



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

SÉRGIO HENRIQUE DE TOLEDO E SILVA

CONFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE BIOFILMES NANOCOMPÓSITOS À BASE DE ALGINATO
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE ZnO

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE PHYSICOCHEMICAL
AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF ALGINATE-BASED NANOCOMPOSITE
BIOFILMS CONTAINING ZnO NANOPARTICLES

CAMPINAS - SP

2017

SÉRGIO HENRIQUE DE TOLEDO E SILVA

CONFECCÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE BIOFILMES NANOCOMPÓSITOS À BASE DE ALGINATO,
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE ZnO

*Dissertação apresentada à Faculdade
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.*

Orientadora: Prof^a. Ângela Maria Moraes

Co-Orientadora: Dr^a. Andréa Cristiane Krause Bierhalz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DO ALUNO SÉRGIO HENRIQUE DE
TOLEDO E SILVA, ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a
ÂNGELA MARIA MORAES E CO-ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^aANDRÉA CRISTIANE KRAUSE BIERHALZ.

CAMPINAS - SP

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Si38c Silva, Sérgio Henrique de Toledo e, 1989-
Confecção e caracterização físico-química e da atividade antimicrobiana de biofilmes nanocompósitos à base de alginato contendo nanopartículas de ZnO / Sérgio Henrique de Toledo e Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Ângela Maria Moraes.

Coorientador: Andréa Cristiane Krause Bierhalz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Nanocompósitos (Materiais). 2. Atividade antimicrobiana. 3. Alginatos. 4. Óxido de zinco. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Bierhalz, Andréa Cristiane Krause, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Production and characterization of the physicochemical and antimicrobial properties of alginate based nanocomposite biofilms containing ZnO nanoparticles

Palavras-chave em inglês:

Nanocomposites (Materials)

Antimicrobial activity

Alginates

Zinc oxide

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Celso Aparecido Bertran

Theo Guenter Kieckbusch

Data de defesa: 02-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Sérgio Henrique de Toledo e Silva e aprovada em 02 de março de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes
Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran
Instituto de Química/UNICAMP

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Sérgio e Wanderléia, por mais que me amar e apoiar, mas também por todas as privações da vida que lhe foram impostas para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos e irmãs Andréia, Guilherme, Lucas e Maria por fazer da vida um caminho menos solitário.

Às minhas amigas e amigos, mais que queridos, Izumi, Ana, Amanda, Ana Luiza, Mirian, Vanessa, Mítio e Taís pela amizade, carinho e por todos os momentos e memórias felizes que temos juntos.

Ao Felipe pelo companheirismo, pelo cuidado e amor.

Aos novos amigos Arnaldo, Ricardo, Vinícius e Flávio por tornar a pós-graduação mais leve e divertida.

Ao professor Theo Guenter Kieckbusch pelas contribuições inestimáveis na concepção do projeto de mestrado.

À professora Maria Helena Miguel, não apenas por me ajudar nos primeiros passos de minha carreira acadêmica, mas, principalmente, por romper com a mesmice e inércia do pensamento.

A Andréa Cristiane Krause Bierhalz pela co-orientação, apoio e amizade.

À professora Ângela Maria Moraes por me receber em seu grupo de pesquisa, pela orientação e por ser um modelo exemplar de profissional.

À equipe do LEBC, especialmente aos amigos Andréa, Cecília, Fernanda, Luízinha, Rafael e Renata pela amizade, pelo apoio e momentos divertidos (ou não) que compartilhamos.

Ao professor Celso Aparecido Bertran por gentilmente permitir a realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura em seu laboratório.

À equipe do LRAC, principalmente Adilson Brandão, Lucélia Silva, Celso Camargo e Hugo Teixeira pela contribuição nos ensaios realizados e pelos esclarecimentos.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia Brasileira (LnNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho teve-se por objetivo analisar a influência de diferentes conteúdos de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO_{nano}) e de diferentes graus de reticulação nas propriedades de filmes de alginato plastificados com glicerol, visando-se a aplicação dos filmes como constituintes de curativos para lesões de pele ou de embalagens para alimentos. Preparados por *casting*, com e sem reticulação com Ca^{++} , três grupos de filmes com e sem ZnO_{nano} foram obtidos: não reticulados com cálcio (SC), reticulados em primeiro estágio (RP) e reticulados em primeiro e segundo estágio (RS). Observou-se que o uso de ZnO_{nano} reforçou a matriz polimérica, não tendo sido possível obter filmes SC sem nanopartículas. O efeito da reticulação com Ca^{++} foi mais intenso que o da adição de ZnO_{nano} para partículas menores que 100 nm. O uso do primeiro e do segundo estágio de reticulação modificou as propriedades dos filmes nanocompósitos, reduzindo sua permeabilidade ao vapor d'água e espessura, melhorando as propriedades mecânicas e aumentando a estabilidade térmica. O efeito de reforço pelas nanopartículas nas propriedades mecânicas dos filmes RP foi potencializado com a redução do tamanho médio das ZnO_{nano} (<50 nm). Contudo, o efeito do segundo estágio de reticulação mostrou-se superior ao uso das nanopartículas, independentemente do tamanho das mesmas, supondo-se que a presença das ZnO_{nano} nos filmes reticulados RS possa ter reduzido a densidade de reticulação. A tonalidade e intensidade da cor foram alteradas, e a transparência dos filmes foi reduzida com o aumento no conteúdo de ZnO_{nano} (<100 nm). Os filmes RS apresentaram, em média, permeabilidade ao vapor d'água igual a $3,30 \text{ g}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa}$, tensão na ruptura de 64 MPa, 2% de alongamento e módulo de Young de 4.700 MPa. A opacidade do filme nanocompósito RS fabricado com 3% do ZnO_{nano} (<50 nm) foi igual a 7,3% em comparação a 10,1% alcançado para o filme RS preparado com o 3% do ZnO (<100 nm). Os filmes nanocompósitos RS apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e efeito bacteriostático contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, como os filmes à base de alginato de cálcio preparados na presença de nanopartículas de ZnO apresentam atividade antimicrobiana, melhoria em variadas propriedades, além de aumento da estabilidade, conclui-se que os mesmos são uma alternativa promissora no desenvolvimento de curativos e embalagens antimicrobianas.

Palavras-chave: nanocompósitos; curativos, embalagens antimicrobianas, alginato, óxido de zinco.

ABSTRACT

The present work had the goal of analyzing the influence of different contents of zinc oxide nanoparticles (ZnO_{nano}) and of different degree of cross-linking on the properties of alginate films plasticized with glycerol, aiming their application as wound dressings or antimicrobial food packaging. Prepared by casting, with and without cross-linking with Ca^{++} , three groups of films with and without ZnO_{nano} were obtained: non cross-linked with calcium (SC), cross-linked in one stage (RP) and cross-linked in two stages (RS). The use of ZnO_{nano} reinforced the polymeric matrix, since it was not possible to obtain SC films without ZnO_{nano} . On the other hand, the cross-linking with Ca^{++} effect was more intense than the addition of ZnO_{nano} smaller than 100 nm. The increase in cross-linking degree, achieved by using the two stages of reticulation, altered the nanocomposite films properties, reducing their water vapor permeability and thickness, improving the mechanical resistance and increasing the thermal stability. The reinforcement effect of ZnO_{nano} on mechanical properties of RP films was enhanced with the reduction on nanoparticle average size (< 50 nm). However, the increase in calcium concentration, accomplished with the use of the second stage of cross-linking, proved to be superior in comparison to nanoparticle incorporation, regardless of the particle average size used, so that the presence of ZnO_{nano} on the RS cross-linked films might have reduced the cross-linking density. The color properties were altered and the transparency was decreased with the increase of zinc oxide nanoparticles. The RS films presented, on average, water vapor permeability of $3.30 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa}$, tensile strength of 64 MPa, 2% of elongation and Young modulus of 4,700 MPa. The opacity of RS nanocomposite film containing 3% of (<50 nm) was 7.3% in comparison to 10.1% obtained for the RS nanocomposite film manufactured with 3% of ZnO (<100 nm). The RS nanocomposite films presented antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and bacteriostatic effect against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, as the calcium alginate based films prepared in the presence of ZnO nanoparticles present antimicrobial activity, improvement on many properties, besides increased stability, it is concluded that they are promising alternative in the development of wound dressings and antimicrobial food packages.

