

Roberta Cristina de Souza

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE FILMES DE POLIETILENO DE
BAIXA DENSIDADE E POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE
LINEAR MODIFICADO COM ANIDRIDO MALEICO
INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINCO**

Dissertação submetida ao programa de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do grau
de mestre em Engenharia de alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Augusto
Mattar Carciofi
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Deise
Helena Baggio Ribeiro

Florianópolis
2015

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

Souza, Roberta Cristina de

Ação antimicrobiana de filmes de polietileno de baixa densidade e polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico incorporados com nanopartículas de óxido de zinco / Roberta Cristina de Souza ; orientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi ; coorientadora, Deise Helena Baggio Ribeiro. - Florianópolis, SC, 2015.
130 p.

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

Inclui referências

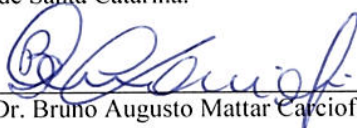
1. Engenharia de Alimentos. 2. Nanopartículas de óxido de zinco. 3. Efeito antimicrobiano. 4. Filme de polietileno. 5. Anidrido maleico. I. Carciofi, Bruno Augusto Mattar . II. Ribeiro, Deise Helena Baggio . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“AÇÃO ANTIMICROBIANA DE FILMES DE
POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE E
POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE LINEAR
MODIFICADO COM ANIDRIDO MALEICO
INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE ZINCO”**

Por

Roberta Cristina de Souza

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Orientador



Profa. Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro

Coorientadora



Prof. Dr. Marco Di Luccio

Coordenador

Banca Examinadora:



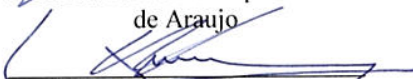
Profa. Dra. Deise Helena Baggio
Ribeiro



Profa. Dra. Cristiane da Costa
Bresolin



Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes
de Araujo



Prof. Dr. Prof. Dr. Haiko Hense

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais Márcia e Jorge.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e força em cada momento.

Aos meus pais Márcia e Jorge, pela base, princípios e incentivo. Ao meu irmão Leonardo, pelos conselhos e momentos de descontração. A toda a minha família.

Ao Diego, pelo companheirismo, apoio, compreensão e carinho.

Aos meus orientadores, professor Bruno e professora Deise, pelos ensinamentos, dedicação e orientações.

Ao professor Pedro Araújo e à colega Jaqueline Morais, pelas contribuições e enriquecimento do trabalho. Ao professor Humberto Riella, pelos materiais fornecidos. E à colega Glaucia Medeiros, pelas palavras e pelos conselhos dedicados.

À amiga Camila Guindani, pela parceria ao longo do mestrado.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos, pelo acolhimento e troca de experiências.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela possibilidade de realizar a maior parte dos experimentos. À Rita, Júlia e Daiane pela dedicação prestada.

Ao Laboratório de Controle de Processos, pela possibilidade de realização de experimentos. Aos colegas do Cermat e do Polimat pela atenção dedicada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade para a realização deste trabalho. Aos professores do PGEAL, pelos ensinamentos repassados. Ao professor Marco Di Luccio, pela eficiência e apoio. À Raquel e Jeovana, pelos esclarecimentos prestados.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

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

Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes.
(Albert Einstein)

RESUMO

As inovações proporcionadas pela redução de tamanho de partículas tornam o estudo de materiais nanométricos de enorme importância. Entre essas propriedades, a ação antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) vem se destacando. O objetivo deste trabalho foi incorporar NPs-ZnO em filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico (PEBDL-AM) e avaliar a atividade antimicrobiana frente às bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*. Os filmes foram incorporados com 10,0; 5,0; 1,0 e 0,5 % de NPs-ZnO por extrusão e por aspersão das NPs-ZnO sobre o filme. As NPs-ZnO foram identificadas como nanobastões com comprimento entre 90,1 e 100,0 nm (10,5 %) e espessura entre 80,1 e 90,0 nm (21 %). As dispersões das nanopartículas em água Milli-Q e os filmes foram avaliados em relação à ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar e diluição em caldo e pelo comportamento do crescimento microbiano. A concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima das dispersões das NPs-ZnO foram estabelecidas como 0,05 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente, para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se pouco sensível as NPs-ZnO em dispersão ou incorporadas aos filmes. Frente ao *Bacillus cereus*, as NPS-ZnO não apresentaram efeito antimicrobiano. Os filmes incorporados com NPs-ZnO por extrusão apresentaram superfície lisa e não apresentaram ação antimicrobiana, sugerindo que as NPs-ZnO ficaram aprisionadas no interior da matriz polimérica, não permitindo o contato com os micro-organismos. Efeito bacteriostático foi observado nos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão frente à *Staphylococcus aureus*. Frente a *Salmonella Typhimurium*, o filme de PEBDL-AM incorporado com 10 % de NPs-ZnO apresentou efeito bactericida e o filme de PEBD para mesma concentração reprimiu o crescimento microbiano, porém para as demais concentrações a bactéria mostrou-se pouco sensível. A análise de FTIR dos filmes de PEBDL-AM indica a reação entre as NPs-ZnO e o anidrido maleico presente no polímero. Não foi observada diferença na molhabilidade dos filmes. Este estudo amplia o interesse da aplicação de NPs-ZnO para a garantia da segurança dos alimentos.

Palavras-chave: Nanopartículas de óxido de zinco. Efeito antimicrobiano. Polietileno. Anidrido maleico.

ABSTRACT

The innovation provided by the reduction in particle size turned into the study of nanometric materials of great importance. Among these properties, the antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) has been outstanding. The aim of this work was to incorporate ZnO-NPs on films low density polyethylene (LDPE) and linear low density polyethylene modified with maleic anhydride (LLDPE-MA) and evaluate the antimicrobial activity against the bacterias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium*. Films were incorporated with 10,0; 5,0; 1,0 e 0,5 % de ZnO-NPs by extrusion and spraying the ZnO-NPs onto the films. ZnO-NPs were identified as nanorods with a length of 90.1 to 100,0 nm (10.5%) and a thickness of 80.1 to 90,0 nm (21%). Dispersions of nanoparticles in Milli-Q and films were evaluated for antimicrobial activity by the disk diffusion and broth dilution and by behavior of microbial growth. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of dispersions ZnO-NPs were determined to be 0.05 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*. Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* showed little sensitivity ZnO-NPs in dispersion or incorporated into the films. Against *Bacillus cereus*, ZnO-NPS showed no antimicrobial effect. The films incorporated ZnO-NPs by extrusion showed smooth surface and showed no antimicrobial action, suggesting that the ZnO-NPs were entrapped within the polymeric matrix, preventing contact with the micro-organisms. Bacteriostatic effect was observed in ZnO-NPs films by spraying against *Staphylococcus aureus*. Against *Salmonella Typhimurium*, LLDPE-MA film incorporated with 10,0 % ZnO-NP showed bactericidal effect and LDPE film for same concentration suppressed microbial growth, however for the other concentrations of bacteria showed little sensitive. FTIR analysis of the LLDPE-MA films indicated a reaction between ZnO-NPs and maleic anhydride present in the polymer. No significant difference was observed in the wettability of the films. These results further the interest of the application of ZnO-NPs to food safety.

Keywords: Zinc oxide nanoparticles. Antibacterial effect. Polyethylene. Maleic anhydride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura cristalina dos cristais de ZnO (a) sal de rocha, (b) blenda de zinco e (c) wurtzita.	36
Figura 2.2. Fórmula estrutural plana do anidrido maleico	42
Figura 2.3. Estrutura química de polietileno modificado com anidrido maleico.....	42
Figura 2.4. Estrutura química de polietileno puro.....	43
Figura 2.5. Representação esquemática da configuração das cadeias de (a) polietileno de alta densidade; (b) polietileno de baixa densidade; e (c) polietileno de baixa densidade linear.....	44
Figura 2.6. Colônias típicas de <i>S. aureus</i> em ágar Baird Parker.	48
Figura 2.7. Colônias típicas de <i>B. cereus</i> em ágar MYP (manitol, gema de ovo e polimixina).	50
Figura 2.8. Colônias típicas de <i>P. aeruginosa</i> em ágar Leite.....	51
Figura 2.9. Colônias típicas de <i>S. Typhimurium</i> ágar XLD (xilose, lisina e desoxicolato).	52
Figura 3.1. Pó de NPs-ZnO.	55
Figura 3.2. (a) Fotografia da extrusora monorosca. (b) Fotografia da Termoprensa.	58
Figura 3.3. (a) Borrifador plástico utilizado na aspersão. (b) Esquema da disposição do filme para aspersão, I. Placa de alumínio; II. Folha de Mylar [®] ; III. Molde de inox; IV. Fita de Teflon [®] ; V. Filme.	59
Figura 3.4. Ângulo de contato entre uma gota de água e uma superfície. Molhabilidade completa ($\theta = 0^\circ$), molhabilidade parcial ($180^\circ < \theta < 90^\circ$) e ausência de molhabilidade ($\theta > 180^\circ$).	62
Figura 3.5. Teste de molhabilidade de filme em goniômetro.....	62
Figura 3.6. Esquema dos procedimentos do teste difusão em ágar em (a) discos e em (b) poços.....	65
Figura 3.7. Esquema dos procedimentos do teste CIM e CBM.	67
Figura 3.8. Esquema dos procedimentos do teste de crescimento microbiano.	68
Figura 4.1. Difractogramas das NPs-ZnO e da carta padrão JCPDS.	71
Figura 4.2. (a) Imagem de MET de NPs-ZnO; histograma de distribuição de tamanho de (b) comprimento e (c) espessura de NPs-ZnO.....	72
Figura 4.3. Comportamento dos materiais extrusados (a) PEBDL-AM puro; (b) PEBD incorporado com 5,0 % de NPs-ZnO; (c) e (d) PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO.....	73
Figura 4.4. Filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.	74

Figura 4.5. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM puro na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	75
Figura 4.6. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 1 % de NPs-ZnO por extrusão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	75
Figura 4.7. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	76
Figura 4.8. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	76
Figura 4.9. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	77
Figura 4.10. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	77
Figura 4.11. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD puro na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	78
Figura 4.12. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	78
Figura 4.13. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	79
Figura 4.14. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	79
Figura 4.15. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	80
Figura 4.16. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.....	80
Figura 4.17. Espectro de FTIR dos filmes de PEBDL-AM puro e incorporado com NPs-ZnO.....	83

Figura 4.18. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>S. aureus</i> nas CIM e CBM. ◇ Controle negativo (-); □ Controle positivo (+); △ 0,5 mg/mL; × 0,05 mg/mL.....	87
Figura 4.19. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>S. Typhimurium</i> nas CIM e CBM. ◇ Controle negativo (-); □ Controle positivo (+); △ 0,5 mg/mL; × 0,05 mg/mL.....	88
Figura 4.20. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>P. aeruginosa</i> durante 72 h. ◇ Controle negativo (-); □ Controle positivo (+); △ 0,5 mg/mL.....	90
Figura 4.21. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>P. aeruginosa</i> durante 216 h. ◇ Controle negativo (-); □ Controle positivo (+); △ 0,5 mg/mL; × 1,0 mg/mL; ○ 2,0 mg/mL.....	90
Figura 4.22. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>S. aureus</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. ◇PEBDL-AM 10,0 %; △ PEBDL-AM 5,0 %; × PEBDL-AM 1,0 %; ○ PEBDL-AM 0,5 %; □ PEBDL-AM PURO; * PEBD 10,0 %; □ PEBD 5,0 %; - PEBD 1,0 %; – PEBD 0,5 %; ◇ PEBD PURO.....	95
Figura 4.23. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>S. Typhimurium</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. ◇PEBDL-AM 10,0 %; △ PEBDL-AM 5,0 %; × PEBDL-AM 1,0 %; ○ PEBDL-AM 0,5 %; □ PEBDL-AM PURO; * PEBD 10,0 %; □ PEBD 5,0 %; - PEBD 1,0 %; – PEBD 0,5 %; ◇ PEBD PURO.....	96
Figura 4.24. Dados experimentais do crescimento microbiano de <i>P. aeruginosa</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. ◇PEBDL-AM 10,0 %; △ PEBDL-AM 5,0 %; × PEBDL-AM 1,0 %; ○ PEBDL-AM 0,5 %; □ PEBDL-AM PURO; * PEBD 10,0 %; □ PEBD 5,0 %; - PEBD 1,0 %; – PEBD 0,5 %; ◇ PEBD PURO.....	97
Figura 4.25. Comportamento de <i>S. aureus</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO após 5 dias (5 % de nível de significância).....	100
Figura 4.26. Comportamento de <i>S. Typhimurium</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO após 5 dias (5 % de nível de significância).....	100
Figura 4.27. Comportamento de <i>P. aeruginosa</i> na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO após 5 dias (5 % de nível de significância).....	101
Figura B.1. Espectros de FTIR dos filmes de PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.....	125

Figura C.1 Imagem da gota para obtenção de ângulo de contato dos filmes incorporados com NPs-ZnO em goniômetro.....	126
Figura D.1. Teste de difusão em ágar para <i>B. cereus</i>	127
Figura D.2. Teste de difusão em ágar em discos para <i>S. aureus</i>	128
Figura D.3. Teste de difusão em ágar em poços para <i>S. aureus</i>	128
Figura D.4. Teste de difusão em ágar em discos para <i>S. Typhimurium</i>	129
Figura D.5. Teste de difusão em ágar em poços para <i>S. Typhimurium</i>	129
Figura D.6. Teste de difusão em ágar em discos para <i>P. aeruginosa</i> ...	130
Figura D.7. Teste de difusão em ágar em discos para <i>P. aeruginosa</i> ...	130
Figura E.1. Teste diluição em caldo em <i>S. aureus</i> para obtenção de CIM e CBM. Plaqueamento das diluições 10^{-1} e 10^{-2} do controle negativo (-) e positivo (+) e dispersão das NPs-ZnO (0,01 a 0,5 mg/mL)....	131
Figura E.2. Teste diluição em caldo em <i>S. Typhimurium</i> para obtenção de CIM e CBM. Plaqueamento das diluições 10^{-1} e 10^{-2} do controle negativo (-) e positivo (+) e dispersão das NPs-ZnO (0,01 a 0,5 mg/mL).....	131
Figura F.1. Teste difusão em ágar de filmes de PEBD extrusados com NPs-ZnO.....	132
Figura F.2. Teste difusão em ágar de filmes de PEBDL-AM extrusados com NPs-ZnO.....	132
Figura F.3. Teste difusão em ágar em <i>P. aeruginosa</i> com filmes de PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Propriedades do PEBD e PEBDL-AM.....	56
Tabela 3.2. Formulações dos filmes incorporados com NPs-ZnO.....	57
Tabela 3.3. Parâmetros operacionais da extrusora para a formação de filmes incorporados com NPs-ZnO.....	58
Tabela 4.1. Resultados de EDS da superfície dos filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO..	81
Tabela 4.2. Resultados de EDS das fraturas criogênicas dos filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.....	82
Tabela 4.3. Concentração de NPs-ZnO incorporada nos filmes obtidos em análise gravimétrica por mufla.....	84
Tabela 4.4. Valores obtidos para ângulo de contato dos filmes incorporados com NPS-ZnO Resultados de EDS da superfície dos filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.....	85
Tabela 4.5. Resumo dos estudos antimicrobianos de ZnO encontrados na literatura	92
Tabela A.1. Espectros de EDS dos filmes de PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão.....	119
Tabela A.2. Espectros de EDS dos filmes de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão.	120
Tabela A.3. Espectros de EDS dos filmes de PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão.	121
Tabela A.4. Espectros de EDS dos filmes de PEBD incorporados com NPs-ZnO por aspersão.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
<i>B.cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
C=O	Grupo funcional carbonila
C-H	Ligação carbono com hidrôgenio
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaOH	Hidróxido de sódio
NPs-ZnO	Nanopartículas de óxido de zinco
OH ⁻	Radial hidroxil
O ₂ ⁻	Superóxido
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCA	Ágar padrão de contagem
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PEBDL	Polietileno de baixa densidade linear
PEBDL-AM	Polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ZnO	Óxido de zinco
Zn ⁺²	Íon zinco
Zn(NO ₃) ₂	Nitrato de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade
M	Massa de nanopartículas de óxido de zinco	mg
mf	Massa de cadinho mais amostra residual	mg
mi	Massa inicial do cadinho	mg
ma	Massa de filme utilizada para teste	mg
N	Contagem microbiana final	log UFC/mL
No	Contagem microbiana inicial	log UFC/mL

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	OBJETIVOS.....	32
1.1.1	Objetivo Geral	32
1.1.2	Objetivos Específicos.....	32
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1	NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO	36
2.1.1	Ação antimicrobiana	38
2.2	MATERIAIS POLIMÉRICOS.....	41
2.2.1	Polietileno.....	42
2.2.2	Incorporação de substâncias antimicrobianas.....	45
2.3	MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS VINCULADOS AOS ALIMENTOS	47
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.3.2	<i>Bacillus cereus</i>	49
2.3.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
2.3.4	<i>Salmonella Typhimurium</i>	52
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO	55
3.1.1	Caracterização das nanopartículas.....	55
3.2	FILMES INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO.....	56
3.2.1	Material polimérico.....	56
3.2.2	Formação do filme incorporado com nanopartículas de óxido de zinco.....	56
3.2.2.1	Extrusão.....	57

3.2.2.2	Aspersão de nanopartículas de óxido de zinco sobre o filme	58
3.2.3	Caracterização.....	60
3.2.3.1	Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por dispersão de energia	60
3.2.3.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	61
3.2.3.3	Molhabilidade	61
3.2.3.4	Determinação de carga inorgânica	63
3.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	63
3.3.1	Meio de Cultura	64
3.3.2	Micro-organismos	64
3.3.3	Nanopartículas de óxido de zinco	64
3.3.3.1	Método de difusão em ágar	64
3.3.3.2	Teste de diluição em caldo - Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima	65
3.3.3.3	Teste de crescimento microbiano.....	67
3.3.4	Filmes incorporados com nanopartículas de óxido de zinco	69
3.3.4.1	Difusão em ágar	69
3.3.4.2	Crescimento microbiano	69
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO.....	71
4.2	FILMES INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO.....	73
4.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	85

4.3.1	Nanopartículas de óxido de zinco.....	85
4.3.2	Filmes incorporados com nanopartículas de óxido de zinco	93
5	CONCLUSÕES	103
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	104
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO A – Espectros de EDS dos filmes incorporados NPs-ZnO	119
	ANEXO B – Espectros de FTIR dos filmes incorporados NPs-ZnO	125
	ANEXO C – Molhabilidade dos filmes incorporados NPs-ZnO ...	126
	ANEXO D – Teste de difusão em ágar das NPs-ZnO	127
	ANEXO F – teste de difusão em ágar dos filmes incorporados com NPs-ZnO.....	132

INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança de alimentos vem estimulando o estudo de agentes antimicrobianos em vários segmentos industriais e meios científicos, para uso direto em alimentos ou incorporados em embalagens. Esses agentes antimicrobianos podem ter origem natural, como as bacteriocinas e óleos vegetais, ou origem química, podendo ser compostos orgânicos e inorgânicos (HAN, 2005).

Nesta linha de pesquisa destacam-se as partículas inorgânicas, que, em dimensões nanométricas, atualmente, são foco de grande interesse devido às inovações proporcionadas pela redução de tamanho. Os íons ou óxidos metálicos, como nanopartículas de prata, dióxido de titânio, óxido de magnésio e óxido de zinco, podem apresentar novas propriedades, diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica. O estudo do potencial antimicrobiano e antifúngico destas nanopartículas, com destaque para as nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO), frente a micro-organismos patógenos e deteriorantes vinculados a alimentos, assim como as diversas formas de obtenção, é uma área recente e que ainda deve ser explorada (MATTOZO; MORAIS; DURÁN, 2006; MARTINEZ-GUTIERREZ et al.; 2010; AZEREDO, 2013; ANN, et al., 2014; PASQUET et al.; 2014).

As NPs-ZnO são estruturas cristalinas e resistentes às condições severas de temperatura e pressão (ÖZGÜR et al., 2005) e podem apresentar nanoestruturas de diferentes morfologias e obtidas de diversos métodos, características estas que influenciam diretamente nas propriedades e aplicação do material (FAN; LU, 2005; GUSSATI, 2010). As NPs-ZnO possuem potencial atividade antimicrobiana e esta propriedade aumenta com o decréscimo do tamanho da partícula, podendo ser bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração (YAMAMOTO, 2001; ZHANG et al. 2007; JONES et al., 2008; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008).

Visto que o óxido de zinco é um composto atualmente reconhecido como substância segura para consumo (GRAS) pela U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2014), o estudo da sua aplicação em comparação a outras nanopartículas metálicas com ação antimicrobiana torna-se uma motivação. Além do mais, não há na literatura um estudo conclusivo a respeito do perfil toxicológico dessas nanopartículas, visto as diversas respostas biológicas frente à diversidade de propriedades, concentração, tempo de exposição e tipo de ensaio (HSIAO; HUANG, 2011, KOEDRITH, 2014, KWONA, 2014).

Na aplicação em embalagens de alimentos, o uso de NPs-ZnO pode resultar em novos materiais com propriedades mecânicas e de barreira melhoradas, além da atividade antimicrobiana (CHAUDHRY et al., 2008; ESPITIA et al., 2012).

As embalagens de polietileno são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, sendo utilizadas em embalagens de produtos lácteos, cárneos, polpa de frutas, produtos de panificação e produtos alimentícios secos, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, ao baixo custo, às propriedades de barreira e por não serem tóxicas (BARÃO, 2011). Deste modo, a incorporação de substâncias antimicrobianas favorecem ainda mais estas embalagens, prolongando o período de vida útil e promovendo a segurança dos alimentos através da redução da taxa de crescimento de micro-organismos específicos ou reduzindo significativamente o potencial de recontaminação dos produtos (HOTCHKISS, 1997; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi incorporar nanopartículas de óxido de zinco em filmes de polietileno de baixa densidade e de polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico e avaliar a atividade antimicrobiana frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são apresentados abaixo:

- a) Caracterizar as nanopartículas de óxido de zinco em tamanho, morfologia e cristalinidade;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco frente às bactérias Gram positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e as bactérias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*;
- c) Incorporar as nanopartículas de óxido de zinco em filmes de polietileno de baixa densidade e polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico por extrusão e aspersão de nanopartículas de óxido de zinco sobre o filme;

- d) Caracterizar os filmes de polietileno de baixa densidade e polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico incorporados com nanopartículas de óxido de zinco quanto à morfologia da superfície, molhabilidade, ligações químicas presentes e homogeneidade da distribuição das nanopartículas de óxido de zinco;
- e) Determinar a atividade antimicrobiana dos filmes de polietileno de baixa densidade e de polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico incorporados com nanopartículas de óxido de zinco frente às bactérias Gram positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e às bactérias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os agentes antimicrobianos são substâncias que podem eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos e são amplamente utilizados e estudados em vários segmentos. Estes agentes podem ser classificados de acordo com sua origem em naturais ou químicos (obtidos sinteticamente por reações químicas). Os antimicrobianos naturais podem ter origem microbiana, animal ou vegetal, e os químicos, podem ser denominados como orgânico ou inorgânico. Estas substâncias antimicrobianas naturais e químicas possuem potencial aplicação na conservação de alimentos, incluindo a aplicação em embalagens de alimentos (HAN, 2005).

As bacteriocinas, como nisina, pediocina e reuterina, são peptídeos antimicrobianos de origem bacteriana. A lactoferrina, presente no leite, a lisozima, no ovo, a quitosana, na casca de camarão e os peptídeos de caseína bovina são peptídeos antimicrobianos de origem animal, os quais vêm sendo investigados para aplicação em alimentos. (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011; ZOU et al., 2013). Os antimicrobianos de origem vegetal são amplamente estudados e pertencem ao grupo de componentes fenólicos encontrados em óleos essenciais de plantas, os quais podem ser obtidos a partir de óleos voláteis, sementes, flores, folhas, cascas, frutos, madeira e raízes de plantas, como exemplos podem ser citados os óleos essenciais de mostarda (TURGIS, 2009), orégano (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012), cravo (SOUZA et al., 2013) e tomilho (DEL TORO-SÁNCHEZ, 2010), com os componentes antimicrobianos alil-isotiocinato, timol, carvacrol e eugenol.

Os agentes antimicrobianos de origem química e que já são conhecidos como conservadores de grau alimentício pertencem ao grupo dos compostos orgânicos, tais como ácidos orgânicos e seus sais, como, por exemplo, o ácido benzóico, os sorbatos, o ácido sórbico, o ácido propiônico, o ácido acético, o nitrito e nitrato de sódio, entre outros (WENG; CHEN, 1997; HAN, 2000; MOLINA et al., 2013).

Outro grupo são os compostos inorgânicos. Nessa linha de pesquisa destacam as nanopartículas metálicas, como por exemplo, as nanopartículas de prata, dióxido de titânio, óxido de zinco e de magnésio. Esses compostos, geralmente encontrados na forma de íons ou óxidos metálicos, em dimensões nanométricas, atualmente, são foco de grande interesse, devido ao seu potencial antimicrobiano e às diversas formas de obtenção, sendo uma área recente e que ainda deve

ser explorada (MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2010; AZEREDO, 2013;).

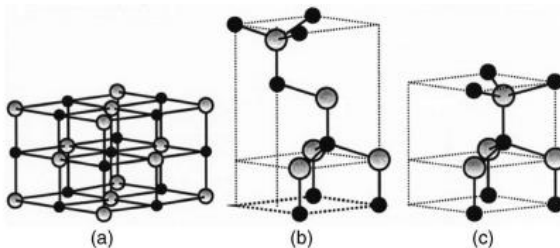
O estudo e aplicação de materiais na escala nanométrica é amplo e de enorme importância, devido às inovações proporcionadas pela redução de tamanho. Os materiais em escala nanométrica, usualmente descritos entre 0,1 e 100 nm, podem apresentar novos comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica, sendo uma área de pesquisa e desenvolvimento interdisciplinar uma vez que são baseados nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais) (MATTOZO; MORAIS; DURÁN, 2006).

2.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

O óxido de zinco (ZnO) é um semicondutor, de coloração branca ou levemente amarelada, com massa específica de $5,6 \text{ g cm}^{-3}$, massa molar de $81,4 \text{ g mol}^{-1}$, se decompõe, na pressão atmosférica, em temperaturas superiores a 2070 K e é alvo de grande interesse pelas suas propriedades eletrônicas, ópticas, químicas e térmicas (ÖZGÜR et al., 2005; PEARTON et al., 2005)

As estruturas cristalinas dos cristais de ZnO podem ser do tipo wurtzita, sal de rocha ou blenda de zinco (Figura 2.1), sendo a fase wurtzita - uma estrutura com coordenação tetraédrica entre átomos de oxigênio e zinco, com ligação covalente sp^3 , mas também com caráter parcialmente iônico - a termodinamicamente mais estável em condições ambientes (STEINER, 2004; ÖZGÜR et al., 2005; MAENSIRI; LAOKULA; PROMARAKB, 2006).

Figura 2.1. Estrutura cristalina dos cristais de ZnO (a) sal de rocha, (b) blenda de zinco e (c) wurtzita.



Fonte: Özgür et al. (2005).

O ZnO pode apresentar nanoestrutura com diferentes morfologias, tais como nanoesferas, nanobastões, nanofios e nanoprismas, característica esta que influencia diretamente nas propriedades e aplicação do material e que é dependente das condições de síntese (FAN; LU, 2005; GUSSATI, 2010).

As principais técnicas de obtenção de nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) referenciadas na literatura são sol-gel (KOLEKAR et al., 2011), hidrotérmica (HU; CHEN, 2008), coprecipitação (ZHONG; MATIJEVIC, 1996) e soloquímica (VAEZI, 2008). A técnica soloquímica vem adquirindo destaque atualmente. Gusatti (2010), obteve NPs-ZnO baseado no processamento soloquímico convencional, para produção de nanoestruturas de ZnO através da reação entre uma solução precursora, contendo zinco e uma solução alcalina (NaOH) aquecida, possibilitando a preparação de NPs-ZnO em baixas temperaturas, em curto tempo de reação, de forma simples, de baixo custo e com a formação de partículas com tamanho e morfologia controlados, sem a adição de nenhum agente estabilizante.

