MC com nisina**

Os filmes de MC e filmes com nisina apresentaram-se homogêneos e não se percebeu formação de agregados na superfície do filme e foi possível perceber que os filmes adicionados com nisina apresentaram diferença na transparência do filme tendendo a coloração amarela (Figura 19).



**Figura 23:** Filmes produzidos, MC (A), MC incorporado com 1% (B), 5 (C) e 10% (D) de NS.

### 3.2.2. Espessura

Os filmes de MC e os filmes de MC incorporados nas diferentes concentrações de NS não apresentaram variação significativa na espessura ( $p > 0,05$ ), apresentando espessura média de  $47,92 \pm 11,45 \mu\text{m}$ . O desvio padrão relativamente alto está relacionado ao processo de *casting*, no qual ocorre variação da espessura em função do seu ajuste manual (ALMEIDA, 2010).

### 3.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes adicionado com nisina

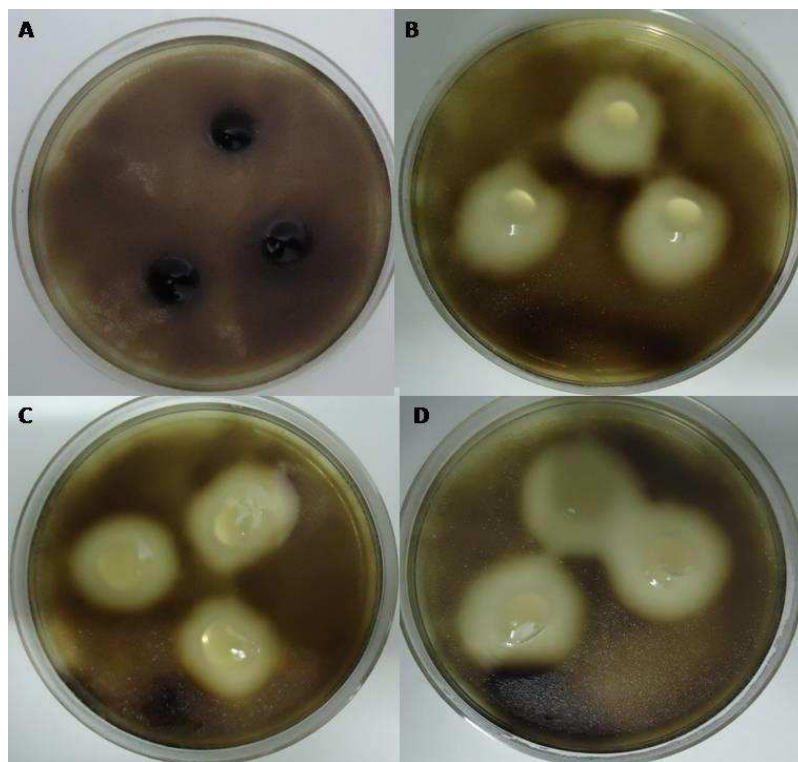
Os resultados obtidos mostraram que os filmes de MC sem nisina não inibiram o crescimento das bactérias avaliadas, enquanto a adição de 1, 5 e 10% (m/m) de NS na matriz de MC foi capaz de inibir tanto o crescimento da *Listeria* quanto o do *S. aureus*, produzindo uma zona de inibição clara em torno do filme, mostrando difusão da nisina para o meio sólido de forma significativa ( $p < 0,05$ ) sendo que a adição de 10% proporcionou maior inibição, de 1,86 cm e 1,70 cm para *Listeria* e *S. Aureus*, respectivamente (Tabela 7 e Figuras 24 e 25).

**Tabela 7:** Diâmetro médio dos halos de inibição para *Listeria* e *S.aureus*.

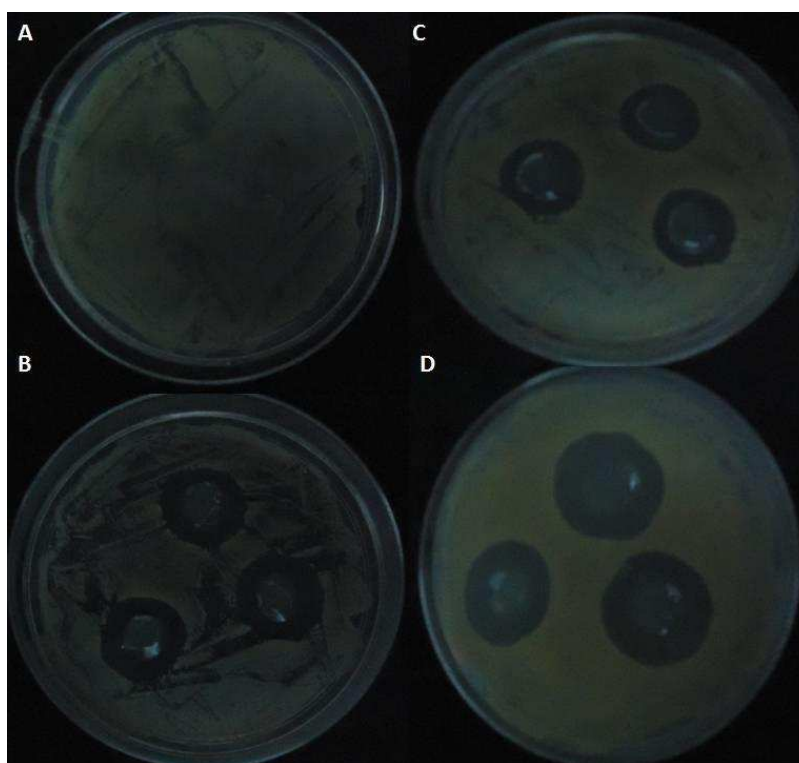
Filme adicionado de nisina (% m/m)	Diâmetro (cm)	
	<i>Listeria</i>	<i>S.aureus</i>
0	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
1	$1,00 \pm 0,15$ b	$0,93 \pm 0,20$ b
5	$1,33 \pm 0,38$ b	$1,40 \pm 0,44$ b
10	$1,86 \pm 0,21$ c	$1,70 \pm 0,24$ c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de tukey ( $p > 0,05$ ).

De acordo com a literatura a nisina apresenta propriedade antimicrobiana, especialmente, contra bactérias Gram-positivas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (BREWER *et al*, 2002;. LOPEZ-PEDEMONTE *et al.*, 2003; SOBRINO-LOPEZ E MARTIN-BELLOSO, 2006), e pouca ou nenhuma atividade contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos.



**Figura 24:** Halos de inibição de *Listeria monocytogenes* pelos filmes de MC (A) e MC incorporados com 1% (B), 5% (C) e 10% (D) de nisina.



**Figura 25:** Halos de inibição de *Staphylococcus aureus* pelos filmes de MC (A) e MC incorporado com 1% (B), 5% (C) e 10% (D) de nisina.

Devido ao seu efeito sobre as bactérias Gram Positivas, especialmente a *Listeriae* a *S. aureus*, muitos estudos reportam a incorporação de nisina em vários tipos de filmes feitos de celulose, nailon, isolado protéico de soro, hidroxipropil metil celulose, Zeína, amido, quitosana, PBAT, proteína de soja, carboximetil celulose e a sua utilização como embalagem ativa para reduzir as bactérias indesejáveis nos gêneros alimentícios (NATRAJAN e SHELDON, 2000; COMA *et al*, 2001; TEERAKARN *et al.*, 2002; CHOLLET *et al*, 2008;. GADANG *et al.*, 2008; KRISTO *et al.*, 2008; NEETOO *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2008; BASTARRACHEA *et al.*, 2010, CAO-HOANG *et al.*, 2010; IMRAN *et al.* 2010, BASCH *et al.*, 2013).

Imran *et al.*(2010) demonstraram queo filme HPMCadicionado coma nisina ( $10^4$  IU) como agente antimicrobianofoi eficiente no controlede patogênicos de origem alimentar *L. monocytogenese S.Aureus*, quando testado emum ensaio de disco-difusão, apresentando halo de inibição de  $1,40 \pm 0,10$  e  $1,40 \pm 0,02$ , respectivamente.

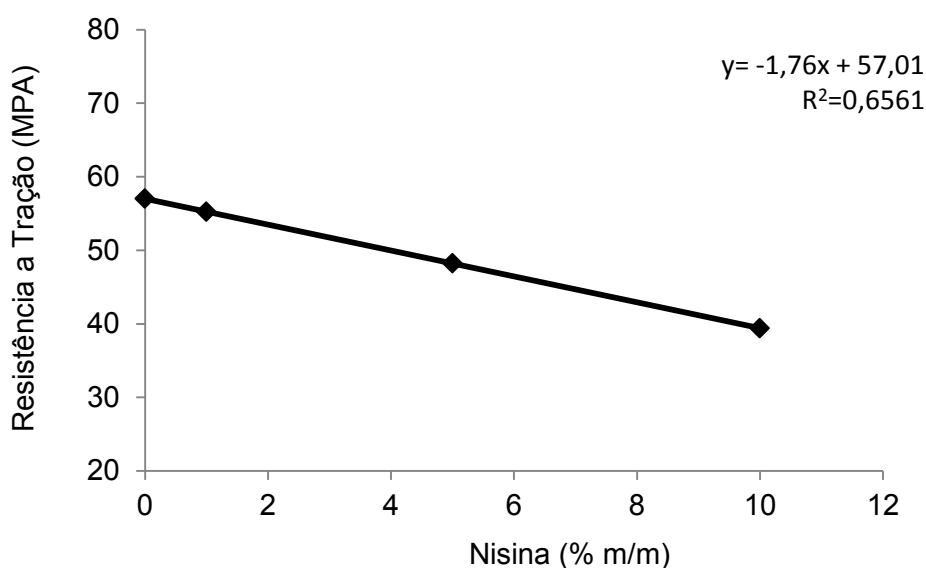
Em outro estudo Imran *et al.* (2014) produziram filme de HPMC, QT, caseinato de sódio e PLA incorporado com  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $0,137\cdot\text{mg nisina}/\text{cm}^{-2}$  de filme) e verificaram que os filmes produzidos apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. O filme de HPMC, QT, caseinato de sódio e PLA com a nisina apresentaram halo de inibição de  $1,80 \pm 0,05$ ,  $2,00 \pm 0,10$ ,  $1,75 \pm 0,05$ ,  $1,05 \pm 0,05$  para *Listeria* e  $1,50 \pm 0,10$ ,  $1,5 \pm 0,10$ ,  $1,40 \pm 0,10$  e  $1,00 \pm 0,05$  para *S.aureus*, respectivamente. De acordo com os autoresos filmes apresentaram potencial para aumentar o prazo de validade dosprodutos alimentares.

Cao-Hoang *et al.* (2010) produziram filme ativo antimicrobiano de caseinato de sódio incorporado com nisina ( $1000 \text{ UI}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) e avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do filme sobre a bactéria *Listeria innocua* e observaram halo de inibição de 1,3 cm em torno do filme. Este mesmo filme foi utilizado para controlar a contaminação de *Listeria*, inoculada em queijo. O filme ativo foi capaz de reduzir  $1,1 \log \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  na contagem de *Listeria* após uma semana de armazenamento a  $4^\circ\text{C}$ , quando comparado ao filme sem nisina.De acordo com os autores, o filme ativo produzido foi promissor para superar problemas associados à contaminação pós-processo estendendo a vida de prateleira e, possivelmente, aumentando a segurança microbiana de queijos.