Keywords: nanocomposite; wound dressing; antimicrobial packaging; alginate; zinc oxide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica	-
A_e	Área exposta do filme	m^2
A_s	Área da seção transversal do filme	mm^2
CA	Capacidade de absorção	g água/g filme seco
d	Distância final de separação das garras	cm
d_0	Distância inicial de separação das garras	cm
D(v, 0.1)	Tamanho de partícula no qual 10% da população de partículas encontram-se abaixo	nm
D(v, 0.5)	Tamanho de partícula no qual 50% da população de partículas encontram-se abaixo	nm
D(v, 0.9)	Tamanho de partícula no qual 90% da população de partículas encontram-se abaixo	nm
E	Alongamento na ruptura	%
F_m	Força máxima no rompimento	N
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho	-
G	Taxa de permeação de vapor d'água	g/dia
L^*, a^*, b^*	Parâmetros de cor	-
$L_p^*, a_p^* e b_p^*$	Parâmetros de cor do filme controle	-
m_0	Massa total inicial do filme	g
m_f	Massa não solúvel	g
m_u	Massa do filme úmido	g
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	-
MS	Massa solubilizável em água	g/g filme seco
MY	Módulo elástico de Young	MPa
NP	Nanopartículas	-
PVA	Permeabilidade ao vapor de água	$g \cdot mm/m^2 \cdot dia \cdot kPa$
RP	Filme reticulado apenas em primeiro estágio	-
RS	Filme duplamente reticulado	-
SC	Filme não reticulado com cálcio	-
T	Nanopartículas tratadas com Ultra Turrax	-
TR	Tensão de ruptura	MPa

US	Nanopartículas tratadas com ultrassom	-
Y	Opacidade do filme em modo de transmitância	%
Y_p	Opacidade do filme colocado sobre o padrão preto	-
Y_b	Opacidade do filme colocado sobre o padrão branco	-
XRD	Cristalinidade	-
ZnO_{nano}	Nanopartícula de ZnO	-
ΔE^*	Diferença total de cor	-
ΔP_{H_2O}	Diferença de pressão parcial de vapor	kPa

Letras gregas

δ	Espessura do filme	mm
α	Diâmetro médio em relação à área superficial	nm
β	Diâmetro médio em relação ao volume da partícula	nm
ω	Conteúdo de umidade	% (g H ₂ O/100 g filme)
θ	Ângulo de contato	°

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Filmes biopoliméricos	19
3.1.1 Alginato	20
3.2 Materiais biopoliméricos ativos.....	23
3.3 (Bio)Nanocompósitos.....	24
3.3.1 Óxido de Zinco.....	25
3.4 Curativos.....	29
3.4.1 Pele	29
3.4.2 Lesões de Pele.....	29
3.4.3 Curativos.....	31
3.4.4 Classificação dos curativos.....	32
3.5 Embalagens tradicionais e embalagens ativas para alimentos.....	36
3.5.1 Embalagens tradicionais	36
3.5.2 Embalagens ativas	37
3.5.3 Embalagens antimicrobianas.....	38
CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Matéria-prima	43
4.2 Reagentes.....	43
4.3 Processo de fabricação dos filmes	43
4.3.1 Filmes controle (sem ZnO).....	45
4.3.2 Filmes nanocompósitos	46
4.4 Caracterização físico-química dos filmes.....	47

4.4.1 Aspecto visual.....	47
4.4.2 Conteúdo de umidade	48
4.4.3 Massa solubilizável em água	48
4.4.4 Espessura	48
4.4.5 Permeabilidade ao vapor de água.....	48
4.4.6 Propriedades mecânicas.....	49
4.4.7 Morfologia	50
4.4.8 Cor e opacidade.....	51
4.4.9 Distribuição do tamanho de partícula.....	52
4.4.10 Capacidade de absorção de soluções fisiológicas	53
4.4.11 Espectroscopia no Infravermelho.....	53
4.4.12 Cristalinidade	54
4.4.13 Análise termogravimétrica.....	54
4.4.14 Atividade antimicrobiana.....	54
4.4.15 Análise estatística dos dados.....	55

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO: EFEITOS DOS PROCESSOS DE RETICULAÇÃO E DESAGREGAÇÃO..... 56

5.1 Avaliação da importância relativa das reticulações primária e secundária em preparações com partículas desagregadas por diferentes métodos.....	57
5.2 Análise geral da importância relativa das reticulações primária e secundária	66

CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO NA REDUÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS 67

6.1 Efeito das condições de processamento na redução do tamanho das partículas de ZnO _{nano} I.....	67
6.2 Efeito das condições de processamento na redução do tamanho das partículas de ZnO _{nano} II.....	70
6.3 Análise geral do efeito da estratégia de desagregação das partículas	72

CAPÍTULO 7: RESULTADOS E DISCUSSÃO: INFLUÊNCIA DO AGENTE RETICULANTE E DO TIPO DE MATERIAL CONSTITUINTE DA FASE DISPERSA	73
7.1 Filmes não reticulados com cálcio	74
7.2 Filmes Reticulados em primeiro estágio (RP) e Filmes Reticulados em primeiro e segundo estágio (RS)	77
7.3 Caracterizações complementares	89
7.3.1 Microestrutura dos filmes	89
7.3.2 Difração de raios-X	96
7.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	97
7.3.4 Análise Termogravimétrica	101
7.3.4 Atividade Antimicrobiana In Vitro	104
7.4 Discussão geral da influência do agente reticulante e do material constituinte da fase dispersa nas propriedades do material	108
CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	110
8.1 Conclusões.....	110
8.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	111
CAPÍTULO 9: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
APÊNDICE A	123
APÊNDICE B.....	126

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Produtos obtidos a partir de polímeros sintéticos fazem parte da vida cotidiana, sendo utilizados em diversas aplicações como embalagens, dispositivos da área da saúde, materiais eletrônicos, eletrodomésticos, automóveis, vestuário, dentre outros. Estes polímeros destacam-se pela disponibilidade, facilidade de processamento e propriedades mecânicas e físicas ajustáveis para aplicações específicas. Apesar de sua alta versatilidade, materiais obtidos a partir de polímeros sintéticos podem apresentar desempenho pouco satisfatório para algumas aplicações específicas, nas quais propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade são necessárias.

Contudo, alguns polímeros sintéticos, como o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e policaprolactona (PCL), apresentam propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade que os tornam adequados para o uso em aplicações biomédicas e de áreas relacionadas à saúde humana ou animal (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003). No entanto, há outra classe de polímeros, os biopolímeros, que se apresentam como alternativa atraente por serem atóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis. Compostos desta categoria podem igualmente ser explorados no desenvolvimento de novos materiais para variadas aplicações específicas.

Encontrados em abundância na natureza, os biopolímeros podem ser extraídos diretamente de fontes naturais (animais ou vegetais), sintetizados por fermentação microbiana ou ainda obtidos pela polimerização de monômeros encontrados na natureza. Dentre os biopolímeros, encontram-se os polissacarídeos e proteínas que, devido a sua natureza coloidal, apresentam boa capacidade de formação de filmes com propriedades mecânicas e de barreira adequadas para diversas aplicações.

O alginato é um polissacarídeo de alta relevância comercial extraído de algas marrons. Além de ser atóxico e biocompatível, o alginato é capaz de formar géis na presença de íons divalentes, sobretudo o cálcio. Zactiti e Kieckbusch (2005) propuseram um processo de produção de filmes de alginato, no qual a reticulação é realizada em dois estágios. No primeiro, uma solução pouco concentrada de cálcio é adicionada à solução de alginato, obtendo-se filmes de baixo grau de reticulação solúveis em água. No segundo estágio, procede-se à reticulação complementar, que consiste da imersão do material obtido no estágio

anterior em uma solução concentrada de íons cálcio que são difundidos através das cadeias de alginato. O primeiro estágio de reticulação é realizado para impedir a dissolução do filme durante a imersão em solução de cálcio concentrada. Uma forte interação entre as cadeias do polissacarídeo resulta deste processo de reticulação com Ca^{++} , com a consequente formação de uma matriz polimérica estruturada, capaz de formar filmes de baixa solubilidade em água e com resistência mecânica moderada. O processo de reticulação do alginato tem sido avaliado para o ajuste de propriedades físico-químicas de filmes de alginato e, também, para o controle da taxa de liberação de compostos ativos incorporados à matriz polimérica (NIETO, 2009).

Filmes de alginato apresentam moderadas propriedades mecânicas, de barreira à umidade e maior dificuldade de processamento quando comparados com filmes plásticos sintéticos, limitando seu amplo uso na produção de filmes. Uma forma de superar tais dificuldades é a produção de filmes compósitos (THARANATHAN, 2003). Os compósitos são materiais híbridos, constituídos por duas ou mais fases, nos quais uma das fases encontra-se dispersa ao longo da matriz polimérica, resultando em melhorias nas propriedades físicas, mecânicas, térmicas e de barreira dos filmes. Quando a fase dispersa apresenta pelo menos uma das dimensões inferior a 100 nm, o material é denominado de nanocompósito. As partículas sólidas ou de géis insolúveis que compõem os compósitos podem ser de natureza química variada como metais, materiais inorgânicos e, inclusive, polímeros distintos dos da matriz principal.

Nanopartículas de metais ou óxidos metálicos podem apresentar atividade antimicrobiana intensa contra várias bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos patogênicos e, por esta razão, podem ser utilizadas como fase dispersa na produção de filmes nanocompósitos. Produzidas a partir de substâncias reconhecidas como seguras (*GRAS – generally recorded as safe*) e que também são aprovadas pela *Food and Drug Administration (FDA, EUA)*, essas nanopartículas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de filmes bioativos antimicrobianos especiais (KANMANI; RHIM, 2014). Dentre os óxidos metálicos, o óxido de prata (AgO) é o bactericida mais conhecido e utilizado. Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO_{nano}) têm ganhado destaque, pois apresentam várias vantagens em relação às de AgO, dentre elas, o fato de ser de custo mais baixo, ter coloração branca, e apresentar propriedades de bloqueio contra radiação UV. O ZnO_{nano} pode ser aplicado em diversos setores, como, por exemplo, na produção de sensores de gás, de células solares, de eletrodos fotocelulares e de diodos emissores de radiação UV, devido a suas propriedades óticas e semicondutoras (TRANDAFILOVIĆ *et al.*, 2012). O ZnO também apresenta propriedades

bactericidas, e apesar de sua atividade antimicrobiana ser mais elevada na presença de luz, este composto também apresenta efeito bactericida pronunciado em pH neutro (pH entre 7 e 8) e na ausência de luz (ZHANG *et al.*, 2008), sendo possível utilizar o ZnO para aplicações antimicrobianas sem uma etapa de excitação ótica. Foram encontradas somente duas referências na literatura consultada a estudos sobre filmes de alginato contendo nanopartículas de ZnO como elemento de estruturação e, complementarmente, como elemento ativo antibacteriano (BAJPAL *et al.*, 2012; AKBAR; ANAL, 2014). No entanto, esses trabalhos não abordaram a influência da concentração de nanopartículas, do tamanho médio de partículas ou do grau de reticulação com Ca^{++} nas propriedades dos filmes à base de alginato, como foi avaliado na presente dissertação de mestrado. Além disso, este composto tem sido incorporado em diversos filmes poliméricos para a produção de filmes nanocompósitos com atividade antimicrobiana, apresentando resultados satisfatórios para esta finalidade (KANMANI; RHIM, 2014).