As NPs-ZnO apresentam propriedades de interesse para diversas aplicações tecnológicas, atendendo as necessidades de muitos setores industriais, como a de borracha, química, farmacêutica, cosmética, odontológica e de alimentos.

Na indústria da borracha, ZnO é utilizado como ativador de vulcanização (NIEUWENHUIZEN, 2001); na cosmética, como agente atenuante da radiação ultravioleta em protetor solar (AL-HILLI; WILLANDER, 2006); na química, como pigmentos, cerâmicas avançadas, células solares e materiais ópticos (TANG et al., 1998; KEIS et al., 1999; HUANG et al., 2001; LOOK, 2001; CAI; HE; ZHANG, 2008); e na indústria farmacêutica e de alimentos, devido as propriedades antimicrobianas e antifúngicas, além de performance em propriedades mecânicas e de barreira de embalagens (ESPITIA, 2012).

A toxicidade das NPs-ZnO ainda não está esclarecida, havendo controvérsias. Alguns estudos têm demonstrado efeitos citotóxicos de NPs-ZnO em diferentes tipos de células humanas, como células epiteliais brônquicas (HENG et al, 2010), células epiteliais do pulmão (HSIAO; HUANG, 2011), células renais (PUJALTÉ et al., 2011) e células epidérmicas (SHARMA et al., 2009). Segundo Heng et al. (2010), os resultados ainda sugerem que certas condições patológicas associadas com o aumento do estresse oxidativo no epitélio das vias aéreas, como pacientes com asma, podem colocar indivíduos atingidos em risco adicional. Esses estudos, a respeito dos efeitos toxicológicos

das NPs-ZnO, conduzem como os principais mecanismos de ação o estresse oxidativo e o dano oxidativo ao DNA. Sharma et al. (2009) observaram uma redução na viabilidade das células em função da concentração NPS-ZnO e do tempo de exposição, demonstrando danos ao DNA e sugerindo potencial genotóxico em células epidérmicas humanas, resultante da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo.

Segundo Heng et al. (2010), a exposição de células a níveis moderados de estresse oxidativo pode regular mecanismos antioxidante e de defesa de estresse no interior da célula, o que pode por sua vez, conferir uma maior resistência aos efeitos citotóxicos de NPs-ZnO. Assim, poderá existir certo nível limiar de pré-exposição ao estresse oxidativo. De acordo com Pujalté et al. (2011), a validade dos resultados *in vitro* é limitada e os resultados desses ensaios de toxicidade mostram danos às células mais graves do que investigações *in vivo*.

Nohynek, Antignac e Toutain (2010) afirmam que evidências atuais sugerem que essas nanopartículas não são tóxicas, não penetram através da pele humana normal ou comprometida e, portanto, não representam um risco para a saúde humana. Kwon et al. (2014) defendem também que as nanopartículas de ZnO não provocam genotoxicidade *in vitro* ou em sistemas de ensaio *in vivo*.

Portando, não há um estudo conclusivo a respeito do perfil toxicológico dessas nanopartículas, visto as diversas respostas biológicas frente à diversidade de propriedades, como tamanho e morfologia, de concentração e tempo de exposição das NPs-ZnO, além do tipo de ensaio, *in vitro* ou *in vivo* (HSIAO; HUANG, 2011, KOEDRITH, 2014, KWON, 2014).

2.1.1 Ação antimicrobiana

O ZnO tem sido estudado devido ao seu excelente potencial antimicrobiano e antifúngico. Esta substância, atualmente, é reconhecida como substância segura (GRAS) pela U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2011), motivando o estudo da sua aplicação em comparação a outras nanopartículas metálicas com ação antimicrobiana. O Ministério da Saúde estabelece uma ingestão diária recomendada (IDR) para adultos de 15 mg de zinco (BRASIL, 1998). Porém, não há uma legislação específica para NPs-ZnO.

A atividade antimicrobiana do ZnO aumenta com o decréscimo do tamanho da partícula e pode ser bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração de ZnO (YAMAMOTO, 2001; ZHANG et

al. 2007; JONES et al., 2008; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008).

Os efeitos antimicrobianos de NPs-ZnO podem ser atribuídos a diversos mecanismos, os quais ainda devem ser mais estudados para maior compreensão. Os principais mecanismos de ação são atribuídos à indução do stress oxidativo, devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS); à desorganização da membrana devido a um acúmulo de NPs-ZnO na membrana bacteriana e à sua internalização celular; e a liberação de íons zinco (Zn^{+2}).

A geração ROS, como radical hidroxil (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), é resultado da ativação das NPs-ZnO pela luz visível e/ou luz ultravioleta, visto que é um material semicondutor e é o responsável por um estresse oxidativo, no interior ou exterior da célula, e por uma interação entre essas espécies com as proteínas, DNA e lipídeos, causando a morte celular (SAWAI et al., 1996; YAMAMOTO, 2001; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008; ZHANG et al., 2008; JALAL et al., 2010; GORDON et al., 2011).

A liberação de íons antimicrobianos de Zn^{+2} e, conseqüente, solubilização no meio contendo os micro-organismos, pode ser responsável pela atividade antimicrobiana de NPs-ZnO, através da ligação à membrana de micro-organismos (KASEMETS et al., 2009). Porém, diferenças no processo metabólico dos íons podem ser observadas dependendo das características intrínsecas de cada micro-organismo e da concentração presente no meio. Os íons Zn^{+2} podem ser indesejáveis e potencialmente tóxicos, mas para alguns micro-organismos e em baixas concentrações, podem aumentar o crescimento bacteriano, agindo como nutriente para o micro-organismo, visto que o elemento zinco é um cofator essencial em diversos processos celulares (REDDY et al., 2007; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008).

A interação direta entre NPs-ZnO e a superfície da bactéria é relatada como devido às forças eletrostáticas. Segundo Stoimenov et al. (2002), a carga total das células bacterianas é negativa devido à dissociação de grupos carboxílicos, os quais estão presentes em excesso e as NPs-ZnO possuem potencial zeta de + 24 mV em pH 7. O resultado das cargas opostas entre as nanopartículas e a superfície das bactérias é a geração de forças eletrostáticas, gerando conseqüentemente danos e o colapso na membrana bacteriana, como a desorganização da parede celular, alteração na morfologia e efluxo de conteúdo celular. O colapso da membrana afeta também a sua permeabilidade, permitindo a internalização das nanopartículas e a indução de um estresse oxidativo

(XIE et al., 2011; ZHANG et al., 2007; BRAYNER et al., 2006). Adicionais danos à membrana celular podem ser causados também pela superfície abrasiva das NPs-ZnO, resultado de irregularidades na superfície (STOIMENOV et al. 2002; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). Ann et al. (2014) observaram por imagens de MEV com EDS a adesão das estruturas de ZnO nas células bacterianas, induzindo danos físicos nas membranas.

Padmavathy e Vijayaraghavan (2008) estudaram a atividade antimicrobiana de suspensões de ZnO de 12 nm, 45 nm e 2 µm contra *Escherichia coli* (*E. coli*) e observaram efetiva inibição de crescimento da bactéria em uma concentração entre 100 a 5 mM. Segundo os autores, abrasividade e geração de ROS promoveram as propriedades biocidas das NPs-ZnO.

Jin et al. (2009) observaram atividade antimicrobiana de NPs-ZnO de 5 nm, contra *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Salmonella enterica* Enteritidis (*S. Enteritidis*) e *E. coli* O157:H7.

O comportamento antimicrobiano de suspensões de NPs-ZnO (nanofluidos de ZnO), com distribuição de tamanho de 24-71 nm e 90-200 nm, contra *E. coli* foi investigada por Zhang et al. (2007). Os resultados demonstraram ação bacteriostática e que o uso de dois dispersantes (polietilenoglicol - PEG e polivinilpirrolidona - PVP) não afetou a ação dos nanofluidos, mas melhorou a estabilidade das suspensões. Os resultados sugeriram que a interação entre a parede da membrana celular com as nanopartículas e a geração de ROS foram os mecanismos de ação.

Savi, Bortoluzzi e Scussel (2013) avaliaram a propriedade antifúngica de NPs-ZnO contra *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus flavus* nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 mM. Os autores observaram que tratamentos com NPs-ZnO interferem no metabolismo celular, conídios (redução do número) e hifas (alterações morfológicas e produção de ROS) e que a ação aumenta com o aumento da concentração.

O efeito antibacteriano de NPs-ZnO sobre *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) foi investigado por Xie et al. (2011). Os resultados demonstraram que a *C. jejuni* foi extremamente sensível ao tratamento com NPs-ZnO. A concentração inibitória mínima de NPs-ZnO para *C. jejuni* foi determinada ser de 0,05-0,025 mg/mL (aproximadamente 0,6 – 0,3 mM), que é de 8 a 16 vezes menor do que para *S. Enteritidis* e *E. coli* O157:H7 (0,4 mg/mL ou aproximadamente 4,9 mM). A ação de NPs-ZnO contra *C. jejuni* foi determinada como bactericida.

2.2 MATERIAIS POLIMÉRICOS

Os polímeros são macromoléculas compostas por unidades pequenas de repetição (monômeros), ligadas por ligação covalente. Quando os polímeros são obtidos por reação entre monômeros da mesma natureza designam-se por homopolímeros e quando obtidos por duas ou mais espécies monoméricas diferentes são chamados de copolímeros (SPERLING, 2006).

Os polímeros podem ser classificados de acordo com sua origem em polímeros naturais, artificiais ou sintéticos. Os polímeros naturais são sintetizados pela natureza, como a borracha natural, a celulose e o amido. Os polímeros artificiais são polímeros naturais modificados pelo homem através de reações químicas, como o acetato de celulose e o nitrato de celulose. Os polímeros sintéticos são os sintetizados pelo homem através de reações químicas, como o polietileno e o polipropileno (BRAUN et al., 2005; CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

Uma cadeia polimérica pode se apresentar de formas ou arquiteturas (a) lineares, com a cadeia polimérica constituída apenas de uma cadeia principal; (b) ramificadas, quando da cadeia principal partem prolongamentos de monômeros, que podem ser longos ou curtos, formando diferentes níveis de ramificações; ou (c) com ligações cruzadas, nas quais as cadeias poliméricas estão ligadas entre si através de segmentos de cadeia unidos por forças primárias covalentes fortes (CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

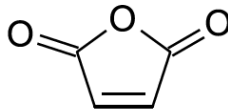
Outra classificação comumente encontrada é em relação ao arranjo de moléculas, podendo ser apresentado em estado amorfo, estado cristalino, ou parcialmente em ambos. No estado amorfo ocorre uma disposição desordenada das moléculas e no estado cristalino há uma ordenação tridimensional de matéria, formando cristais. No caso de polímeros, depende da estrutura química, do peso molecular e do tratamento físico, incluindo temperatura, tempo e forças a que foi submetido o material. (MANO; MENDES, 1999).

Os polímeros também podem ser classificados como (a) termoplástico, com a capacidade de amolecer e fluir quando sujeitos a um aumento de temperatura e pressão e de solidificar posteriormente, estes processos podem ser repetidos por diversas vezes; (b) termorrígido, o qual sofre o processo de cura, ocorrendo uma transformação química irreversível, com a formação de ligações cruzadas, tornando-se rígido; ou (c) elastômero, o qual pode ser

deformado repetidamente e cessando o esforço volta ao tamanho original (CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

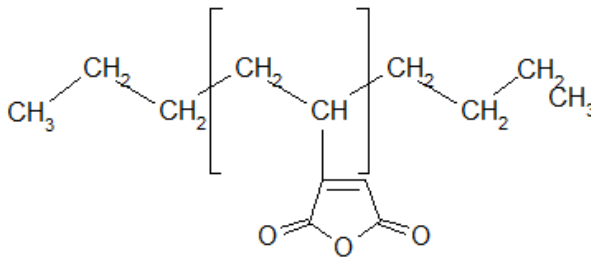
Um dos monômeros comumente utilizados para modificação de polímeros é o anidrido maleico, assim como as substâncias similares a ele, como o ácido fumárico, ácido itacônico ou o ácido citacônico. Esta modificação, também conhecida como graftização de polímeros, alteram as propriedades dos materiais pela introdução de certas modificações químicas que resultam em novas características, tais como propriedades adesivas, alteração da polaridade das cadeias e propriedades reacionais com outros polímeros para a produção de agentes de compatibilização (HAMIELEC; GLOOR; ZHU, 1991; CHA; WHITE, 2001). A fórmula estrutural plana do anidrido maleico e do polietileno modificado por este monômero são apresentados nas Figuras 2.2 e 2.3.

Figura 2.2. Fórmula estrutural plana do anidrido maleico



Fonte: RZAYEV (2011).

Figura 2.3. Estrutura química de polietileno modificado com anidrido maleico.



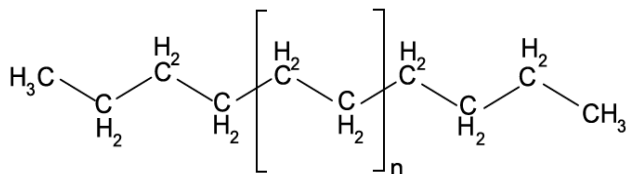
Fonte: RZAYEV (2011).

2.2.1 Polietileno

Os polietilenos são polímeros semicristalinos, termoplásticos e produzidos através da polimerização por adição do etileno. As resinas de polietileno quimicamente puras consistem de alcanos com a fórmula $C_{2n}H_{4n+2}$, onde n é o grau de polimerização, isto é, o número de

monômeros de etileno polymerizados para formar a cadeia (PEACOCK, 2000), conforme Figura 2.4.

Figura 2.4. Estrutura química de polietileno puro.



Fonte: PEACOCK (2000).

De acordo com a norma ASTM D-4976 (2006), o polietileno pode ser classificado segundo sua densidade como:

- Classe 1 (0,910 a 0,925 g cm⁻³) = Polietileno de Baixa Densidade;
- Classe 2 (>0,925 a 0,940 g cm⁻³) = Polietileno de Média Densidade;
- Classe 3 (>0,940 a 0,960 g cm⁻³) = Polietileno de Alta Densidade;
- Classe 4 (>0,960 g cm⁻³) = Polietileno de Alta Densidade.

As classes 3 e 4 cobrem duas faixas de densidade, mas ambas são classificadas como polietileno de alta densidade.

Segundo Peacock (2000), existem diferentes tipos de polietileno, sendo estes classificados principalmente em relação à configuração das cadeias e à densidade, tais como polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade linear (PEBDL) e polietileno de baixa densidade (PEBD), conforme representado na Figura 2.5. Referências de polietileno de ultra baixa densidade (PEUBD) e polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) podem também ser encontradas (COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003).

O PEBD apresenta aproximadamente 50 % de cristalinidade, enquanto o PEAD possui alta cristalinidade, cerca de 90 % ou mais. A cristalinidade do PEBDL, embora muito menor que a do PEAD, é maior do que a do PEBD. Essa maior cristalinidade em adição à linearidade das cadeias poliméricas afeta positivamente as propriedades mecânicas dos filmes de PEBDL, sem causar decréscimo em suas características ópticas (COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003).

O PEBD possui ramificações de cadeias curtas e longas, estas apresentam um efeito pronunciado sobre a reologia do fundido devido à

redução do tamanho molecular e ao aumento dos entrelaçamentos. As ramificações de cadeia curta têm influência, tanto no PEBD como no PEBDL, sobre a morfologia e algumas propriedades físicas tais como rigidez, densidade, dureza e resistência à tração, pois impede um arranjo perfeitamente ordenado das cadeias (MARK, 1999; COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003; CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

Figura 2.5. Representação esquemática da configuração das cadeias de (a) polietileno de alta densidade; (b) polietileno de baixa densidade; e (c) polietileno de baixa densidade linear.



Fonte: PEACOCK (2000).

O PEBD possui propriedades de interesse para diversas aplicações, tais como boa processabilidade, baixo custo, flexibilidade, tenacidade, resistência ao impacto, boa resistência química a solventes aquosos e boas propriedades elétricas. Como aplicações deste polímero podem ser citadas filmes para embalagens industriais e agrícolas, embalagens de alimentos, produtos farmacêuticos e hospitalares, brinquedos e utilidades domésticas, revestimento de fios e cabos, tubos e mangueiras (MARK, 1999).

O PEBDL é um copolímero de etileno com uma α -olefina, como propeno, 1-buteno, 1-hexeno ou 1-octeno. O PEBDL apresenta estrutura molecular de cadeias lineares com ramificações curtas. Comparado ao PEAD, o PEBDL apresenta resistência à tração e dureza mais baixas, conforme aumenta o teor de ramificações, e exibe em filmes maior resistência ao impacto e ao rasgamento, possuindo também boas propriedades de selagem térmica. O PEBDL substitui ou é misturado ao PEBD em várias aplicações e é utilizado em filmes para uso industrial, lonas em geral, brinquedos, artigos farmacêuticos e hospitalares, revestimento de fios e cabos (MARK, 1999; COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003).

Devido às excelentes propriedades mecânicas, baixo custo, além de propriedades de barreira e por não serem tóxicas, as embalagens de polietileno são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, sendo utilizadas em embalagens de produtos lácteos, cárneos, polpa de frutas,

produtos de panificação, produtos alimentícios secos, etc (BARÃO, 2011).

2.2.2 Incorporação de substâncias antimicrobianas

O uso de nanomateriais para aplicações em embalagens de alimentos levou a novos materiais com propriedades mecânicas e de barreira melhoradas e com atividade antimicrobiana (CHAUDHRY et al., 2008; ESPITIA et al., 2012).

Os polímeros incorporados com antimicrobianos para acondicionamento de alimentos podem ter várias aplicações. Uma é para prolongar o período de vida útil e promover a segurança, reduzindo a taxa de crescimento de micro-organismos específicos por contato direto da embalagem com a superfície de alimentos sólidos ou envolvendo grandes quantidades de líquidos. Em segundo lugar, a embalagem antimicrobiana poderia ser esterilizante ou desinfetante. Tais materiais de embalagem antimicrobiana reduziram significativamente o potencial de recontaminação dos produtos. Em terceiro lugar, pelo menos no conceito, isto poderia resultar em alimentos esterilizantes, especialmente líquidos (HOTCHKISS, 1997; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

NPs-ZnO têm sido incorporadas em diferentes materiais, incluindo vidro, PEBD, polipropileno, poliuretano, papel e quitosana, utilizando diferentes métodos de incorporação. E o teste de difusão em ágar e o contato direto dos materiais com o micro-organismo em meio de cultura líquido, seguida de contagem de colônia, são testes comumente utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana (GHULE et al, 2006; LEPOT et al, 2010; APPLEROT et al., 2009; JIN et al., 2009; LI et al, 2009; EMAMIFAR et al, 2010; PRASAD et al, 2010; VICENTINI et al., 2010; EMAMIFAR et al, 2011; ESKANDARI et al, 2011).

Applerot et al. (2009) estudaram o mecanismo e a cinética de deposição de NPs-ZnO em vidro por irradiação ultrassônica. O vidro revestido com 1 h de tratamento possuiu atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, com uma redução da contagem microbiana de 89 % e 15 %, respectivamente, após 4 h de incubação. Essa diferença indicou uma diferença na suscetibilidade à ROS. Eskandari et al. (2011) estudaram a deposição de NPs-ZnO em vidro pelo método de solução química e observaram propriedades estáveis após dois meses e que o material desempenha um papel importante na inibição do crescimento de *Candida albicans*.

A incorporação de nanopartículas em papel foi também estudada. Ghule et al. (2006) revestiram papel com NPs-ZnO (20 nm) sem adição de ligantes e encontraram atividade antimicrobiana contra *E. coli*. Prasad et al. (2010) trabalharam com nanocompósitos de ZnO com amido como agente de estabilização, resultando em um papel com elevado poder de cobertura, propriedades antifúngicas e protetor UV, aumentando a vida útil do papel.

NPs-ZnO incorporados em filmes de polipropileno orientado biaxialmente (BOPP) foram preparadas com sucesso por Lepot et al. (2010), resultando em uma dispersão uniforme das nanopartículas. Os nanocompósitos obtidos apresentaram melhores propriedades mecânicas em combinação com as propriedades de barreira ao oxigênio e com a manutenção da estabilidade térmica.

Li et al. (2009) estudaram revestimentos à base de poliuretano reforçado com NPs-ZnO (27 nm). Os filmes, com concentração ótima de 2 % em massa, apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Bacillus subtilis* e propriedade mecânicas melhoradas.

De acordo com Emamifar et al. (2010), filmes de PEBD incorporados com nanopartículas de prata e de óxido de zinco por extrusão possuem ação antimicrobiana interessantes. NPs-ZnO (0,25 % em massa) prolongaram a vida de prateleira de suco de laranja fresco em 28 dias sem causar efeitos sensoriais. Nanopartículas de prata apresentaram uma maior efetividade antimicrobiana, porém efeitos sensoriais negativos. Foram realizados neste estudo testes em fungos e bactérias aeróbicas totais. Os mesmos autores em outro estudo testaram os efeitos dos mesmos em suco de laranja inoculada com $8,5 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ de *Lactobacillus plantarum*, observando redução do crescimento microbiano (EMAMIFAR et al., 2011).

A migração de NPs-ZnO em embalagens é ainda pouco relatada na literatura. Emamifar et al. (2011) estudaram a migração de íons de zinco de embalagens de 15 x 10 cm obtidas a partir de filmes de PEBD incorporados com 0,25 e 1 % em massa de NPs-ZNO, com média de 70 nm de diâmetro, por extrusão e verificaram a migração de $0,26 \pm 0,006$ e $0,13 \pm 0,004 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, após 56 dias de estocagem de 175 mL de suco de laranja a 4 °C. Após 112 dias, a migração de íons de zinco observada foi de $0,68 \pm 0,002$ e $0,54 \pm 0,005 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.3 MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS VINCULADOS AOS ALIMENTOS

O principal grupo de micro-organismos patogênicos vinculados aos alimentos são as bactérias. As bactérias compreendem um grande grupo de seres procariontes e possuem suas particularidades em relação à forma, tamanho, fator de virulência e demais características que são responsáveis pela sua identificação, presença em alimentos e ação como patógenos (MADIGAN et al., 2010).

As bactérias podem ser classificadas de acordo com sua estrutura celular em Gram positivas ou Gram negativas, as quais diferenciam-se em relação à composição e estrutura da parede celular. A parede celular de bactérias Gram positivas é constituída por várias camadas de peptidoglicano, formando uma estrutura espessa e rígida e contém ácidos teicóicos, que consistem principalmente de um álcool e fosfato e, devido a sua carga, podem ligar-se e regular o movimento de cátions para dentro e para fora da célula, além de desempenhar um papel no crescimento e identificação celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

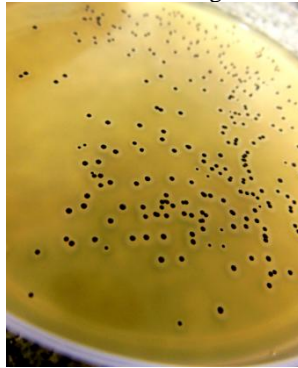
A parede celular de bactérias Gram negativas, a qual não contém ácidos teicóicos, é constituída de uma ou poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa formada por lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos. O peptidoglicano está ligado às lipoproteínas da camada externa (lipídeos ligados covalentemente a proteínas). O periplasma, um fluido em contato com a membrana plasmática e membrana externa, contém uma alta concentração de proteínas de transporte e enzimas de degradação, como, por exemplo, enzimas que agem em compostos antimicrobianos. O lipídeo A é a porção lipídica dos LPS e é incorporado na camada superior da membrana externa. Quando as bactérias Gram negativas morrem, elas liberam este lipídeo, que funciona como uma endotoxina, responsável pelos sintomas associados a infecções por bactérias Gram negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Figura 2.6) é uma bactéria Gram positiva, aeróbica, mesófila, imóvel, com 0,5 a 1,0 μm de diâmetro e apresenta-se ao exame microscópico em cocos agrupados em forma de cachos. A condição ideal de crescimento é em meio com pH

entre 6 e 7 e, embora cresça em meios de cultura sem NaCl, multiplicam-se em concentrações de até 10 %. Algumas linhagens podem crescer em até 20 % de sal. Esta bactéria é classificada como estafilococos coagulase e DNase positiva e é uma das bactérias patogênicas mais importantes, atuando como agente de uma ampla gama de infecções. (JAY, 2005; TRABULSI et al., 1999; MADIGAN et al., 2010; Food and Drug Administration, 2012c).

Figura 2.6. Colônias típicas de *S. aureus* em ágar Baird Parker.



Fonte: o próprio autor.

O *S. aureus* é um patógeno humano versátil, encontrado na microbiota local da pele e do trato respiratório superior e é capaz de causar intoxicação estafilocócica alimentar, devido à produção de toxinas proteicas termoestáveis, denominada enterotoxinas, classificadas também como superantígenos. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de cadeia simples e são resistentes às enzimas proteolíticas gástricas e jejunais, tais como tripsina e pepsina, passando intactas através do trato digestivo. No intestino, essas enterotoxinas estimulam linfócitos T a produzirem citocinas, ativam uma resposta inflamatória, a qual resulta em gastroenterite. As enterotoxinas também estimulam o centro do vômito no sistema nervoso central, por meio dos nervos vago e simpático induzindo o retroperistaltismo. O *S. aureus* produz diversos sorotipos de enterotoxinas, sendo a mais comum a enterotoxina A, uma proteína codificada por um gene cromossomal. A enterotoxina é termoestável e, portanto, não é inativada pela cocção e pasteurização do alimento (JAY, 2005; TRABULSI et al., 1999; SANTOS et al., 2007; MADIGAN et al., 2010).

Os alimentos que são frequentemente atribuídos em casos de intoxicação alimentar estafilocócica são carnes e derivados, produtos de ovos, produtos de panificação, como bolos com cremes, e leite e seus derivados, porém qualquer alimento manipulado e armazenado com abuso de temperatura possui potencial para proliferação do micro-organismo e consequente produção de enterotoxina (Food and Drug Administration, 2012c; OLIVEIRA et al., 2013). Em lácteos, a intoxicação alimentar pode ocorrer através do consumo de leite infectado de vacas com mastite estafilocócica, assim como dos derivados lácteos fabricados a partir desse leite (JAY, 2005).

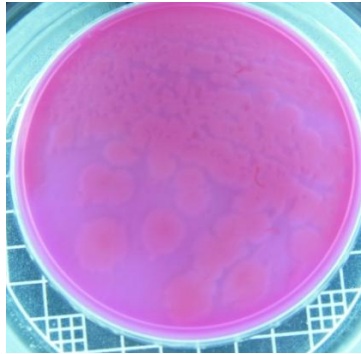
É conhecida a resistência do *S. aureus* a fármacos antimicrobianos, por base genética cromossomal e/ou plasmidial. Os mecanismos de resistência podem estar relacionados a vários mecanismos: inativação do antibiótico, como penicilina e cloranfenicol, por enzimas; desenvolvimento de uma via bioquímica resistente ao antibiótico, como a sulfonamidas; bombeamento para fora da célula e alteração do alvo, por exemplo, cloranfenicol e eritromicina, respectivamente (MADIGAN et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

2.3.2 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* (*B. cereus*) (Figura 2.7) é um bastonete Gram positivo, de grandes dimensões, aeróbico facultativo, formador de esporos esféricos e normalmente é encontrado no solo, na poeira e na água. Cresce em meios cujo valor do pH está entre 4,9 e 9,3 e a maioria das cepas são móveis (JAY, 2005).

Os esporos de *B. cereus*, denominados endósporos, são termorresistentes. Esses endósporos se apresentam em estado latente e são resistentes a condições adversas do meio, como na cocção. Caso o alimento não seja mantido em condições de refrigeração adequadamente, os endósporos desse bacilo germinam em células vegetativas e toxina é produzida (Food and Drug Administration, 2012a).