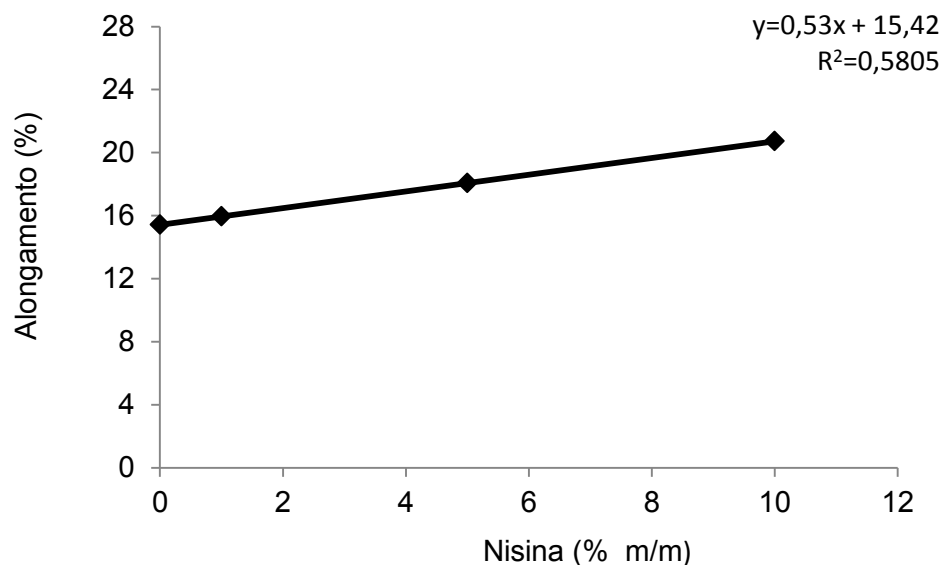
A incorporação de nisina nas concentrações de 1,5 e 10% (m/m) no filme de MC apresentou resultados satisfatórios quanto à inibição de *Staphylococcus sp.* e *Listeria monocytogenes*. O Filme antimicrobiano incorporado com nisina, mediante os resultados obtidos, apresentou potencial de aplicação como embalagem ativa antimicrobiana para o acondicionamento de alimentos contaminantes com as bactérias em estudo, estendendo assim a vida de prateleira e assegurando a segurança alimentar.

### 3.2.4. Propriedades mecânicas

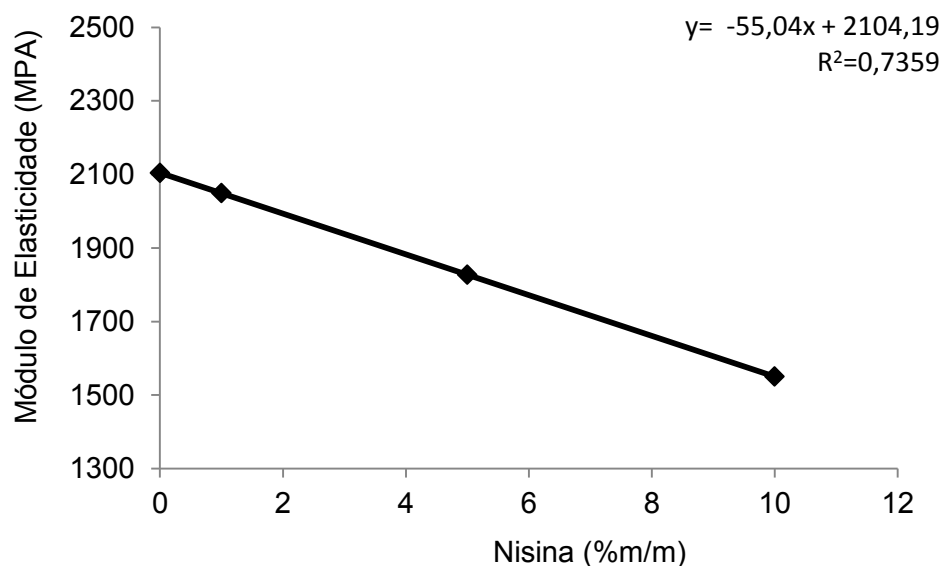
O efeito do aumento da concentração de, nisina, nas propriedades mecânicas do filme de MC pode ser explicado pela análise de regressão por meio da equação ajustada que explica a variação de y em função das diferentes concentrações de nisina avaliadas. De acordo com a regressão, o aumento da concentração de nisina promoveu decréscimo na resistência à tração e no módulo de elasticidade do filme (Figuras 26 e 28) de forma significativa ( $p < 0,05$ ), enquanto o alongamento aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 27). Dessa forma, pode-se perceber que a nisina, possivelmente, pode ter atuado como plastificante, afetando a formação da rede do filme de metil celulose e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas do filme.



**Figura26:** Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na resistência mecânica de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada.



**Figura 27:** Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no alongamento de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada.



**Figura 28:** Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) no módulo e elasticidade de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada.

Estudos relatam que, de forma geral, a adição de agentes antimicrobianos em matrizes poliméricas (nisina, lisozima, sorbato de potássio, natamicina entre outros) provoca perda da resistência mecânica do filme. Este efeito negativo pode estar relacionado com a quebra da rede causada pela substituição parcial de polímeros pelo aditivo que cria descontinuidades dentro da matriz, resultando em filmes menos resistentes (CHÁ *et al.*, 2002; SEBTI *et al.*, 2007; OLLÉ RESA *et al.*, 2014).

Os resultados estão de acordo com as tendências observadas para a adição de nisina em polímeros, uma vez que a adição de nisina provocou uma diminuição na resistência à tração e no módulo de elasticidade de biopolímeros biodegradáveis.

Sebti *et al.* (2007) estudaram o efeito de nisina ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na resistência à tração de filme de HPMC e observaram uma forte diminuição desta propriedade variando de 60 MPa para 35 MPa. De acordo com os mesmos, os resultados revelaram um efeito plastificante importante da nisina.

Pranoto *et al.*, (2005) verificaram que o aumento da concentração de nisina (51000 a 204000 UI/g de quitosana) em filme de quitosana provocou a diminuição da resistência à tração (37,03 a 13,58 MPa) enquanto aumentou o alongamento (3,45 para 30,72%) do filme de forma significativa ( $p < 0,05$ ).

Basch *et al.* (2013) produziram blendas de HPMC com amido, adicionados de nisina (3000 UI/mL) e observaram que a adição de nisina causou uma diminuição da tensão na ruptura e do módulo de Young, cerca de 85% e 89%, respectivamente. Sanjurjo *et al.* (2006) também observaram comportamento semelhante no estudo de filme comestível de amido contendo nisina.

Bastarrachea *et al.* (2010) observaram que a incorporação de 1000 a 5000 UI/cm<sup>2</sup> em filme de PBAT promoveu uma redução de 30% a 50% no módulo de elasticidade e de 29 a 40% na tensão à ruptura. Os autores atribuíram este comportamento à formação de orifícios e poros na película adicionada com nisina, ocasionando a falta de homogeneidade na estrutura do filme criando uma estrutura mais fraca.

Ollé Resa *et al.* (2014) avaliaram o efeito da nisina (0,204 g/100 g de filme) na propriedade mecânica de filme de amido e também verificaram que a adição de antimicrobiano provocou diminuição da tensão na ruptura, variando os valores de 1,647 a 0,153 MPa, e maior deformação na ruptura, aumentando os valores de 1,180 % para 2,752%, promovendo efeito de plastificante no filme.

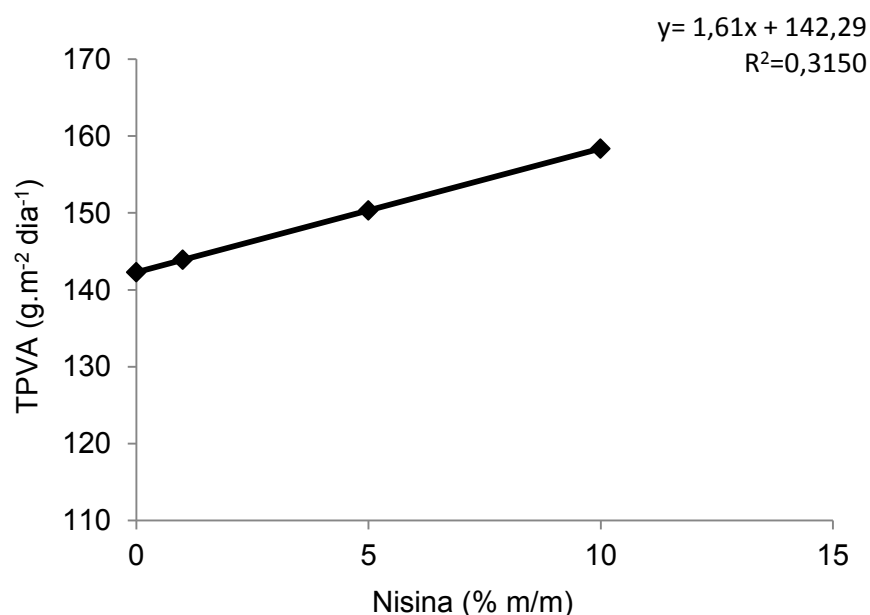
De acordo com Flores *et al.* (2007), a incorporação de agentes antimicrobianos pode interferir na matriz dos biopolímeros por meio do desenvolvimento de pontes de hidrogênio entre as cadeias de biopolímeros e o agente o antimicrobiano que substituiria as interações biopolímero-biopolímero e inibiria a formação de ligações de hidrogênio água-biopolímero nas regiões amorfas da matriz.

O efeito da nisina nas propriedades mecânicas pode estar também relacionado ao fato de que quando a nisina, hidrofóbica, é incorporada na matriz de MC, as moléculas da nisina tendem a formar aglomerados maiores na matriz do filme, causando uma descontinuidade da rede, tornando o filme mais frágil, o que pode ser percebido nas fotomicrografias apresentadas no presente trabalho.

De acordo com os resultados de estudos mecânicos, pode-se concluir que a adição de nisina de 10% à matriz de MC provocou uma diminuição da resistência à tração e do módulo da elasticidade em 31% e 25,7%, respectivamente, enquanto aumentou o alongamento, ou seja, promoveu o enfraquecimento enquanto aumentou a flexibilidade.

### 3.2.6. Taxa de permeabilidade ao vapor de água

O efeito da concentração de nisina na taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) nos filmes metilcelulose pode ser explicado pela análise de regressão por meio da equação ajustada que explica a variação de y em função das diferentes concentrações de nisina avaliadas (Figura 29). De acordo com a regressão o aumento da concentração de nisina promoveu aumento linear da TPVA dos filmes, de forma significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 29:** Efeito das nisina em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10%) na TPVA de filme de MC, por análise de regressão com a equação ajustada.

A adição de nisina a 10% (m/m) promoveu o aumento de 11,9% na taxa de TPVA do filme de MC, diminuindo a barreira ao vapor de água do filme. Este resultado pode ser consequência da maior ruptura da matriz do biopolímero produzido pela adição de nisina devido à formação de aglomerados nas concentrações de 5 e 10%, como foi comprovada na microscopia de MEV e MFA levando a formação de uma matriz menos organizada, com presença de poros, uma vez que a nisina pode estar situada entre as camadas da matriz, favorecendo a difusão de água. Segundo Khwaldia *et al.* (2005), o aumento significativo da TPVA dos biopolímeros com a incorporação de agentes antimicrobianos está relacionado à re-estruturação da matriz polimérica.

Basch *et al.* (2013) observaram que a incorporação de nisina (3,000 UI/mL) promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em torno de 21% na TPVA de filmes de amido com HPMC. Sebti *et al.* (2007) produziram filme de HPMC adicionado de nisina ( $250 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e também identificaram que a nisina proporcionou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na TPVA de  $4,9 \pm 0,2$  a  $9,6 \pm 0,4 \text{ (g} \cdot \text{m}^{-2} \text{ 24 h Pa}^{-1} \text{ m)} \times 10^6$ . Os autores atribuíram este comportamento à maior ruptura que a nisina provoca na matriz polimérica, provavelmente, devido à formação de poros dilatados, favorecendo a difusão da água.