Dentre as aplicações potenciais para os filmes compósitos de alginato e ZnO estão os filmes antimicrobianos para embalagens de alimentos. Estes sistemas apresentam-se como uma tecnologia contributiva para a extensão da vida de prateleira de produtos alimentícios mais susceptíveis à deterioração. Nesses sistemas de conservação superficial, agentes antimicrobianos incorporados a matrizes poliméricas podem se difundir para a superfície do alimento de forma controlada, atuando na redução ou inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes.

Assim, além da extensão da vida de prateleira, embalagens antimicrobianas podem contribuir para a redução da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) associadas a microrganismos patogênicos ou suas toxinas e que resultam em problemas significativos para a sociedade.

Logo, filmes antimicrobianos compósitos à base de alginato e partículas de ZnO podem contribuir para a área de embalagens em três pilares: sustentabilidade, extensão da vida de prateleira e segurança dos alimentos.

Devido a suas propriedades biocompatíveis, filmes de alginato podem ser também utilizados na área da saúde humana e animal, em contato direto com tecidos e órgãos vivos. Em especial, as lesões de pele figuram como uma área de aplicação relevante para os filmes biopoliméricos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as lesões crônicas de pele são uma epidemia global e avanços no seu tratamento e gestão são de importância vital (WHO, 2010).

Lesões infectadas agravam a situação do paciente, pois aumentam potencialmente a mortalidade e a morbidade, e sobrecarregam os sistemas de saúde. Dessa forma, o desenvolvimento de dispositivos capazes de prevenir e combater agentes infecciosos pode ser benéfico no tratamento de lesões infectadas e feridas passíveis de desenvolver infecções, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e minimizando custos para os serviços de saúde.

Assim, tendo em vista a necessidade de desenvolvimento de filmes plásticos biodegradáveis e oriundos de fontes renováveis e a oportunidade de inovar através dos filmes ativos, no presente trabalho propôs-se confeccionar filmes antimicrobianos nanocompósitos à base de alginato e nanopartículas de ZnO, contendo glicerol como plastificante e reticulados com íons cálcio. Foi realizada a caracterização destes filmes com relação às propriedades mecânicas, físico-químicas e de atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Além disso, foi também avaliada a importância relativa dos componentes estruturais nas propriedades do filme. Ao final, ênfase foi dada para avaliação do potencial de uso de tais filmes para aplicações como embalagens antimicrobianas para alimentos e/ou curativos para o tratamento de lesões de pele.

A presente dissertação de mestrado está organizada como descrito a seguir. No Capítulo 2 são descritos os objetivos do presente trabalho. No Capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica referente aos aspectos teóricos e práticos de relevância ao tema proposto, sendo também como são descritas as características de maior relevância e requerimentos para as aplicações abordadas, especificamente embalagens antimicrobianas para alimentos e curativos para lesões de pele. No Capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos utilizados na execução do trabalho. Em seguida, os resultados e discussão foram divididos em três capítulos. No Capítulo 5 é discutida a avaliação da importância relativa das reticulações primária e secundária em preparações com partículas desagregadas por diferentes métodos. No Capítulo 6 são apresentados os resultados do efeito das condições de processamento na redução do tamanho das partículas, enquanto o Capítulo 7 consiste da avaliação da influência do agente reticulante e do tipo de material constituinte da fase dispersa. Finalmente, no Capítulo 8 são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros e no Capítulo 9, as referências bibliográficas consultadas.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação de mestrado foi analisar a influência de diferentes conteúdos de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO_{nano}) e de diferentes graus de reticulação nas propriedades de filmes de alginato plastificados com glicerol, visando-se sua aplicação como embalagens antimicrobianas para alimentos ou na constituição de curativos para o tratamento de lesões de pele.

2.2 Objetivos específicos

O trabalho foi estruturalmente desenvolvido de acordo com os seguintes objetivos específicos:

- a) Determinar a influência da concentração e do tamanho médio de nanopartículas de ZnO nas propriedades de filmes nanocompósitos à base de alginato confeccionados sem o pré-tratamento e sem a reticulação complementar com íons Ca^{++} ;
- b) Avaliar o efeito do conteúdo e do tamanho médio de nanopartículas de ZnO incorporadas a filmes à base de alginato pré-tratados com cálcio nas propriedades do material, tais como cor, opacidade, permeabilidade ao vapor d'água e resistência mecânica;
- c) Determinar a influência da fração mássica e do tamanho das nanopartículas de óxido de zinco, assim como avaliar o efeito do grau de reticulação nas propriedades de filmes à base de alginato pré-tratados com cálcio e submetidos à reticulação complementar por íons Ca^{++} ;
- d) Avaliar a atividade antibacteriana dos filmes mais promissores preparados nas etapas anteriores, e complementar sua caracterização físico-química.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentada uma revisão da literatura referente ao desenvolvimento de filmes biopoliméricos e de nanocompósitos, abordando as características e propriedades das matérias-primas utilizadas no presente trabalho. Ao final, é apresentada uma revisão referente às aplicações às quais será destinado o material desenvolvido: curativos para lesões de pele e embalagens antimicrobianas para alimentos.

3.1 Filmes biopoliméricos

Devido a sua alta biodegradabilidade, biocompatibilidade, sustentabilidade e comestibilidade, polímeros naturais e outras biomoléculas têm sido explorados para o desenvolvimento de materiais com características plásticas e menos agressivos ao meio ambiente como alternativa aos materiais sintéticos não degradáveis derivados do petróleo. Polissacarídeos, proteínas e lipídeos de origem animal e vegetal são geralmente utilizados para este propósito.

Biopolímeros da categoria dos polissacarídeos são particularmente atraentes para diversas aplicações devido a sua natureza coloidal, boas propriedades de formação de filme, resistência mecânica moderada e boas propriedades de barreira a gases. Polissacarídeos como alginato, amido, carragena, celulose e derivados, quitosana e pectina têm sido amplamente avaliados para a produção de materiais de embalagem para alimentos (KANMANI; RHIM, 2014). No entanto, seu uso ainda é limitado devido a suas propriedades inferiores de processamento e rendimento quando comparados com filmes de polímeros sintéticos derivados do petróleo. Os polissacarídeos também possuem baixa resistência à umidade e, conseqüentemente, seus filmes apresentam alta permeabilidade ao vapor d'água e alto intumescimento, o que pode ocasionar a degradação precoce dos produtos. Além disso, a baixa capacidade de alongamento torna necessário o uso de plastificantes na formulação dos filmes, o que pode também ocasionar a redução das propriedades de barreira, prejudicando a funcionalidade do material (CHA; CHINNAN, 2004).

No campo de desenvolvimento de biomateriais de uso na área de saúde humana e animal, há, também, apreciável destaque dos polissacarídeos na constituição de dispositivos

na forma de filmes para a liberação controlada de compostos como antibióticos, anti-inflamatórios, agentes antimicrobianos, anestésicos e hormônios. A incorporação destes em matrizes polissacarídicas, além de protegê-los, possibilita o aumento da estabilidade da preparação farmacêutica, a melhoria da biodisponibilidade do fármaco e de sua aceitação pelo paciente, com a vantagem de propiciar a degradação da matriz pelo organismo enquanto o agente ativo é liberado (BUENO; MORAES, 2011).

Dentre os polissacarídeos com potencial para aplicações que incluem as embalagens e coberturas para alimentos e os biomateriais úteis, por exemplo, como curativos, destaca-se o alginato, cujas características e propriedades serão descritas no item a seguir.

3.1.1 Alginato

O ácido algínico é um carboidrato coloidal hidrofílico extraído de diversas espécies de algas pardas com soluções diluídas de álcalis. Em termos moleculares, o alginato é um copolímero linear composto de grupamentos do ácido β -D-manurônico (M) (Fig. 3.1a) e do ácido α -L-gulurônico (G) (Fig. 3.1b) unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-4). Esses meros podem ser organizados em blocos contendo apenas resíduos G consecutivos (blocos G), apenas resíduos M consecutivos (blocos M) ou resíduos alternados de M e G (blocos MG) (Fig. 3.1c). A composição e a estrutura sequencial variam conforme o tipo de alga utilizada (LENCINA *et al.*, 2013).

O alginato extraído de algas marrons da família *Phaeophyceae*, cujas fontes comerciais incluem a *Laminaria sp.* e a *Macrocystis pyrifera*. O uso desse polirruonato oferece vantagens na preparação de hidrogéis como: (i) ambiente aquoso relativamente inerte dentro da matriz, (ii) porosidade do gel que permite alta difusividade de macromoléculas, (iii) dissolução e biodegradabilidade sob condições fisiológicas normais, que permitem seu uso como matriz, para incorporação e liberação de proteínas, medicamentos e células (NIETO, 2009). Na Tabela 3.1, apresenta-se a composição típica de alginatos produzidos pelas duas fontes mais comuns de algas pertencentes à família *Phaeophyceae*.

A principal aplicação comercial do alginato é na forma dos sais de sódio, de potássio e de amônio. As propriedades coloidais de espessamento, estabilização, suspensão, formação de gel e emulsificação destes compostos justificam sua utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e papelreira (LEE; MOONEY, 2012; LENCINA *et al.*, 2013). As propriedades físicas dos alginatos dependem da sua massa molar e da proporção e distribuição

dos grupos M e G. O uso de alginatos ricos em blocos M permite a obtenção de estruturas mais flexíveis, ideais para confecção de filmes maleáveis, homogêneos e transparentes (VAZ, 2012), adequados para aplicação como base para curativos e embalagens de alimentos.