Figura 2.7. Colônias típicas de *B. cereus* em ágar MYP (manitol, gema de ovo e polimixina).



Fonte: o próprio autor.

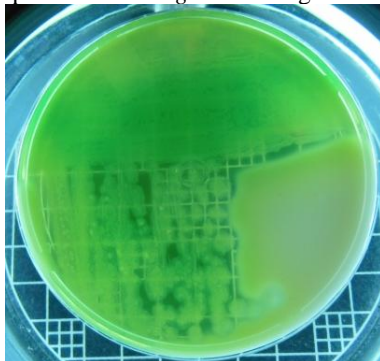
Esta bactéria produz uma grande variedade de toxinas e enzimas extracelulares, responsáveis pela intoxicação alimentar em humanos. O *B. cereus* produz duas enterotoxinas que resultam em duas formas clínicas diferentes, diarreia e vômito, conhecidos como síndrome diarreica e emética, respectivamente. Na síndrome diarreica a toxina é termolábil e age no intestino delgado. E na síndrome emética, a toxina é termoestável e é produzida durante o crescimento bacteriano no alimento contaminado. O aquecimento de um alimento contaminado pode matar as células de *B. cereus*, porém, a toxina que resulta em síndrome emética pode permanecer ativa, já que é muito resistente às diferentes condições ambientais. Os sintomas de ambos os tipos de doenças geralmente desaparecem por si mesmos, mas pode causar sérias complicações, embora raramente em pessoas saudáveis. Os alimentos veículos desta bactéria constituem-se em pratos à base de produtos amiláceos, com destaque para o arroz cozido relacionado à síndrome emética e, para a síndrome diarreica, podem ser citados vegetais, carne moída, leite, pudins e sopas (JAY, 2005; MADIGAN et al., 2010; Food and Drug Administration, 2012a).

2.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) (Figura 2.8) é o mais frequente bacilo Gram negativo não fermentador isolado nos laboratórios de microbiologia clínica. É classificado como aeróbico, móvel por flagelo polar, com 0,5 a 0,8 μm de diâmetro por 1,5 a 3,0 μm de comprimento, psicrotrófico, podendo crescer em temperaturas de

refrigeração, embora a temperatura ótima seja de 35 °C e é considerado o protótipo de patógeno oportunista (TRABULSI et al., 1999).

Figura 2.8. Colônias típicas de *P. aeruginosa* em ágar Leite.



Fonte: o próprio autor.

P. aeruginosa são encontradas tanto no solo, como em animais, podem ser encontrados em carnes e leite cru e seus derivados, como queijos, sendo a principal forma de veiculação a água. Esta bactéria constitui o mais importante grupo de bactérias deteriorantes de alimentos frescos refrigerados, devido às suas enzimas proteolíticas e lipolíticas, responsáveis, como por exemplo, pela hidrólise da caseína do leite e consequente deterioração do alimento (JAY, 2005; KESKIN, EKMEKÇI, 2008).

A síntese de alginato por esta bactéria forma um biofilme, uma matriz exopolissacarídea altamente hidrofóbica, que ancora as bactérias a uma superfície colonizada. A matriz do biofilme reduz significativamente a capacidade de penetração de agentes antimicrobianos. Outra característica dessa bactéria é a produção de pigmentos fluorescentes. Esses exopigmentos são metabólitos secundários e, dentre os diversos produzidos, a piocianina, hidrossolúvel, é predominante neste bacilo (TRABULSI et al., 1999; MADIGAN et al., 2010).

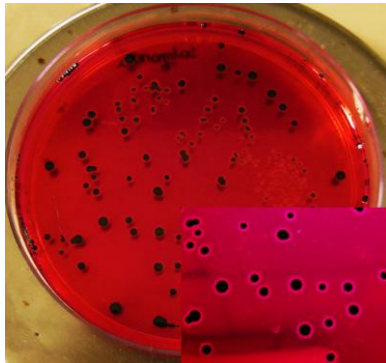
A esta bactéria está vinculada a presença de exo e endotoxinas. A exotoxina A, proteína tóxica liberada pela célula do patógeno, é responsável pela infecção por *P. aeruginosa*, inibindo a síntese proteica. A endotoxina, um componente estrutural do LPS da parede de bactérias Gram negativas, é intrínseca em 100% das amostras de *P. aeruginosa* e funciona como fator de virulência conferindo atividade

imunostimulante ao infectado. A importância clínica desta bactéria está vinculada, além de atingirem indivíduos imunocomprometidos, à resistência a diversos antimicrobianos de uso habitual, devido a mecanismos como impermeabilidade da membrana, formação de biofilme, sistemas de efluxo e presença de plasmídios de resistência (TRABULSI et al., 1999; MADIGAN et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

2.3.4 *Salmonella* Typhimurium

A *Salmonella entérica*, subespécie *entérica*, sorotipo Typhimurium, usualmente chamada de *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) (Figura 2.9), é um bastonete Gram negativo, móvel, anaeróbico facultativo, mesófilo, com 0,7 a 1,5 µm de diâmetro e 2,0 a 5,0 µm de comprimento, e multiplica-se em meios com valor de pH entre 4,5 e 9,5. A *S. Typhimurium* é, juntamente com o sorotipo *S. Enteritidis*, a principal causa de salmonelose transmitida por alimentos em humanos, sendo as principais fontes os tratos intestinais de humanos e animais de sangue quente (JAY, 2005; Food and Drug Administration, 2012b).

Figura 2.9. Colônias típicas de *S. Typhimurium* ágar XLD (xilose, lisina e desoxicolato).



Fonte: o próprio autor

Os mecanismos que podem introduzir estes micro-organismos nos alimentos são vinculados aos animais destinados à produção de alimentos frescos, à contaminação fecal provocada por manipuladores de alimentos e à consequente contaminação cruzada. As infecções

alimentares por *Salmonella* sp. são transmitidas principalmente por ovos consumidos crus ou mal cozidos, mas também frequentemente vinculados a carnes e produtos cárneos, como embutidos e carnes curadas porém cruas, aves domésticas, leites e produtos lácteos (SILVA; DUARTE, 2002; MADIGAN et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2013).

A *S. Typhimurium* apresenta simultaneamente diversos fatores de virulência que podem agir sinergisticamente ou individualmente. A infecção por *S. Typhimurium* começa quando estes micro-organismos atravessam a camada epitelial do intestino e alcançam a lâmina própria, onde se multiplicam. As salmonelas são fagocitadas pelos macrófagos e monócitos, resultando em resposta inflamatória, também relacionada com a liberação de prostaglandinas, que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Após a adesão e invasão, favorecidas por antígeno flagelar e fíbrilas, a *Salmonella* patogênica emprega uma combinação de endotoxina, enterotoxina e citotoxina para danificar e matar as células hospedeiras, provocando os sintomas clássicos da salmonelose, que são diarreia, febre, dores abdominais e vômito (JAY, 2005; MADIGAN et al., 2010).

O *S. aureus*, a *S. Enteritidis* e a *S. Typhimurium* estão entre os principais patógenos vinculados a doenças transmitidas por alimentos, ressaltando a importância do controle do crescimento destes em alimentos, impactando diretamente na saúde pública (FRANCO; LANDGRAF, 2008; BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

As NPs-ZnO utilizadas (Figura 3.1) foram fornecidas pela empresa Kher Nanotecnologia Química Ltda. A produção das nanopartículas foi via processamento soloquímico, pela reação entre uma solução precursora ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) e uma solução alcalina (NaOH) aquecida (GUSATTI, 2010; GUSATTI et al., 2010).

As dispersões de NPs-ZnO foram preparadas nas concentrações desejadas para cada teste pela mistura em água Milli-Q. Inicialmente, a mistura de água e nanopartículas foi mantida durante 30 minutos em banho ultrassônico (Modelo 1650A, Marca UNIQUE) para minimizar a aglomeração das NPs-ZnO, seguidos de cinco segundos de agitação (Agitador de Soluções AP56 Phoenix). As dispersões foram preparadas imediatamente antes do início de cada teste.

Figura 3.1. Pó de NPs-ZnO.



Fonte: o próprio autor.

3.1.1 Caracterização das nanopartículas

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

Análise de MET (JEM-1011 TEM, 100kV) foi realizada no Laboratório da Central de Microscopia Eletrônica da UFSC adaptando-se as técnicas propostas por Leng (2008) e Gusatti (2010). Assim, uma dispersão de aproximadamente $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de NPs-ZnO em água Milli-Q, mantida em banho ultrassônico por 30 minutos, foi preparada e uma gota foi adicionada em um *grid*, o qual consiste em um filme de carbono amorfo, com 3 a 5 nm de espessura, sustentado em uma grade de cobre com 3 mm de diâmetro. O *grid* com a amostra permaneceu em

temperatura ambiente para máxima remoção do solvente e posterior análise no equipamento.

As imagens foram analisadas no software ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, USA). As nanopartículas observadas em sua totalidade tiveram suas dimensões de espessura e comprimento medidos. Um total de 200 nanopartículas foi considerado para a elaboração de histogramas de distribuição de tamanho.

A análise de DRX foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural da UFSC em difratômetro de raios X (modelo X'Pert, Philips, Holanda), operando a 40 kV e 30 mA e utilizando como radiação incidente CuK ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). As amostras foram examinadas em um intervalo de medida 2θ entre 20 e 80°, com incrementos de 0,05° a cada 1 s.

3.2 FILMES INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

3.2.1 Material polimérico

Os polímeros utilizados para incorporação de NPs-ZnO foram polietileno de baixa densidade – PEBD (Braskem) e polietileno de baixa densidade linear modificado com 1 % em massa de anidrido maleico – PEBDL-AM (especificação Polybond® 3109, Chemtura). Na Tabela 3.1 estão apresentadas as propriedades fornecidas pelo fabricante.

Tabela 3.1. Propriedades do PEBD e PEBDL-AM.

	PEBD	PEBDL-AM
Massa específica (g cm^{-3})	0,915	0,926
Índice de fluidez (190 °C/2,16 Kg) ($10^{-1} \text{g min}^{-1}$)	30	30
Temperatura de fusão (°C)	NE	123

*NE: não especificado.

3.2.2 Formação do filme incorporado com nanopartículas de óxido de zinco

Para a formação de um filme com 0,50 mm de espessura e com atividade antimicrobiana resultante da adição das NPs-ZnO, foram adotadas duas estratégias: Extrusão da mistura física das NPs-ZnO e dos *pellets* de polímero e aspersão das NPs-ZnO sobre o filme e posterior

usão. Os filmes foram denominados ao longo do trabalho de acordo com a formulação utilizada para cada amostra, de acordo com a Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Formulações dos filmes incorporados com NPs-ZnO.

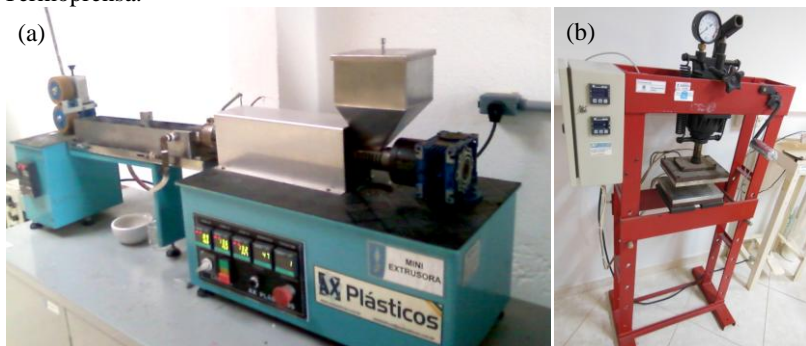
Método de incorporação	Formulação
Extrusão	Filmes de PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBD incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBD incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO
Aspersão	Filmes de PEBDL-AM incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBDL-AM incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBDL-AM incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBD incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBDL incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBDL incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO
	Filmes de PEBD incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO

3.2.2.1 Extrusão

Os *pellets* de PEBD e PEBDL-AM foram misturados fisicamente com as partículas de NPs-ZnO em um béquer de vidro na proporção de 0,5, 1,0 e 5,0 % em massa de nanopartículas por massa de polímero.

A extrusão foi realizada em extrusora monorosca (Mini-extrusora Axplásticos, modelo AX 14LD86, Brasil), apresentada pela fotografia da Figura 3.2.a, e os parâmetros operacionais estão apresentadas na Tabela 3.3. A mistura extrusada em uma única passagem foi moldada para formar filmes de 0,5 mm de espessura em uma termoprensa hidráulica (Somar, Brasil) (Figura 3.2.b) com controle manual de pressão. Para isto, um pré aquecimento a 180 °C por 5 minutos e uma prensagem por 15 min, sob 2096 kPa de pressão e 180 °C foram realizados. Posteriormente, os filmes foram resfriados em temperatura ambiente.

Figura 3.2. (a) Fotografia da extrusora monorosca. (b) Fotografia da Termoprensa.



Fonte: o próprio autor.

Tabela 3.3. Parâmetros operacionais da extrusora para a formação de filmes incorporados com NPs-Zn.

	Temperatura zona de saída (°C)	Temperatura zona de compressão (°C)	Temperatura zona de alimentação (°C)	Rotação Rosca (Hz)	Torque (Nm)
PEBD	165	155	145	0,85	41
PEBDL-AM	155	150	140	0,85	41

3.2.2.2 Aspersão de nanopartículas de óxido de zinco sobre o filme

Sobre a superfície dos filmes formados pela termoprensagem dos *pellets* do polímero desejado, foi realizada a incorporação de NPs-ZnO pela aspersão das partículas suspensas em água e posterior fusão, conforme descrito a seguir.

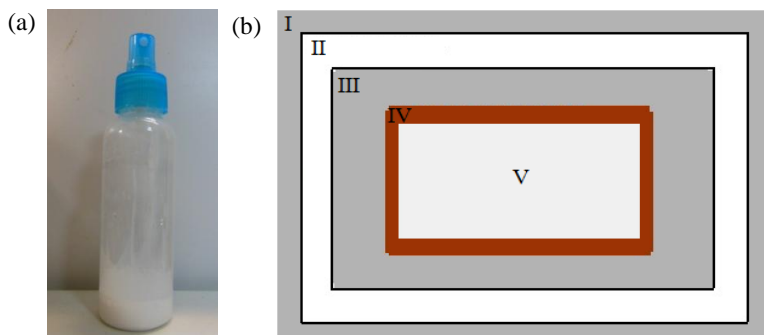
Para a formação dos filmes, 8,0 g dos *pellets* poliméricos (PEBD ou PEBDL-AM) foram acondicionados em estufa durante 24 h a 80 °C para retirada da umidade superficial. Em seguida, procedeu-se a elaboração dos filmes de polietileno em termoprensa hidráulica (Somar, Brasil), a partir de um pré aquecimento a 180 °C por 5 minutos e uma prensagem por 15 min, sob 2096 kPa de pressão e 180 °C. Os filmes, com aproximadamente 4,0 g, 96,0 cm² e 0,5 mm de espessura, foram resfriados em temperatura ambiente e acondicionados em estufa (24 h, 80 °C).

As dispersões de NPs-ZnO em água Milli-Q foram preparadas nas proporções de 13,3; 6,6; 1,3 e 0,6 % em massa de NPs-ZnO por massa de água Milli-Q, mantendo-se durante 30 minutos em banho ultrassônico (Modelo 1650A, Marca UNIQUE), para após aspersão de aproximadamente 3,0 mL desta dispersão na superfície do filme, obter uma proporção teórica de 10,0; 5,0; 1,0 e 0,5 % em massa de NPs-ZnO por massa de polímero, respectivamente.

Os filmes foram dispostos em placa de alumínio e folha de Mylar® e para uma imobilização adequada foram fixados com fita adesiva de Teflon®, fornecida gentilmente pela empresa Derflon, conforme Figura 3.3.b.

Os filmes foram pré-aquecidos a 115°C (abaixo da temperatura de fusão) na termoprensa, mantendo um espaçamento entre as chapas de aquecimento de 3 cm, durante 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a aspersão manual das NPs-ZnO com auxílio de borrifador plástico (Figura 3.3.a). Foram realizadas 30 borrifadas, totalizando um volume aproximado de 3 mL, conforme determinado em testes preliminares. Após a aspersão, manteve-se o sistema a 115 °C durante 15 minutos para evaporação da água. Em seguida, foi realizado aquecimento gradual do sistema, a 4,3 °C min.⁻¹, até 180 °C, permanecendo 10 minutos nesta temperatura. Os filmes incorporados com NPs-ZnO foram retirados da termoprensa e resfriados em temperatura ambiente.

Figura 3.3. (a) Borrifador plástico utilizado na aspersão. (b) Esquema da disposição do filme para aspersão, I. Placa de alumínio; II. Folha de Mylar®; III. Molde de inox; IV. Fita de Teflon®; V. Filme.



Fonte: o próprio autor.

3.2.3 Caracterização

Os filmes de PEBD e PEBDL-AM foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia por dispersão de energia, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e molhabilidade. A determinação da concentração incorporada de NPs-ZnO foi realizada através da determinação de carga inorgânica por mufla.

3.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por dispersão de energia

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a espectroscopia por dispersão de energia (EDS) são importantes tecnologias para a observação e análise de características microestruturais de materiais, fornecendo rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida e normalmente são utilizadas para o estudo de estruturas superficiais de amostras com dimensões relativamente grandes. O MEV resulta em imagens de alta resolução e de aparência tridimensional, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas. O princípio do MEV é análogo as diferentes técnicas de microscopia eletrônica, os quais se baseiam em diferentes sinais produzidos pela interação de feixes de elétrons com a amostra. Quando o feixe primário de elétrons, de pequeno diâmetro, incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra. Neste volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidos são utilizados para formar as imagens (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Os filmes de PEBD e PEBDL-AM foram caracterizados utilizando a técnica de MEV (JEOL JSM-6390LV) acoplado com equipamento de EDS (NORAN System SIX versão 2.0), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, UFSC.

O preparo das amostras foi realizado com a fixação dos filmes em um suporte metálico, *stub*, por meio de uma fita adesiva dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro, sob vácuo.

A superfície e a fratura criogênica dos filmes foram analisadas em MEV com ampliação de 50, 500 e 3 500 vezes e tensão de 10 kV. Em EDS foram utilizados ampliação de 150 vezes e tensão de 15 kV e

estudadas quatro regiões dos filmes para observar a distribuição elementar de zinco, oxigênio e carbono.

3.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os átomos que constituem uma molécula estão em movimento contínuo devido a vários tipos de vibrações. A atividade das vibrações normais dependerá da estrutura molecular e da simetria à qual a molécula pertence. Se uma energia radiante, com intensidade conhecida, é fornecida à amostra por meio de um feixe incidente e a intensidade do feixe transmitido for analisada, poderá ser observado que a intensidade será menor em alguns números de onda particulares, o que significa que ligações químicas presentes na amostra absorveram seletivamente estas frequências. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR baseia-se nesses fenômenos, ou seja, na observação da frequência e intensidade de radiação infravermelha absorvida quando um feixe desta radiação atravessa ou reflete na amostra, resultando em uma análise qualitativa e quantitativa de ligações químicas, respectivamente (CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

A análise de FTIR foi realizada na Central de Análises, no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, utilizando o software ResolutionsPro versão 5.2.0 (Agilent Technologies). O objetivo da análise foi analisar qualitativamente as ligações químicas presentes nos filmes.

Para a realização da análise, um espectro inicial de *background* do ar foi realizado, a fim de descontar a influência dos componentes do ar no espectro. Os espectros dos filmes de 0,5 mm de espessura, previamente mantidos em estufa a 80 °C/ 24 h, foram obtidos na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} e com 32 varreduras acumuladas para formar o espectro final. Para a análise dos filmes utilizou-se o acessório de refletância total atenuada (ATR) e um dispositivo que permitiu aplicar pressão sobre a amostra, a fim de melhorar o contato físico com a superfície do cristal (ZnSe) do equipamento. A profundidade de penetração do infravermelho foi de 2 μm . Cada amostra foi medida em triplicata.

3.2.3.3 Molhabilidade

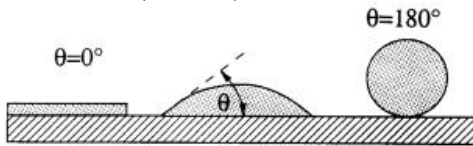
O fenômeno de molhabilidade está relacionado com as forças coesivas do líquido, que tendem a formar uma gota esférica, e as força

adesivas entre o sólido e o líquido, que tendem a espalhar o líquido sobre o sólido (BERG, 1993).

A molhabilidade de um material pode ser avaliada a partir da medida do ângulo de contato entre a água e o material, e este está relacionado com a competição entre estas forças coesivas e adesivas. De acordo com BERG (1993) o valor deste ângulo de contato inferior a 90° caracteriza uma superfície hidrofílica, e superior a 90° uma superfície hidrofóbica.

Na Figura 3.4 estão apresentadas condições de molhabilidade entre água líquida e uma superfície.

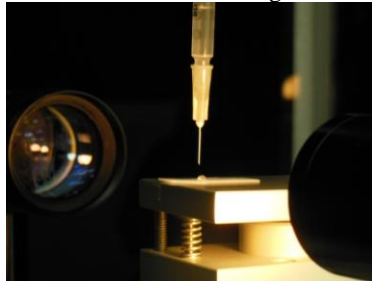
Figura 3.4. Ângulo de contato entre uma gota de água e uma superfície. Molhabilidade completa ($\theta = 0^\circ$), molhabilidade parcial ($0^\circ < \theta < 180^\circ$) e ausência de molhabilidade ($\theta > 180^\circ$).



Fonte: BEYSENS (1995).

A molhabilidade dos filmes obtidos foi estudada com uso de goniômetro e software DROPimage Advanced versão 2.4.8.5 (Raméhart Instrument co.), no Laboratório de Controle de Processos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, através do ângulo de contato formado entre a superfície de uma gota de água e a superfície sólida do filme (Figura 3.5).

Figura 3.5. Teste de molhabilidade de filme em goniômetro.



Fonte: o próprio autor.

Nesta técnica, denominada gota séssil, uma gota de água (Milli-Q) foi suavemente depositada sobre a superfície do filme de 0,50 mm de

espessura, previamente mantido em estufa a 80 °C/ 24 h, por meio de uma seringa. O goniômetro utiliza a linha tangente a partir do ponto de contato das três fases, líquido, sólido e gás para determinar o ângulo de contato dos sistemas líquido-sólido. A gota foi observada com uma lente de baixo aumento, e os ângulos de contato direito e esquerdo foram medidos, obtendo-se a variação angular ao longo do tempo. Utilizaram-se 90 medições de ângulo de contato, em intervalos de tempo de 2 segundos. O meio gasoso utilizado foi ar ambiente e o teste foi realizado em triplicata. A medição do ângulo de contato foi usada como critério de avaliação da modificação da molhabilidade dos filmes e, conseqüentemente do caráter hidrofóbico ou hidrofílico, em decorrência da incorporação de NPs-ZnO.

3.2.3.4 Determinação de carga inorgânica

As amostras de filmes de 0,50 mm de espessura e 2,0 cm², equivalente a aproximadamente 100 mg, previamente mantidos em estufa a 80 °C/ 24 h, foram adicionados em cadinhos de porcelana e mantidos em mufla a 800 °C por 4 h. Os cadinhos foram tarados em mufla a 800 °C, por 2 h. Anteriormente a pesagem, as amostras foram mantidas em dessecador com agente dessecante de sílica gel, até alcançarem temperatura ambiente. O teste teve como objetivo avaliar, além da concentração de NPs-ZnO nos filmes, a homogeneidade entre os filmes de mesma amostra. O teste foi realizado em triplicata.

Conforme apresentado na Equação 3.1, a massa de NPs-ZnO (M) nos filmes foi calculada pela razão entre a diferença da massa do cadinho mais amostra residual (mf) e a massa inicial do cadinho (mi), e a massa de filme utilizada (ma) todas expressas em mg. O resultado foi expresso em porcentagem.

$$M = \frac{mf-mi}{ma} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os experimentos de testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Centro Ciências Agrárias, UFSC.

3.3.1 Meio de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos testes antimicrobianos foram Ágar Müeller-Hinton (Kasvi); Ágar padrão de contagem - PCA (Kasvi); Caldo Nutriente (Acumedia) e Caldo infusão de cérebro e coração - BHI (Oxoid).

3.3.2 Micro-organismos

Foram estudadas as bactérias Gram positivas *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e as bactérias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 1428).

As bactérias teste foram ativadas em 5 mL de caldo BHI, mantidas em estufa bacteriológica (Marca Edutec) a 35 °C por 24 h antes do início dos testes.

3.3.3 Nanopartículas de óxido de zinco

3.3.3.1 Método de difusão em ágar

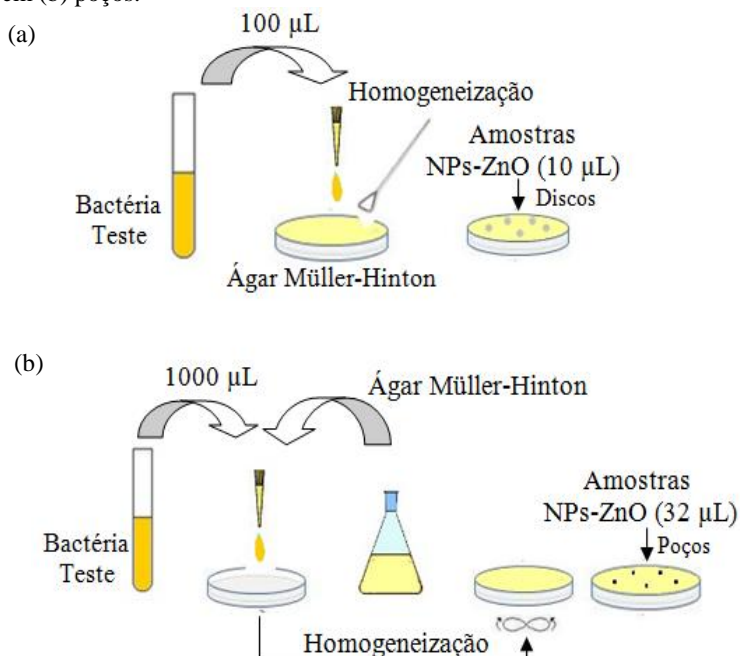
O método de difusão em ágar foi realizado com discos de papel filtro e poços em meio de cultura sólido (Figura 3.6). O Ágar Müeller-Hinton é recomendado como meio para Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão (Norma M2-A8, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS).

O método em discos foi realizado através da fixação de cinco discos de papel filtro (9 mm) em placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton previamente inoculado com a bactéria teste, na concentração de 10^9 UFC/mL, pela técnica de plaqueamento em superfície. Os discos foram impregnados com um volume de 10 µL das dispersões de NPs-ZnO com concentrações variando entre 0,01 e 100 mg/mL. Os controles positivo e negativo foram, Ciprofloxacino (0,25 µg/µL) e água Milli-Q, respectivamente. O teste foi realizado em duplicata.

O método com uso de poços, consistiu na abertura de poços, de aproximadamente 5 mm de diâmetro, no ágar Müeller-Hinton previamente inoculado com a bactéria teste, na concentração de 10^9 UFC/mL, pela técnica de plaqueamento em profundidade, preenchidos com 32 µL cada, com as amostras de NPs-ZnO e controles, nas mesmas

concentrações do teste em discos de papel filtro. O teste foi realizado em duplicata.

Figura 3.6. Esquema dos procedimentos do teste difusão em ágar em (a) discos e em (b) poços.



Fonte: o próprio autor.