Mei *et al.* (2013) avaliaram a influência da adição de nisina (10.0000 UI/g) em blenda de amido com quitosana e notaram que os filmes incorporados com nisina aumentaram drasticamente a TPVA quando comparado com o controle. A nisina é um polipeptídeo que, adicionada à solução formadora de película, pode diminuir as interações intermoleculares e aumentar a repulsão eletrostática entre nisina e componentes da matriz e, assim, aumentar a TPVA do filme.

Em contraste, Imran *et al.* (2010) avaliaram o efeito da adição de nisina (1000 UI/mL) em filme de HPMC na propriedade de barreira ao vapor de água e verificaram que a nisina, na concentração avaliada, não interferiu de forma significativa na TPVA. Resa *et al.* (2014) observaram o mesmo comportamento, ou seja, a nisina (0,204 g/100 g), não interferiu de forma significativa na propriedade de barreira do filme de amido. Apesar disso, os valores médios da TPVA nos dois trabalhos foram superiores para os filmes incorporados com nisina quando comparado ao controle, indicando uma tendência no aumento da TPVA.

As concentrações elevadas de nisina no polímero tendem a diminuir a propriedade de barreira do filme de metil celulose, o que torna importante encontrar alternativas para minimizar o efeito da nisina na propriedade de barreira do filme de forma a obter um filme com boa capacidade antimicrobiana, sem comprometimento de suas características de barreira.

### **3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura**

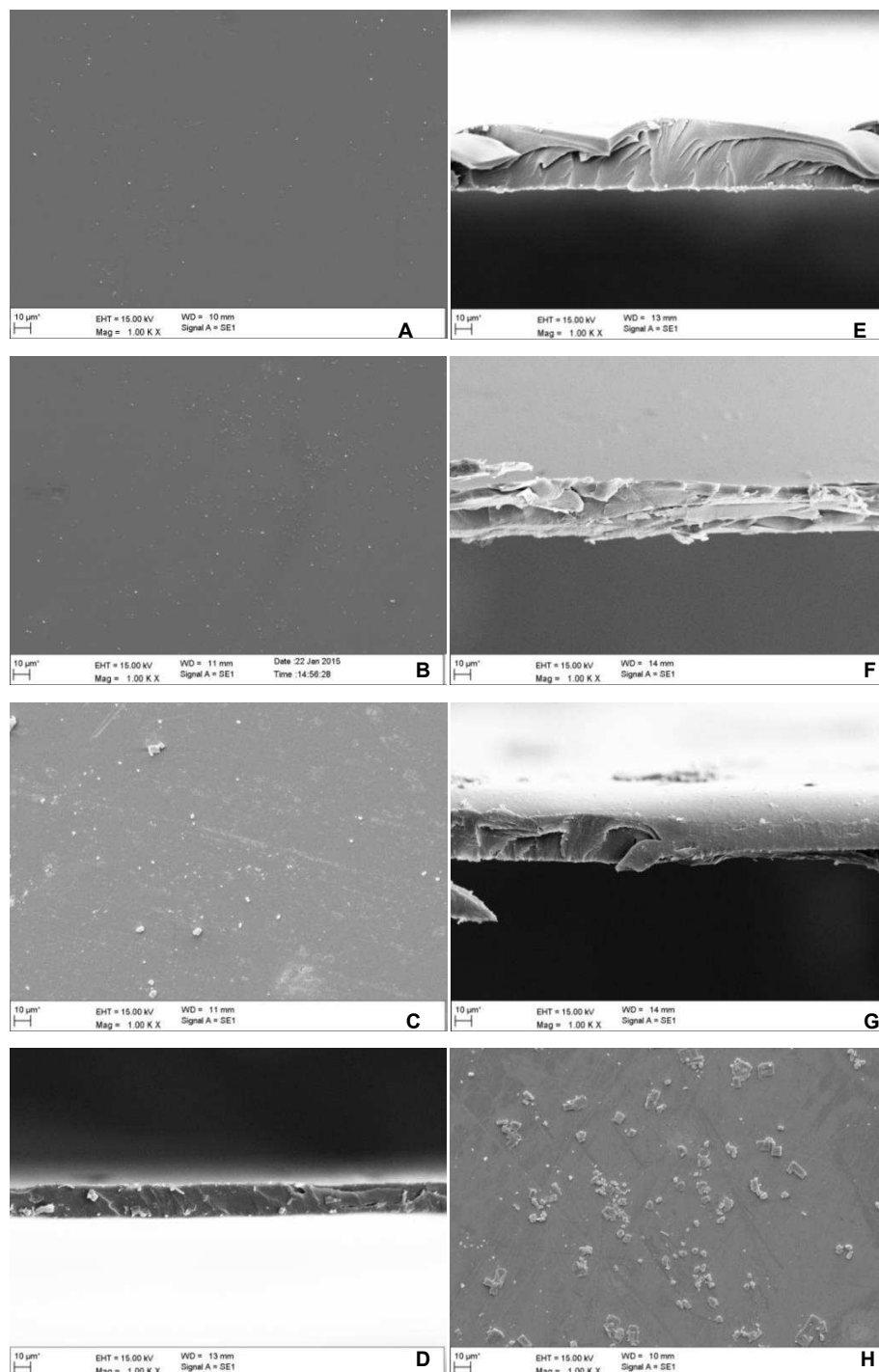
Observando a micrografia do filme de MC, percebeu-se a presença de grânulos brancos na superfície do filme indicando a presença de resina polimérica que não foi completamente solubilizada e este fato está relacionado ao processo de produção do filme. Apesar disso, o filme de MC apresentou-se compacto, sem presença de poros e fissuras, como pode ser verificado na imagem do corte transversal do filme de MC. O filme adicionado de 1% de nisina, apresentou micrografia similar ao filme de MC (Figura 30 A e B).

Avaliando-se as imagens de superfície obtidas no microscópio eletrônico de varredura dos filmes de MC incorporado com nisina em concentrações de 5 e 10%, observou-se que a nisina apresentou baixa solubilidade na matriz, apresentando partículas grandes na superfície do filme, indicado uma distribuição heterogênea da nisina na superfície do filme como pode ser percebido na Figura 30. Este ocorrido pode estar relacionado à característica hidrofóbica da nisina e ao pH (4,6) utilizado para tentar facilitar a solubilização da nisina no polímero

A presença da nisina sobre a superfície revela uma interação fraca entre o antimicrobiano e a matriz polimérica que pode comprometer a integridade da superfície microscópica. Também foi possível observar, por meio do corte transversal, a presença da nisina no interior do polímero se situando entre as cadeias, podendo aumentar o espaçamento entre elas. Esta observação está correlacionada às propriedades de barreira e de tração. A formação de agregados pode enfraquecer a matriz polimérica, aumentando a taxa de permeabilidade ao vapor de água e diminuindo a resistência à tração do filme de MC.

Bastarrachea *et al.* (2010) observaram, por meio da MEV, que adição de nisina em filme de PBAT provocou modificação da superfície do filme devido à formação de aglomerados de nisina que levou à formação de poros na matriz polimérica, influenciando nas propriedades mecânica e de barreira do filme

produzido conforme identificado pela MFA. De acordo com Linssen*et. al.* (2003), a separação das cadeias do polímero pode levar à formação dos poros numa matriz polimérica.



**Figura 30:** Filmes de MC incorporados com nisina: 0% (A); 1% (B); 5% (C) e 10% (D) (superfície) e 0% (E); 1% (F); 5% (G) e 10% (H) (corte transversal) (1000 X).

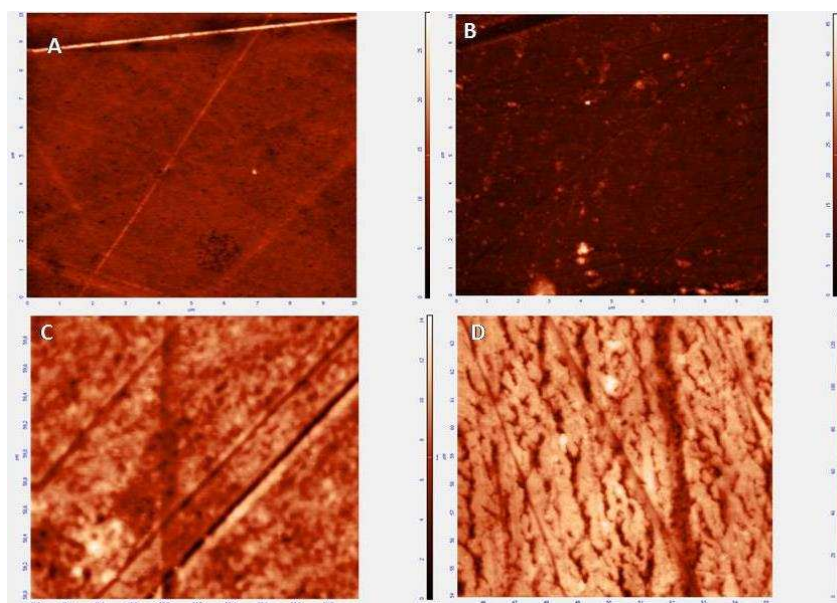
Santiago *et al.*(2009) verificaram que adição de pediocina (bacteriocina) em filme de acetato de celulose provocou modificação na superfície do filme de acetato tornando a superfície do filme mais áspera devido à baixa solubilidade da pediocina no filme, assim como observado no presente trabalho.

Já Imran,*et. al.* (2013) produziram filmes de HPMC, quitosana, caseinato de sódio e PLA adicionado de nisina ( $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , correspondente a  $0,137\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$  de área do filme) que se apresentou distribuída de forma homogênea e boa solubilização na matriz polimérica, apesar de, no filme de HPMC, apresentar pequenos agregados de nisina. O que pode estar relacionado à concentração de nisina adicionada que é inferior à dosagem utilizada no presente trabalho.

Quanto maior a concentração de nisina maior foi a presença de grandes partículas de nisina tanto na superfície quanto no interior do polímero, interferindo significativamente ( $p<0,05$ ) nas propriedades mecânicas e barreira do filme.

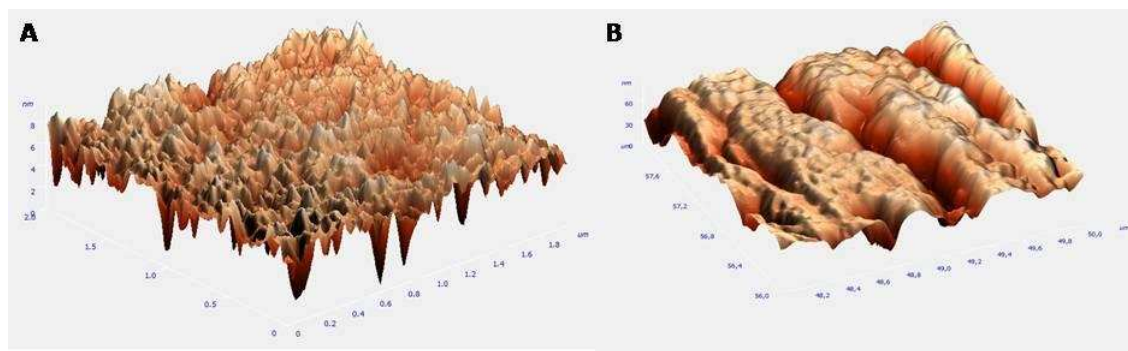
### 3.2.8. Microscopia de Força Atômica

Percebeu o aparecimento de regiões mais claras nos filme adicionados com nisina, devido à presença de nisina aglomerada na superfície do filme indicando baixa miscibilidade na matriz polimérica (Figura 31).O mesmo comportamento foi comprovado pela análise de MEV (Figura 30).