Figura 3.1: Representação da estrutura química do alginato: a) fórmula molecular do ácido β -manurônico, b) do ácido α -L-gulurônico; e c) padrões intramoleculares dos diferentes açúcares do alginato (adaptado de STOKKE *et al.*, 1991).

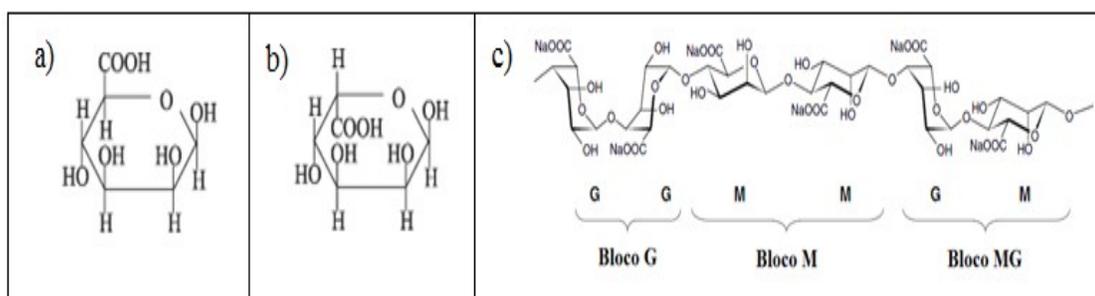


Tabela 3.1: Composição química e composição dos blocos sequenciais de alginato obtidos a partir de *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria hyperborica* (STOKKE *et al.*, 1991).

FONTE	Fração mássica dos blocos				
	G	M	GG	MM	GM/MG
<i>M. pyrifera</i> (alto M)	0,40	0,60	0,21	0,40	0,20
<i>L. hyperborica</i> (alto G)	0,66	0,34	0,55	0,22	0,12

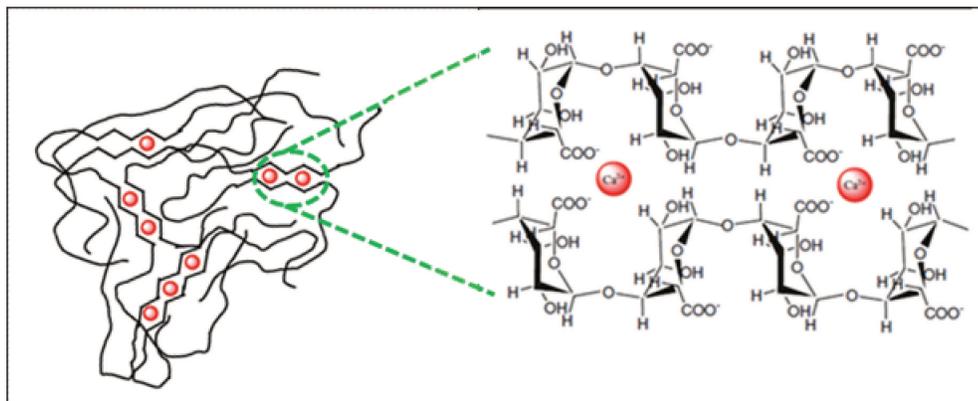
O alginato é um poliuronato capaz de formar associações cadeia-cadeia, resultando em fortes hidrogéis com a adição de diversos cátions divalentes. Allen e colaboradores (1963) avaliaram o cálcio como o agente reticulante de maior efetividade, sendo o mais empregado na fabricação de hidrogéis. A propriedade do alginato de formar fortes hidrogéis na presença de cálcio é a responsável pelo seu amplo uso na indústria de alimentos, farmacêutica, biotecnológica e tratamento de efluentes. Apesar disso, devido à natureza hidrofílica dos hidrocolóides, filmes obtidos com polissacarídeos, como o alginato, exibem pouca resistência à água (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2011). Na literatura científica, podem ser encontrados diversos trabalhos relatando características físico-químicas, mecânicas e

higroscópicas de filmes de alginato reticulados com íons cálcio. Nesses trabalhos, a reticulação é realizada pela difusão de Ca^{++} através de uma matriz de alginato de sódio (RHIM, 2004; OLIVAS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2008). No entanto, outros agentes reticulantes podem ser empregados, como descrito no trabalho de Lima, Andreani e Soldi (2007), no qual foi utilizado formaldeído para realizar a reticulação.

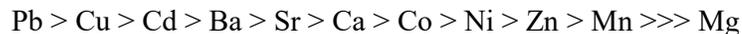
Zactiti e Kieckbusch (2005) desenvolveram uma metodologia própria, na qual se obtém, inicialmente, um filme de baixo grau de reticulação com Ca^{++} . Em seguida, esses filmes são submetidos a uma reticulação complementar por imersão em uma solução concentrada de cloreto de cálcio. A reticulação primária impede a dissolução do filme durante a imersão em solução de cálcio concentrada. Ao final dos dois estágios, obtém-se um filme reticulado, com baixa solubilidade em água e com maior resistência ao intumescimento e à permeação ao vapor d'água. Além disso, é possível ajustar algumas das propriedades do filme, como as propriedades mecânicas e a taxa de liberação de compostos ativos, através da intensidade do grau de reticulação no segundo estágio.

A gelificação pela interação dos íons cálcio com blocos uronato do alginato pode ser descrita pelo modelo conhecido como caixa de ovos, conforme esquematizado na Figura 3.2. Estudos de difração de raios X indicam que os íons Ca^{++} ficam acomodados em cavidades formadas por zonas de junção de pares de cadeias helicoidais de sequências de guluronatos (BRACCINI; PÉREZ, 2001). As zonas de junção são formadas por regiões das cadeias poliméricas que as mantêm conectadas. As cadeias de polissacarídeos formam, então, uma rede tridimensional, mantendo o solvente confinado nos interstícios da matriz polimérica (DONATI *et al.*, 2005).

Figura 3.2: Representação esquemática da transição sol-gel para alginato, envolvendo zonas de junção tipo “caixa de ovos” (adaptado de LENCINA *et al.*, 2013).



Todos os cátions divalentes apresentam potencial energético para realizar a reticulação de alginato. Segundo Mørch *et al.* (2006), a afinidade do alginato por diferentes cátions decresce na seguinte ordem:



Esta sequência de afinidade estaria relacionada ao raio atômico do átomo do cátion e também à proporção de ácido gulurônico do alginato.

Aos filmes de alginato estabilizados com cátions divalentes, é possível incorporar uma grande variedade de compostos, podendo ser obtidos materiais para diversas aplicações, conforme descrito a seguir.

3.2 *Materiais biopoliméricos ativos*

Materiais biopoliméricos ativos podem ser desenvolvidos pela adição em sua composição de compostos com atividade biológica. Estes compostos são retidos na matriz polimérica e podem ser liberados de forma gradual para o meio no qual estão em contato, tendo grande potencial para aplicação em diversas áreas como embalagens ativas para alimentos, dispositivos de liberação controlada de fármacos e curativos bioativos. Desta forma, é possível agregar diversas funções ao material polimérico, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica, dentre outras. Diversos aditivos alimentícios, como o ácido poliglicólico, alginato, ácido polilático, carragena e quitosana, já estão aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e podem ser usados para nanoencapsulação de compostos bioativos (SOZER; KOKINI, 2009).

Esses materiais podem ser fabricados em forma de filmes, o que facilita seu uso em aplicações que requerem o recobrimento ou contato superficial. No entanto, filmes fabricados a partir de polissacarídeos podem apresentar limitações referentes à resistência mecânica e de barreira à umidade, de forma que a produção de materiais compósitos pode ser uma alternativa para superar tais limitações (SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007). Estudos recentes demonstram que a mistura homogênea de biopolímeros e vários tipos de materiais constituintes da fase dispersa em escala nanométrica (*nanofillers*) resultam em melhorias nas propriedades físicas, mecânicas, térmicas e de barreira dos filmes (RHIM; PARK; HA, 2013). Isso é consequência da intensa interação interfacial entre o material que constitui a fase dispersa (que apresenta grande área superficial específica) e a matriz polimérica, bem como da formação de caminhos tortuosos de difusão gasosa causada por *nanofillers* impermeáveis (KANMANI; RHIM, 2014).

3.3 (Bio)Nanocompósitos

Os compósitos são materiais bifásicos constituídos por uma fase contínua, também denominada de matriz, e uma fase descontínua conhecida como enchimento ou fase dispersa. Nos nanocompósitos, o material da fase dispersa encontra-se na escala nanométrica, geralmente com uma das dimensões inferior a 100 nm (ARORA; PADUA, 2010).

Os materiais resultantes da nanoestruturação apresentam propriedades físicas e químicas significativamente diferentes das características dos materiais em macro (e micro) escala constituídos pelas mesmas substâncias (DUNCAN, 2011). Isso se deve ao pequeno tamanho, à composição química e à estrutura superficial das nanoestruturas, que resulta em grande área superficial específica da fase dispersa e, conseqüentemente, intensifica as forças interfaciais das interações polímero-fase dispersa (BOUWMEESTER *et al.*, 2009). Por essa razão, é importante que o enchimento esteja uniformemente disperso na matriz polimérica para garantir que suas propriedades sejam homogêneas e obtenha-se máximo aproveitamento da alta área superficial (ARORA; PADUA, 2010).

Exemplos de materiais constituintes de fases dispersa nanométricas incluem argilas e silicatos, nanotubos de carbono, nanolâminas de grafeno, nanopartículas metálicas e minerais, além de estruturas nanométricas derivadas de polímeros, como *nanowhiskers* (cristais filamentosos individuais com dimensões em escala nanométrica no comprimento ou no diâmetro), nanocristais ou nanofibras poliméricas (DAINELLI *et al.*, 2008; HENRIETTE, 2009).