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

3.3.3.2 Teste de diluição em caldo - Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima

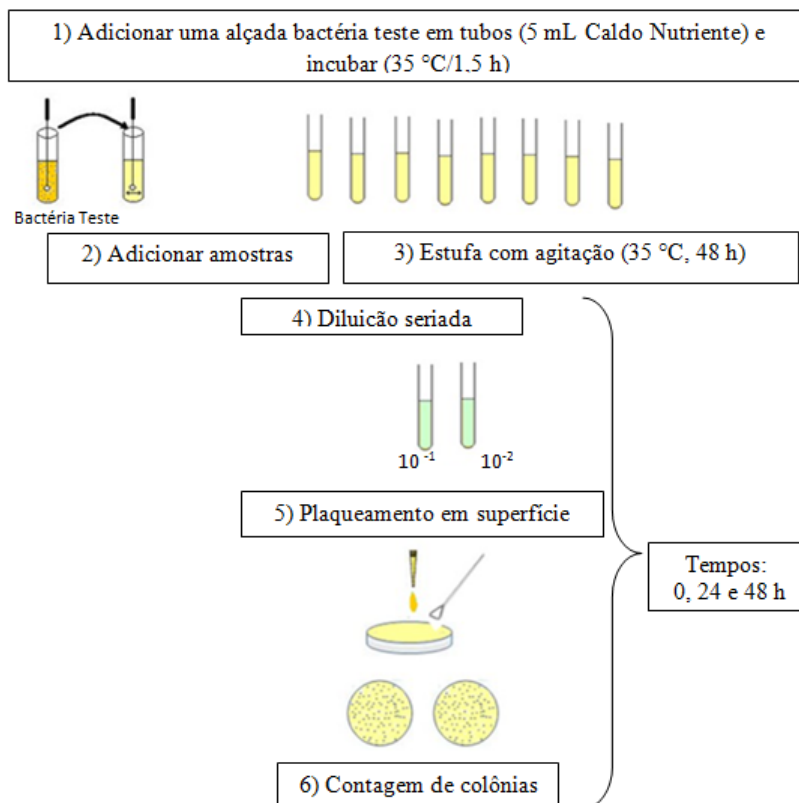
O teste de diluição em caldo foi realizado em tubos com 5 mL de Caldo Nutriente inoculados com uma alçada das bactérias teste e incubados em estufa bacteriológica (Marca FANEM), por 1,5 h a 35 °C, resultando numa concentração inicial de 10^5 UFC/mL, conforme recomendado pela Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes

Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico (Norma M7-A6, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS).

Aos tubos foram adicionados as seguintes concentrações de NPs-ZnO: 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 e 0,01 mg/mL, Ciprofloxacino (0,02 mg/mL) e água Milli-Q como controle positivo e negativo, respectivamente. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica com agitação (Marca TECNAL, Modelo TE820) a 35 °C.

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), em mg/mL, descritas como as menores concentrações capaz de inibir o crescimento bacteriano e eliminar 99,99 % dos micro-organismos, respectivamente, foram determinadas a partir de contagem de colônia de placas semeadas em superfície em ágar PCA, a partir de diluição seriada em água peptonada 0,1 %. A contagem foi realizada no tempo inicial e após 24 h e 48 h de incubação. O teste foi realizado em duplicata. A ausência de crescimento de colônias bacterianas, após 48 h de incubação, na diluição 10^{-1} , caracterizou a CBM. A mesma contagem logarítmica de colônias bacterianas, após 48 h de incubação, caracterizou a CIM.

Figura 3.7. Esquema dos procedimentos do teste CIM e CBM.

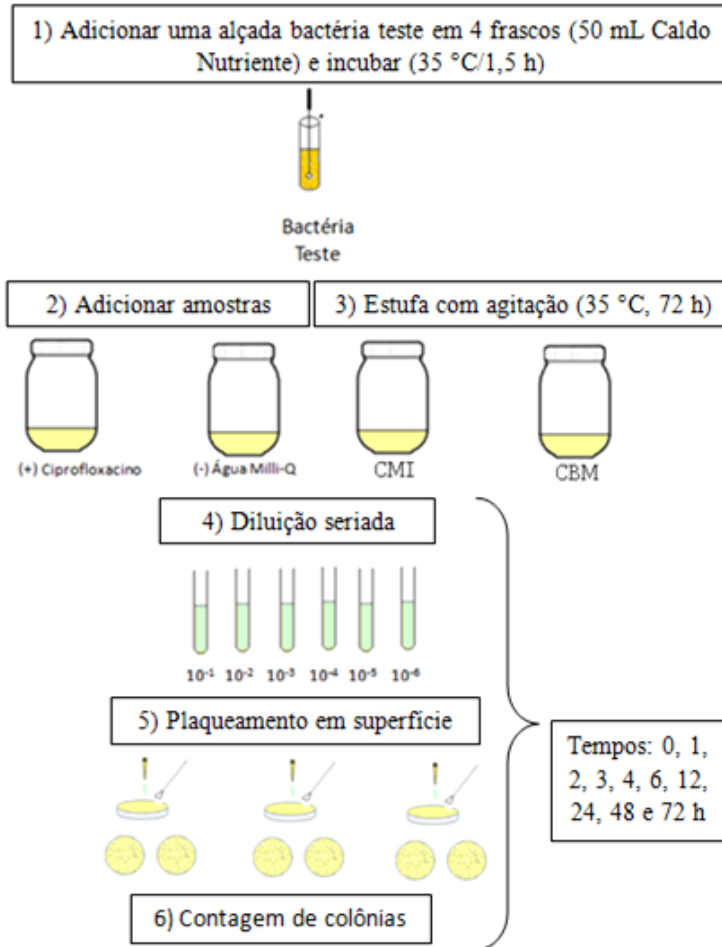


Fonte: o próprio autor.

3.3.3.3 Teste de crescimento microbiano

O teste de crescimento microbiano (Figura 3.8) foi realizado em frascos com 50 mL de Caldo Nutriente inoculados com uma alçada das bactérias teste e incubados em estufa bacteriológica (Marca FANEM), por 1,5 h a 35 °C, resultando numa concentração inicial de 10⁵ UFC/mL.

Figura 3.8. Esquema dos procedimentos do teste de crescimento microbiano.



Fonte: o próprio autor.

Aos frascos foram adicionados as CIM e CBM de NPs-ZnO de cada bactéria, Ciprofloxacino (0,02 mg/mL) e água Milli-Q como controle positivo e negativo, respectivamente. Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica com agitação (Marca TECNAL, Modelo TE820) a 35 °C por 72 h.

As amostras passaram por diluições seriadas em água peptonada 0,1 % e diluições foram inoculadas pela técnica de plaqueamento em superfície em placas de Petri contendo ágar PCA, em duplicata,

seguidas de incubação (24 h/35 °C). A contagem de colônias foi realizada no instante da adição das amostras e após 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 h de incubação em estufa com agitação a 35 °C.

3.3.4 Filmes incorporados com nanopartículas de óxido de zinco

3.3.4.1 Difusão em ágar

O método de difusão em ágar foi realizado através da fixação de amostras de filmes, de 1,0 cm², em placas de Petri, contendo Ágar Müeller-Hinton previamente inoculado com a bactéria teste, na concentração de 10⁹ UFC/mL, pela técnica de plaqueamento em superfície. O controle negativo foi o filme de polietileno sem NPs-ZnO. O teste foi realizado em duplicata. O resultado foi analisado através da presença ou ausência de um halo de inibição de crescimento microbiano em torno do filme, cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano testado e a sensibilidade da bactéria.

3.3.4.2 Crescimento microbiano

Tubos com 5 mL de Caldo Nutriente foram inoculados com uma alçada das bactérias teste e incubados em estufa bacteriológica (Marca FANEM), por 1,5 h a 35 °C, resultando numa concentração inicial de aproximadamente 10⁵ UFC/mL.

Aos tubos foram adicionados os filmes, de 2,0 cm², incorporados com diferentes concentrações de NPs-ZnO e filmes com polietileno sem adição de NPs-ZnO, como controle negativo. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica com agitação (Marca TECNAL, Modelo TE820) a 35 °C.

As amostras passaram por diluições seriadas em água peptonada 0,1 % e diluições foram inoculadas, pela técnica de plaqueamento em superfície, em placas de Petri contendo ágar PCA, seguidas de incubação (24 h/35 °C). A contagem de colônias foi realizada no instante da adição dos filmes e após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação em estufa com agitação a 35 °C. O teste foi realizado em duplicata.

Os filmes utilizados para os testes antimicrobianos foram esterilizados em luz ultravioleta durante 20 minutos, em ambos os lados.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

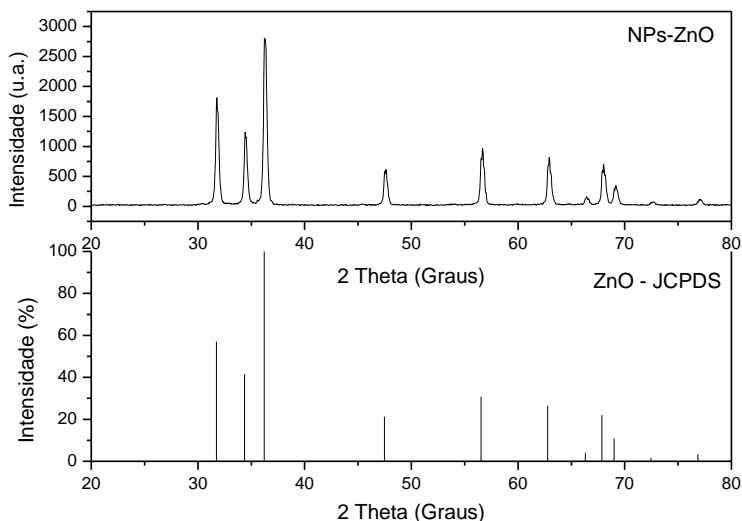
Os dados foram tratados usando análise de variância (ANOVA) através do software Statistica versão 7 (StatSoft, Inc, USA). E teste de Tukey foi utilizado para determinar a diferença estatística dos valores médios com significância expressa em nível de 5 %.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

A estrutura cristalina da amostra de NPs-ZnO foi investigada pela técnica de DRX. Os difratogramas das NPs-ZnO e do padrão de difração para ZnO fornecido pelo Joint Committee on Powder Diffraction Standards – JCPDS, International Centre for Diffraction Data, cartão número 01-089-1397 estão apresentados na Figura 4.1. As NPs-ZnO estudadas apresentaram picos de difração que coincidem com o padrão, confirmando a estrutura hexagonal wurtzita do ZnO utilizado, com grupo espacial $P6_3mc$ e parâmetros de rede $a = 3,25 \text{ \AA}$ e $c = 5,21 \text{ \AA}$, conforme especificado na carta padrão. As NPs-ZnO mostraram-se com elevado grau de pureza, pois nenhum pico de outra fase foi detectado no difratograma.

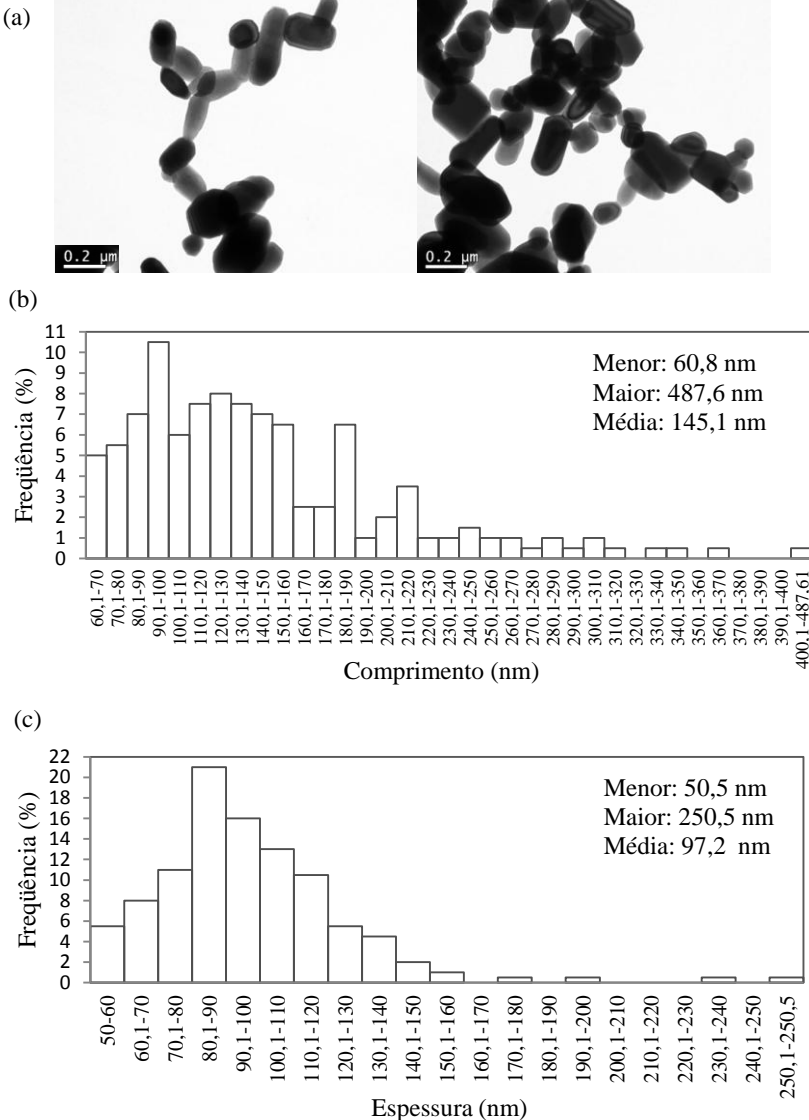
Figura 4.1. Difratogramas das NPs-ZnO e da carta padrão JCPDS.



A morfologia e distribuição de tamanho de partículas de ZnO obtidas por MET estão apresentadas na Figura 4.2. A imagem de MET mostra partículas com morfologia do tipo bastão e com comprimento e espessura variando, de acordo com os histogramas de distribuição de tamanho. Os histogramas mostram que, entre as faixas de tamanho estabelecidas, há predominância de nanopartículas com comprimento

entre 90,1 e 100,0 nm (10,5 %) e espessura entre 80,1 e 90,0 nm (21 %) e valores médios de 145,1 e 97,2 nm, respectivamente.

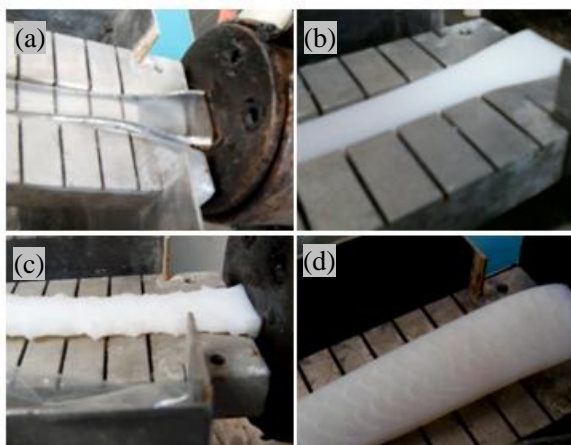
Figura 4.2. (a) Imagem de MET de NPs-ZnO; histograma de distribuição de tamanho de (b) comprimento e (c) espessura de NPs-ZnO.



4.2 FILMES INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Os *pellets* de PEBD extrusados com NPs-ZnO tiveram a opacidade aumentada conforme foi aumentada a razão nanopartículas/polímero e resultaram em um material flexível (Figura 4.3b), similar ao PEBD puro (Figura 4.3a). Entretanto, a extrusão dos pellets de PEBDL-AM com as nanopartículas resultou em um material rígido, evidenciando a interação entre o polímero e o ZnO. Devido à característica do material na saída da extrusora (Figuras 4.3c e 4.3d), não foi viável extrusar os filmes de PEBDL-AM, e, portanto, apenas o filme de PEBDL-AM com 1,0 % de NPs-ZnO foi obtido por extrusão.

Figura 4.3. Comportamento dos materiais extrusados (a) PEBDL-AM puro; (b) PEBD incorporado com 5,0 % de NPs-ZnO; (c) e (d) PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO.

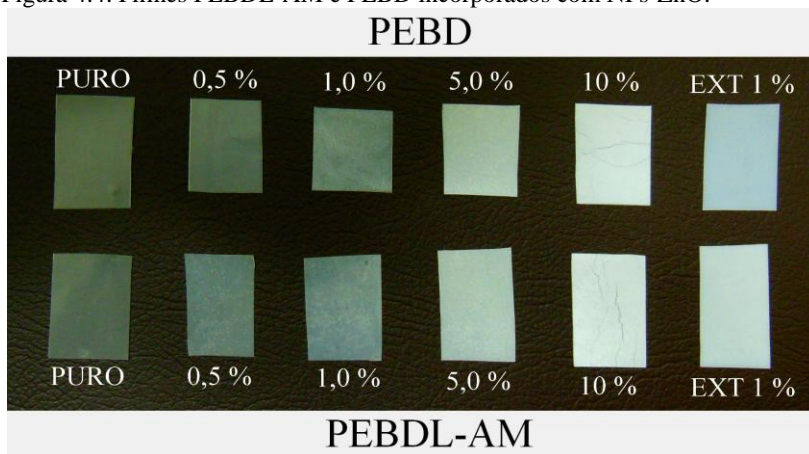


Os filmes de PEBD extrusados com NPs-ZnO obtidos por termoprensagem apresentaram-se homogêneos a olho nu, enquanto que os filmes de PEBDL-AM extrusado com NPs-ZnO apresentam pequenos pontos brancos de NPs-ZnO distribuídos. A fotografia destes filmes incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão (EXT 1 %) está apresentada na Figura 4.4.

Os filmes de PEBD e PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão em todas as concentrações testadas foram obtidos. O aquecimento necessário para a incorporação por aspersão da dispersão de NPs-ZnO resultou em nova fusão dos filmes de polietileno e

eventuais deformações, sendo selecionadas para continuidade apenas as porções homogêneas e visualmente planas. Nas duas concentrações mais elevadas da dispersão (5,0 e 10,0 %) observou-se acúmulo de pó de NPs-ZnO sobre o filme formado, tendo sido realizada a lavagem dos filmes. Os filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão estão representados na Figura 4.4.

Figura 4.4. Filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.



As imagens obtidas por MEV dos filmes de PEBDL-AM e PEBD puros (Figuras 4.5 e 4.11) mostram superfície lisa, podendo apresentar pequenas deformações, semelhante a bolhas, devido, provavelmente, ao aquecimento em termoprensa.

Os filmes extrusados apresentaram-se semelhantes aos puros, ou seja, com superfície lisa (Figuras 4.6 e 4.12). O que sugere que as NPs-ZnO encontram-se no interior do filme.

Nos filmes obtidos por aspersão com 0,5 % de NPs-ZnO (Figuras 4.7 e 4.13) foi possível observar a incorporação das nanopartículas na forma de aglomerados. Isso pode ter ocorrido durante o processo de evaporação do solvente, resultante do movimento da água sobre o polímero, as quais tendem à coalescer, carregando as nanopartículas, o que resulta em pontos de aglomeração das mesmas. Este fenômeno também foi observado nos filmes obtidos por aspersão com 1 % de NPs-ZnO (Figuras 4.8 e 4.14).

Com o aumento da concentração (5,0 % e 10,0 %) observa-se visualmente e por MEV uma distribuição mais uniforme de NPs-ZnO, porém com maior rugosidade ((Figuras 4.9, 4.10, 4.15 e 4.16).

Figura 4.5. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM puro na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

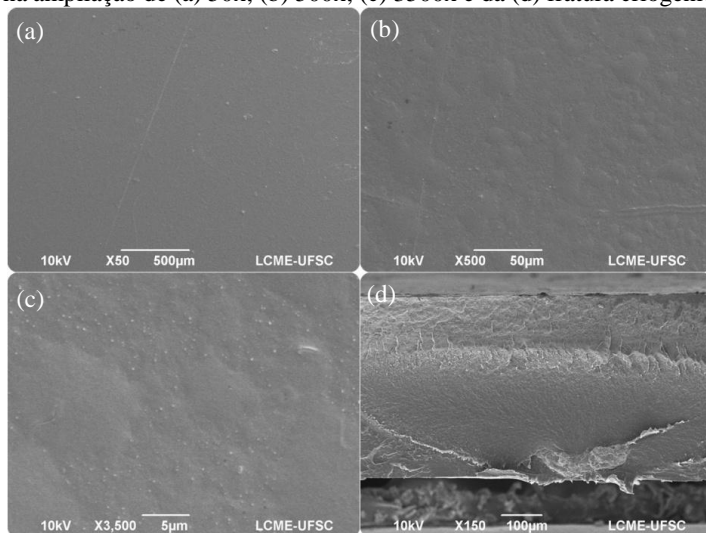


Figura 4.6. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 1 % de NPs-ZnO por extrusão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

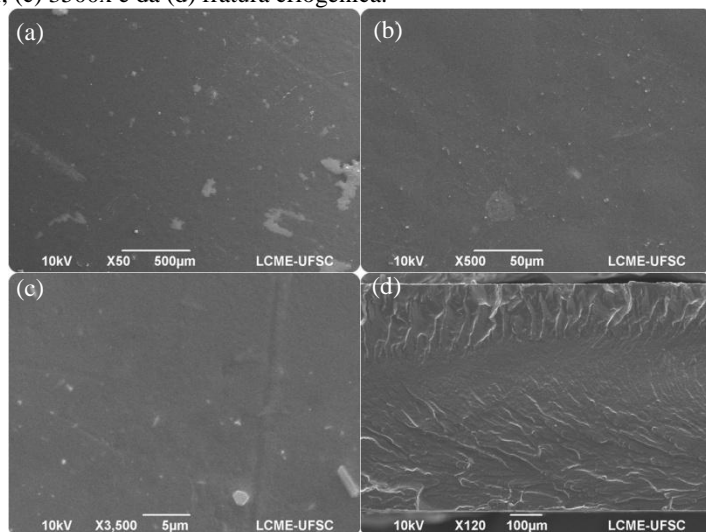


Figura 4.7. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

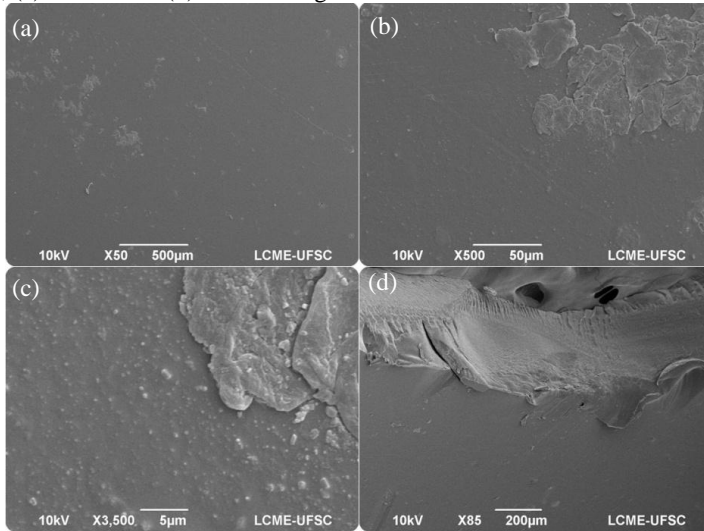


Figura 4.8. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

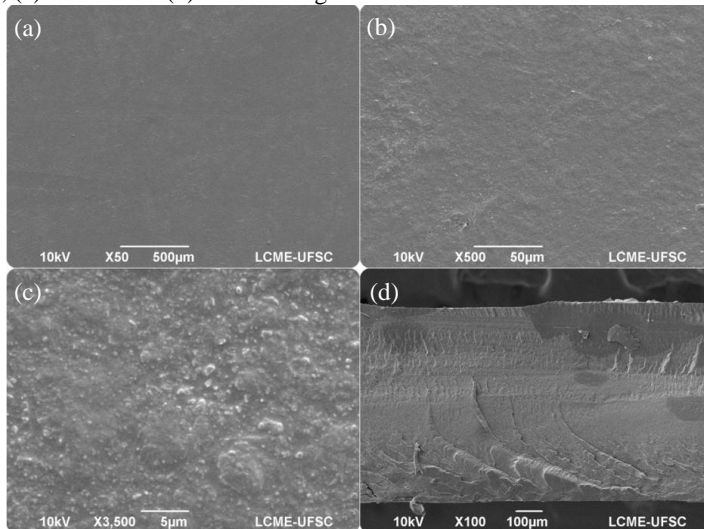


Figura 4.9. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

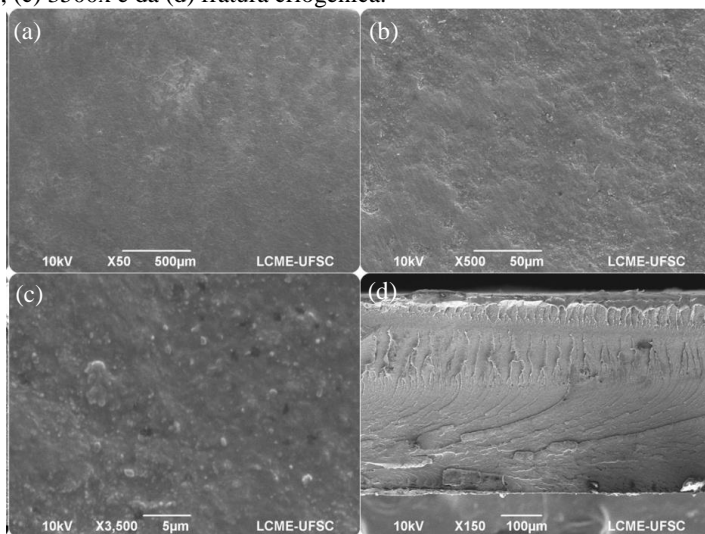


Figura 4.10. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBDL-AM incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

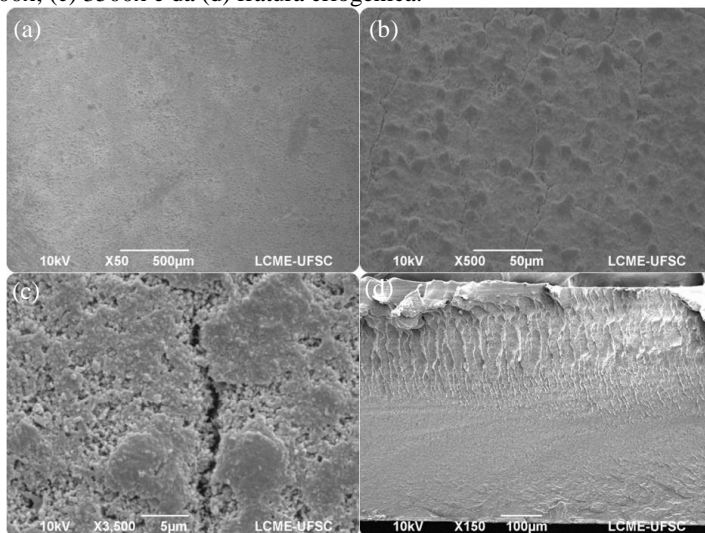


Figura 4.11. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD puro na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

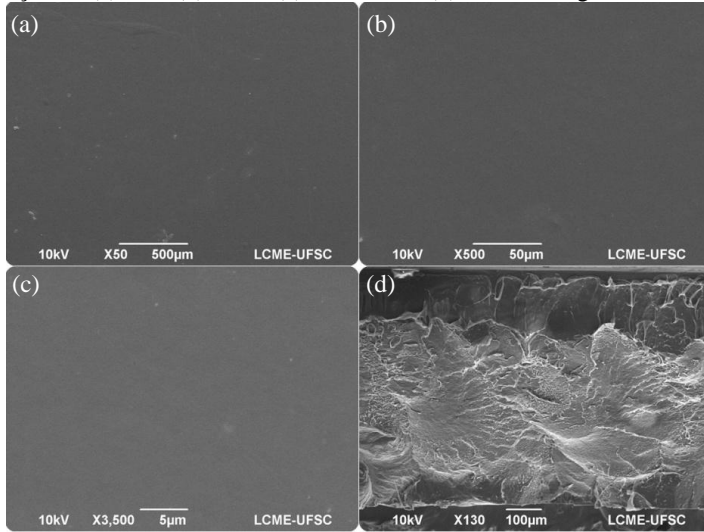


Figura 4.12. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

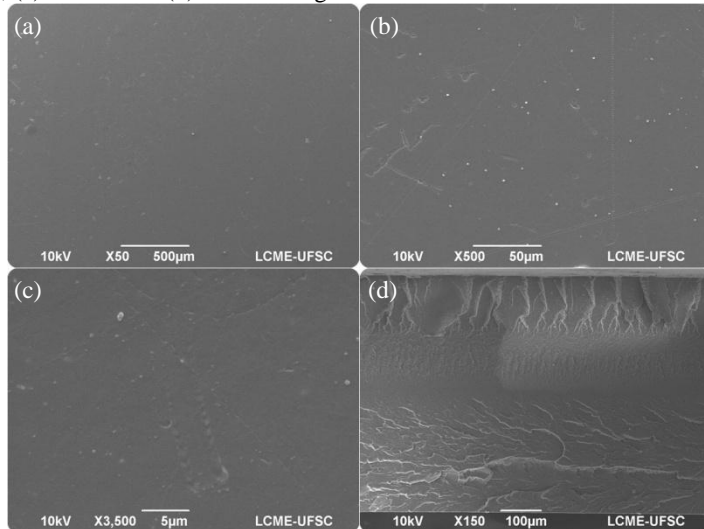


Figura 4.13. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

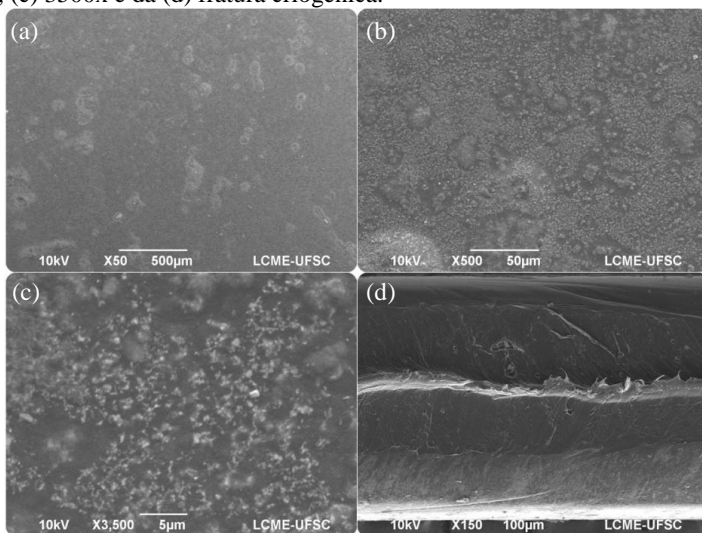


Figura 4.14. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

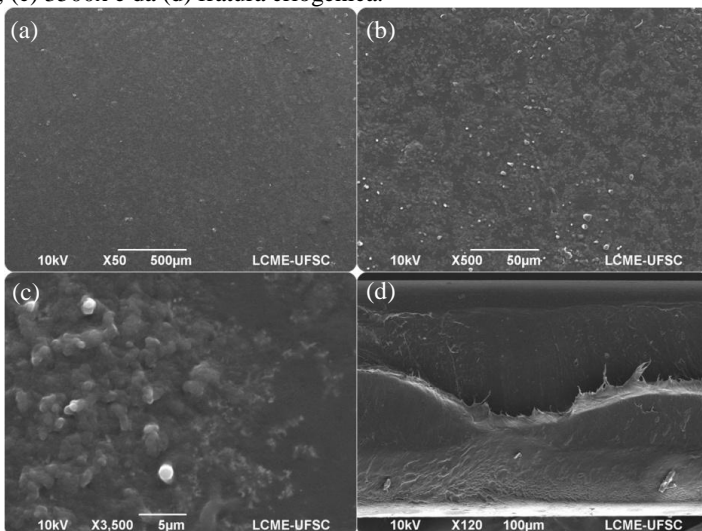


Figura 4.15. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 5,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.