**Figura 31:**Fotomicrografias em 2D dos filme de MC incorporados com 0%,1%, 5% e 10% de nisina.(10 x 10  $\mu\text{m}$ ).

No filme com 10% de nisina houve aparecimento de “buracos” denominados por alguns autores como “crateras” (Espitia *et al.*, 2013) quando comparado ao filme de MC (Figura 32).



**Figura 32:** Fotomicrografias em 3D do filme de MC (A) e filmes de MC adicionado de nisina a 10% (B) (2 x 2  $\mu\text{m}$ ).

Espitia *et al.* (2013) verificaram que a adição de 50% de pediocina, em filme de metil celulose levou à formação de poros na superfície do filme. De acordo com Espinoza-Herrera *et al.* (2011), a formação dos poros na matriz polimérica é provavelmente devido à menor transferência de massa durante a evaporação do solvente levando a uma secagem mais lenta.

Observou-se que adição de nisina provocou um aumento na rugosidade dos filmes (Tabela 8). Outros já estudos indicaram que a nisina provoca alteração na rugosidade da superfície de polímeros. Ollé Resa *et al.* (2014) observaram este comportamento em filme de amido. La Stória *et al.* (2008) também observaram um aumento considerável na rugosidade na superfície de filmes de polietileno com a presença de nisina.

**Tabela 8:** Rugosidade (Ra) dos filmes de MC incorporados com 0%, 1%, 5% e 10% de nisina. (2x2  $\mu\text{m}$ ).

Filme de MC incorporado com NS (%)	Ra (nm)
0	0,74
1	1,26
5	2,3
10	12,87

A nisina alterou a integridade da superfície do filme de metil celulose, levando a um aumento na rugosidade da superfície e na formação de poro, esta característica está relacionada com as propriedades mecânicas e de barreira conforme já discutida no item de avaliação de propriedades mecânicas e taxa de permeabilidade ao vapor de água de filme de MC incorporado com nisina.

### 3.2.9. Propriedades ópticas

A avaliação da cor de filmes é uma característica importante já que, no momento da aquisição, os consumidores são atraídos pela aparência externa do alimento. A Tabela 9 apresenta os parâmetros de cor. Observou-se que com a adição de nisina (5 e 10% m/m) no filme de MC houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros  $b^*$ , índice de amarelamento e transmitância quando comparado ao filme de MC sem adição de nisina. Já a concentração de 1%(m/m) de nisina não influenciou em nenhum dos parâmetros avaliados. Esse fenômeno pode ser atribuído à própria cor do agente antimicrobiano incorporado ao filme, já que a nisina apresenta coloração tendendo ao amarelo.

Flores *et al.* (2010) relataram que a adição de nisina em filmes fabricados a partir de amido de tapioca provocou aumento no valor de  $b^*$  de 4 a 12 unidades, e diminuiu o valor de  $L^*$  de 86 para 79 quando comparado ao filme sem conservante. Porém, no presente trabalho, a nisina não provocou alteração na luminosidade dos filmes. Baschet *et al.* (2013) também observaram que a adição de nisina provoca alteração no parâmetro  $b^*$  do filme de amido.

Ollé Resa *et al.* (2014) observaram que adição de nisina também proporcionou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no valor dos parâmetros  $b^*$  e YI de 2,94 para 7,36 e de 5,04 para 13,85, respectivamente. Portanto, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os dos estudos relatados sobre a influência da adição de nisina em filmes.

Sivaroban *et al.* (2008) avaliaram o efeito da adição de nisina (10000 IU/g) em filme obtido de proteína de soja. A adição de nisina não influenciou na cor do filme, não sendo identificada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  quando comparado ao filme sem antimicrobiano. Isto sugere que a influência

na coloração do filmes pela adição de nisina também está relacionado à concentração utilizada.

**Tabela 9:**Valores médios das coordenadas cor L\*e b\* e valores médios de índice de amarelamento (YI E313) e transparência dos filmes de metil celulose (MC) incorporados com nisina nas concentrações de 0, 1, 5 e 10%.

Filme com Nisina (%)	Parâmetros de cor			Transmitância (500 nm)
	L*	b*	YI	
0	93,09 ± 0,62 a	1,06 ± 0,02 a	1,19 ± 0,06a	90,32 ± 0,87 a
1	93,04 ± 1,31 a	1,23 ± 0,25 a	1,34 ± 0,06 a	90,34 ± 0,34 a
5	93,70 ± 0,11 a	1,69 ± 0,17 b	2,53 ± 0,30 b	84,11 ± 0,98 b
10	93,16 ± 0,26 a	2,40 ± 0,25 b	4,55 ± 0,23 b	71,43 ± 2,74 b

\*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem do controle pelo teste de Dunnet ao nível de 5% de significância.

A adição de nisina (5 e 10%) diminuiu a transparência do filme de 90,32 para 84,11e de 90,33 para 71,43, respectivamente, quando comparado ao filme de MC,de forma significativa ( $p < 0,05$ ). A diminuição da transparência pode ser atribuída à concentração de nisina adicionada ao filme e pode estar relacionada com à baixa miscibilidade da nisina na matriz de MC e, que devido à formação de aglomerados diminui a passagem de luz pelo filme.Imran *et al.*, (2010) também verificou que a adição de nisina provocou redução na transparência do filme de HPMC de forma significativa ( $p < 0,05$ ).

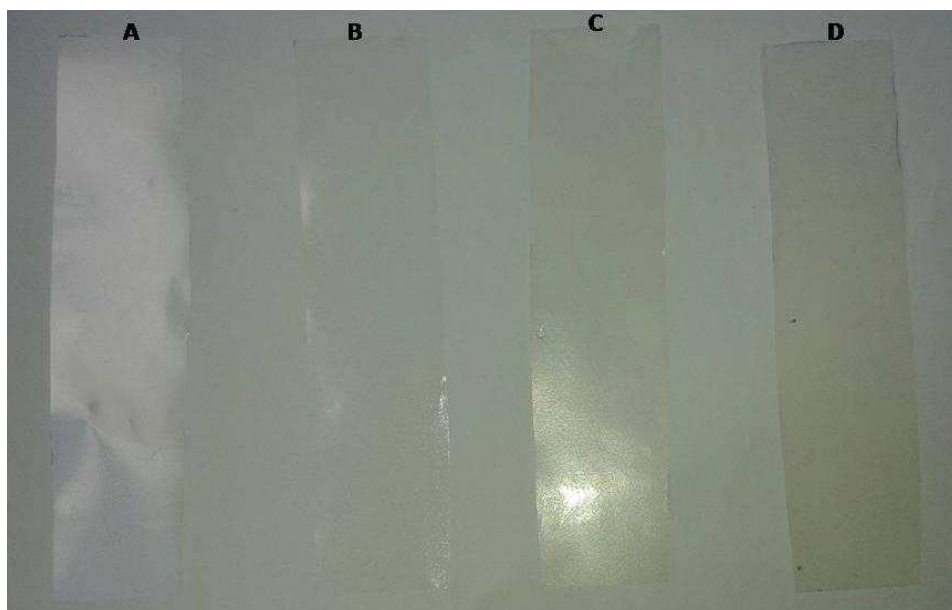
### 3.3. FILME DE METIL CELULOSE INCORPORADO COM NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA E NISINA

#### 3.3.1. Desenvolvimento do filme

Baseado nos resultados obtidos no item 3.1. e 3.2 deste capítulo, o melhor tratamento do filme de MC incorporado com NPQ (5% m/m) e filme incorporado com nisina(10%) foram selecionados com a finalidade de obter um filme ativo antimicrobiano reforçado com NPQ. Apesar do filme de MC com 10% de nisina ter apresentado melhor atividade antimicrobiana sobre *Listeria* e *S.aureus*, o mesmo influenciou negativamente nas propriedades mecânicas e de barreira do filme de MC.

Para a avaliação do efeito em conjunto, os filme com NPQ (5%) e NS (10%) foram comparados ao filme de MC sem aditivo, ao filme de MC com NPQ a 5% e ao filme de MC com NS a 10%.

O filme com a mistura apresentou-se similar ao filme com 10% de nisina, sendo possível perceber visualmente a presença da nisina, indicando que a nisina apresentou maior relevância na apresentação do filme (Figura 33).



**Figura 33:** Filmes produzidos: MC (A), MC incorporado com 5% de NPQ (B), MC com 10% de nisina(C) e MC com 5% de NPQ e 10% de nisina(D).

### 3.3.1. Espessura

A mistura de 5% de NPQ e 10% de nisina provocou aumento no valor médio na espessura dos filmes de MC,  $51,7 \pm 15 \mu\text{m}$ . No entanto, não diferiu dos demais tratamentos pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes adicionado com NPQ e Nisina

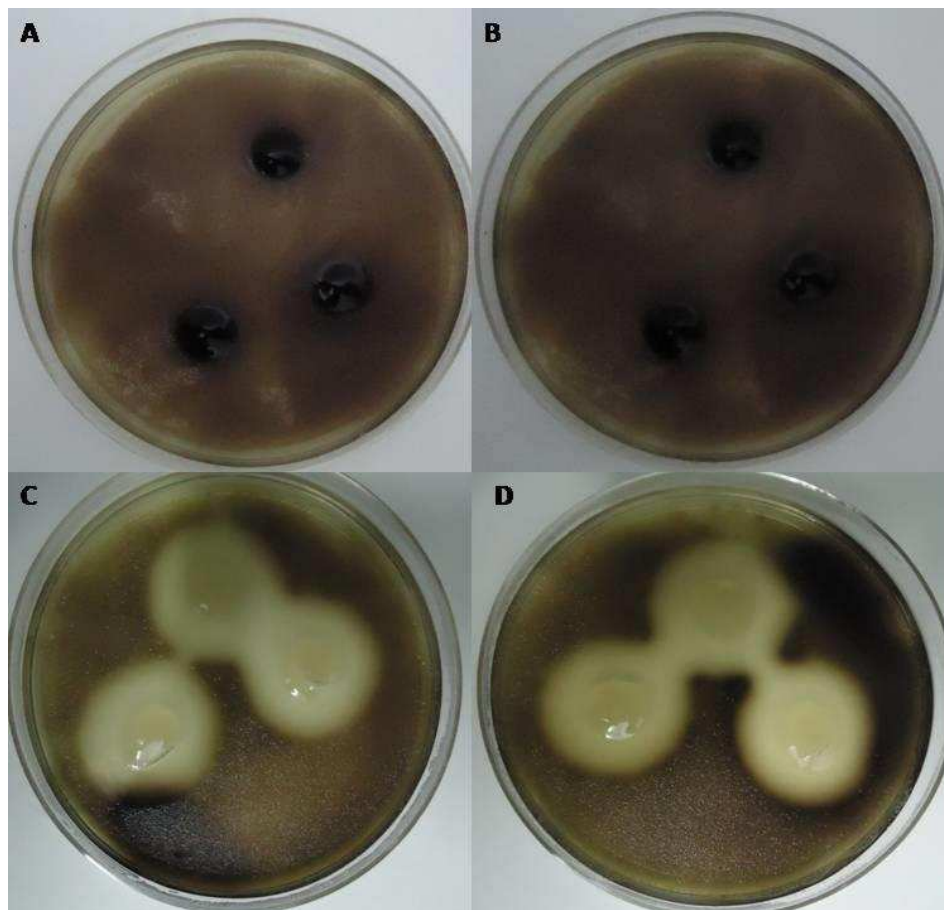
De acordo com a Tabela 10 verificou-se que o filme adicionado com a mistura de NPQ (5%) e NS (10%) apresentou aumento no valor médio do diâmetro do halo de 1,57 para 1,7 e 1,8 para 2,14 cm, para *Listeria* e *S. aureus*, respectivamente, quando comparado ao filme de MC com 10% de nisina. No entanto, a mistura não diferiu de forma significativa ( $P < 0,05$ ) do filme de MC com 10% de nisina, indicando

que não houve efeito sinérgico entre a nisina e NPQ na ação antimicrobiana (Figura 34 e 35).