Além da ação de reforço, o uso de nanopartículas pode conferir atividade antimicrobiana aos nanocompósitos. Dentre os óxidos metálicos, as nanopartículas mais usadas são AgO, ZnO, TiO₂ e CuO, sendo o AgO o bactericida mais frequentemente utilizado.

Diversos trabalhos foram publicados relatando a incorporação de partículas de prata em filmes biopoliméricos, como de amido e quitosana, que apresentaram forte atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (RHIM *et al.*, 2006; VIMALA *et al.*, 2010; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010; BI *et al.*, 2011; TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2011). Vários polissacarídeos têm sido utilizados como veículo de agentes antimicrobianos ativos como nanopartículas (NPs) de metais ou óxidos metálicos. Ágar, carragena e carboximetilcelulose (CMC) são exemplos de polissacarídeos testados com esta finalidade, uma vez que são biodegradáveis, biocompatíveis, renováveis, abundantemente disponíveis e têm boa capacidade de formação de filme. É importante ressaltar que a atividade

antimicrobiana e outras propriedades de filmes nanocompósitos produzidos com estes biopolímeros podem variar dependendo do polissacarídeo utilizado e das condições de processo empregadas durante sua manufatura (KANMANI; RHIM, 2014).

O ZnO_{nano} está sendo cada vez mais empregado como material de recheio funcional em dispositivos eletrônicos, catalisadores, pigmentos, materiais ópticos, cosméticos e absorvedores de UV. O ZnO_{nano} apresenta várias vantagens em relação ao AgO_{nano}, entre elas, o fato de ser de custo mais baixo, de ter propriedades de bloqueio contra radiação UV e apresentar boa tolerância a altas temperaturas. Ao contrário dos compostos de prata, que têm coloração escura, o ZnO_{nano} apresenta cor branca, o que facilita sua aceitação pelo consumidor, além refletir radiação IV. Por estas razões, o óxido de zinco será mais detalhadamente descrito a seguir.

3.3.1 Óxido de Zinco

O ZnO é um material inorgânico com múltiplas aplicações em optoeletrônica, pigmentos, cosméticos, farmacêuticos e sensores químicos (ANN *et al.*, 2014). É um dos cinco compostos de zinco reconhecido como biosseguro e biocompatível pelo FDA (FDA, 2016), o que possibilita seu uso em dispositivos biomédicos (WANG, 2004a). Pertencente à família das Wurtzitas, suas estruturas podem ser descritas como planos alternados de íons Zn⁺² e O⁻² tetraedricamente coordenados, o que resulta em uma simetria não centrada com superfícies polares (WANG, 2004a).

Seus principais métodos de síntese são deposição química em fase vapor e suas variações, crescimento em solução aquosa e eletrodeposição (SCHMIDT-MEND; MACMANUS-DRISCOLL, 2007). Segundo Espitia *et al.* (2012), o método de síntese mecanoquímico, processo que combina a redução de tamanho através de um moinho de bolas com reação química mecanicamente ativada na nanoescala, tem sido empregado em escala industrial. Sob condições específicas, estruturas nanométricas no formato de bastões, agulhas, fios, anéis, cintos, hélices, pentes, e cápsulas podem ser sintetizadas utilizando esses métodos (WANG, 2004a e b; JIE *et al.*, 2005; UMAR; SUH; HAHN, 2007; YANG *et al.*, 2009). Essa grande diversidade de morfologias faz com que o ZnO seja, provavelmente, o nanomaterial mais rico em variedade estrutural, tornando-o um material funcional versátil (SCHMIDT-MEND; MACMANUS-DRISCOLL, 2007).

O ZnO é um material tecnologicamente relevante, possuindo propriedades de interesse para aplicações piezoelétricas e piroelétricas. Além disso, possui *gap* de energia de 3,37 eV, o

que possibilita seu uso como semicondutor. Também possui alta energia de ligação de excíton (60 meV), que garante emissão excitônica (emissão de excítons) e luminescência UV à temperatura ambiente (WANG, 2004b).

Compostos orgânicos conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana como óleos essenciais, ácidos orgânicos, enzimas, peptídeos e bacteriocinas apresentam algumas limitações como sensibilidade a condições intensas de processamento e desenvolvimento de resistência por parte de linhagens microbianas (HAJIPOUR *et al.*, 2012). Neste sentido, o uso de nanopartículas inorgânicas com atividade antimicrobiana apresenta vantagens sobre os compostos orgânicos, como maior estabilidade e maior vida de prateleira (RAGHUPATHI; KODALI; MANNA, 2011). Estudos avaliando a atividade antimicrobiana de óxidos metálicos, como o ZnO, vêm sendo realizados desde a década de 50, nos quais ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas foi verificada. No caso específico de nanopartículas de ZnO, a atividade antimicrobiana já foi investigada para variados tipos celulares. Por exemplo, Zhang *et al.* (2007 e 2008) observaram atividade contra *E. coli*. Espitia *et al.* (2013b) verificaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella choleraesuis*, porém não observaram atividade contra *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus platarum* e *P. aeruginosa*. Em outro estudo, Ann *et al.* (2014) observaram atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, assim como atividade contra *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Apesar de suas divergências, todos os estudos citados sugerem que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com a concentração e com a área superficial das nanopartículas.

Os estudos citados descrevem a atividade antimicrobiana do ZnO_{nano} contra importantes agentes patógenos responsáveis por toxi-infecções alimentares e infecções de lesões de pele. De acordo com dados do Ministério da Saúde, 7,2% e 5,8% dos surtos de origem alimentar entre 2007 e 2016 no Brasil foram causados por *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Além disso, por meio de um estudo em unidades básicas de saúde do estado de Goiás verificou-se que, em pacientes apresentando úlceras de perna infectadas entre junho e julho de 2007, *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram os agentes etiológicos com frequência de 65% e 23% dos casos, respectivamente (MARTINS *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação antimicrobiana do ZnO_{nano} mais aceito está relacionado a dois fatores principais: formação e liberação de espécies ativas de oxigênio e dano à parede celular devido à interação e adesão das partículas.

Espécies ativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*– ROS), em especial H_2O_2 , O_2^- , OH^\bullet e OH^- , podem ser formadas e liberadas da superfície das partículas, aumentando a atividade oxidativa do meio. As ROS podem causar dano aos constituintes celulares como lipídeos, proteínas e material genético e sua formação é potencializada por fotocatalise. Zhang *et al.* (2008) verificaram que a ação bactericida de nanopartículas de ZnO na presença de luz foi 6 vezes superior à determinada no escuro. Estudos também sugerem que o ZnO apresenta atividade pronunciada em pH neutro (pH de 7 a 8) e na ausência de luz (TRANDAFILOVIĆ *et al.*, 2012).

Ann *et al.* (2014) notaram que diferentes bactérias reagem de forma distinta ao ZnO. Nesse trabalho, o óxido de zinco apresentou menor efeito contra *S. aureus*, o que, de acordo com os autores, pode ser devido à habilidade desse microrganismo de se defender contra o estresse oxidativo, através da enzima catalase. A *P. aeruginosa* foi mais susceptível do que a *S. aureus* à ação das nanopartículas, notando-se efeito fortemente inibitório contra *S. pyogenes*, microrganismo que não possui citocromo-oxidase ou catalase. Estes mesmos autores também verificaram que as nanopartículas de ZnO aderem à parede celular de células de *S. aureus*, sem no entanto, danificá-la. Com relação à *P. aeruginosa*, verificou-se adesão das partículas, com dano a algumas células e extravasamento de conteúdo celular. A ação sobre o *S. pyogenes* foi altamente destrutiva à integridade da parede celular e membrana plasmática. Resultados similares foram obtidos por Zhang *et al.* (2007) que observaram modificação da morfologia de *E. coli*, com ruptura da membrana plasmática de algumas células.

O mecanismo de interação e adesão das partículas de ZnO à superfície das células se dá por forças eletrostáticas. Segundo Zhang *et al.* (2007), o potencial zeta das partículas em pH 7,2 é igual a +24 mV, de forma que estas tendem a se ligar fortemente com interfaces negativamente carregadas, como a superfície das células de *E. coli*. A interação direta das partículas com a superfície celular pode levar a modificações morfológicas, internalização das partículas, alteração na permeabilidade da membrana e também liberação do conteúdo celular (ESPITIA *et al.*, 2012).

Pasquet *et al.* (2014) avaliaram partículas comerciais de ZnO de grau farmacêutico com diferentes propriedades físicas e fisico-químicas, incluindo área específica, cristalinidade, morfologia e porosidade. Os autores observaram diferentes níveis de atividade antimicrobiana e concluíram que o aumento na área específica das nanopartículas resulta em aumento na atividade antimicrobiana, porém não necessariamente de maneira direta. Os

autores observaram que outros fatores, como a cristalinidade e a porosidade, tiveram forte influência no efeito bactericida do ZnO. De acordo com os pesquisadores, não foi possível concluir se a morfologia da partícula altera a ação antimicrobiana.

Efeitos citotóxicos de partículas de ZnO foram observados em células epiteliais de brônquios, pulmões e rins humanos, sendo atribuídos ao estresse oxidativo e dano oxidativo ao DNA. No entanto, outros estudos sugerem que o ZnO não provoca efeitos tóxicos ou comprometimento das atividades celulares (ESPITIA *et al.*, 2012). Premanathan *et al.* (2011) avaliaram a citotoxicidade de ZnO a células mononucleadas do sangue (PBMC) e células leucêmicas (HL60). Os resultados demonstraram que o ZnO induziu efeito tóxico seletivo às células em multiplicação desordenada e pouco efeito foi observado nas células PBMC.