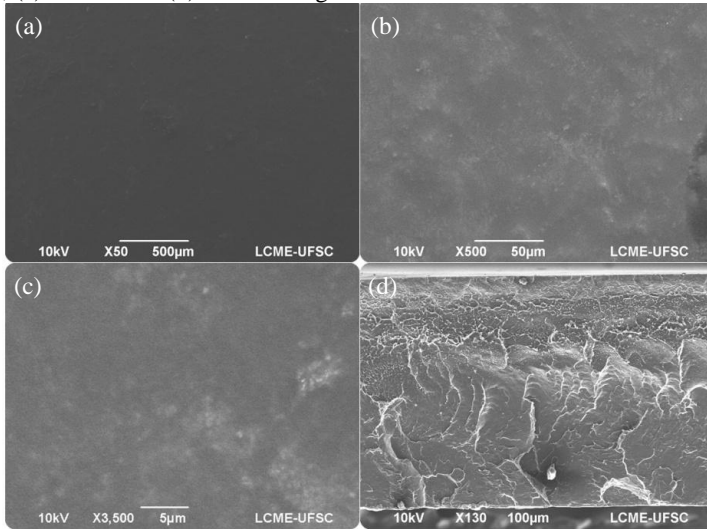
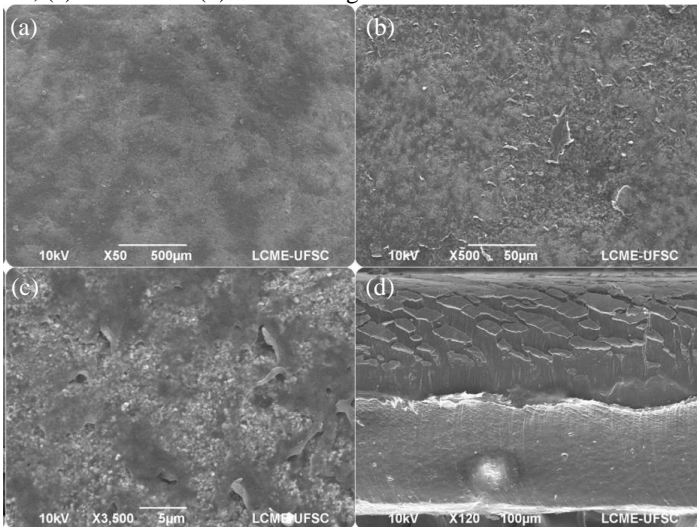


Figura 4.16. Imagens obtidas por MEV da superfície do filme de PEBD incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO por aspersão na ampliação de (a) 50x; (b) 500x; (c) 3500x e da (d) fratura criogênica.



Os filmes incorporados por aspersão mostraram-se muito flexível na presença do nitrogênio líquido, não ficando rígido suficiente para obter uma rápida fratura, resultando em dobramento do filme (Figuras 4.13, 4.14 e 4.16). Este comportamento não influenciou na obtenção e na interpretação dos resultados das fraturas.

A composição percentual em massa dos elementos carbono, oxigênio e zinco obtidas por EDS para a superfície dos filmes em todas as concentrações testadas são apresentados na Tabela 4.1 e para a fratura criogênica, nas concentrações de 10,0 % para filmes obtidos por aspersão e 1,0% para filmes obtidos por extrusão, na Tabela 4.2.

A análise de EDS nos filmes confirmou a ausência do elemento Zn nos filmes puros. Através dos resultados de EDS foi possível confirmar a presença de aglomerados de NPs-ZnO nos filmes com 0,5 % de NPs-ZnO, pois o desvio padrão da quantidade do elemento zinco detectada nas diferentes áreas do filme foi maior que 16 % do valor da média (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Resultados de EDS da superfície dos filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.

	PEBDL-AM			PEBD		
	Carbono	Oxigênio	Zinco	Carbono	Oxigênio	Zinco
10,0 %	8,95±0,27	2,05±0,11	89,01±0,23	59,48±6,54	4,86±0,51	35,67±6,45
5,0 %	29,46±2,72	2,00±0,13	68,54±2,85	70,30±0,75	4,08±0,48	25,62±0,75
1,0 %	24,34±3,31	1,75±0,16	73,92±3,43	75,54±1,58	2,14±0,34	22,32±1,43
0,5 %	73,98±4,17	1,74±0,24	24,28±4,10	68,86±5,56	3,09±0,56	28,05±5,07
EXT 1 %	97,47±0,14	0±0	2,53±0,14	98,24±0,04	0±0	1,76±0,04
PURO	99,49±0,52	0,51±0,52	0±0	100±0	0±0	0±0

O elemento oxigênio, o qual poder ser oriundo do óxido de zinco ou do anidrido maleico, não foi detectado nos filmes extrusados. Este resultado é um indicativo que o anidrido maleico reagiu na extrusão e o oxigênio foi liberado do material.

Nos filmes extrusados foi confirmada a presença do elemento Zn ao longo da fratura, enquanto nos filmes incorporados por aspersão apenas em uma das superfícies (Tabela 4.2), como esperado.

Os espectros de EDS são apresentados no Anexo A. Os demais elementos encontrados, como do material de recobrimento de preparo de amostra (elemento ouro e impurezas), não foram analisados neste

estudo, e, portanto não fizeram parte dos cálculos da composição percentual em massa dos elementos, embora os picos sejam detectados nos espectros de EDS.

Tabela 4.2 Resultados de EDS das fraturas criogênicas dos filmes PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.

		PEBDL-AM			PEBD		
	Área	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Zinco (%)	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Zinco (%)
Aspersão 10,0%	Superficial	74,08	6,49	19,43	91,15	0,26	8,59
	Central	100	0	0	100	0	0
Extrusão 1,0 %	Superficial	97,76	0	2,24	98,37	0	1,63
	Central	97,39	0	2,61	96,89	0	3,11

Os espectros de FTIR dos filmes são apresentados no Anexo B. Os espectros mostram picos característicos de polietileno, relativo às vibrações de deformação axial assimétrica (2915 cm^{-1}) e simétrica (2848 cm^{-1}) e de deformação angular simétrica (1462 cm^{-1}) e assimétrica (719 cm^{-1}) do grupo metileno (C-H) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; GULMINE et al., 2002; JEZIÓRSKA, 2006). Estes picos estavam presentes em todos os filmes.

Para os filmes de PEBDL-AM, como esperado, o espectro apresentou um pico característico (1785 cm^{-1}) de vibração de deformação axial da carbonila presente no grupamento anidrido (C=O). No filme de PEBDL-AM extrusado, o espectro não apresentou mais este sinal, o que indica a reação das NPs-ZnO com o anidrido maleico (Figura 4.17). Para os filmes de PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão os resultados sugerem uma redução parcial deste pico, indicando que existem sítios reativos no interior do polímero. Jeziórska (2006) também relata o desaparecimento do sinal relativo ao anidrido maleico em PEBDL graftizados ao formar blendas com poliamidas e retalhos de tecidos contendo politereftalato de etileno (PET), sugerindo uma possível reação com o anidrido maleico.

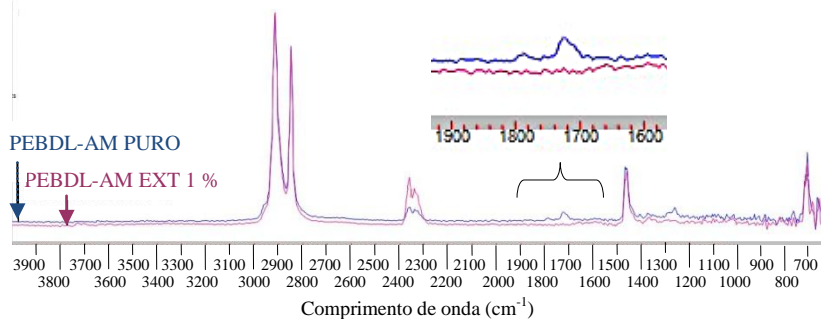
Sclavons et al. (2005) encontraram a banda na região de 1785 cm^{-1} , revelando que este sinal é característico da interação entre grupos succínicos, advindos de uma homopolimerização do anidrido maleico ou de interações entre grupos succínicos próximos. Jeziórska (2006) encontrou picos em 1787 cm^{-1} (C=O), confirmando a presença de anidrido succínico em PEBDL graftizados com anidrido maleico. Porto

et al. (2004) obtiveram picos em 1782 cm^{-1} , referentes à deformação axial do grupo C=O em PEBD graftizado com anidrido maleico. E Bettini e Agnelli (2000) relatam a região de 1792 cm^{-1} para medir as vibrações dos grupos succínicos característicos de grupos anidridos cíclicos com cinco membros no anel.

O sinal na região próxima a 1725 cm^{-1} , relacionada à função éster, devido ao estiramento da ligação C=O foi encontrada nas amostras de PEBD e PEBDL-AM. Esta banda desapareceu quando os filmes foram incorporados com NPs-ZnO por extrusão, sugerindo uma interação com as nanopartículas. Na literatura são encontrados relatos referentes ao surgimento do grupamento carbonila em polietilenos devido à degradação termomecânica (ANDERSSON; STALBOM; WESSLÉN, 2004; PINHEIRO; CHINELATTO; CANEVAROLO, 2004). Essa degradação pode ser a causa do surgimento desse grupamento em PEBD.

A presença de sinal em 3600 e 3750 cm^{-1} nas análises dos filmes incorporados por aspersão pode estar relacionada a grupos de OH (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000) de moléculas de água adsorvida na superfície das NPs-ZnO.

Figura 4.17. Espectro de FTIR dos filmes de PEBDL-AM puro e incorporado com NPs-ZnO.



O sinal característico de ZnO (400 a 500 cm^{-1}) não foi obtida nos espectros devido à limitação imposta pelo cristal utilizado, que não permitiu análise em comprimentos de onda inferiores a 650 cm^{-1} .

A Tabela 4.3 apresenta a quantidade de resíduos minerais. A análise estatística em nível de 5 % de significância apresenta não haver diferença significativa na quantidade total de NPs-ZnO incorporada nos dois diferentes polímeros para uma mesma concentração. Os filmes

preparados por aspersão com as dispersões de 10,0 e 5,0 % de NPs-ZnO apresentaram-se com, aproximadamente, um razão $\frac{1}{2}$ entre a concentração no filme e a concentração na dispersão inicial, enquanto que nas menores concentrações (1,0 e 0,5 %), a razão foi maior que 1 em alguns casos. Ainda, o desvio padrão destes dados foi superior a 43 % para os filmes incorporados com 0,5 % de NPs-ZnO, ratificando a heterogeneidade destes.

Os filmes extrusados não apresentaram diferença estatística significativa em relação à concentração. O filme de PEBD extrusado com 1,0 % não apresentou diferença entre os obtidos por aspersão nas concentrações inferiores a 10,0 %. O filme de PEBDL-AM extrusado com 1,0 % apresentou diferença significativa entre os filmes obtidos por aspersão, excedo para a concentração de 5,0 %.

Tabela 4.3. Concentração de NPs-ZnO incorporada nos filmes obtidos em análise gravimétrica por mufla.

	PEBDL-AM	PEBD
10,0 %	5,40±0,28 ^c	5,44±0,10 ^c
5,0 %	2,53±0,18 ^d	2,30±0,17 ^{cd}
1,0 %	0,72±0,04 ^a	1,24±0,13 ^{ab}
0,5 %	0,92±0,41 ^a	1,13±0,49 ^{ab}
EXT 1 %	2,01±0,17 ^{bcd}	1,49±0,13 ^{abc}

Os valores médios e os respectivos desvios padrões dos ângulos de contato são apresentados na Tabela 4.4. Observa-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações dos mesmos polímeros, porém comportamento diferenciado entre filmes de PEBDL-AM e PEBD.

O filme de polietileno puro com anidrido maleico apresentou-se mais hidrofílico, sugerindo a influência da modificação do polímero com anidrido maleico. O aumento da concentração de NPs-ZnO dos filmes de PEBDL-AM resultou em um pequeno aumento no ângulo de contato dos mesmos. E o aumento da concentração de NPs-ZnO dos filmes de PEBD resultou em uma redução no ângulo de contato dos mesmos.

Embora exista diferença estatística significativa entre os ângulos de contatos, a amplitude destes valores é pequena e pode-se afirmar que a incorporação de NPs-ZnO nos polímeros não alterou a molhabilidade dos filmes, visto que as variações na rugosidade das superfícies podem

influenciar nos valores de ângulo de contato (WENZEL, 1936; ROACH; SHIRTCLIFFE; NEWTON, 2008). Deste modo, pode-se afirmar que os filmes permaneceram com caráter hidrofóbico e com ângulo de contato semelhante ao encontrado na literatura para filmes de polietileno puros, de aproximadamente 95 ° (PORTO et al., 2004; PANDIYARAJA et al., 2014).

Ao longo do tempo de análise observou-se uma pequena e gradual redução nos ângulos de contato e no volume da gota, indicando a relação direta entre ambos. As imagens das gotas a partir das quais os ângulos de contato foram medidos para os diferentes filmes, estão apresentados no Anexo C.

Tabela 4.4. Ângulo de contato dos filmes incorporados com NPS-ZnO.

	PEBDL-AM	PEBD
10,0 %	95,18±1,71 ^c	90,22±1,87 ^e
5,0 %	99,01±1,02 ^j	91,93±0,76 ^{ab}
1,0 %	97,17±1,04 ^h	94,91±1,81 ^c
0,5 %	92,81±1,12 ^b	95,59±1,40 ^f
EXT 1 %	88,72±0,83 ^d	98,46±0,97 ⁱ
PURO	92,65±1,44 ^a	95,98±2,51 ^g

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.3.1 Nanopartículas de óxido de zinco

O método de difusão em ágar foi realizado como uma análise qualitativa para prever o comportamento antimicrobiano das NPs-ZnO. As imagens das placas do teste de difusão em ágar frente aos micro-organismos estudados são apresentadas no Anexo D.

Concentrações inferiores a 30 mg/mL apresentaram um halo de inibição de crescimento para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*. Em testes para *B. cereus* foram utilizadas concentrações de até 100 mg/mL, porém nenhum halo de inibição de crescimento foi observado. Esse resultado sugere que NPs-ZnO não possui potencial efeito antimicrobiano contra *B. cereus*. Na literatura não foi encontrado relatos de efeito antimicrobiano de NPs-ZnO frente a *B. cereus*.

Os resultados para *S. aureus* mostram a presença de halo ao redor dos discos e poços em concentrações igual e superior a 0,1 mg/mL e 2,5

mg/mL, respectivamente. Na análise para *S. Typhimurium* a presença de halo de inibição foi observada na concentração igual e superior a 2,5 mg/mL em ambos os testes.

A zona de inibição foi de difícil visualização para *P. aeruginosa*, pois não apresenta halo bem delineado, mostrando-se difuso do disco em direção ao meio. Foi observado o halo de inibição em concentração igual e maior que 1 mg/mL no teste de difusão em discos. No teste em poços, não foram observados halos, porém pontos com ausência de crescimento microbiano em concentração igual e superior a 0,1 mg/mL.

Embora, tenha sido observado halo de inibição de crescimento crescente com o aumento da concentração de NPs-ZnO, não é recomendado analisar os resultados quantitativamente. Observou-se que este método é delicado e susceptível a pequenas alterações nas condições de trabalho, como espessura do meio e precisão na adição da amostra, além da granulometria e diâmetro dos discos. Mas, principalmente, devido que, de acordo com Pasquet et al. (2014) as partículas de óxido de zinco dificilmente se difundem para fora dos discos de celulose e o comportamento das partículas no ágar não é conhecida.

Os testes em caldo são considerados confirmatórios e mais precisos do que os de difusão em ágar, pois a possibilidade de interação das nanopartículas com as bactérias são mais elevados na fase líquida (NEGI et al.,2012). Deste modo, para a obtenção da CIM e da CBM foram realizados testes de diluição em caldo.

Os resultados revelaram uma CIM de 0,05 mg/mL (aproximadamente 0,6 mM) e CBM de 0,5 mg/mL (aproximadamente 6,1 mM) para *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Foi observado um aumento do efeito antimicrobiano com o aumento da concentração. No Anexo E são apresentadas algumas imagens do plaqueamento realizado para contagem microbiana no teste de diluição em caldo.

A ação de inibição de ZnO em meios de cultura microbiana pode provir da supressão do crescimento e/ou da morte celular. Em concentrações maiores de NPs-ZnO, inicialmente ocorre a morte de uma subpopulação de células sensíveis, reduzindo a população microbiana, e, em seguida, retardam o crescimento de uma subpopulação resistente, que pode manter-se em baixa concentração ou pode passar a crescer. Em concentrações inferiores, o tratamento apenas suprime o crescimento de bactérias, e prolongam a fase de latência, antes do início do crescimento em velocidade exponencial (MIRHOSSEINI; FIROUZABADI, 2013), o que, buscando-se a conservação de alimentos, é de grande interesse.

Os dados experimentais do crescimento microbiano (Figuras 4.18 e 4.19) mostram que a concentração de 0,5 mg/mL em 24 h de incubação não apresentou mais células viáveis de *S. aureus* e *S. Typhimurium*, enquanto o controle negativo alcançou uma contagem de 10^6 UFC/mL. Em apenas 6 h de incubação foi observada uma redução, em relação ao controle negativo, de 38,3 e 31,6 % do crescimento microbiano de *S. aureus* para as concentrações 0,5 e 0,05 mg/mL, respectivamente. Para *S. Typhimurium*, após o mesmo intervalo de tempo, houve uma redução de 60,6 e 51,1 % para as concentrações 0,5 e 0,05 mg/mL, respectivamente.

Figura 4.18 Dados experimentais do crescimento microbiano de *S. aureus* nas CIM e CBM. \diamond Controle negativo (-); \square Controle positivo (+); \triangle 0,5 mg/mL; \times 0,05 mg/mL.

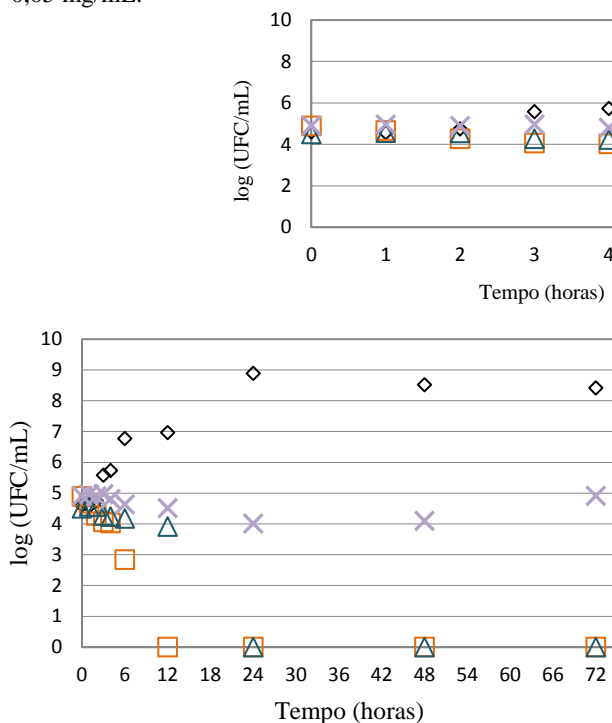
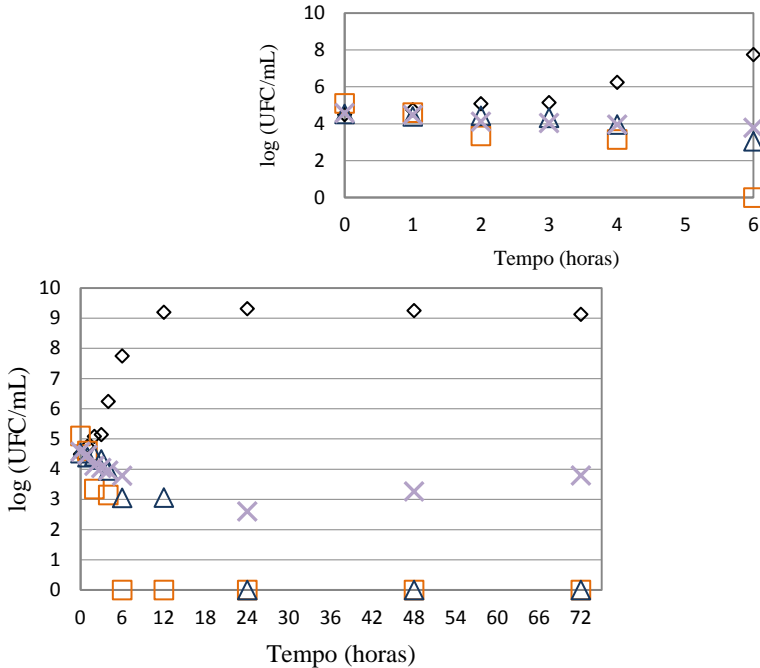


Figura 4.19 Dados experimentais do crescimento microbiano de *S. Typhimurium* nas CIM e CBM. \diamond Controle negativo (-); \square Controle positivo (+); \triangle 0,5 mg/mL; \times 0,05 mg/mL.



Xie et al. (2011) encontraram uma CIM de 0,4 mg/mL para NPs-ZnO com tamanho médio de 30 nm na inibição da *S. Enteritidis*. Akbar e Anal (2014) estudaram NPs-ZnO esféricas (50 nm) e encontraram que concentrações superiores a 0,1 mg/mL foram letais para *S. Typhimurium* (TSTIR 292).

Sawai (2003) estudou a alteração na condutividade elétrica do meio de crescimento provocada pelo metabolismo das bactérias na presença de ZnO (2,6 μ m). Ele obteve que as concentrações de 0,99 mg/mL e de 0,67 mg/mL eliminou 100 % e reduziu 50 % do crescimento microbiano de *S. aureus* 9779, respectivamente. Yamamoto (2001) estudou o efeito antimicrobiano de partículas de ZnO também a partir das alterações na condutividade elétrica com o crescimento de bactérias e observaram que partículas de ZnO de 800 nm apresentaram efeito bactericida na concentração de 1,6 mg/mL frente a *S. aureus* 9779.

Ann et al. (2014) estudaram ação antimicrobiana de duas NPs-ZnO diferentes com forma de bastões e 26 % das nanopartículas com tamanho entre 51–60 nm e forma de placas com 31 % das nanopartículas com tamanho entre 71–80 nm. Eles observaram, por turbidimetria, que a concentração de 2 mM das nanopartículas na forma de bastões e placas inibiu o crescimento microbiano de *S. aureus* em 36 ± 3 e 29 ± 2 %, respectivamente.

Jones et al. (2008) observaram que a concentração de 2 mM de NPs-ZnO de 8 nm de diâmetro, e a concentração de 5 mM de NPs-ZnO de 50-70 nm reduziram o crescimento microbiano de *S. aureus* (RN6390) em 99 e 40-50 %, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Mirhosseini e Firouzabadi (2013), que estudaram o efeito de NPs-ZnO (20-25 nm) frente a *S. aureus* (PTCC1431) e observaram que concentrações de 0,5 e 2 mM não apresentaram atividade antimicrobiana, 5 mM apresentaram efeito inibitório no crescimento bacteriano em relação ao controle e 10 mM eliminaram completamente o micro-organismo alvo. NPs-ZnO esféricas de 50 nm de diâmetro foram também testadas frente a *S. aureus* (TISTR 029) e uma concentração superior a 0,1 mg/mL foi encontrada como letal. Os danos na morfologia das células foram claramente percebidos por MET (AKBAR; ANAL, 2014).

Os dados experimentais do crescimento microbiano para *P. aeruginosa* foi obtida para 0,5 mg/mL e revelou um comportamento análogo ao controle negativo nas primeiras 24 h, observando-se uma redução gradual, que culminou em 12,2 % ao final de 72 h. Devido a essa redução observada ao final do terceiro dia de teste, realizou-se um novo experimento do crescimento microbiano com contagens diárias durante 9 dias. As concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL (12,3 e 24,6 mM) foram também avaliadas (Figura 4.20). Concentrações superiores a estas resultavam em um meio de cultura extremamente saturado, com aparência leitosa e com sedimentação de NPs-ZnO exagerada e devido a essas razões não foram estudadas.

Os dados experimentais do crescimento microbiano de *P. aeruginosa* apresentada na Figura 4.21 sugerem uma maior redução do crescimento nas maiores concentrações até o quarto dia de teste, resultando numa redução de 7,4; 10,6 e 25,7 % para 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL de NPs-ZnO. Porém após esse período, o comportamento aparenta ser semelhante para todas as concentrações testadas, com uma redução média de aproximadamente 15,5 % ou 1,4 log UFC/mL em comparação ao controle negativo, após 9 dias de incubação.