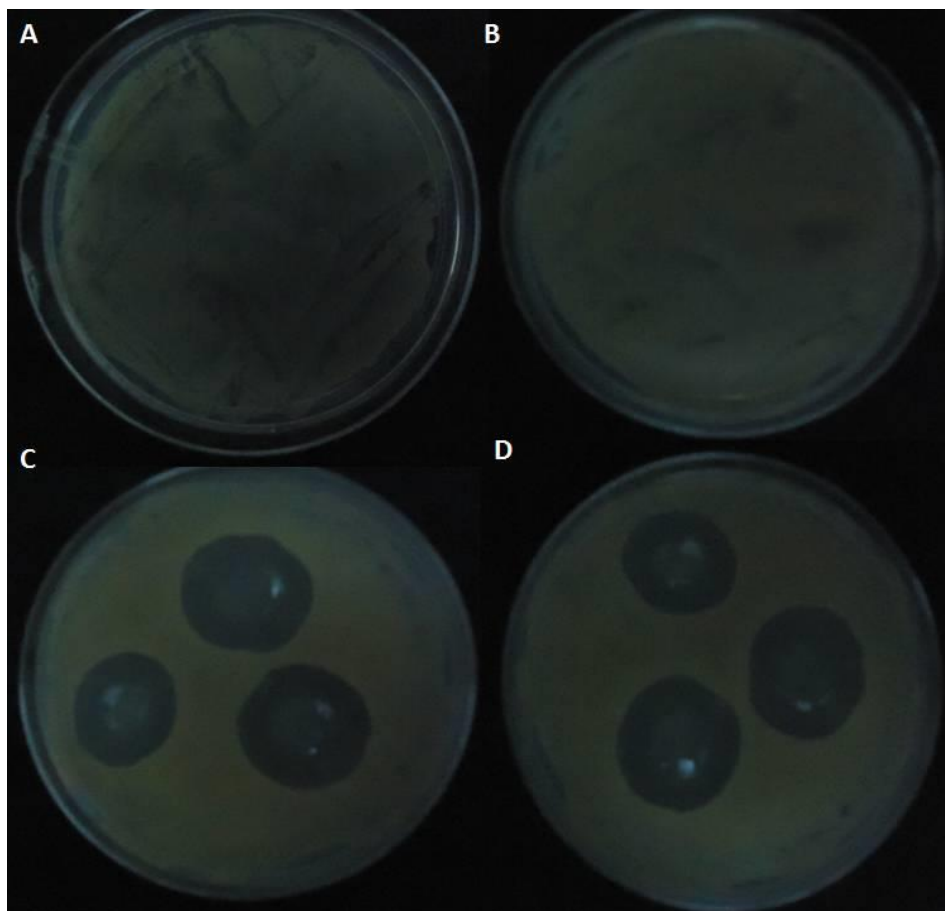
**Tabela 10:** Diâmetro médio dos halos de inibição para *Listeria* e *S.aureus*.

Tratamentos	Diâmetro (cm)	
	<i>Listeria</i>	<i>S.aureus</i>
MC	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
MC com 5% de NPQ	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
MC com 10% de NS	1,85 ± 0,34 b	1,70 ± 0,24 b
MC com 5% de NPQ e 10% de NS	1,86 ± 0,44b	1,73 ± 0,44 b

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de tukey ( $p > 0,05$ ).



**Figura 34:** Formação de halos de inibição de *Listeria monocytogenes* pelos filmes de MC (A); MC incorporado com 5% de NPQ (B); MC com 10% de nisina (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de nisina (D).



**Figura 35:** Formação de halos de inibição de *Staphylococcus aureus* pelos filmes de MC (A); MC incorporado com 5% de NPQ (B); MC com 10% de nisina (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de nisina (D).

Verificou-se que o filme de MC com 5% de NPQ não apresentou atividade antimicrobiana sobre as bactérias analisadas. Sendo assim a atividade antimicrobiana do filme MC com 5% de NPQ e 10% de nisina foi atribuída à atividade antimicrobiana da nisina.

### 3.3.3. Propriedades mecânicas e TPVA

O filme de MC produzido com a mistura de 5 % de NPQ e 10% de nisina não diferiu do filme de MC, significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey quanto à resistência mecânica e ao módulo de elasticidade e a alongamento. Os resultados indicaram que a resistência mecânica do filme com a mistura foi inferior ao filme de MC e ao filme com 5% de NPQ, enquanto apresentou melhoria em relação ao filme com 10% de nisina indicando que a NPQ influenciou no aumento desta propriedade no filme com NPQ e NIS. No entanto, percebe-se que os valores de resistência à

tração do filme com a mistura foram inferiores a resistência à tração do filme de MC com NPQ, sugerindo que a nisina teve maior influência sobre a propriedade mecânica do filme do que a NPQ (Tabela 11).

**Tabela 11:** Propriedades físico-mecânicas (resistência à tração, alongamento e módulo de elasticidade e TPVA) do filme MC filme de MC incorporados com NPQ a 5%, MC com nisina a 10% e filme de MC com NPQ 5% e NS10%.

Filmes	Resistência a tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)	TPVA ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ )
MC	57,34 ± 5,88 a	15,04 ± 2,83 a	2168,90 ± 128,18 a	139,48 ± 8,03 a
MC com 5% de NPQ	74,67 ± 4,40 b	9,15 ± 3,73 b	2482,17 ± 118,70 b	123,80 ± 8,20 ab
MC com 10% de NS	39,50 ± 7,25 c	20,54 ± 2,52 c	1610,79 ± 192,25 c	156,13 ± 13,60 c
MC com 5% de NPQ e NS 10%	58,42 ± 3,81 a	14,60 ± 2,44 a	2077,97 ± 118,40 a	147,12 ± 10,74 b

\*Letras iguais em uma mesma coluna não diferem entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

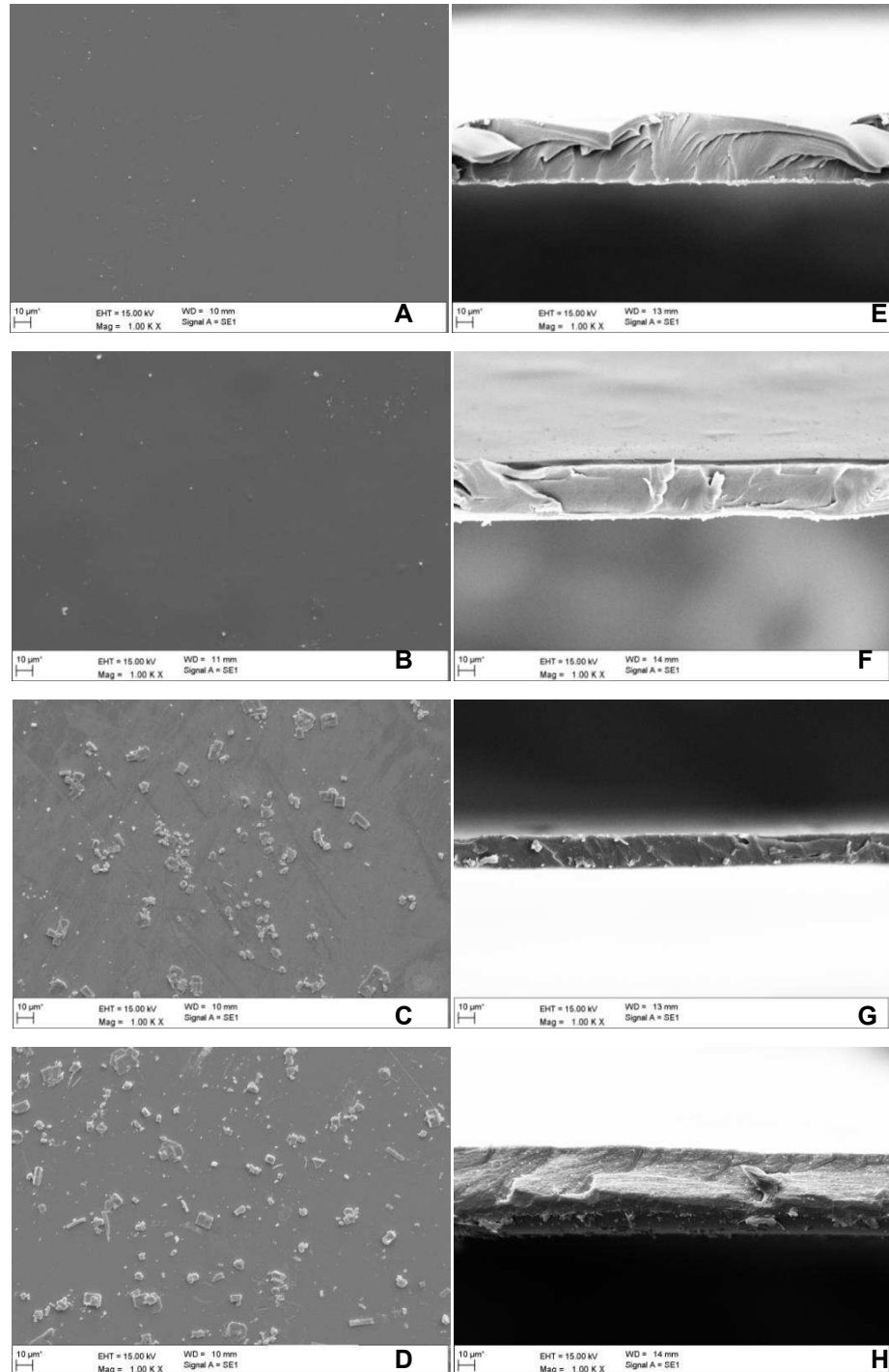
O mesmo comportamento foi verificado para a propriedade de barreira do filme. O filme com a mistura de NPQ e NIS não diferiu do filme de MC e apresentou taxa de permeabilidade menor do que o filme com 10% de NS (Tabela 11).

### 3.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura e Força atômica

De acordo com as imagens obtidas observou-se que a superfície dos filmes com a mistura de NIS 10% e NPQ 5% e o filme de MC com 10% de nisina apresentaram-se similares, com presença de nisina na superfície, indicando que a nisina também apresentou baixa solubilidade nos filme de MC quando misturado com 5% de NPQ (Figura 36). A presença da nisina sobre a superfície revela uma interação fraca entre o antimicrobiano e a matriz polimérica o que pode comprometer a integridade da superfície microscópica.