O ZnO_{nano} pode se apresentar na forma de um pó branco e segundo a Ficha de Segurança de Informações de Produtos Químicos (MSDS) dos produtos fornecidos pela Sigma-Aldrich (códigos 544906 e 677450), a manipulação das partículas deve ser realizada com equipamento de proteção individual, evitando a formação de poeira e aspiração das mesmas. Quando em contato prolongado, o ZnO_{nano} pode causar irritações cutâneas e ao trato respiratório. Seu descarte deve ser realizado pela dissolução em solvente apropriado e encaminhado para incineração, evitando-se a descarga ao meio ambiente, especialmente porque o ZnO pode ser tóxico a organismos aquáticos com efeitos duradouros. Ainda de acordo com a MSDS, a dose letal mediana para causar toxicidade aguda por ingestão é de 7,95 mg/kg e, via inalação, é de 2,5 mg/kg. Esses valores foram obtidos com ensaios clínicos realizados em ratos. Além disso, o ZnO_{nano} é não carcinogênico (SIGMA-ALDRICH, 2016a e b).

O ZnO tem sido incorporado em diversos filmes poliméricos para produção de embalagens de filmes nanocompósitos com atividade antimicrobiana (ESPITIA *et al.* 2013a; ARFAT *et al.*, 2014; KANMANI; RHIM, 2014). Trandafilović *et al.* (2012) produziram *in loco* cristais de ZnO_{nano} usando um meio contendo alginato de sódio, acetato de zinco e NaOH, que foi submetido à radiação de microondas por até 5 minutos, formando, assim, partículas nanocompósitas. Todas as amostras de nanocompósitos de alginato e ZnO apresentaram atividade antibacteriana rápida e intensa, com 99,9% de redução para *S. aureus* e 100% para *E. coli* após 2 horas de exposição. O alginato utilizado era rico em blocos G e não foi realizada a etapa de reticulação com cálcio.

Esse resultado abre uma perspectiva otimista sobre a produção de biofilmes de alginato contendo ZnO como princípio ativo antimicrobiano para aplicação como biomateriais ou

como embalagens e/ou coberturas para alimentos. No entanto, diferentemente do estudo de Trandafilović *et al.* (2012), no presente trabalho as nanopartículas de ZnO foram adquiridas comercialmente e incorporadas à matriz de alginato para formação de filmes e não de partículas. Espera-se que o tipo de alginato e o efeito da reticulação tenham papel de relevância sobre a atividade antimicrobiana final, visto que sua variação pode, a princípio, alterar a disponibilidade do microbicida para o meio.

Por essa razão, a seguir são descritos os principais aspectos relativos à área de curativos para lesões de pele e embalagens antimicrobianas. Ao final de cada seção, são apresentados os principais relatos encontrados na literatura científica que descrevem a confecção de filmes nanocompósitos utilizando alginato e ZnO_{nano}.

3.4 Curativos

3.4.1 Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, podendo corresponder a 15% do peso corpóreo de um indivíduo adulto (VENUS; WATERMAN; MACNABE, 2011) e sua área pode chegar a 2m² (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013). Trata-se de um tecido epitelial e mesenquimal complexo, em multicamadas, dividido em epiderme, com estruturas anexas como folículos capilares, glândulas sudoríparas e sebáceas, derme (contendo colágeno e fibras elásticas) e hipoderme (camada subcutânea de gordura) (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013).

As funções da pele são muitas, como conferir uma barreira física contra o ambiente externo, contribuir para o controle da perda de água, da termorregulação, da percepção sensorial, da síntese de vitamina D e no amortecimento contra traumas (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013). A pele também possui funções imunológicas, pois constitui a primeira defesa do organismo contra microrganismos invasores (VENUS; WATERMAN; MACNABE, 2011).

As células na superfície da pele são constantemente repostas por regeneração a partir das camadas inferiores. O processo de cicatrização de uma lesão consiste do mesmo processo em maior escala (PAUL; SHARMA, 2004).

3.4.2 Lesões de Pele

Lesões de pele estão dentre as maiores causas de mortes ao redor do mundo (CHABY *et al.*, 2007), podendo ser definidas como dano físico ou térmico que leva ao rompimento da

continuidade do tecido epitelial da pele ou mucosa (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

As lesões podem ser classificadas, de acordo com a natureza e processo de reparo, em agudas ou crônicas. Lesões agudas são definidas como danos no tecido que podem ser completamente curados, com formação mínima de cicatriz. O tempo de cura para feridas agudas, em geral, é de 8 a 12 semanas. Lesões agudas podem ser causadas por estresse mecânico (como abrasão ou dilaceramento), devido ao contato friccional da pele com superfícies rígidas. Também podem ser causadas pela penetração de materiais como facas e projéteis. Outros tipos de feridas agudas compreendem as causadas por agentes químicos, devido à eletricidade ou, ainda, queimaduras resultantes da exposição a altas temperaturas (BOATENG *et al.*, 2008).

As lesões crônicas, por sua vez, são originadas pelo dano do tecido dérmico cujo processo de reparo é lento (mais de 12 semanas) e, geralmente, é recorrente. Nas lesões crônicas, o processo de reparo natural é interrompido, não sendo estas auto-suficientes em efetivamente reparar o tecido lesionado por diversas razões (PAUL; SHARMA, 2004; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). Geralmente, quadros clínicos de lesões crônicas permanecem por longos períodos no estágio inflamatório e não progredem para os estágios subsequentes de reparo do tecido (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016).

De acordo com o número de camadas da pele afetadas pela lesão, as feridas podem ser classificadas em superficiais, de profundidade parcial ou total (PAUL; SHARMA, 2004). As lesões superficiais são aquelas que afetam apenas a superfície epidérmica (BOATENG *et al.*, 2008; DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016). Lesões que afetam camadas mais profundas da epiderme, como vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas, folículos capilares e derme, são chamadas de lesões de profundidade parcial. As lesões profundas são aquelas que danificam o tecido adiposo sob a pele ou camadas teciduais ainda mais profundas (BOATENG *et al.*, 2008).

Lesões agudas ou crônicas, com características únicas, tais como perda excessiva de tegumento, infecção que resulte em perda de tecido, morte tecidual e presença de patologia, são classificadas como lesões complexas (BOATENG *et al.*, 2008).

Apesar do processo de reparação tecidual ser natural, infecções, perda de fluido e a velocidade de cicatrização podem aumentar consideravelmente o tempo de reparo do tecido lesionado, podendo trazer sérias complicações clínicas aos pacientes (PAUL; SHARMA, 2004). Por essa razão, é relevante o uso de curativos e dispositivos médicos que contribuam para a redução do tempo de reparo e para o adequado processo de cicatrização, com potencial

para impacto nos custos de tratamento e na qualidade de vida dos pacientes.

3.4.3 Curativos

Quando as lesões de pele ficam expostas, podem ocorrer perdas de proteinases, fatores de crescimento e fatores quimiostáticos que são importantes para o processo de re-epitelização, pois estes estimulam a síntese de colágeno e promovem a angiogênese. Desta forma, torna-se importante a utilização de curativos para a cobertura e proteção das lesões (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

A função primária dos curativos é manter a lesão úmida e impedir a entrada de agentes infecciosos. O fluido que confere a umidade natural de uma lesão é importante, pois contém proteínas e citocinas que facilitam o debridamento autolítico, a angiogênese, a formação de tecido de granulação e a migração de queratinócitos (BROUSSARD; POWERS, 2013). É importante também que o curativo retenha calor, facilite trocas gasosas, minimize riscos de infecção, contribua para o debridamento do tecido e estimule a epitelização e migração celular. Além dessas características, um curativo ideal deve ser de fácil aplicação, acessível financeiramente, facilmente armazenável, não alergênico, estéril ou esterilizável e não tóxico (BROUSSARD; POWERS, 2013; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). De forma geral, o curativo ideal deve permitir um rápido processo de cicatrização, com custos acessíveis e mínimo de inconveniente ao paciente (BOATENG *et al.*, 2008).

Uma das mais antigas teorias sobre o tratamento de lesões de pele refere-se à manutenção de sua umidade, buscando-se favorecer condições ambientais adequadas ao reparo do tecido lesionado (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016). Isso foi primeiramente proposto por Winter (1962) que avaliou a taxa de re-epitelização de lesões de pele superficiais em porcos domésticos. Em todos os animais, foram realizadas duas lesões: uma lesão controle, que foi mantida exposta ao ar, e as lesões “úmidas”, que foram cobertas com filme de polietileno. Os resultados desses primeiros estudos sugeriram que as lesões úmidas foram epitelizadas mais rapidamente. Após três dias, a lesão exposta ao ar apresentou, em média, 34% de epitelização e a lesão mantida úmida, 98%. De acordo com o autor, a ausência de crosta nas lesões úmidas facilita a migração celular, o que contribui para a redução do tempo de reparo da lesão. O surgimento antecipado do novo tecido conectivo sob a epiderme reparada sugere que sua produção é estimulada pela presença da epiderme.

De forma semelhante, em 1963, Hinman e Maibach avaliaram o efeito do uso de curativos para recobrir lesões de pele superficiais em homens adultos e saudáveis. Lesões

experimentais de 0,5 cm² foram realizadas no lado interno do braço dos voluntários. As lesões controle foram mantidas expostas ao ar e as lesões úmidas foram recobertas com filmes de polietileno. Foi verificado que as lesões protegidas não formaram cicatriz aparente e que a taxa de epitelização foi mais elevada, de forma que o percentual de novo tecido foi pelo menos duas vezes maior do que nas lesões expostas ao ambiente.