Figura 4.20 Dados experimentais do crescimento microbiano de *P. aeruginosa* durante 72 h. ◇ Controle negativo (-); □ Controle positivo (+); △ 0,5 mg/mL.

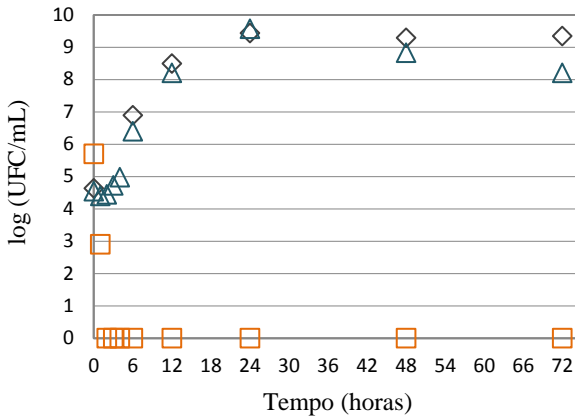
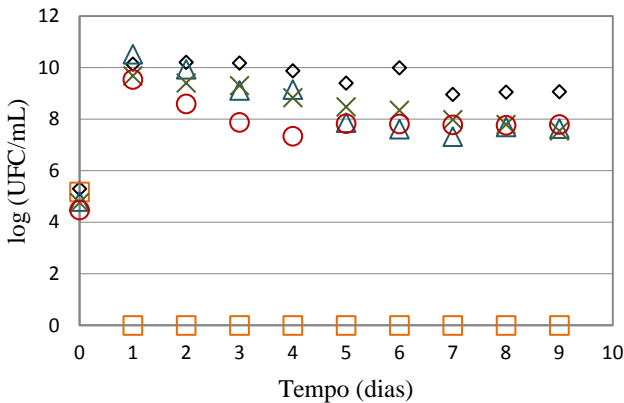


Figura 4.21 Dados experimentais do crescimento microbiano de *P. aeruginosa* durante 216 h. ◇ Controle negativo (-); □ Controle positivo (+); △ 0,5 mg/mL; × 1,0 mg/mL; ○ 2,0 mg/mL.



Os resultados estão em desacordo com Ann et al. (2014) que estudaram ação antimicrobiana de duas NPs-ZnO diferentes com forma de bastões e 26 % das nanopartículas com tamanho entre 51–60 nm e forma de placas com 31 % das nanopartículas com tamanho entre 71–80 nm e observaram, através de testes de turbidimetria, que a concentração

de 2 mM das nanopartículas na forma de bastões e placas inibiu o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* em 72 ± 2 e 65 ± 1 % em relação ao controle, respectivamente, durante 24 h de incubação.

Lee et al. (2014) estudaram a inibição de *P. aeruginosa* PAO1 e também observaram um pequeno efeito antimicrobiano das NPs-ZnO (< 50 nm). Eles observaram que o crescimento de células planctônicas não foi afetado em concentração de 3 mM até 12 h, enquanto que o crescimento foi ligeiramente reduzido em 10 mM, sendo obtido uma CIM de 300 mM, o que equivale a aproximadamente 24,42 mg/mL. Embora as NPs-ZnO não exibiram potencial de citotoxicidade para *P. aeruginosa*, eles observaram que a concentração de 1 mM NPs-ZnO inibiu mais que 95 % da formação de biofilme sobre a superfície de poliestireno e suprimiu a formação de biofilme na superfície de vidro, o que é extremamente interessante, visto que as NPs-ZnO são resistentes a condições severas de pressão e temperatura, comparados com compostos orgânicos. Os resultados sugerem que ocorreu a inibição da adesão inicial de células de *P. aeruginosa* na formação de biofilme. Este estudo demonstrou também que as NPs-ZnO reduziu a produção de fator de virulência, baseado em estudos de expressão gênica.

Os mesmo autores estudaram também os efeitos da mesma nanopartícula em cepas de *S. aureus* sensível (MSSA, ATCC 6538) e resistente (MRSA, ATCC BAA-1707) à meticilina e obtiveram uma concentração de 5 mM de NPs-ZnO que inibiu a formação de biofilme pela supressão do crescimento celular.

Os estudos apresentados relataram valores para CIM e CBM inferiores e superiores aos encontrados no presente estudo. Entretanto, a maioria das análises foi com partículas menores que as utilizadas neste trabalho (tamanho médio de partícula entre 8 a 80 nm frente aos valores médios de comprimento e espessura de 145,1 e 97,2 nm, respectivamente deste estudo). A origem das cepas de microorganismos, assim como a morfologia das partículas também podem ter influenciado no efeito antimicrobiano das NPs-ZnO. O resumo dos estudos encontrados na literatura é apresentado na Tabela 4.5.

É essencial que as partículas de ZnO entrem em contato ou penetrem nas células microbianas para expressar suas atividades antibacterianas (MIRHOSSEINI; FIROUZABADI, 2013). E nanopartículas de menor tamanho apresentam maior relação área/volume, sendo possível uma maior quantidade de nanopartículas entrarem em contato com a célula microbiana.

Tabela 4.5. Resumo dos estudos antimicrobianos de ZnO encontrados na literatura.

Micro-organismo	Característica de partícula de ZnO	Estudo antimicrobiano	Autor (ano)
<i>S. aureus</i> 9779	2,6 μm	CIM: 0,99 mg/mL CIM _{50%} : 0,67 mg/mL	Sawai (2003)
<i>S. aureus</i> RN6390	8 nm de diâmetro e 50-70 nm de diâmetro	2 mM (~0,16 mg/mL): - 99 % e - 40-50 %,	Jones et al. (2008)
<i>S. aureus</i> PTCC1431	20-25 nm	Efeito inibitório: 0,4 mg/mL Eliminação completa: 0,8 mg/mL)	Mirhosseini e Firouzabadi (2013)
<i>S. aureus</i> 9779	800 nm	Efeito bactericida: 1,6 mg/mL	Mirhosseini e Firouzabadi (2013)
<i>S. aureus</i>	Bastões de 51–60 nm (26%) e placas de 71–80 nm (31%)	2 mM (~0,16 mg/mL): - 36 \pm 3 % e - 29 \pm 2 %	Ann et al. (2014)
<i>S. aureus</i> TISTR 029	50 nm de diâmetro	Letal \geq a 0,1 mg/mL	Akbar; Anal (2014)
<i>S. Enteritidis</i>	30 nm de diâmetro	CIM = 0,4 mg/mL	Xie et al. (2011)
<i>S. Typhimurium</i> TSTIR 292	50 nm de diâmetro	Letal \geq a 0,1 mg/mL	Akbar e Anal (2014)

Neste trabalho, apesar da utilização de banho ultrassônico para desagregar os aglomerados de NPs-ZnO formados e o uso de estufa bacteriológica com agitação durante a incubação, não foi possível evitar totalmente a sedimentação de aglomerados de NPs-ZnO, o que pode ter reduzido o efeito antimicrobiano. Esse comportamento foi também observado por outros autores (MIRHOSSEINI; FIROUZABADI, 2013; PASQUET et al., 2014;). Segundo Mirhosseini e Firouzabadi (2013), uma dispersão adequada de ZnO em meio líquido (meio de cultura ou de alimentos) é essencial para aumentar a eficiência de inibição microbiana, ou seja, a disponibilidade de NPs-ZnO em meio seria mais importante que a sua concentração total usada.

4.3.2 Filmes incorporados com nanopartículas de óxido de zinco

Os resultados de difusão em ágar não apresentaram halo de inibição de crescimento para os filmes incorporados com NPs-ZnO por extrusão. Esses resultados foram confirmados pelo teste de diluição em caldo, obtendo altas contagens microbianas (10^9 UFC/mL), do mesmo modo que o controle negativo. Esses resultados sugerem que as NPs-ZnO ficaram aprisionadas no interior da matriz polimérica, não permitindo o contato com os micro-organismos e, portanto, não pronunciando o potencial efeito antimicrobiano das NPs-ZnO, visto que é essencial que as moléculas de ZnO entre em contato ou penetrem nas células microbianas para expressar suas atividades antibacterianas (MIRHOSSEINI; FIROUZABADI, 2013).

Resultado semelhante foi relatado por Jin et al. (2009) em estudos com filmes de poliestireno obtidos por *casting* incorporados com 0,01 e 1 % de NPs-ZnO. Eles também não encontraram efeito antimicrobiano frente *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *E. coli* O157:H7 em teste em ágar e caldo. Os autores sugerem que as moléculas de ZnO foram fortemente vinculadas dentro do filme, o que impediu a liberação de ZnO e a ação antimicrobiana.

Devido à ausência de ação antimicrobiana desses filmes, apenas as amostras incorporadas com 1,0 % de NPs-ZnO foram caracterizadas, como observado no Item 4.2.2. Os resultados de MEV com EDS reforçam a ideia que as NPs-ZnO estão pouco disponíveis na superfície do filme extrusados, pois apresentaram uma superfície lisa e resultados de EDS que comprovam que a concentração de 1,0 % ficou distribuída em todo o filme, inclusive em regiões que as bactérias não têm contato.

Os resultados de difusão em ágar para os filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão revelam ausência de halo de inibição de crescimento para todos os filmes testados para *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Esses resultados estão de desacordo com os testes de diluição em caldo. Uma possível explicação é uma baixa migração do filme e difusão em ágar das nanopartículas. Para *P. aeruginosa*, embora não tenha sido observado halo após 24 h de incubação, após 48 h de incubação observou-se a presença dos mesmos nas maiores concentrações testadas (5,0 e 10,0 %). As imagens das placas do teste de difusão em ágar dos filmes frente aos micro-organismos estudados são apresentadas no Anexo F.

O estudo do crescimento microbiano para *S. aureus* (Figura 4.22) indica que houve diferença estatística significativa entre os filmes

incorporados com NPs-ZnO e os puros, exceto para o filme PEBDL-AM 0,5 %, mas que não houve diferença entre os polímeros utilizados. A redução microbiana, em relação ao controle e após 5 dias de incubação, para os filmes de PEBDL-AM com 10,0; 5,0; 1,0 e 0,5 % foi de 23,2; 23,1; 10,7 e 11,4 %, respectivamente. Os filmes de PEBD com as mesmas concentrações apresentaram redução de 24,1; 24,8; 18,7 e 22,5 %, respectivamente. Esses valores representam uma redução máxima de 1,8 log UFC/mL e mínima de 0,8 log UFC/mL. Os resultados indicam um efeito bacteriostático dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão frente a *S. aureus*.

O teste de crescimento microbiano para *S. Typhimurium* (Figura 4.23) indica que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na ação antimicrobiana nos filmes de PEBDL-AM incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO e os demais filmes, porém para esta mesma concentração o tipo de polímero (com e sem anidrido maleico) não teve influência na ação antimicrobiana, embora a redução microbiana média foi de 67,0 % (-5,4 log UFC/mL) para o filme de PEBDL-AM incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO e de 17,4 % (-1,4 log UFC/mL) para o filme de PEBD incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO, em relação ao filme sem tratamento. O efeito antimicrobiano dos demais filmes incorporados com NPs-ZnO não apresentou diferença estatística significativa em relação ao filme sem tratamento. A redução microbiana média para estes filmes foi de 12,4; 13,0; 13,3; 9,2; 9,1 e 8,8 % para os filmes de PEBDL-AM incorporados com 5,0; 1,0 e 0,5 % de NPs-ZnO e filmes de PEBD incorporados com 5,0; 1,0 e 0,5 % de NPs-ZnO, respectivamente, ao final do estudo.

Figura 4.22 Dados experimentais do crescimento microbiano de *S. aureus* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão. \diamond PEBDL-AM 10 %; \triangle PEBDL-AM 5 %; \times PEBDL-AM 1 %; \circ PEBDL-AM 0,5 %; \square PEBDL-AM PURO; $*$ PEBD 10,0 %; \square PEBD 5,0 %; $-$ PEBD 1,0 %; $-$ PEBD 0,5 %; \diamond PEBD PURO.

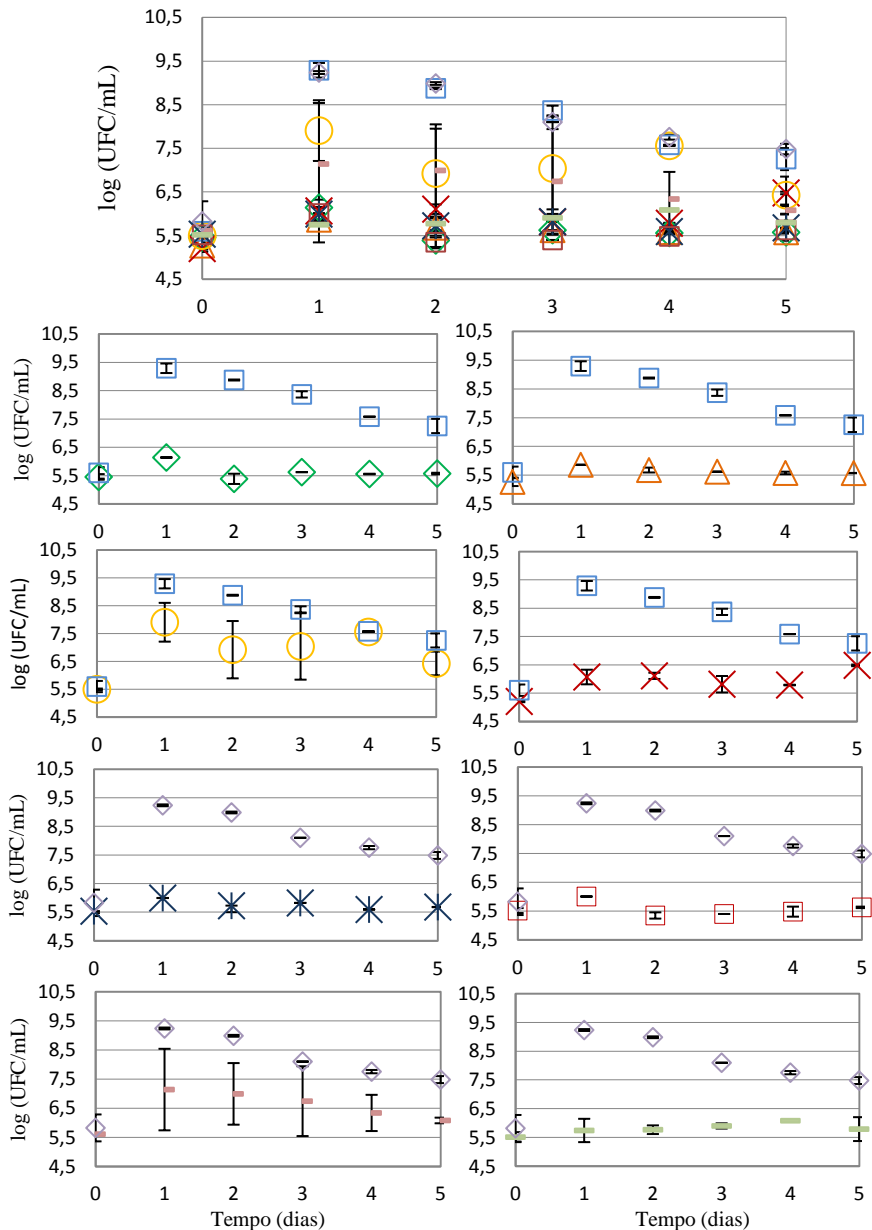
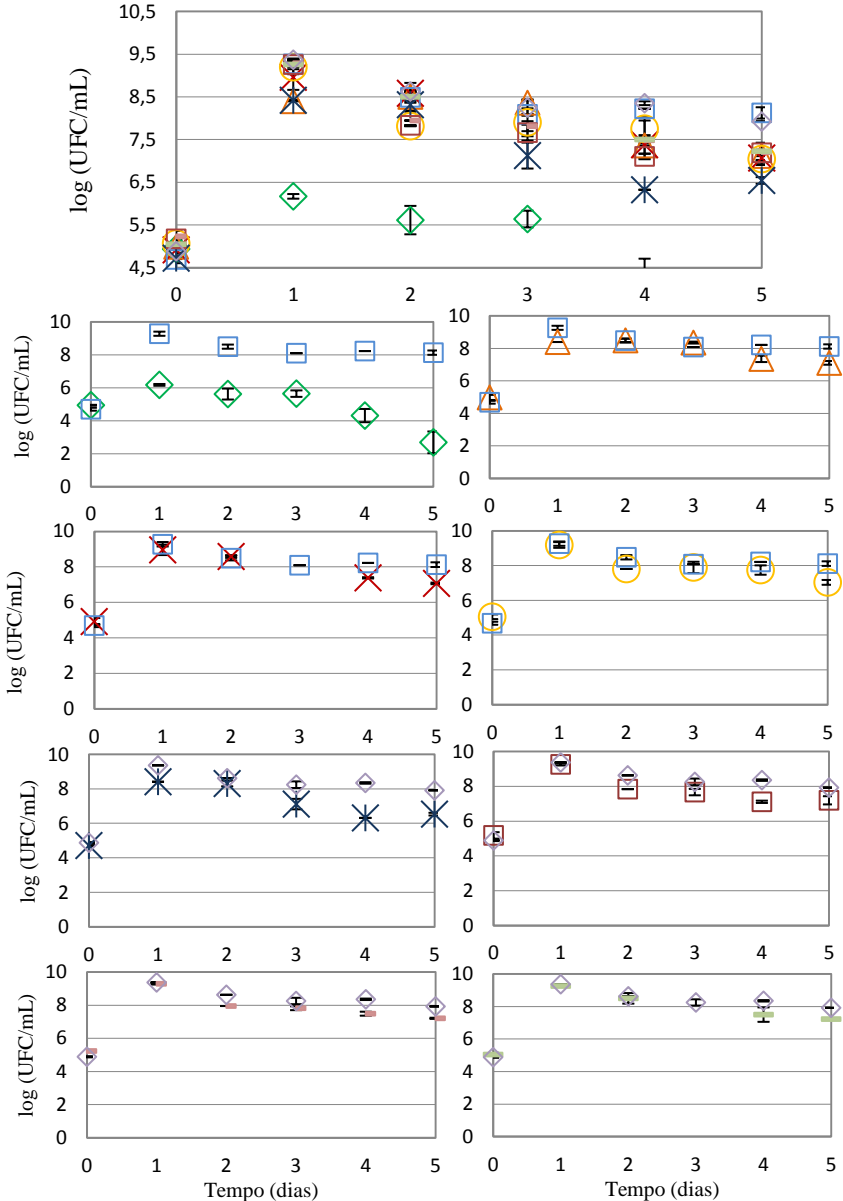


Figura 4.23 Dados experimentais do crescimento microbiano de *S. Typhimurium* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspersão.
 ◆ PEBDL-AM 10 %; △ PEBDL-AM 5 %; × PEBDL-AM 1 %; ○ PEBDL-AM 0,5 %; □ PEBDL-AM PURO; * PEBD 10,0 %; ◻ PEBD 5,0 %; - PEBD 1,0 %; ▬ PEBD 0,5 %; ◇ PEBD PURO.



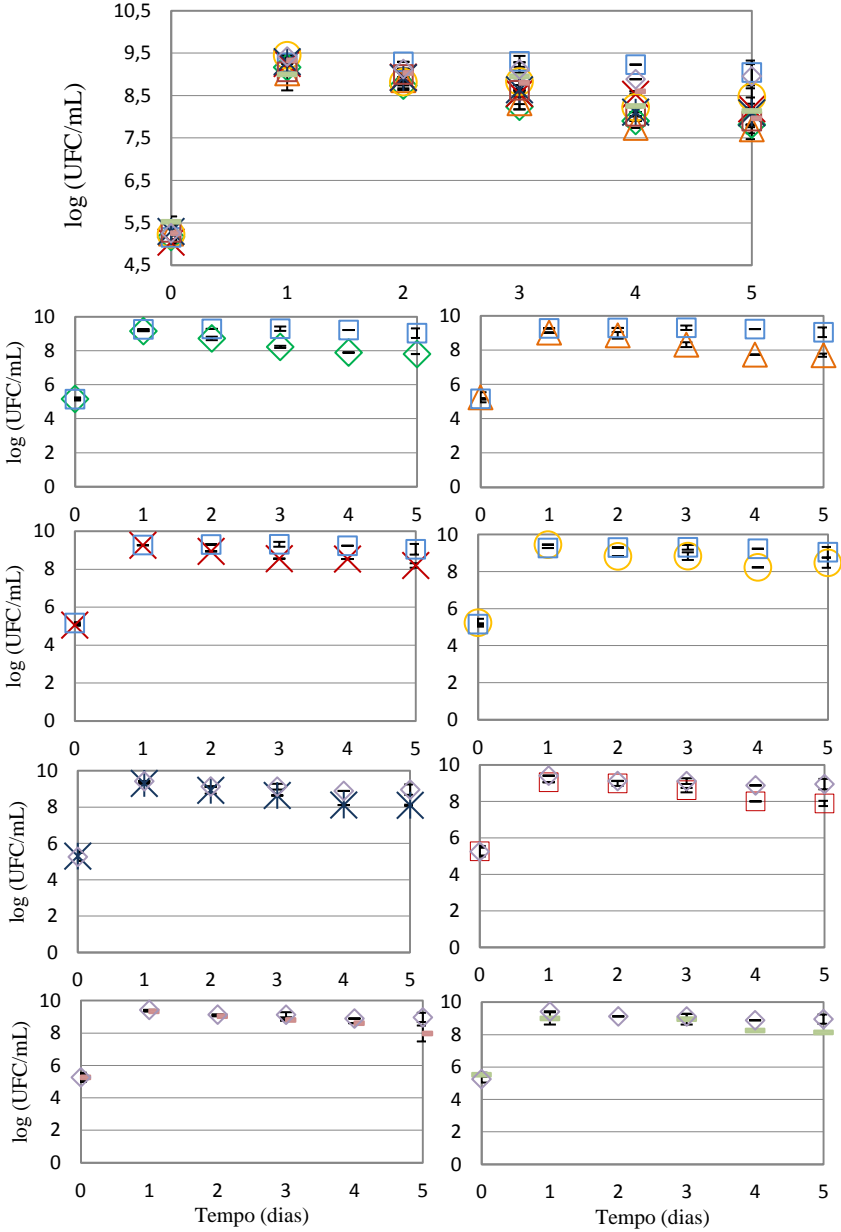
Os resultados do crescimento microbiano de *P. aeruginosa* mostram que os filmes tratados não apresentaram diferença estatística significativa ao nível de significância de 5 %, embora os filmes incorporados com 10,0; 5,0; 1,0 e 0,5 % de NPs-ZnO tiveram uma redução média no crescimento microbiano de 13,6; 14,8; 9,4; 6,3 % para PEBDL-AM, e 9,6; 11,8; 11,1 e 9,1 % para PEBD em relação aos filmes puros, respectivamente (Figura 4.24), que em escala logarítmica representam uma redução entre 0,6 e 1,3 log UFC/mL.

Os valores de redução microbiana e a análise estatística das amostras contendo as NPs-ZnO em relação ao controle negativo frente a *S. Typhimurium* e a *S. aureus* não ressaltam o potencial efeito antimicrobiano das nanopartículas.

Os dados do crescimento microbiano do controle negativo (sem NPs-ZnO) das bactérias *S. Typhimurium* e a *S. aureus* demonstram uma contagem microbiana máxima (10^9 UFC/mL) após 24 h de incubação e decaimento ao longo do tempo, acompanhando o perfil da curva microbiana definida na literatura. Esta redução do número de células viáveis pode ser resultado da limitação de nutrientes no meio de cultura e outros tipos de estresses ao longo do tempo de estudo (TRABULSI et al., 1999). Todavia, os dados do crescimento microbiano frente às amostras com NPs-ZnO com efeito antimicrobiano apresentaram repressão no crescimento e redução de células viáveis, não alcançando contagens máximas como o controle negativo, indicando que a redução microbiana observada foi devido ao efeito tóxico das nanopartículas.

Para a *P. aeruginosa* essa reflexão não foi necessária, visto que para as amostras não tratadas a concentração microbiana se manteve em aproximadamente 10^9 UFC/mL ao longo dos cinco dias de incubação. De acordo com PIRNAY et al. (2005), esta bactéria oportunista é resistente a variações na disponibilidade de nutrientes.

Figura 4.24 Dados experimentais do crescimento microbiano de *P. aeruginosa* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO por aspensão. \diamond PEBDL-AM 10,0 %; \triangle PEBDL-AM 5,0 %; \times PEBDL-AM 1,0 %; \circ PEBDL-AM 0,5 %; \square PEBDL-AM PURO; $*$ PEBD 10,0 %; \square PEBD 5,0 %; $-$ PEBD 1,0 %; \square PEBD 0,5 %; \diamond PEBD PURO.



Nas Figuras 4.25, 4,26 e 4,27 estão apresentadas as análises estatísticas do efeito antimicrobiano dos filmes incorporados com NPs-ZnO obtidos em relação à inibição microbiana, a partir da razão entre a contagem microbiana após cinco dias de incubação (N) e a inicial (No) para cada filme agindo em cada micro-organismo. A análise estatística comparando todos os grupos, em nível de significância de 5 %, revelou não haver diferença significativa entre os filmes tratados e não tratados para *P. aeruginosa*. Frente ao *S. aureus*, os filmes incorporados com 10,0 e 5,0 % de NPs-ZnO mostraram efeito antimicrobiano significativo, o que não foi observado nos filmes incorporados com 1,0 e 0,5 % de NPs-ZnO, exceto para a amostra de PEBD 0,5 %. Este resultado pode ser devido à ausência de distribuição uniforme de NPs-ZnO nos filmes de PEBD 0,5 % observados nos testes de caracterização, resultando assim em valores de inibição microbiana com grande desvio padrão. Para *S. Typhimurium* os resultados mostram que apenas o filme PEBDL-AM 10,0 % apresentou efeito estatisticamente significativo.

É importante mencionar que para os filmes incorporados com concentrações mais baixas, a incorporação física pode ter uma influência maior no efeito antimicrobiano, pois o polímero ao fundir-se pode envolver e aprisionar parte das nanopartículas, inviabilizando a ação das mesmas.

No presente estudo nem sempre foi observada uma redução microbiana maior em filmes com maiores concentrações de NPs-ZnO. Esse resultado sugere que as nanopartículas podem apresentar maiores tamanhos de partículas, reduzindo a área de contato, devido à aglomeração em altas concentrações, reduzindo o efeito antimicrobiano. Esse comportamento foi também observado por Emamifar et. al. (2010), que obtiveram maior efeito antimicrobiano em filmes com 0,25 % em comparação aos filmes com 1 % de NPs-ZnO.

Figura 4.25 Comportamento de *S. aureus* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO após 5 dias (5 % de nível de significância).

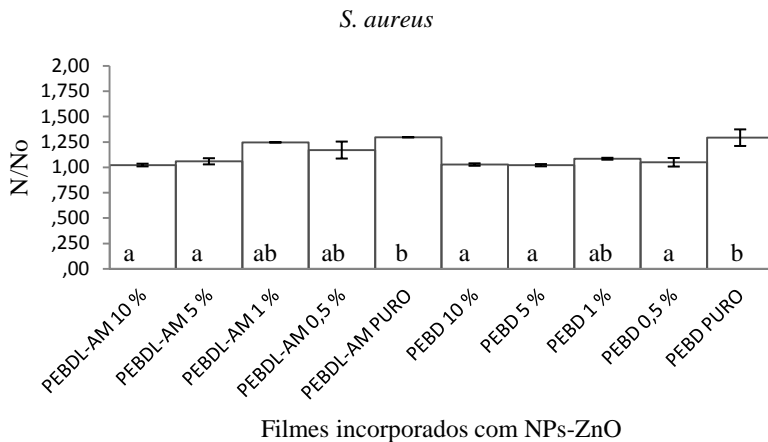


Figura 4.26 Comportamento de *S. Typhimurium* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO após 5 dias (5 % de nível de significância).