Na avaliação do corte transversal dos filmes (Figura 36, E-H) também se verificou a presença da nisina distribuída no interior do filme com a mistura (NPQ e NS) situando-se entre as camadas da matriz, assim como nos filmes de MC com 10% de NIS. Entretanto a imagem indica que a nisina apresentou-se menos aglomerada no interior do polímero, apresentando melhor distribuição, podendo indicar que as NPs proporcionaram maior estabilidade da nisina no interior do polímero, evitando a formação de grandes aglomerados de nisina que pode estar

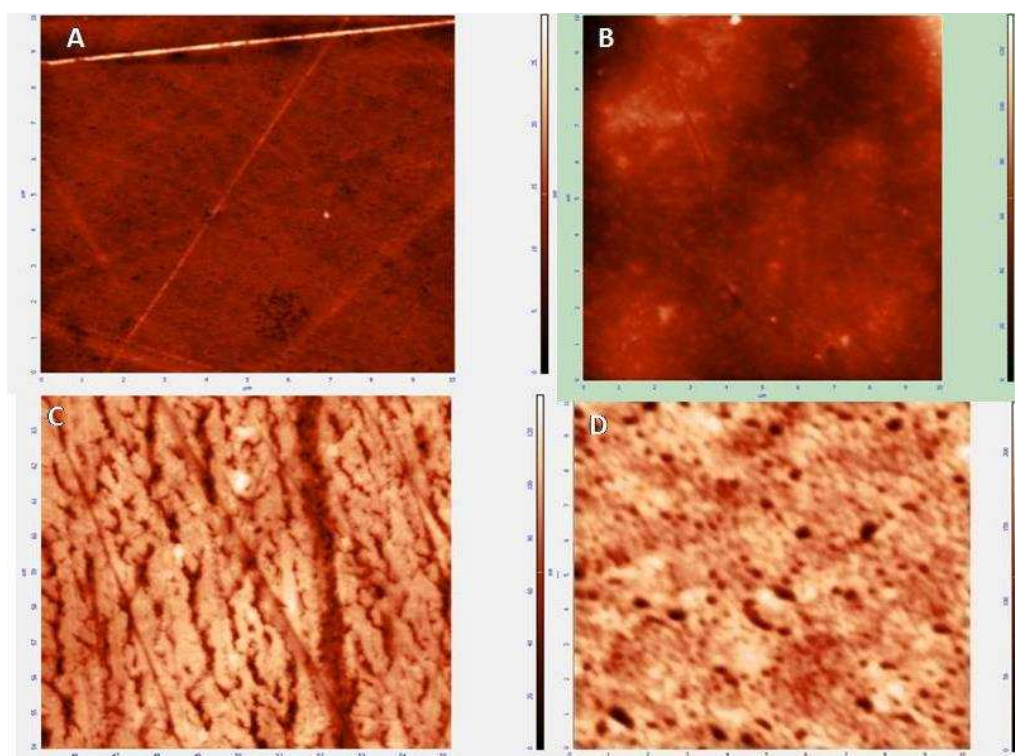
relacionada à melhoria na resistência mecânica e de barreira obtida relação ao filme com NIS 10%.



**Figura 36:** Fotomicrografias do Filmes de MC (A); MC incorporado com 5% de NPQ (B); MC com 10% NS (C) e MC com 5% de NPQ e 10% de NS (D) (superfície) e filmes de MC (E); MC incorporado com 5% de NPQ (F); MC com 10% NS (G) e MC com 5% de NPQ e 10% de NS (H) (corte transversal). (1000X).

Verificou-se que no filme com a mistura de NPQ e NS não houve presença de NPQ aglomeradas, sugerindo que as mesmas estão distribuídas no interior do polímero, podendo indicar que a nisina não desestabilizou as NPQ no polímero. No entanto, a influência nas propriedades mecânica e de barreira do filme foi maior do que a das NPQ, o que está relacionado com a baixa miscibilidade da nisina no polímero.

A análise por MFA (Figura 37) confirma a descrição obtida por MEV na qual, o filme com a mistura de NS e NPQ revelou topografia bem similar ao filme com nisina 10% e apresentando-se bem diferente do filme de MC e filme de MC com 5% de NPQ. Tal fenômeno sugere que o aumento no valor médio de resistência mecânica e diminuição no valor de TPVA do filme ativo com a mistura de 10% de nisina 5% de NPQ quando comparado ao filme ativo com nisina a 10% foi proporcionado pela forma com que as NPQs estão distribuídas no interior do polímero e como esta influencia na distribuição da nisina no interior da matriz.



**Figura 37:**Topografia em 2D dos filmes MC (A), e filme de MC incorporado com 5% de NPQ (B), filme de MC com 10% de NS(C) e MC com 5% de NPQ e10% e NS (D) (10 x 10  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.5. Propriedades ópticas

O filme produzido com a mistura NS e NPQ proporcionou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no valor de  $b^*$  e no índice de amarelamento (YI) quando comparados aos demais tratamentos indicando um efeito conjunto dos aditivos adicionados, uma vez que tanto a nisina quanto a quitosana apresentam cor natural tendendo ao amarelo. O filme com a mistura de NPQ e NS apresentou o dobro do valor da coordenada  $b^*$  quando comparado ao filme de MC com cada aditivo separadamente.

**Tabela 12:** Valores médios das coordenadas cor  $L^*$  e  $b^*$  e valores médios de índice de amarelamento (YI E313) e transparência dos filmes de metil celulose (MC), MC incorporado com 5% de NPQ, MC com 10% de NS e MC com 5% de NPQ e 10% de NS.

Tratamentos	Parâmetros de cor			Transmitância (500 nm)
	$L^*$	$b^*$	YI	
MC	93,09 ± 0,62 a	1,07 ± 0,02 a	1,16 ± 0,04 a	89,32 ± 0,87 a
MC com 5% de NPQ	93,21 ± 0,36 a	2,06 ± 0,11 a	3,26 ± 0,18 b	89,89 ± 0,18 a
MC com 10% de NS	93,16 ± 0,26 a	2,40 ± 0,25 a	4,55 ± 0,25 c	71,43 ± 2,70 b
MC com 5% de NPQ e 10% de NS	92,61 ± 0,38 a	4,83 ± 2,39 b	6,17 ± 0,92 d	71,64 ± 2,22 b

\*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Quanto à transmitância, observou-se que o filme com a mistura (NPQ+NS), não diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do filme ativo com 10% de nisina, apresentando uma redução na transparência do filme, indicando que as NPs não interferiram na transparência deste filme, sendo então o efeito da nisina mais relevante nas propriedades de transparência do filme.

#### 4. CONCLUSÃO

O filme bio-nanocompósito de metil celulose com nanopartículas de quitosana foi produzido com sucesso.

A imagem de MFA revelou que as NPQ apresentaram tamanho do diâmetro variando de 100 a 200 nm na superfície do filme.

O aumento da concentração de NPQ no filme MC proporcionou melhoria na sua barreira ao vapor de água, bem como a resistência à tração e módulo de elasticidade. O estudo indicou que a adição de 5% de NPQ foi a concentração que obteve melhor efeito nas propriedades físico mecânicas do filme de MC.

Desta forma, o estudo de nanopartículas de quitosana pode melhorar a funcionalidade de biopolímeros biodegradáveis para aplicações em alimentos.

O filme ativo antimicrobiano incorporado com 1, 5 e 10% de nisina apresentaram atividade *in vitro* sobre *S. aureus* e *Listeria*, sendo que a adição de 10% de nisina apresentou maior atividade antimicrobiana, apresentando-se como uma boa opção como embalagem ativa para alimentos.

As imagens de MEV e MFA demonstraram que a nisina apresentou baixa miscibilidade no polímero de MC apresentando tamanho macroscópico na superfície do filme.

Observou-se que o aumento da concentração de nisina no filme de MC melhorou significativamente a capacidade de estiramento do filme, mas alterou de forma adversa a resistência à tração e permeabilidade do polímero.

O filme de MC produzido com 10% de nisina e 5% de NPQ apresentou resistência à tração e TPVA inferiores ao filme de MC com NPQ a 5%. No entanto apresentaram melhoria destas propriedades quando comparado ao filme ativo somente com 10% nisina e não apresentaram diferença em relação ao filme de MC. Assim, a adição conjunta de NPQ (5%) e nisina (10%) proporcionou melhoria no filme ativo.

O filme nanocompósito ativo produzido apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *S. aureus* e *Listeria*. Desta forma referido filme apresentou-se promissor para estender a vida de prateleira e assegurar a segurança microbiana dos alimentos.

## CONCLUSÕES GERAIS

As nanopartículas de quitosana foram produzidas pelo método de gelificação iônica com sucesso.

A melhor razão de massa de QT:TPP que proporcionou o menor tamanho do diâmetro das NPQ foi a de 3:1, utilizando concentração de QT a  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e TPP a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , obtendo tamanho médio de  $284,7 \pm 24,3 \text{ nm}$  e valor do potencial zeta com carga positiva de  $36,3 \pm 3,6 \text{ mV}$ .

As micrografias de MFA indicaram que as NPs apresentam forma esférica. e tamanho médio variando de 40 a 80 nm e altura cerca de 20 a 30 nm

As nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana superior à atividade da quitosana sobre *S.aureus* e *E.coli*.

O filme bio-nanocompósito de metil celulose com nanopartículas de quitosana foi produzido com sucesso.

A imagem de MFA revelou que as NPQ apresentaram tamanho do diâmetro variando de 100 a 200 nm na superfície do filme, confirmando a produção do filme nanocompósito.

O aumento da concentração de NPQ no filme MC proporcionou melhoria na sua barreira ao vapor de água, bem como a resistência à tração e no módulo de elasticidade. O estudo indicou que a adição de 5% de NPQ foi a concentração que obteve melhor efeito nas propriedades físico mecânicas do filme de MC.

O filme de MC com 10% de nisina apresentou maior atividade antimicrobiana atividade *in vitro* sobre *S. aureus* e *Listeria*.

Observou-se que o aumento da concentração de nisina no filme de MC melhorou significativamente a capacidade de estiramento do filme, mas alterou de forma adversa a resistência à tração e permeabilidade do polímero.

O filme de MC produzido com 10% de nisina e 5% de NPQ apresentou resistência à tração e TPVA inferiores ao filme MC com NPQ a 5%. No entanto, apresentaram melhoria destas propriedades quando comparado ao filme ativo somente com 10% de nisina. Assim, a adição conjunta de NPQ (5%) e de nisina (10%) proporcionou melhoria no filme ativo. Desta forma apresentou-se promissor para estender a vida de prateleira e assegurar a segurança microbiana dos alimentos.

O estudo demonstrou que as NPQ produzidas apresentaram aplicação na melhoria das propriedades físico-mecânicas do filme de metilcelulose, revelando ser promissoras para aplicação em outros tipos de matérias poliméricas biodegradáveis de fonte renovável.

Conclui-se, portanto, que os filmes bionanocompósito ativo produzidos apresentam potencial para estender a vida de prateleira dos alimentos e sugere-se, em estudos futuros a aplicação do mesmo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEN, R. **Novel Food Packaging Techniques**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003. 590p.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 4, p. 566-574, 2009.

ALMEIDA, G. W. R. **Desenvolvimento e caracterização de filme nanocompósito de base celulósica e sua avaliação como embalagem ativa antimicrobiana**. 2010. 97 f. Dissertação (título de Magister Scientiae)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard terminology relating to plastics**: ASTM D883-00. Philadelphia, 2000.

ANTONIOU, J. F. L., MAJEED, H., QI, J., YOKOYAMA, W., ZHONG, F. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 465, p. 137-146, 2015.

ARAUZ, L., JOZALA, A. F., MAZZOLA, P. G., VESSONI PENNA, T. C. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends Food Science Technology**, v. 20, p.146, 2009.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Tensile Properties Thin Plastic Sheeting**, D882-09 Philadelphia: ASTM, p. 11, 2009a.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for water vapor transmission of materials**. E 96/E 96 M - 05. Philadelphia: ASTM, p. 11, 2010.

AVILA-SOSA, R., PALOU, E., JIMÉNEZ MUNGUÍA, M. T., NEVÁREZ MOORILLÓN, G. V.; NAVARRO CRUZ, A. R., LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1531, n. 1-2, p. 66-72, 2012.