Desde então, uma característica essencial dos curativos é a absorção de exsudato. O exsudato consiste basicamente de sangue, cujas hemácias e plaquetas foram removidas, e é fundamental na irrigação e manutenção de um ambiente úmido para o tratamento da lesão. É importante que o curativo seja capaz de absorver o excesso de exsudato e manter um teor adequado de umidade na superfície da lesão que favoreça os estágios do processo de reparo do tecido dérmico e epitelial, evitando que a lesão fique seca e que a crosta se forme. Dessa maneira, minimiza-se a formação não só da crosta, mas também da cicatriz, reduzindo-se o tempo total de cicatrização do tecido em reconstrução (PAUL; SHARMA, 2004; BOATENG *et al.*, 2008). A manutenção deste ambiente úmido é importante para que a reparação da pele ocorra em taxa máxima e tenha aparência final esteticamente aceitável (BOATENG *et al.*, 2008).

3.4.4 Classificação dos curativos

Existem vários critérios para classificação dos curativos como função, material de composição e forma física. Estes podem, ainda, ser classificados em primários, secundários e curativos em ilha (*island dressings*). Com relação à habilidade de interferir no processo de cicatrização, os curativos podem ser classificados em passivos, ativos e bioativos. Os curativos também podem ser classificados em curativos tradicionais, modernos, substitutos de pele e outros dispositivos de tratamento de lesões. Dessa forma, os curativos podem se encaixar em diversas classificações (BOATENG *et al.*, 2008).

Curativos primários estão em contato direto com a lesão e os secundários recobrem os primários. Os curativos em ilha possuem uma região absorvente central e, ao redor, uma porção adesiva (BOATENG *et al.*, 2008).

Os curativos passivos têm como única função o recobrimento da lesão. Os curativos interativos são constituídos de materiais poliméricos permeáveis a vapor de água e oxigênio, porém evitam a entrada de bactérias na lesão. São indicados para lesões de baixa exsudação. Os bioativos, por sua vez, são curativos capazes de realizar a liberação de compostos que apresentaram alguma atividade durante o processo de reparo e contribuem para redução do

tempo de cicatrização (PAUL; SHARMA, 2004).

Os curativos tradicionais são aqueles feitos de algodão ou de bandagens sintéticas ou naturais. Podem ser usados como curativos primários, secundários ou compósitos em dispositivos mais complexos e com diversas funções. Os curativos tradicionais não permitem a manutenção da umidade adequada da lesão e quando úmidos (em contato com a lesão), podem aderir à ferida em exsudação e sua remoção pode ser dolorosa. Por essa razão, são recomendados para feridas secas, limpas e com baixa liberação de exsudato, ou ainda como curativos secundários que absorvam o excesso de exsudato liberado e protejam a ferida (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). Curativos tradicionais podem ser usados para absorver fluidos, requerendo trocas constantes para evitar a maceração do tecido saudável (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015), sendo considerados do tipo passivos (PAUL; SHARMA, 2004).

Com o objetivo de manter a ferida com o leito úmido e contornar as limitações dos curativos tradicionais, curativos modernos são desenvolvidos e empregados clinicamente. Os curativos modernos podem ser encontrados em diversas formas como: hidrogéis, hidrocolóides, espumas, filmes adesivos, filmes permeáveis, curativos compostos e curativos biológicos (BOATENG *et al.*, 2008). Os curativos modernos facilitam o funcionamento dos processos intercelulares envolvidos na cicatrização da lesão dérmica, não sendo apenas revestimentos. Estes permitem ainda uma adequada circulação de oxigênio, limitam a exposição de bactérias e mantêm a lesão suficientemente úmida, criando um ambiente ótimo para seu tratamento e contribuindo para a aceleração da cicatrização (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Os curativos à base de alginato reticulados com cálcio são particularmente interessantes devido à habilidade de formar gel quando em contato com o exsudato da lesão, através de uma reação na qual os íons sódio presentes no fluido corpóreo são trocados pelos íons cálcio que reticulam o curativo. A troca iônica de cálcio presente em géis de alginato por íons monovalentes já foi observada experimentalmente. Wang e Spencer (1997), através de ensaios de diálise de géis de alginato de cálcio contra soluções contendo CaCl_2 e KCl , verificaram que a adição do cátion monovalente resultou no deslocamento de cálcio e intumescimento do gel. Em altas concentrações de sal, até o Ca^{+2} ligado a blocos G foi deslocado. Além disso, os autores também observaram que quando em contato com soluções contendo KCl acima de 0,2 mol/L, é possível ocorrer a transição do gel para o estado sol. No entanto, é importante considerar, inclusive, outros fatores que podem contribuir para o intumescimento de géis de

alginato quando em contato com fluidos biológicos. Dentre esses fatores, está a presença de compostos sequestrantes (como ânions citrato e lactato), a presença de íons competidores (como o potássio e o sódio, como discutido acima) e o aumento da pressão osmótica e aumento da força iônica do solvente. Esses fatores, atuando isoladamente ou de forma combinada, podem contribuir para redução da estabilidade da rede polimérica de moléculas de alginato reticuladas com cálcio, levando ao seu intumescimento e, até, transição para o estado sol (DONATI; PAOLETTI, 2009).

Por meio desses mecanismos de interação com o exsudato, curativos à base de alginato são capazes de manter um ambiente úmido requerido para que o processo de cicatrização ocorra com sucesso, devido ao aprisionamento de água em sua rede tridimensional de cadeias interconectadas (MORGAN, 1996; THOMAS, 2000; PAUL; SHARMA, 2004; BOATENG *et al.*, 2008; BROUSSARD; POWERS, 2013; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016), podendo absorver até 20 vezes o valor de sua massa (BROUSSARD; POWERS, 2013). Esses curativos são recomendados para lesões com moderada a alta exsudação (MORGAN, 1996; BOATENG *et al.*, 2008; BROUSSARD; POWERS, 2013; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016) e, devido a suas propriedades hemostáticas, também são indicados para lesões com sangramento, promovendo rápida granulação e re-epitelização do tecido (PAUL; SHARMA, 2004). São contra-indicados para lesões secas ou cobertas com tecido necrótico duro (MORGAN, 1996; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Comercialmente, já estão disponíveis alguns curativos à base de alginato, como o KaltostatTM (Convatec), TegagemTM (3M Healthcare) e o Comfeel PlusTM (Coloplast) (BOATENG *et al.*, 2008). Esses produtos são constituídos de alginato de cálcio e indicados para lesões de espessura parcial ou total e de média a alta exsudação e podem ser, atualmente, encontrados nas páginas virtuais de seus fabricantes.

Os curativos de alginato também contribuem para aceleração do processo de cicatrização, ativando macrófagos a produzir citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), iniciando sinais do processo inflamatório (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). Em sua revisão, Morgan (1996) apresenta diversos exemplos de casos clínicos sobre o desempenho de curativos comerciais à base de alginato. Nestes exemplos, os curativos do biopolímero são comparados com outros curativos comerciais. Em quase todos os casos citados, os curativos de alginato aceleraram o processo de reparo, em especial, apresentando bom desempenho durante a fase de hemostasia. Caso não sejam trocados regularmente, os

curativos de alginato podem levar à maceração da pele devido ao acúmulo de fluido na região periférica da lesão (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016).

Outra classe interessante de curativos são os curativos bioativos, formados de materiais biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos. São compostos principalmente de ácido hialurônico, alginato, quitosana e colágeno, sendo constituídos por apenas um ou pela combinação desses biopolímeros. Substâncias biologicamente ativas são comumente incorporadas à matriz polimérica para que sejam liberadas de forma controlada no local da lesão. Tais compostos podem ser fármacos que auxiliem na limpeza da lesão e na remoção de tecido necrótico, antimicrobianos que previnam ou combatam infecções, fatores de crescimento que acelerem o processo de cicatrização do tecido, ou nutrientes que abasteçam as necessidades locais (BOATENG *et al.*, 2008; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

O uso de antimicrobianos é de interesse no tratamento de lesões altamente contaminadas, assim como de lesões que apresentem alto risco de infecção, como feridas crônicas e lesões resultantes de cirurgias e acidentes, ou quando o paciente apresenta baixa resistência imunológica. A aplicação local de antimicrobianos através de curativos ativos é preferível, pois reduz a dose administrada por via oral ou injetável, melhorando sua eficiência no combate a infecções (diminui o efeito de distribuição) e reduzindo efeitos adversos como toxicidade e aumento da resistência a antibióticos (BOATENG *et al.* 2008).

A administração de suplementos como vitaminas e minerais pode também ser realizada com o uso de curativos bioativos. Tais compostos contribuem significativamente para a melhoria do processo de regeneração, visto que a lesão demanda por quantidades diferentes de nutrientes devido à diferença metabólica local e estes são mais rápida e eficientemente disponibilizados através dos curativos do que através da ingestão (BOATENG *et al.* 2008).

A escolha do curativo por parte dos profissionais da área da saúde não é um processo simples. É necessário qualificar o tipo de lesão e determinar em qual estágio do processo de cicatrização ela se encontra e avaliar fatores intrínsecos e extrínsecos que retardam a cicatrização. Também é importante considerar se a aplicação do mesmo causaria dano ao tecido ou se haveria perfusão tecidual e qual a carga microbiana presente na lesão, ou seja, se há potencial para infecção.