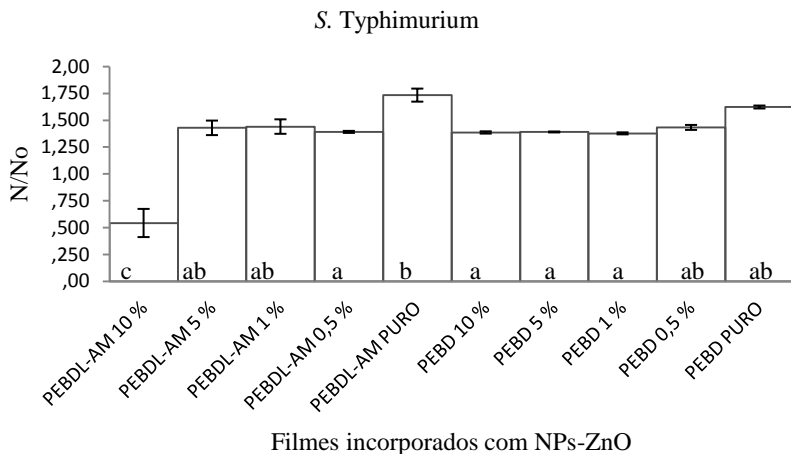
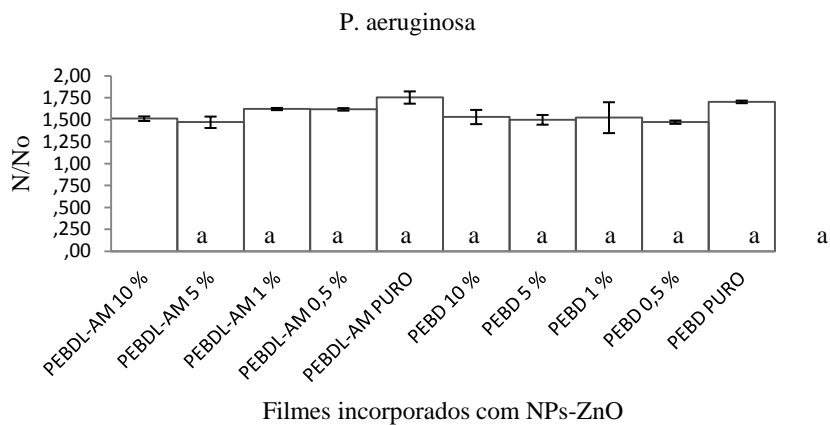


Figura 4.27. Comportamento de *P. aeruginosa* na presença dos filmes incorporados com NPs-ZnO após 5 dias (5 % de nível de significância).



5 CONCLUSÕES

As partículas de óxido de zinco apresentaram forma de bastão e estrutura cristalina do tipo wurtzita e podem ser denominadas de NPs-ZnO por apresentarem dimensões nanométricas.

A CIM e a CBM das dispersões das NPs-ZnO foram estabelecidas como 0,05 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente, para as bactérias *S. aureus* e *S. Thiphymurium*. Para *P. aeruginosa* a dispersão de NPs-ZnO mostrou-se pouco sensível, e a CIM e a CBM não foram estabelecidas nas concentrações testadas. Frente ao *B. cereus*, os resultados indicaram que as NPS-ZnO não apresentam efeito antimicrobiano.

Os filmes de PEBDL-AM apresentaram comportamento na extrusora que limitou sua obtenção, e a análise de FTIR indicou uma reação entre as NPs-ZnO e o anidrido maleico presente no polímero.

Os resultados e as análises estatísticas revelaram não haver diferença significativa na quantidade total de NPs-ZnO incorporada entre os dois diferentes polímeros para uma mesma concentração e método de obtenção. Todavia, estes resultados não demonstram a disponibilidade das NPs-ZnO nos filmes.

Os filmes incorporados com NPs-ZnO por extrusão apresentaram ao MEV superfície lisa e os filmes incorporados por aspersão apresentaram superfície com maior rugosidade. Após a incorporação das nanopartículas não foi observada diferença na molhabilidade dos filmes.

Os resultados antimicrobianos dos filmes de PEBD e PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão indicaram um efeito bacteriostático dos filmes frente a *S. aureus*.

Frente a *S. Typhimurium* o filme de PEBDL-AM incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO teve efeito bactericida, resultando numa contagem microbiana de aproximadamente 2,7 log UFC/mL (-5,4 log UFC/mL em relação ao filme sem tratamento) após cinco dias de incubação. Os demais filmes não apresentaram diferença estatística em relação ao filme sem tratamento, com redução variando entre 0,7 e 1,4 log UFC/mL. Embora a análise estatística revele não haver diferença na ação antimicrobiana em relação ao controle, foi observada repressão do crescimento da bactéria frente aos filmes de PEBD incorporados com 10,0 % de NPs-ZnO, resultando numa contagem microbiana após cinco dias de incubação de aproximadamente 6,5 log UFC/mL.

A bactéria *P. aeruginosa* mostrou-se pouco sensível aos filmes de PEBD e PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO, pois a contagem

microbiana ao final dos cinco dias de incubação foi superior a 7,8 log UFC/mL, observando-se uma redução do crescimento microbiano em relação ao filme não tratado entre 0,6 e 1,3 log UFC/mL. Os filmes não apresentaram diferença estatística.

Os filmes incorporados com NPs-ZnO por extrusão não apresentaram ação antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. Estes resultados sugerem que as NPs-ZnO ficaram aprisionadas no interior da matriz polimérica, não permitindo o contato com os micro-organismos, e, portanto, não pronunciando efeito antimicrobiano.

As maiores concentrações de NPs-ZnO utilizadas não resultaram necessariamente no maior efeito antimicrobiano, o que indica que foi mais importante à disponibilidade das nanopartículas do que a concentração das mesmas.

Os objetivos deste trabalho foram alcançados com sucesso. As NPs-ZnO apresentaram potencial efeito antimicrobiano frente a micro-organismos patógenos e podem ser incorporadas a materiais poliméricos. Este estudo amplia o interesse da aplicação de NPs-ZnO para a garantia da segurança dos alimentos.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Obter filmes incorporados com NPs-ZnO por extrusora de filmes ao invés de termoprensa, investigando esta etapa como possível causa do aprisionamento das nanopartículas na matriz polimérica;
- b) Estudar o uso de agente estabilizante para as NPs-ZnO, visando uma redução da sedimentação em soluções aquosas;
- c) Estudar o sinergismo com outros compostos antimicrobianos;
- d) Realizar testes toxicológicos com as NPs-ZnO utilizadas neste trabalho;
- e) Estudar a migração de NPs-ZnO em matrizes poliméricas.

REFERÊNCIAS

- AKBAR, A.; ANAL, A. K. Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in ready to eat poultry meat. **Food Control**, v. 38, p. 88-95, 2014.
- AL-HILLI, S.M.; WILLANDER, M. Optical properties of zinc oxide nanoparticles embedded in dielectric medium for UV region: Numerical simulation. **Journal Nanoparticle Research**, v. 8, p. 79-97, 2006.
- ANDERSSON, T.; STALBOM, B.; WESSLÉN, B. Degradation of polyethylene during extrusion. II. Degradation of low-density polyethylene, linear low-density polyethylene, and high-density polyethylene in film extrusion. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 91, n. 3, p. 1525–1537, 2004.
- ANN, L. C.; MAHMUD, S.; BAKHORI, S, K. N. SIRELKHATIM, A.; MOHAMAD, D.; HASAN, H.; SEENI, A.; RAHMAN, R. A. Antibacterial responses of zinc oxide structures against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes*. **Ceramics International**, v. 40, p. 2993–3001, 2014.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- APPLEROT, G.; PERKAS, N.; AMIRIAN, G.; GIRSHEVITZ, O.; GEDANKEN, A. Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 3, p. S3–S8, 2009.
- ASTM (2006). Standard specification for polyethylene plastics molding and extrusion materials, D-4976. In Annual Book of ASTM; American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- AZEREDO, H.M.C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, p. 56-69, 2013.

BARÃO, M. Z. **Dossiê Técnico** (Embalagens para produtos alimentícios). SBRT, 2011.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232–239, 2012.

BERG, J. C. **Wettability**. New York: Marcel Dekker, 1993.

BETTINI, S. H. P.; AGNELLI, J. A. M. Evaluation of methods used for analyzing maleic anhydride grafted onto polypropylene by reactive processing. **Polymer Testing**, v. 19, n. 01, p. 3-15, 2000.

BEYSENS, D. The Formation of Dew. **Atmospheric Research**, v. 39, p. 215-237, 1995.

BRASIL. Portaria MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/058b25804745873290fed43fbc4c6735/PORTARIA_33_1998.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 abril 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas Por Alimentos. 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em 15 dez 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2014.

BRAUN, D. et al. **Polymer synthesis: theory and practice**. 4th. Berlin: Springer, 2005.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on

Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 866–870, 2006.

CAI, K.F., HE, X.R., ZHANG, L.C. Fabrication, properties and sintering of ZnO nanopowder. **Materials Letters**, v. 62, p. 1223-1225, 2008.

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

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007.

CHA, J.; WHITE, J. L. Maleic anhydride modification of polyolefin in an internal mixer ant twin-screw extruder: experimental and kinect model. **Polymer Engineering and Science**, v. 41, n. 07, p. 1227-1237, 2001.

CHAUDHRY, Q.; AITKEN, R.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 25, n. 3, p. 241-58, 2008.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTA MARIA, L. C. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras**. 21. Ed. Porto Alegre: Edipucrs 2007.

DEL TORO-SÁNCHEZ, C. L.; AYALA-ZAVALA, J. F.; MACHI, L.; SANTACRUZ, H.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocylic Chemistry**, v. 67, p. 431–441, 2010.

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

EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, n. 3–4, p. 408–413, 2011.

ESKANDARI, M.; HAGHIGHI, N.; AHMADI, V.; HAGHIGHI, F.; MOHAMMADI, S. R. Growth and investigation of antifungal properties of ZnO nanorod arrays on the glass. **Physica B: Condensed Matter**, v. 406, n. 1, p. 112–114, 2011.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, p. 1447–1464, 2012.

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

FDA (2014). Part 182 - Substances generally recognized as safe. Food and drug administration, Washington DC, USA. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.8991>>. Acesso em: 26 outubro 2014.

Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species], 2012a.

Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [*Salmonella* species], 2012b.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

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

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

GULMINE, J. V.; JANISSEK, P.R.; HEISE, H.M.; AKCELRUD, L. Polyethylene characterization by FTIR. **Polymer Testing**, v. 21, p. 557–563, 2002.

GUSATTI, Marivone. **Síntese de nanocristais de ZnO via processamento soloquímico**. 152 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis. 2010.

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

HAMIELEC, A.E.; GLOOR, P.E.; ZHU, S. Kinetics of free radical modification of polyolefins in extruders: chain scission, crosslinking and grafting. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 69, p. 611–618, jun. 1991.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, n. 3, p. 56–65, 2000.

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

HENG, B. C.; ZHAO, X.; XIONG, S.; WOEI NG, K.; YIN-CHIANG BOEY, F.; SAY-CHYE LOO, J. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1762–1766, 2010.

HOTCHKISS, J.H. Food-packaging interactions influencing quality and safety. **Food Additives Contaminants**, v. 14, p. 601-607, 1997.

HSIAO, I. L.; HUANG, Y. J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 7, p. 1219–1228, 2011.

HU, Y.; CHEN, H. Preparation and characterization of nanocrystalline ZnO particles from a hydrothermal process. **Journal Nanoparticle Research**, v. 10, p. 401–407, 2008.

HUANG, M. H.; MAO, S.; FEICK, H.; YAN, H.; WU, Y.; KIND, H.; WEBER, E.; RUSSO, R.; YANG, P. Room-Temperature Ultraviolet Nanowire Nanolasers. **Science**, v. 292, n. 5523, p.1897-1899, 2001.

JALAL, R.; GOHARSHADI, E. K.; ABARESHI, M.; MOOSAVI, M.; YOUSEFI, A.; NANCARROW, P. ZnO nanofluids: green synthesis, characterization, and antibacterial activity. **Materials Chemistry and Physics**, v. 121, n. 1–2, p. 198–201, 2010.

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

JEZIÓRSKA, R. Maleic anhydride grafted LLDPE modified polyamide and fabrics waste containing PET blends. **Pigment and Resin Technology**, v. 35, n. 1, p. 3–11, 2006.

JIN, T.; SUN, D.; SU, J.Y.; ZHANG, H.; SUE, H. J. Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.

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

KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1116–1122, 2009.

KEIS, K.; VAYSSIERES, L.; LINDQUIST, S.; HAGFELDT. Nanostructured ZnO electrodes for photovoltaic applications. **Nanostructured Materials**, v. 12, p. 487–490, 1999.

KESKIN, D; EKMEKÇI, S. Investigation of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in foods and the effect of salt and pH on *P. aeruginosa*. **Hacettepe Journal Biology and Chemistry**, v. 1, n. 36, p. 41-46, 2008.

KOEDRITH, P.; BOONPRASERT, R.; KWON, J. Y.; KIM, I.; SEO, Y. R. Recent toxicological investigations of metal or metal oxide nanoparticles in mammalian models *in vitro* and *in vivo*: DNA damaging potential, and relevant physicochemical characteristics. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 10, p.107-126, 2014.

KOLEKAR, T. V.; YADAV, H.M.; BANDGAR, S.S.; DESHMUKH, P.Y. Synthesis By Sol-Gel Method And Characterization Of ZnO Nanoparticles. **Indian Streams Research Journal**, v. 1, n. 1, 2011.

KWON, J. Y.; LEE, S. Y.; KOEDRITH, P.; LEE, J. Y.; KIM, K.; OH, J.; YANG, S. I.; KIM, M.; LEE, J. K.; JEONG, J.; MAENG, E. H.; LEE, B. J.; SEO, Y. R. Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* tests. **Mutation Research**, v. 761, p. 1-9, 2014.

LEE, J. H.; KIM, Y. G.; CHO, M. H.; LEE, J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 12, p. 888-896, 2014.

LENG, Y. **Materials characterization: Introduction to microscopic and spectroscopic methods**. Singapore: John Wiley & Sons, 2008.

LEPOT, N.; VAN BAEL, M.K.; VAN DEN RUL, H.; D'HAEN, J.; PEETERS, R.; FRANCO, D.; MULLENS, J. Synthesis of ZnO nanorods from aqueous solution. **Materials Letters**, v.61, n.13, p. 2624–2627, 2010.

LI, J. H.; HONG, R. Y.; LI, M. Y.; LI, H. Z.; ZHENG, Y.; DING, J. Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 64, n.4, p. 504–509, 2009.

LOOK, D. C. Recent advances in ZnO materials and devices. **Materials Science and Engineering**, v. 80, p. 383–387, 2001.

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

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; DUNLAB, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição, São Paulo: Artmed, 2010.

MAENSIRIA, S.; LAOKULA, P.; PROMARAKB, V. Synthesis and optical properties of nanocrystalline ZnO powders by a simple method using zinc acetate dihydrate and poly(vinyl pyrrolidone). **Journal of Crystal Growth**, v. 289, p. 102–106, 2006.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polimeros**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.

MARK, J. E. **Polymer data handbook**. Ohio: Oxford University Press, 1999.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F.; OLIVE, P. L.; BANUELOS, A.; ORRANTIA, E; NINO, N.; PHDD, SANCHEZ, E. M.; RUIZ, F. BACH, H.; AV-GAY, Y. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 681–688, 2010.

MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C.; DURÁN, N. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo, SP: Artliber, 2006.

MIRHOSSEINI, M; FIROUZABADI, F. B. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 2, 2013.

MOLINA, T. P. C. A, MARIANNE AYUMI SHIRAI, M. A.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Active biodegradable packaging for fresh pasta. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 25-29, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M2-A8**: padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. 8. ed. Anvisa, v. 23, n. 1. Substitui a Norma M2-A7 v. 20, n. 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M7-A6**: metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada. 6. ed. Anvisa, v. 23, n.2. Substitui a Norma M7-A5 v. 20, n. 2. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2013.

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

NIEUWENHUIZEN, P. J. Zinc accelerator complexes. Versatile homogeneous catalysts in sulfur vulcanization. **Applied Catalysis A: General**, v. 207, p. 55–68, 2001.

NOHYNEK, G. J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 239–259, 2010.

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

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

PADMAVATHY, N; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, p. 035004, 2008.

PANDIYARAJA, K. N.; DESHMUKHB, R. R.; RUZYBAYEVC, I.; SHAHC, S. I.; SUD, P.; HALLELUYAHE, J. M.; HALIM, A. S. Influence of non-thermal plasma forming gases on improvement of surface properties of low density polyethylene (LDPE). **Applied Surface Science**, v. 307, n. 109–119, 2014.

PASQUET, J.; CHEVALIER, Y. COUVAL, E. BOUVIER, D.; NOIZET, G.; MORLIÈRE, C.; BOLZINGERB, M. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 460, p. 92– 100, 2014.

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

PEARTON, S.J.; NORTON, D.P.; IP, K.; HEO, Y.W.; STEINER, T. Recent progress in processing and properties of ZnO. **Progress in Materials Science**, v. 50, p. 293–340, 2005.

PINHEIRO, L. A.; CHINELATTO, M.A.; CANEVAROLO, S.V. The role of chain scission and chain branching in high density polyethylene during thermo-mechanical degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v.86, p. 445-453, 2004.

PIRNAY, J. P.; MATTHIJS, S.; COLAK, H.; CHABLAIN, P.; BILOCQ, F. ELDERE, J. V.; VOS, D. D.; ZIZI, M.; TRIEST, L.;

CORNELIS, P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 969–980, 2005.

PORTO, M. F.; GIROTTO, E. M.; KUNITA, M. H.; GONÇALVES, M. C.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F.; RADOVANOVIC, E. Atomic force microscopy, scanning electric potential microscopy and contact-angle surface analysis of low-density polyethylene grafted with maleic anhydride. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 128, p. 86-91, 2004.

PRASAD, V.; SHAIKH, A.J.; KATHE, A.A.; BISOYI, D.K.; VERMA, A.K.; VIGNESHWARAN, N. Functional behaviour of paper coated with zinc oxide-soluble starch nanocomposites. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 210, n. 14, p. 1962–1967, 2010.

PUJALTÉ, I.; PASSAGNE, I.; BROUILLAUD, B.; TRÉGUER, M.; DURAND, E.; OHAYON-COURTÈS, C.; L'AZOU, B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 10, p. 1–16, 2011.

RZAYEV, Z. M. O. Graft copolymers of maleic anhydride and its isostructural analogues: High performance engineering materials. **International Review of Chemical Engineering**, v. 3, n. 2, p. 153-215, 2011.

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

ROACH, P., SHIRTCLIFFE, N. J., NEWTON, M. I.: Progress in superhydrophobic surface development. **Soft Matter**, v. 4, 2008.

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

SAVI, G. D.; BORTOLUZZI, A. J. e SCUSSEL, V. M. Antifungal properties of Zinc-compounds against toxigenic fungi and mycotoxin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1834–1840, 2013.

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

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 177–182, 2003.

SCLAVONS, M.; LAURENT, M.; DEVAUX, J.; CARLIER, V. Maleic anhydride-grafted polypropylene: FTIR study of a model polymer grafted by ene-reaction. **Polymer**, v. 46, p. 8062–8067, 2005.

SHARMA, V.; SHUKLAA, R. K.; SAXENAB, N.; PARMARA, D.; DASB, M.; DHAWANA, A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology Letters**, v. 185, p. 211–218, 2009.

SILVA, E.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

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

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. 4th ed. New Jersey: Wiley, 2006.

STEINER, T. **Semiconductor nanostructures for optoelectronic applications**. USA: Artech House, 2004.

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

TANG, Z. K.; WONG, G. K. L.; YU, P.; KAWASAKI, M.; OHTOMO, A.; KOINUMA, H.; SEGAWA, Y. Room-temperature ultraviolet laser emission from self-assembled ZnO microcrystallite thin films. **Applied Physics Letters**, v. 72, n. 25, 1998.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, v. 20, p. 1073–1079, 2009.

VAEZI, M. R. Two-step solchemical synthesis of ZnO/TiO₂ nanocomposite materials. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 205, p. 332-337, 2008.

VICENTINI, D. S.; SMANIA, A., JR.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. **Materials Science and Engineering**, v. 30, n. 4, p. 503–508, 2010.

XIE, Y.; HE, Y.; IRWIN, P. L.; JIN, T.; SHI, X. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2325, 2011.

WENG, Y. M.; CHEN, M. J. Sorbic anhydride as antimycotic additive in polyethylene food packaging films. **Lebensmittle-Wissenschaft and Technologie**, v. 30, p. 485-487, 1997.

WENZEL, R. N.: Resistance of Solid Surfaces to Wetting By Water. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 28, n. 8, 1936.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **International Journal of Inorganic Materials**, v. 3, p. 643–646, 2001.

ZHANG, L; JIANG, Y; DING, Y.; POVEY, M; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, p.479–489, 2007.

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

ZHONGL, Q.; MATIJEVIK, E. Preparation of uniform zinc oxide colloids by controlled double-jet precipitation. **Journal of Material Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 443-447, 1996.

ZOU, Y.; JUNG, L.; LEE, S. H.; KIM, S.; CHO, Y.; AHN, J. Enhanced antimicrobial activity of nisin in combination with allyl isothiocyanate against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* and *Shigella boydii*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 324–333, 2013.

ANEXO A – Espectros de EDS dos filmes incorporados NPs-ZnO

Tabela A.1. Espectros de EDS dos filmes de PEBDL-AM incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão.

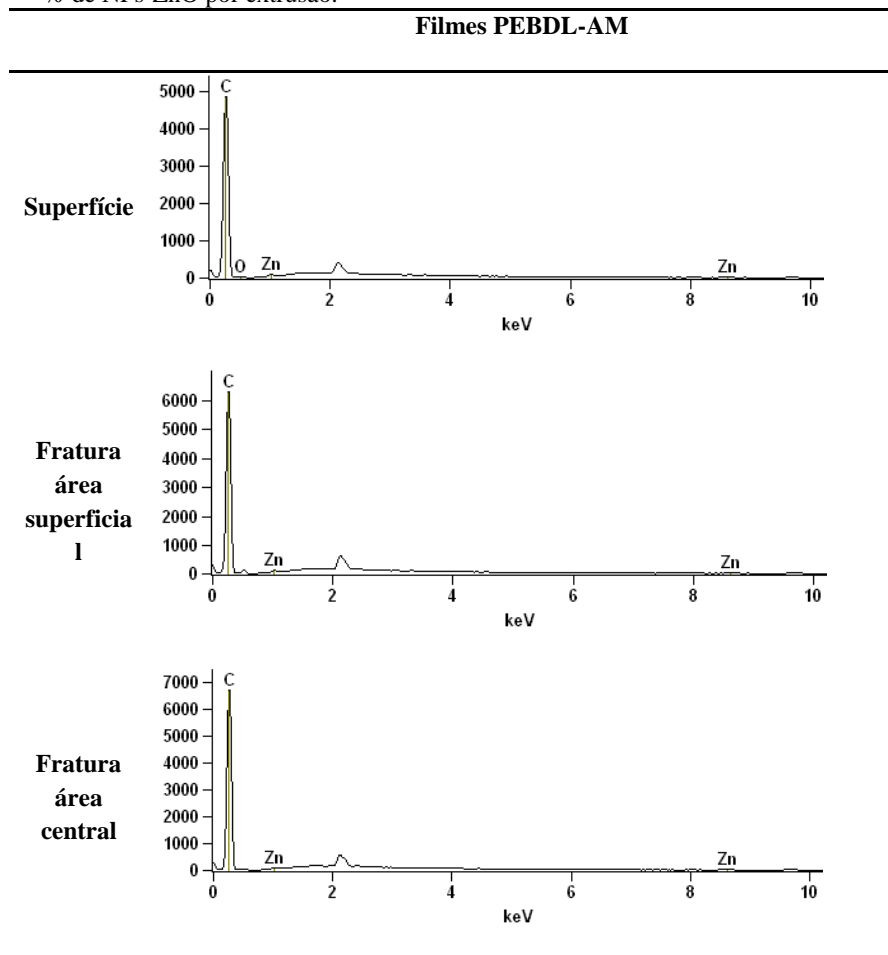


Tabela A.2. Espectros de EDS dos filmes de PEBD incorporados com 1,0 % de NPs-ZnO por extrusão.

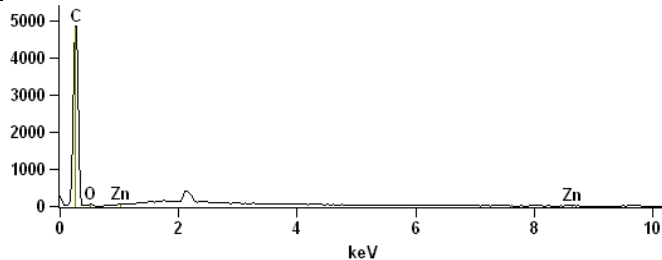
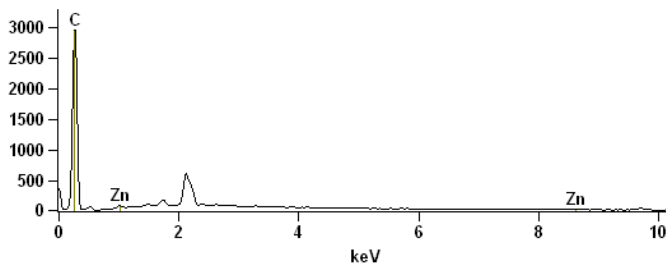
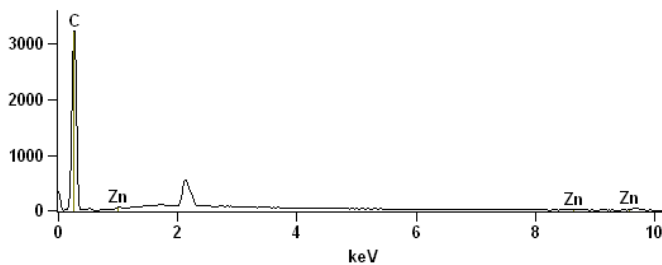
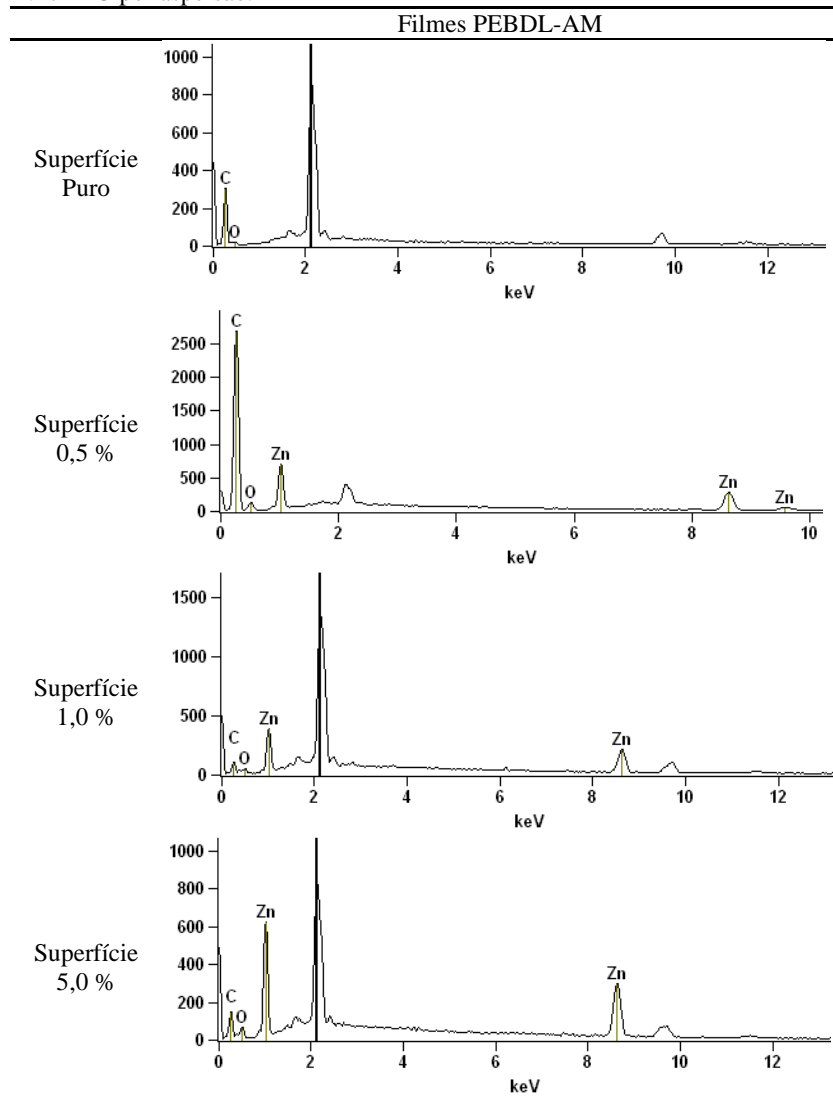
Filmes PEBD**Superfície****Fratura
área
superficial
I****Fratura
área
central**

Tabela A.3. Espectros de EDS dos filmes de PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão.