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

AZEREDO, H., MATTOSO, L. H. C., AVENA-BUSTILLOS, R. J., MUNFORD, M. L., WOOD, D., & MCHUGH, T. H. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. **Journal of Food Science**, v. 75, N1 e N2 2010.

BARBOSA, A. T., ARAÚJO, H. G. S., MATOS, P. N., CARNELOSSI, M. A. G., CASTRO, A. A. Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, p. 135-140, 2013.

BASCH, C. Y., ROSA J. J. A., FLORES, S. K. Physical and Antimicrobial Properties of Tapioca Starch-HPMC Edible Films Incorporated with Nisin and/or Potassium Sorbate. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2419–2428, 2013.

BASTARRACHEA, L., DHAWAN, S., SABLANI, S., HYUNGMAH, J., KANG, D., ZHANG, J., TANG. J. Biodegradable Poly (butylenesadipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v.75, p.E215-224, 2010.

BAYER, R.; KNARR M. Thermal precipitation or gelling behaviour of dissolved methylcellulose (MC) derivatives—Behaviour in water and influence on the extrusion of ceramic pastes. Part 1: Fundamentals of MC-derivatives. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, p.1007–1018, 2013.

BIE, P., LIU, P., YU, L., LI, X., CHEN, L., XIE, F. The properties of antimicrobial films derived from poly (lactic acid)/starch/chitosan blended matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 959– 966, 2013.

BLANCO, M. A. **avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico ah plus™**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de pós-graduação e pesquisa de engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

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

BODNAR, M.; HARTMANN, J.; BORDELY, J. Synthesis and study of cross-linked chitosan-N-poly (ethylene glycol) nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3030–3036, 2006.

BODVIK, R., DEDINAITEA, A., KARLSONB, L., BERGSTRÖMA, M., BÄVERBÄCKC, P., PEDERSENC, J. S., EDWARDSK, K., KARLSSOND, G. I.V., CLAESS, E. P .M. Aggregation and network formation of aqueous methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 354, p.162–171, 2010.

BREUKINK E., VAN HEUSDEN, H.E., VOLLMERHAUS, P.J., SWIEZEWSKA, E., BRUNNER L., WALKER S. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. **JOURNAL. Biology Chemistry**, v. 278, p. 19898–19903, 2003.

BREWER, R., ADAMS, M.R., PARK, S.F. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* nisin in the presence of ethanol. **Letters Applied Microbiology**, v. 34, p. 18- 21, 2002.

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

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L. & ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Journal of Applied Polymer Science**, v.125, p. 125-132, 1997.

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) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 81, 2009.

CAMILLOTO, G. P.; PIRES, A, C. S.; SOARES, N. F. F.; ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, S. O. Effect of active packaging incorporated with triclosan on bacteria adhesion. **Journal of Food Science**, v. 75; N. p.8, 2010.

CAO-HOANG, L., CHAINE, A., GRÉGOIRE, L., WACHÉ, Y. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. **Food Microbiology**, v. 27.p. 940-944, 2010.

CHA, D. S., COOKSEY, K., CHINNAN, M. S., PARK, H. J. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. **LWT – Food Science and Technology**, v. 36, p. 209–213, 2003.

CHANG, P. R. JIAN, R., YU, J., MA, X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starchcomposites. **Food Chemistry**, v. 120 p. 736–740, 2010.

CHANTARASATAPORN, P.; TEPKASIKUL, P.; KINGCHA, Y.; YOKSAN, R.; PICHYANGKURA, R.; VISESSANGUAN, W.; CHIRACHANCHAI, S.; Water-based oligochitosan and nanowhisler chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. **Food Chemistry**, v. 159, p. 463–470, 2014.

CHAUDHRY, Q., CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p.595-603, 2011.

CHEN, S. P., WU, G. Z., LONG, D. W., LIU, Y. D. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Ca<sub>3</sub>V<sub>10</sub>O<sub>28</sub> complex membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 92–97, 2006.

CHOLLET, E., SEBTI, I., MARTIAL-GROS, A., DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes

influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982-989, 2008.

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

COMA, V., SEBTI, I., PARDON, P., DESCHAMPS, A., PICHAVANT, F.H. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **Journal Food Protein**, v. 64, p. 470-475, 2001.

CRUZ-ROMERO, M. C.; MURPHY, T.; MORRIS, E.; KERRY, J. P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 393-397, 2013.

DEBEAUFORT, F., VOILLEY, A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: 2. Mechanical and Thermal Properties as a Function of Plasticizer Content. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p. 685-689, 1997.

DHAR, N.; AKHLAGHI, S. P.; TAM, K. C. Biodegradable and biocompatible polyampholyte microgels derived from chitosan, carboxymethyl cellulose and modified methyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 101-109, 2012.

DONG, Y., NG, W. K., SHEN, S., KIM, S., TAN, R. B. H. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 940– 945, 2013.

DOULABI, A.H., MIRZADEH, H., IMANI, M., SAMADI, N. Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: physical and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 48–56, 2013.

ELSABEE, M. A. ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 1819–1841, 2013.

ESPINOZA-HERRERA, N., PEDROZA-ISLAS, R., SAN MARTÍN-MARTINEZ, E., CRUZ-OREA, A., & TOMÁS, S. Thermal, mechanical and microstructures properties of cellulose derivatives films: A comparative study. **Food Biophysics**, v. 6, p.106-114, 2011.

ESPITIA, P. J. P; SOARES, N. F. F; TEÓFILO, R. F; COIMBRA, J. S. R; VITOR, D. M; BATISTA, R. A; FERREIRA, S. O; ANDRADE, N. J; MEDEIROS, E. A. A. Physical–mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 199–208 2013.

FABREGAS, A.; MINÁRRO, M.; MONTOYA, E. G.; LAZANO, P. P.; CARRILLO, C.; SARRATE, R.; SANCHEZ, N.; TICO, J. R.; NEGRE, J. M. S. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method

to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, p. 199–204, 2013.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21-27, 2012.

FDA (Food Drug Administration) Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient Fed Regist, v. 53, p.11247–11251, 1998.

FERNANDES, A.; MORAIS, S.; ARAÚJO, A.; SANTOS, D.; The influence of oxidative degradation on the preparation of chitosan. **Colloid Polymers Science**, v. 284, p. 1-9, 2005.

FERNANDES, M. F. M., FILGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2205-2213, 2008.

FLORES, S. K., GERSCHENSON, L. N., JAGUS, R. J., & SANJURJO, K. J. Strategies for extending shelf life of foods using antimicrobial edible films. **Series food science and technology**, p. 69–99, 2010.

FLORES, S., CONTE, A., CAMPOS, C., GERSCHENSON, L., DEL NOBILE, M. A. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 580–586, 2007.

FRANCHETTI, S. M. M., MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FU, X.; SHEN, Y.; JIANG, X.; HUANG, D.; YAN, Y. Chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups for antimicrobial finishing of cotton fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 221-227, 2011.

GADANG, V. P., HETTIARACHCHY, N. S., JOHNSON, M. G., OWENS, C. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a Turkey frankfurter system. **Journal.Food Science**, v. 73, p. 389- 394, 2008.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2-3, p.65-73, 2005.

GARCIA, M. A. A., PINOTTI, A. B., MARTINO, M. A., ZARITZKY, N. N. Electrically treated composite FILMS based on chitosan and methylcellulose blends. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 722–728, 2009.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* sem esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de**

**hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2007.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 4-5, p. 427-437, 2005.

GUPTA, V. K.; KARAR, P. K. Optimization of process variables for the preparation of chitosan-alginate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 78-80, 2011.

GYAWALI, R., IBRAHIM, S. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p.412- 429, 2014.

HAMPIKYAN, H. Efficacy of nisin against *Staphylococcus aureus* in experimentally contaminated sucuk, a Turkish-type fermented sausage. **Journal Food Protein**, v.72, p. 1739-1743, 2009.

HOSSEINI, S. F., REZAEI M., ZANDI M., FARAHMANDGHAHI, F. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 172 e 182, 2015.

HUQ, T., HUQ, B., RIEDL, J., BOUCHARD, S., SALMIERI, M., LACROIX. Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Cellulose**, v. 21, p. 4309-4321, 2014.

IMRAN, M., EL-FAHMY, S., REVOL-JUNELLES, A., DESOBRY, S. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p.219-225, 2010.

IMRAN, M., KLOUJ, A., REVOL-JUNELLES, A., DESOBRY, S. Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v.143, p. 178-185, 2014.

IMRE, B., PUKÁNSZKY, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 1215-1233, 2013.

ING, L. Y., ZIN, N., SARWAR, A., KATAS, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. **International Journal of Biomaterials**, Article ID 632698, 9 pages, 2012.

JI, S., LU, J., LIU, Z., SRIVASTAVA, D., SONG, A., LIU, Y. Dynamic encapsulation of hydrophilic nisin in hydrophobic poly lactic acid particles with controlled morphology by a single emulsion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 85-93, 2014.

JIN, H.; XU, Y.; SHEN, J.; PING, Q.; SU, Z.; YOU, W. Chitosan-glutathione conjugate-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Promising carriers for oral thymopentin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 51-57, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 299p.

KANATT, S. R., RAO, M. S., CHAWLA, S. P., SHARMA, A. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. **Food Science and Technology**, v. 57, p. 106-115, 2014.

KHAN, A.; VU, K., DANG, K., RIEDL, B., LACROIX, M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, na-edta and ph against gram-negative and gram-positive bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v.61, p.124-129, 2015.

KHWALDIA, K., LINDER, M., BANON, S., DESOBRY, S. Effects of mica, carnauba wax, glycerol, and sodium caseinate concentrations on water vapor barrier and mechanical properties of coated paper. **Journal of Food Science**, v. 70, p.3, 2005.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-66, 2010.

KRISTO, E., KOUTSOUMANIS, K. P., BILIADERIS, C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 373-386, 2008.

KROCHTA, J.M. & MULDER-JOHNSTON, C.D. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51(2), p. 61 – 74, 1997.

LA STORIA, A., ERCOLINI, D., MARINELLO, MAURIELLO, F. G., Characterization of bacteriocin coated antimicrobial polyethylene films by atomic force microscopy. **Journal.Food Sciece**, v.73, p. 48–54, 2008.

LACETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, DUEÑAS, I.; DE LA CABA, K.; Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p.889–899, 2013.

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**, v. 22, p. 994–998, 2005.

LI, J. Q. H. Rheological properties of chitosan–tripolyphosphate complexes: From suspensions to microgels. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1670– 1677, 2012.

LINO, R. C. **Desenvolvimento de filmes de metil celulose incorporados por nanopartículas de poli-ε- caprolactona/β-caroteno**. 2012. 139f. **Dissertação** (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), programa de pós-graduação em

Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LINSSEN, JPH., VAN WILLIGE, RWG., DEKKER, M. 2003. **Packaging-flavor interactions**. In: Ahvenainen R, editor. Novel food packaging techniques. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 144–171.

LIU, C. G.; DESAI, K. G. H.; CHEN, X. G.; PARK, H. J. Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1728-1733, 2005.

LIU, W. E HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus Lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2551, 1990.

LOPEZ, O., GARCIA, M. A., VILLAR, M. A., GENTILI, A., RODRIGUEZ, M. S., ALBERTENGO, L. Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. **Food Science and Technology**, v. 57, p. 106-, 2014.

LOPEZ, T. L; CARVALHO, E.; SEIJO, B.; ORTEGA, V. J.; BASTOS, G. D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal Colloid Interface Science**, v. 283, p. 344–351, 2005.