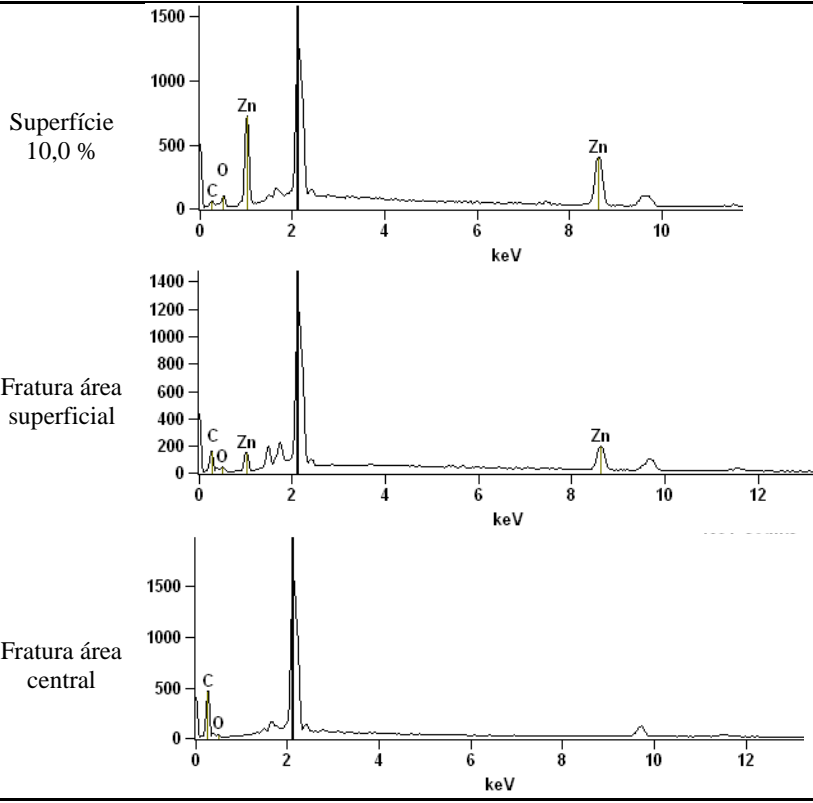
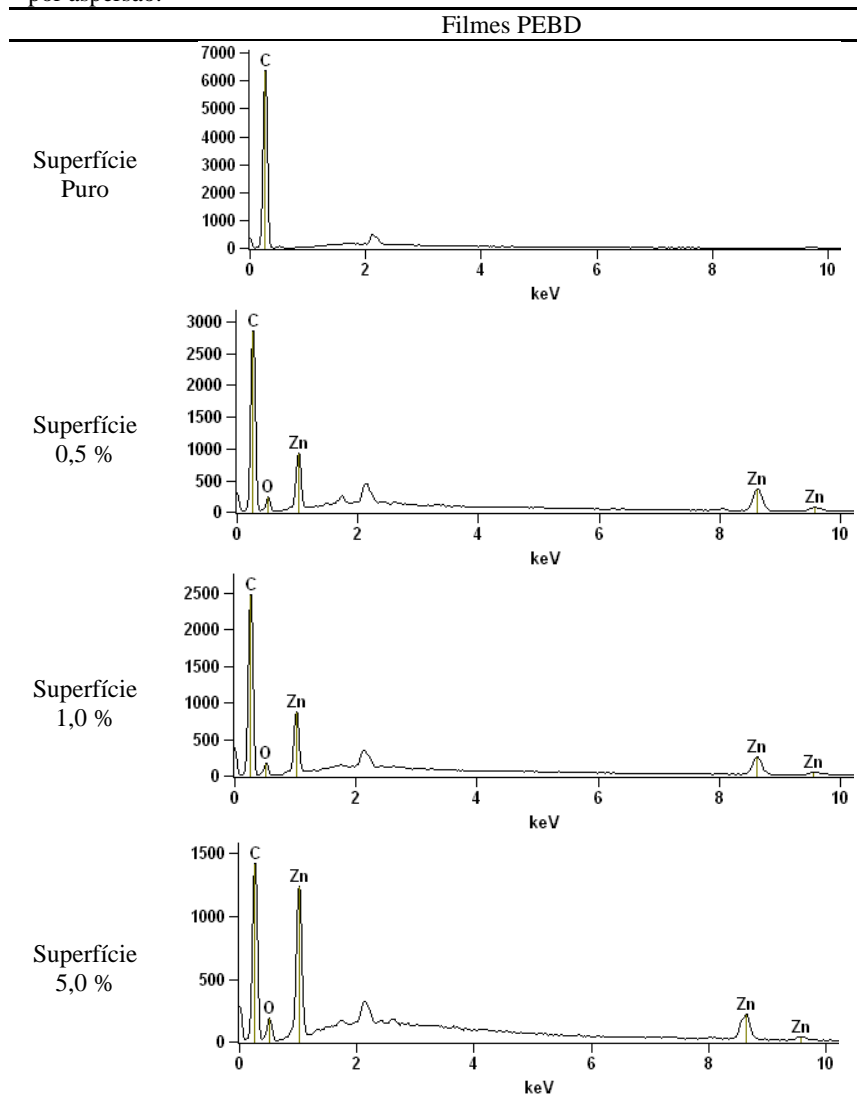
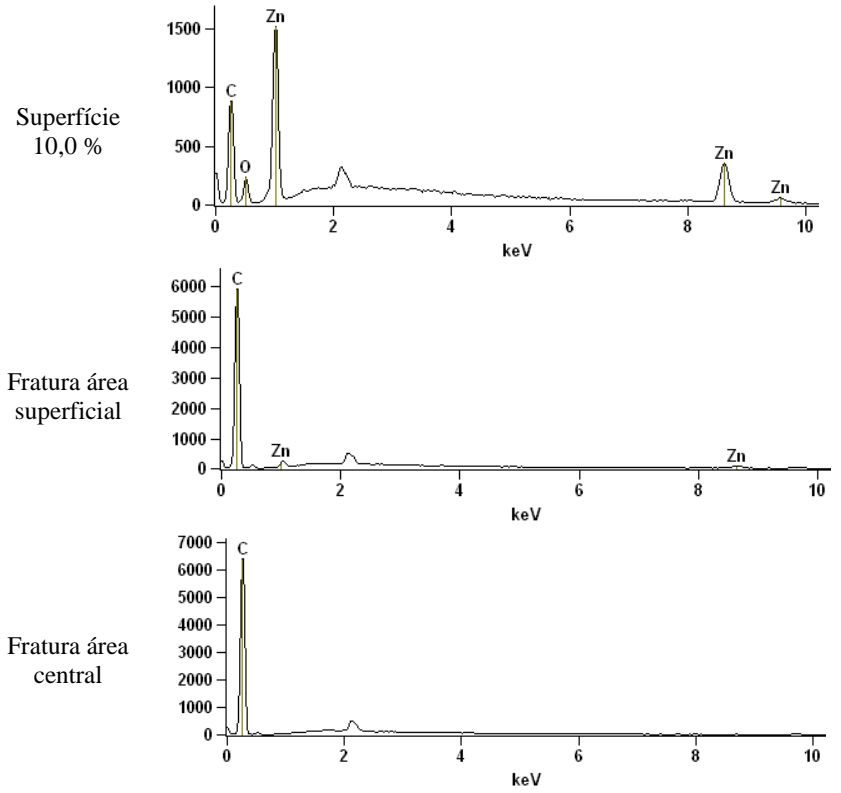


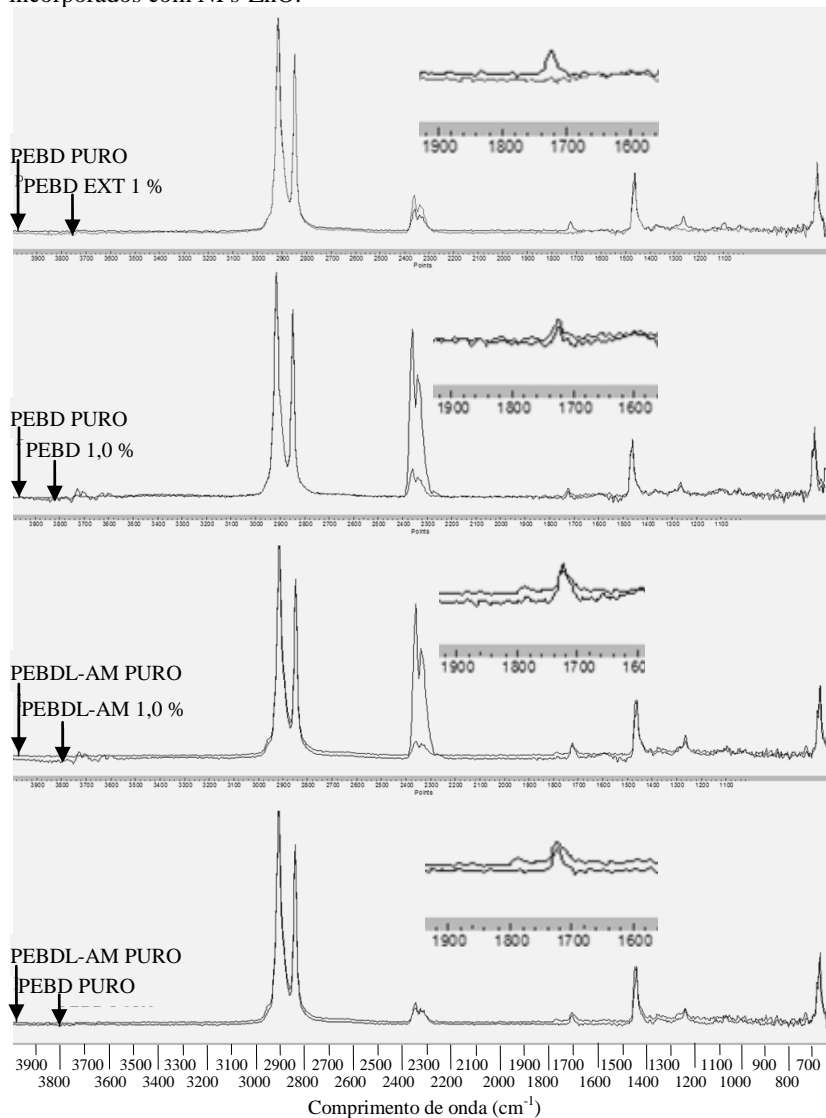
Tabela A.4. Espectros de EDS dos filmes de PEBD incorporados com NPs-ZnO por aspersão.





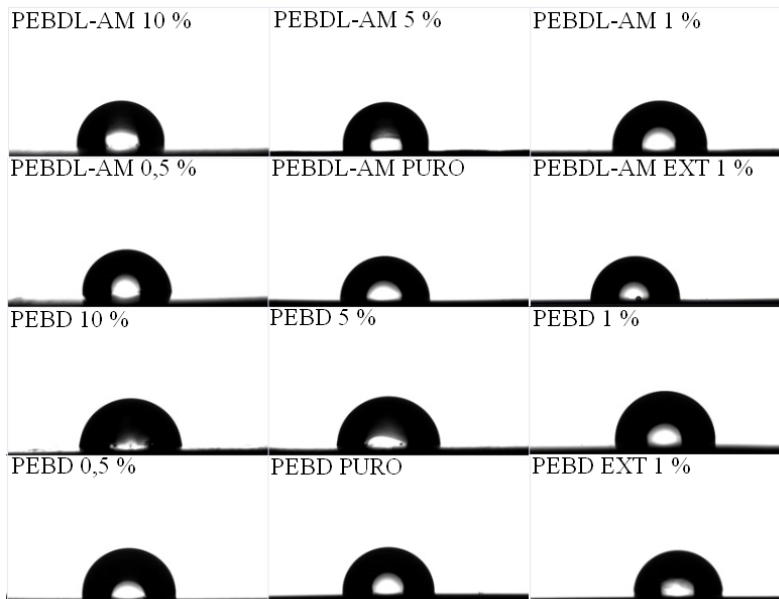
ANEXO B – Espectros de FTIR dos filmes incorporados NPs-ZnO

Figura B.1. Espectros de FTIR dos filmes de PEBDL-AM e PEBD incorporados com NPs-ZnO.



ANEXO C – Molhabilidade dos filmes incorporados NPs-ZnO

Figura C.1 Imagem da gota para obtenção de ângulo de contato dos filmes incorporados com NPS-ZnO em goniômetro.



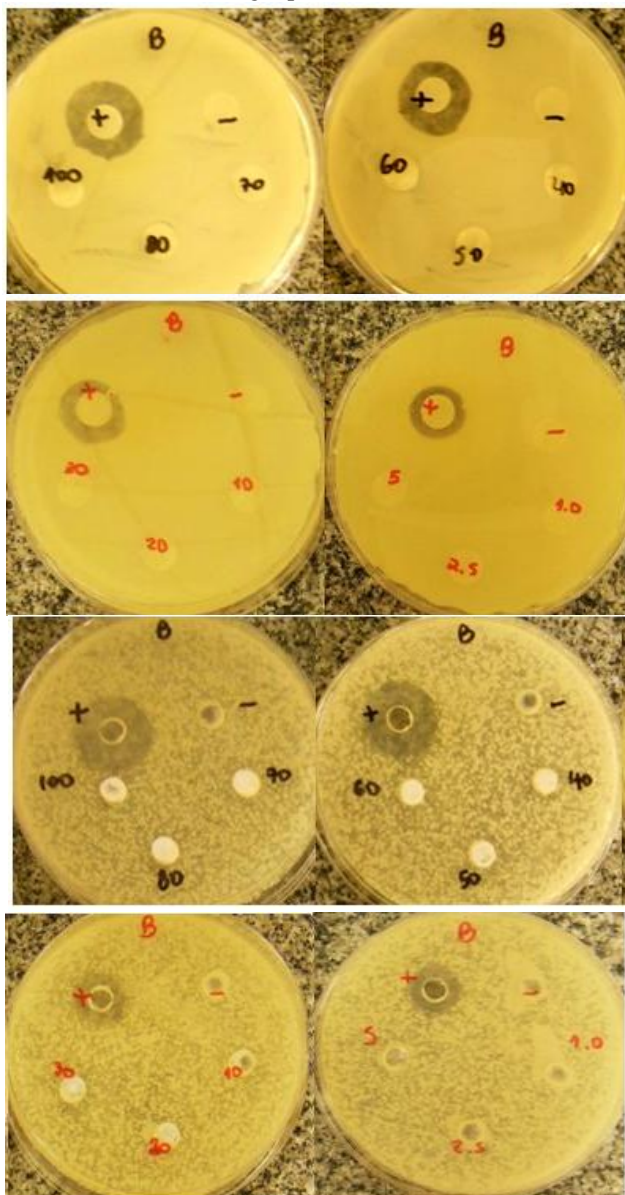
ANEXO D – Teste de difusão em ágar das NPs-ZnOFigura D.1. Teste de difusão em ágar para *B. cereus*.

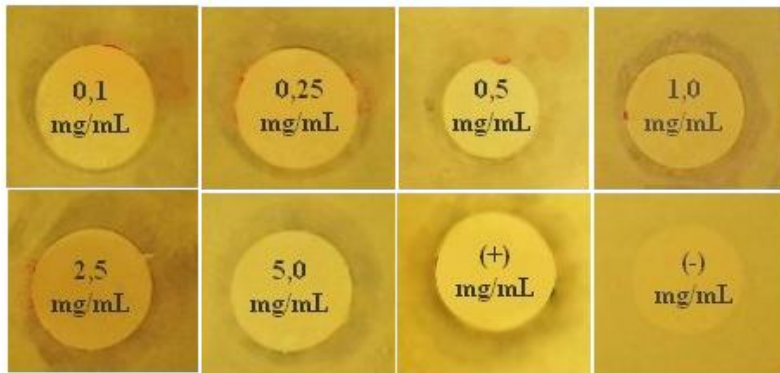
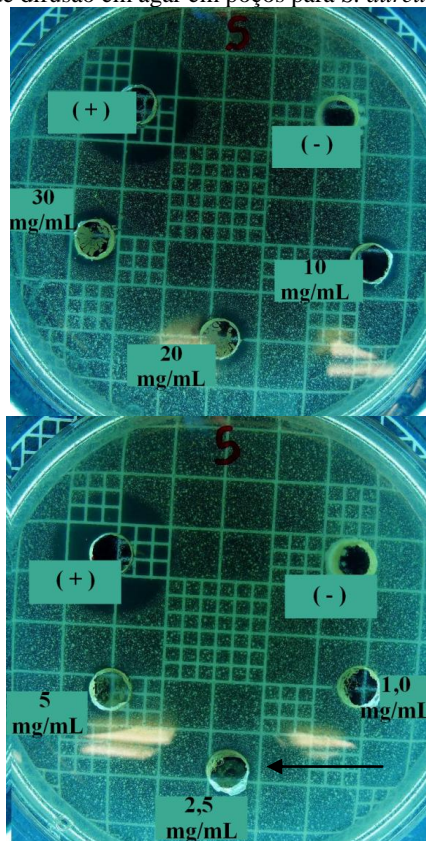
Figura D.2. Teste de difusão em ágar em discos para *S. aureus*.Figura D.3. Teste de difusão em ágar em poços para *S. aureus*.

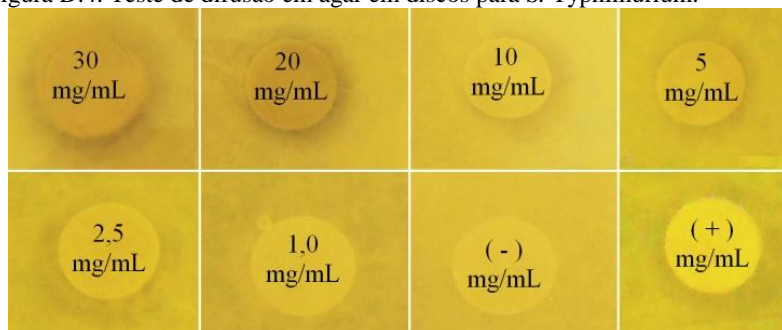
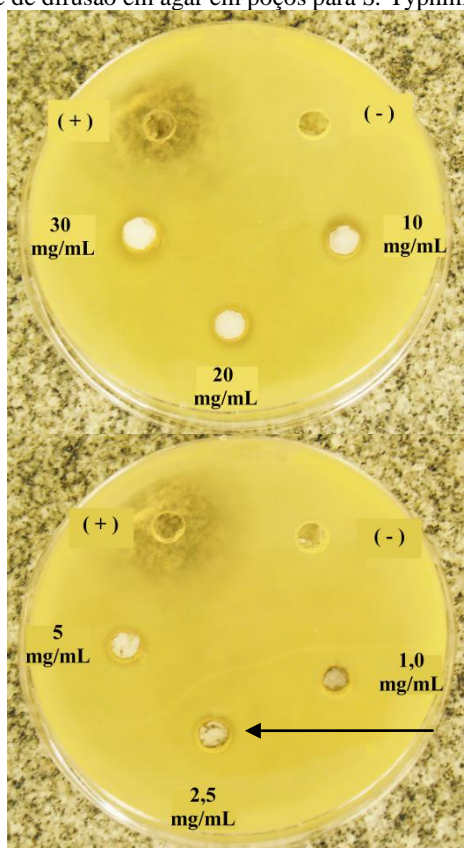
Figura D.4. Teste de difusão em ágar em discos para *S. Typhimurium*.Figura D.5. Teste de difusão em ágar em poços para *S. Typhimurium*.

Figura D.6. Teste de difusão em ágar em discos para *P. aeruginosa*.

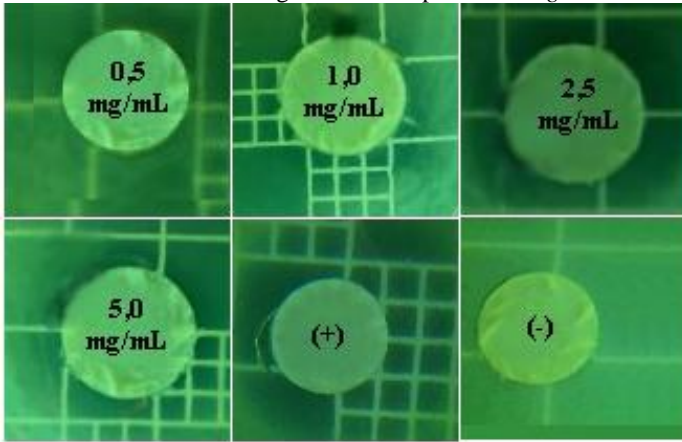
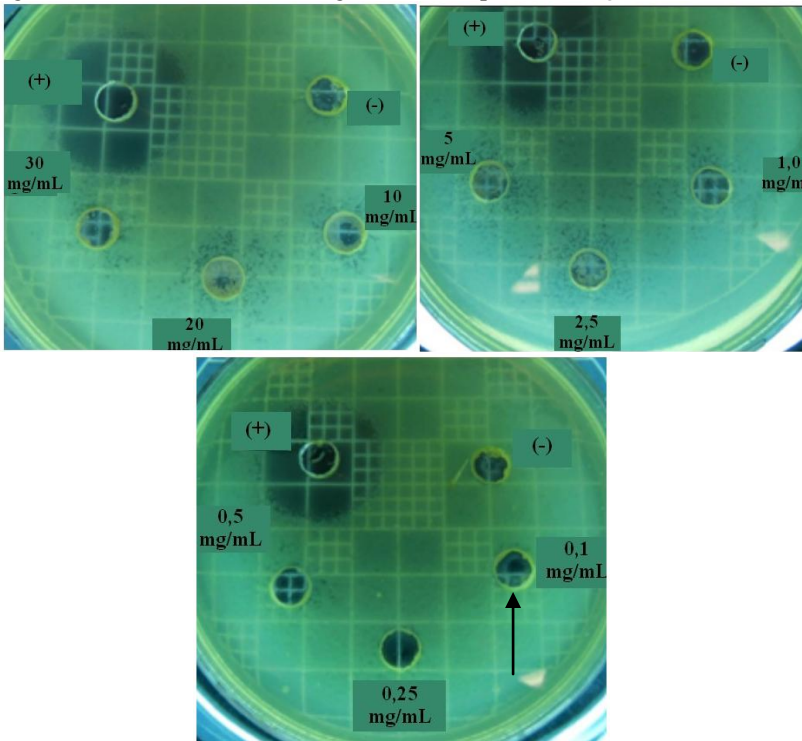


Figura D.7. Teste de difusão em ágar em discos para *P. aeruginosa*.



ANEXO E – Teste de diluição em caldo das NPs-ZnO

Figura E.1. Teste diluição em caldo em *S. aureus* para obtenção de CIM e CBM. Plaqueamento das diluições 10^{-1} e 10^{-2} do controle negativo (-) e positivo (+) e dispersão das NPs-ZnO (0,01 a 0,5 mg/mL).

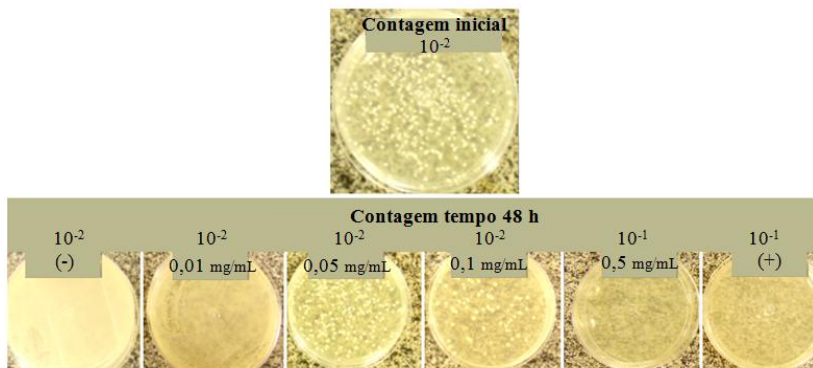
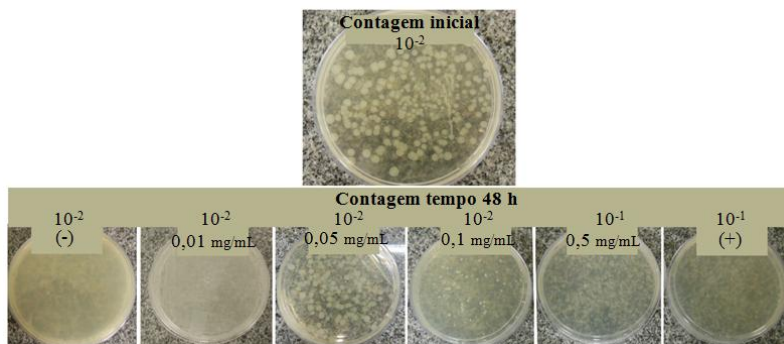


Figura E.2. Teste diluição em caldo em *S. Typhimurium* para obtenção de CIM e CBM. Plaqueamento das diluições 10^{-1} e 10^{-2} do controle negativo (-) e positivo (+) e dispersão das NPs-ZnO (0,01 a 0,5 mg/mL).



ANEXO F – Teste de difusão em ágar dos filmes incorporados com NPs-ZnO

Figura F.1. Teste difusão em ágar de filmes de PEBD extrusados com NPs-ZnO.

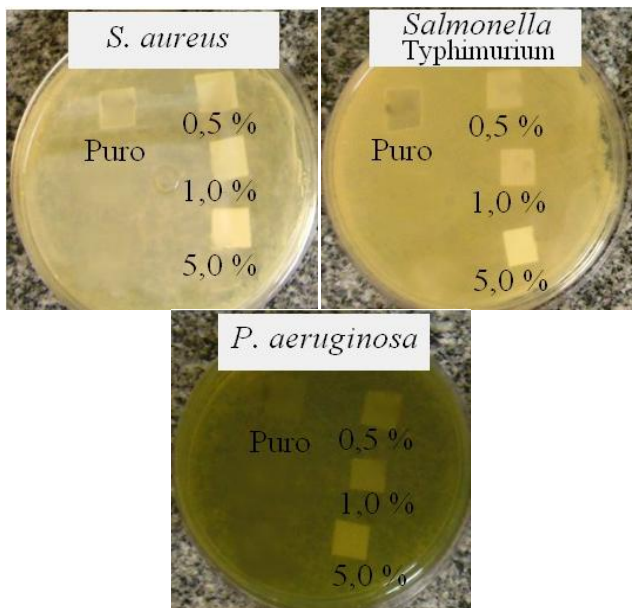


Figura F.2. Teste difusão em ágar de filmes de PEBDL-AM extrusados com NPs-ZnO.

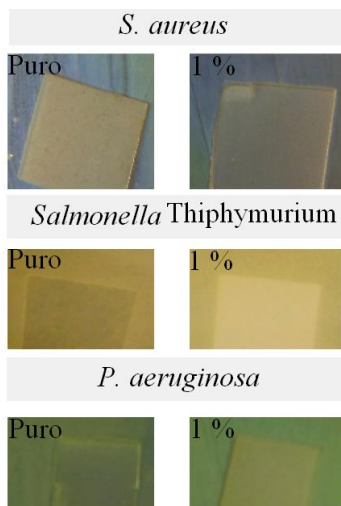


Figura F.3. Teste difusão em ágar em *P. aeruginosa* com filmes de PEBDL-AM incorporados com NPs-ZnO por aspersão.