LOPEZ-PEDEMONTE, T. J., ROIG-SAGUES, A. X., TRUJILLO, A. J., CAPELLAS, M., GUAMIS, B. Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. **Journal. Dairy Science**, v.86, p. 3075-3081, 2003.

LOREVICE, M. V., DE MOURA, M. R., AOUADA, F. A., & MATTOSO, L. H. C. Development of novel guava puree films containing chitosan nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.12, p. 2711e 2717, 2012.

LOREVICE, M. V., MOURA, M. R., MATTOSO, L. H.C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. **Quimica Nova**, v. 37, n. 6, p. 931-936, 2014 (a).

LOREVICE, M. V., MOURA, M. R., OTONI, C. G, MATTOSO, L. H.C. Propriedades de barreira de nanocompósitos preparados com polpa de goiaba. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG, 01 a 05 de Setembro de 2014. **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (b)**.

LU, Y., WENG, L., & ZHANG, L. Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1046–1051, 2004.

MAHALIK, N. P., NAMBIAR, A. N. Trends in food packaging and Manufacturing stems and technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 117-128, 2010.

MAITY, D., MOLLICK, M. R.; MONDAL, D., BHOWMICK, B., BAIN, M. K., BANKURA, K., SARKAR, J., ACHARYA, K., CHATTOPADHYAY, D. Synthesis of methylcellulose–silver nanocomposite and investigation of mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 818– 1825, 2012.

MAMANI, H. N. C. **Produção e caracterização de filmes compostos de metil celulose, glucomanana, pectina, gelatina e lipídios**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MANSOUR, M., AMRI, D., BOUTTEFROY, A., LINDER, M., MILLIERE, J. B. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. **Journal Applied Microbiology**. v. 86, p. 311, 1999.

MARTELLI, M. R., BARROS, T. T., DE MOURA, M. R., MATTOSO, L. H. C., & ASSIS, O. B. G. Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. **Journal of Food Science**, v. 78, p.98-104, 2013.

MEI, J., YUAN ,Y., GUO, Q., WU, Y., LI, Y., YU, H. Characterization and antimicrobial properties of water chestnut starch-chitosan edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.61, p.169-174, 2013.

MELO, N. R., SOARES, N. F. F., GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Ceres**, v. 52, p. 921-938, 2005.

MIYAZAKI, K., ISLAM, N. Nanotechnology systems of innovation–An analysis of industry and academia research activities. **Technovation**, v. 27 p. 661–675. 2007.

MOLY, K. A.; BHAGAWAN, S. S.; GROENINCHX, G.; THOMAS, S. Correlation between the morphology and dynamic mechanical properties of ethylene vinyl acetate/linear low-density polyethylene blends: Effects of the blend ratio and compatibilization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, p. 4526 – 4538, 2006.

MOURA, M. R. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos- Tese Doutorado**. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Física Química)-Faculdade em química na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MULDERS, J.W., BOERRIGTER I, J., ROLLEMA, H.S., SIEZEN, R.J., VOS, W.M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal of Biochemistry**, v.201, p. 581–584, 1991.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3-19, 2001.

NASTI, A.; ZAKI, N. M.; DE LEONARDIS, P.; UNGPHAIBOON, S.; SANSONGSAK, P.; RIMOLI, M. G.; TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1918-1930, 2009.

NATRAJAN, N., SHELDON, B. W. Inhibition of Salmonella on poultry skin using protein- and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. **Journal.Food Protein**, v. 63, p. 1268-1272, 2000.

NEETOO, H., Y, M., CHEN, H., JOERGER, R. D., HICKS, D. T., HOOVER, D. G. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. **International.Journal.Food Microbiology**, v.122, p. 8-15, 2008.

NEVES, A. L. P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana**. 2013. 150 f. Tese (Doutor em Engenharia Química)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

NEVES, A. L. P.; MILIOLIA, C. C.; MULLERA, L.; RIELLA, H. G.; KUHNENA, N. C.; LABMAC, H. K. S.; Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.445, p. 34– 39, 2014.

NGUYEN, V. T., GIDLEY, M. J., DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, p. 471-478, 2008.

NO, H. K., MEYERS, S. P., PRINYAWIWATKUL, W., XU, Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. **Journal of Food Science**, v. 72, n.5, p. 87–100, 2007.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

NORONHA, C. M., CARVALHO, S. M., LINO, R. C., BARRETO, P. L. M. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, p. 529–535, 2014.

OJIJO, RAY, V. S. Processing strategies in bionanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, 1543– 1589, 2013.

OLIVEIRA, R. P.; OLIVEIRA, A. P.; GASPAR, C. SILVESTRE, S. MARTINEZ, J.; AMARALD, M.H.; BREITENFELD, L. Sodium Tripolyphosphate: An excipient with intrinsic in vitro anti-Candida activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, p. 130-134, 2011.

OLLÉ RESA, C. P., JAGUS, R. J., GERSCHENSON, L. N. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. **Materials Science and Engineering**, .v. 40, p. 281–287, 2014.

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

PEELMAN, N., RAGAERT, P., MEULENAER, B., PEETERS, D., CARDON, L., IMPE, F. V., DEVLIEGHERE, F. Application of bioplastics for food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.32, p.128-141, 2013.

PEÓN, J.; VEGA, J. F.; DEL AMO, B.; MARTÍNEZ-SALAZAR, J. Phase morphology and melt viscoelastic properties in blends of ethylene/vinyl acetate copolymer and metallocene-catalysed linear polyethylene. **Polymer**, v.44, p. 2911 – 2918, 2003

PERESSINI, D.; BRAVIN, B.; LAPASIN, R.; RIZZOTTI, C.; SENSIDONI, A. Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 25 – 32, 2003.

PHAECHAMUD, T., Hydrophobically modified chitosans and their pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 1, p. 2–9, 2008.

PINOTTI, A. B., GARCIA. M. A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N. E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 66–72, 2007.

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

PSOMIADOU, E.; ARVANITOYANNIS, I.; YAMAMOTO, N. Edible films made from natural resources; microcrystalline cellulose (MCC), methylcellulose (MC) and corn starch and polyols - Part 2. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, p. 193 – 204, 1996.

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

QUIROZ, M. J. T.; LECOT J.; BERTOLA N., PINOTTI, A. Stability of methylcellulose-based films after being subjected to different conservation and processing temperatures. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 18–2925, 2013.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p.219– 228, 2013.

RESTUCCIA, D., SPIZZIRRI, U. G., PARISI, O. I., CIRILLO, G., CURCIO, M., IEMMA, F., PUOCI, F., VINCI, G., PICCI, P. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, v. 21, p. 1425–1435, 2010.

RHIM, J., PARK, H.; SIK HA, C. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629– 1652, 2013.

RIMDUSIT, S., JINGJID, S., DAMRONGSAKKUL, S., TIPTIPAKORN, S., TAKEICHI, T. Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 444– 455, 2008.

SADAKA, F., NGUIMJEU, C., HÉLÈNE BRACHAIS, C., VROMAN, I., TIGHZERT, L., COUVERCELLE, J. Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p. 1-23, 2014..

SANTIAGO-SILVA, P., SOARES, N. F. F., NÓBREGA, J. E., JÚNIOR, M. A. W., BARBOSA, K. B. F., A.G.P. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA<sup>®</sup> 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v.20, p. 85–89, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726, 2006.

SCHNEIDER, N., WERKMEISTER, K., PISCHETSRIEDER, M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. **Food Chemistry**, v.127, p. 847-854, 2011.

SEBTI, I., CHOLLET, E., DEGRAEVE, P., NOEL, C., PEYROL, E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.693–699, 2007.

SEVERINA E., SEVERIN A., TOMASZ, A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Journal Antimicrobial Chemother**, v.41, p. 341–347, 1998.

SILVA, I. R. **Desenvolvimento e caracterização de filmes nanoestruturados de metil celulose reforçados com montmorilonita e nanotubos de carbono**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SILVEIRA, M. F. A. **Filme antimicrobiano de acetato de celulose incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. 2005. 56f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SIVAROOBAN, T., HETTIARACHCHY, N. S., JOHNSON, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA Incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, v. 4, p. 781–785, 2008.

SOARES, N. F. F., PIRES, A. C. S., CAMILLOTO, G. P., SILVA, P. S., ESPITIA, P. J. P., SILVA, W. A. Recent patents on active packaging for food application. **Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture**, v. 1, p. 171-178. 2009.

SOBRINO-LOPEZ, A., MARTIN-BELLOSO, O. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. **J. Food Protein**, v. 69, p. 345-353, 2006.

SONG, Y.; GAO, L.; LI, L.; ZHENG, Q. Influence of gliadins on rheology of methylcellulose in 70% (v/v) aqueous ethanol. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 98 – 104, 2010.

SORRENTINO, A., GORRASI, G., VITTORIA, V. Potential perspectives of bio - nanocomposites for food packaging applications. **Trends Food Science. Technology**, v. 18, p. 84, 2007.

SOUZA, A. C., DITCHFIELD, C., TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. **Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products**, v. 511-537, 2010.

SRIUPAYO, J., SUPAPHOL, P., BLACKWELL, J., RUJIRAVANIT, R. Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 130–136, 2005.

SUN, Z., ZHONG J., LIANG, X., LIU, J., CHEN, X., HUAN, L. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein nsr. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 53 p. 1964, 2009.

SUN, Z., ZHONG, X., LIANG, J., LIU, X., CHEN, L. H. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **Antimicrobial. Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 1964, 2009.

SUNG, S., SIN, L., TEE, T., BEE, S., RAHMAT, A. R., RAHMAN, W., TAN, A., VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, p.110-23, 2013.

TAKALA, P. N., VU, K. D.;SALMIERI, S.,KHAN, R.,LACROI, M. Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli stored at 4 C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p.499 e 506, 2013.

TANG, C. H.; JIANG, Y.; WEN, Q. B.; YANG, X. Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v.120, p. 296–307, 2005.

TANG, E. S. K., HUANG, M., LIM, L. Y., Ultrasonication of chitosan and chitosannanoparticles, **International Journal.Pharmaceutical**, v. 201, p. 51–58, 2003.

TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M. F.; PINTADO, M. M. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. Revista Brasileira de **Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013.

TEERAKARN, A., HIRT, D. E., ACTON, J. C., RIECK, J. R., DAWSON, P. L. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. **Journal. Food Science**, v. 67, p. 3019-3025, 2002.

TEIXEIRA, E. M.; OLIVEIRA, C. R.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, A.C.; PALADIN, P. D. Nanofibras de algodão obtidos sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 4, p. 264-268, 2010.

TOLEDO, M. M. **Crescimento de Lactococcus lactis subsp. lactis NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

TONG, Z., NI, L., LING, J. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. **Peptides**, v. 60, p.32-40, 2014.

TSAI, M. L.; CHEN, R. H.; BAI, S. W.; CHEN, W. Y. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 756–761, 2011.

TUNÇ, C., DUMAN, O. Preparation of active antimicrobial methycellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, p. 465 e 472, 2011.

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

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

WORANUCHA, S., YOKSANA R. E. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p.578– 585, 2013 b.

WORANUCHA, S., YOKSANA R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p.586– 592, 2013 a.

WU, Y., YANG, W. L., WANG, C. C., HU, J. H., FU, S. K. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 235–245, 2005.

YOKSAN, R., JIRAWUTTHIWONGCHAI, J., ARPO, K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.76, p. 292 e 297, 2010.

YU, S., TSAI, M., LIN, B., LIN, C., MI, F. Tea catechins-cross-linked methylcellulose active films for inhibition of light irradiation and lipid peroxidation induced b-carotene degradation. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 491 e 505, 2015.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v. 7, p. 2956-2966, 2007.