Não foram encontrados trabalhos relatando o uso de ZnO_{nano} para fabricação de filmes nanocompósitos à base de alginato reticulados com cálcio na área de curativos. No entanto, Mohandas *et al.* (2015) preparam bandagens à base de alginato, quitosana e nanopartículas de óxido de zinco. Nesse estudo, o ZnO_{nano} foi sintetizado pelo método hidrotérmico e

apresentou tamanho médio entre 70 e 120 nm. Em seguida, as nanopartículas foram adicionadas a hidrogéis de alginato e quitosana com concentração final de 0,05 a 1%. Os hidrogéis nanocompósitos foram liofilizados para obtenção de bandagens porosas (porosidade entre 60 e 70%) para aplicação como curativos. Os autores observaram que o aumento da concentração de nanopartículas resultou na redução do intumescimento e a presença do ZnO_{nano} no material não alterou a taxa de degradação *in vitro* e conferiu atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Nos ensaios de viabilidade celular, realizados com fibroblastos dérmicos humanos, foi verificado que as bandagens compósitas contendo até 0,1% de óxido de zinco apresentaram comportamento similar ao controle sem ZnO_{nano} (aproximadamente 100% de viabilidade celular). A concentrações superiores de nanopartículas, foi observado viabilidade celular entre 40 e 60%.

Em outro estudo relacionado ao tratamento de lesões de pele, Stromberg e Agren (1984) avaliaram a eficácia da aplicação tópica de ZnO em cicatrizar úlceras de perna. Para isso, realizaram um estudo randomizado e duplo cego em 37 pacientes geriátricos, dos quais 19 apresentaram úlcera de perna arterial e 18, úlcera de perna venosa. Os pacientes foram organizados em pares, de forma que apresentassem úlceras semelhantes, sendo que um membro recebeu o tratamento tópico de ZnO e outro não. Em um grupo foram utilizadas compressas de algodão e água estéril e no outro, uma compressa similar impregnada com ZnO (400 µg ZnO/cm²). No grupo placebo, o tamanho médio das úlceras foi reduzido de 4,2 cm² para 2,7 cm². No grupo tratado com ZnO, o tamanho médio inicial da lesão foi de 3,6 cm² e ao final foi de 0,4 cm². Os autores também estabeleceram um critério de cicatrização bem sucedida que consistia na redução da área inicial das lesões em 25% para úlceras arteriais e 50% para úlceras venosas e na ausência de exsudação. Neste sentido, 83% dos pacientes tratados com ZnO apresentaram cicatrização bem sucedida, enquanto apenas 42% do grupo placebo se enquadraram nesse critério.

Por essa razão, a fabricação de curativos nanocompósitos à base de alginato e nanopartículas de ZnO pode ser vantajosa no tratamento de lesões de pele, em especial, de lesões crônicas.

3.5 Embalagens tradicionais e embalagensativas para alimentos

3.5.1 Embalagens tradicionais

As embalagens, comumente compostas de materiais sintéticos e derivados do petróleo,

fazem parte do cotidiano e estão presentes em diversos tipos de produtos, tais como alimentos e bebidas, tintas, produtos cosméticos e de higiene pessoal, produtos de informática e entretenimento, material de escritório e assim por diante. O consumo global dos produtos das indústrias de embalagens em 2009 foi estimado em US\$380,00 bilhões, sendo que 50% desse montante corresponde ao mercado de alimentos embalados. Em países em desenvolvimento, o valor do mercado de embalagens para alimentos foi estimado em US\$15,4 bilhões (MANALILI; DORADO; VAN OTTERDIJK, 2014).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA, 2001), a embalagem pode ser definida como: “artigo que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los, desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agente externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações”. A resolução ainda ressalta que não deve haver migração de compostos indesejáveis ou tóxicos da embalagem para o alimento, ou seja, compostos que migram para o alimento não podem oferecer risco à saúde e não podem ocasionar mudança/alteração da composição do alimento e/ou de suas propriedades sensoriais. Nessa perspectiva, nota-se que a função tecnológica da embalagem limita-se a conter o produto com a finalidade exclusiva de protegê-lo de fatores externos.

A escolha da embalagem deve ser feita de forma que o material seja compatível com o alimento e que suas propriedades contribuam para minimizar os principais problemas relacionados à sua deterioração e à redução de sua qualidade, tais como ataque de insetos e roedores, degradação devido à luz, rancificação oxidativa, rancificação hidrolítica, desnaturação proteica, desenvolvimento microbiológico, cristalização e alterações coloidais, reações devido às trocas gasosas (alteração da atmosfera interna) e modificações das propriedades físicas (MULTON, 1996). As embalagens tradicionalmente empregadas na indústria de alimentos na atualidade são compostas de material inerte, ou seja, não interagem com os componentes do alimento, tendo um papel essencialmente passivo em sua conservação.

3.5.2 Embalagens ativas

Com a contínua mudança nas tendências de consumo, na economia e na população, as embalagens podem sofrer modificações no que diz respeito à função que desempenham. A indústria de alimentos enfrenta desafios relevantes no desenvolvimento e inovação devido à demanda de consumidores por produtos mais frescos, com menos aditivos, que sejam fáceis

de usar/manipular (que requeiram pouca manipulação) e que tenham maior vida de prateleira. Essa tarefa se torna extremamente difícil para determinadas classes de produtos, como vegetais minimamente processados, produtos cárneos e embutidos e derivados de leite, ou seja, produtos com altos valores de atividade de água e pH (LABUZA; BRENEE, 1989; DAINELLI *et al.*, 2008). Produtos refrigerados recebem atenção especial, devido ao curto prazo de validade e, em geral, à alta sensibilidade à deterioração microbiana.

Essas tendências alavancaram o desenvolvimento de um novo conceito de embalagem: as embalagens ativas. Diferente das embalagens tradicionais, as embalagens ativas desempenham uma função que contribui especificamente para extensão da vida de prateleira, mantendo ou melhorando seus atributos de qualidade (nutricional, sensorial, etc.). A funcionalidade é obtida pela interação deliberada entre o material de embalagem e o alimento (ou sua atmosfera) sem, entretanto, causar toxicidade ou alteração das propriedades do produto alimentício de forma indesejada (LABUZA; BRENEE, 1989; SUPPAKUL; MILTZ; BIGGER, 2003; CHA; CHINNAN, 2004; DAINELLI *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2009).

Existem diversos tipos de embalagens ativas, sendo as principais as absorvedoras de oxigênio e umidade, absorvedoras de etileno, absorvedoras ou emissoras de dióxido de carbono, embalagens antioxidantes e antimicrobianas (LABUZA; BRENEE, 1989). No contexto deste trabalho, as embalagens antimicrobianas são de maior relevância e por esta razão serão mais detalhadamente discutidas.

3.5.3 Embalagens antimicrobianas

A deterioração a partir da superfície é um problema que frequentemente limita a vida de prateleira do produto. Alimentos frescos, em especial, podem se deteriorar a partir da contaminação superficial ou interna, sendo necessário reduzir a taxa de crescimento ou inibir o crescimento microbiano (CHA; CHINNAN, 2004). Além disso, surtos de envenenamento alimentar devido a contaminações externas impulsionam a pesquisa por formas inovadoras de evitar o crescimento microbiano em alimentos e ainda manter sua qualidade nutricional, frescor e segurança (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002). Com o propósito de abordar esse tipo de problema, as embalagens antimicrobianas ou sistemas de embalagens antimicrobianas foram desenvolvidos especificamente para controlar o crescimento de microrganismos que adversamente agem contra a qualidade, segurança e vida de prateleira do alimento. Esses sistemas são mais recomendados para produtos de maior sensibilidade à deterioração microbiana, ou seja, com altos valores de atividade de água (0,99) e pH acima de 6,5

(APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; HAN, 2003).

Na maioria dos casos, as embalagens antimicrobianas atuam como sistemas de preservação superficial, conforme definido por Labuza e Brenee (1989), inibindo a deterioração microbiana que ocorre de fora para dentro do alimento (a partir da superfície) e têm como vantagem o uso de quantidades inferiores dos conservadores químicos e outros aditivos para obter o efeito inibitório ou protetivo desejado. É possível, também, usar combinações de compostos que, com efeito sinérgico, possibilitam a redução da dosagem dos conservadores/preservativos (LABUZA; BRENEE, 1989 ; HAN, 2003).

As embalagens antimicrobianas atuam de forma a reduzir, a inibir ou a retardar o crescimento microbiano que possa se apresentar em um alimento embalado ou no próprio material de embalagem. Seu mecanismo de ação deve ser tal que a taxa de inibição do crescimento microbiano seja similar à taxa de crescimento, para que, ao longo do tempo, seu desempenho seja satisfatório. É importante ressaltar que o emprego de embalagens antimicrobianas não deve resultar em adoção de práticas de higiene e segurança dos alimentos de menor rigor, assim como não deve promover o uso de matérias-primas de menor qualidade. Seu emprego deve, portanto, objetivar o acréscimo e não a substituição de uma barreira ao crescimento de microrganismos.

De acordo com Appendini e Hotchkiss (2002), Han (2003), Suppakul, Miltz e Bigger (2003) e Soares *et al.* (2009), os principais métodos de obtenção de embalagens antimicrobianas são:

- a) Adição de sachês contendo antimicrobianos voláteis;
- b) Incorporação de compostos voláteis e não voláteis diretamente à matriz polimérica por dissolução, dispersão, adsorção ou imobilização;
- c) Recobrimento sequencial com agentes antimicrobianos na superfície de polímeros previamente depositados;
- d) Uso de polímeros com atividade antimicrobiana inerente;
- e) Uso de embalagens contendo compostos (incorporados à matriz polimérica ou em sachês) capazes de absorver ou reter compostos necessários para o desenvolvimento microbiano;

Nos casos acima listados, a mitigação do desenvolvimento microbiano pode ocorrer por, basicamente, dois mecanismos: (i) o composto antimicrobiano migra para o alimento ou (ii) o composto antimicrobiano não migra para a superfície do alimento, mas inibe o crescimento de microrganismos (LABUZA; BRENEE, 1989; SUPPAKUL; MILTZ; BIGGER, 2003; CHA;

CHINNAN, 2004; SOARES *et al.*, 2009). Quando o agente antimicrobiano não for volátil, deve haver contato entre a superfície do alimento e da embalagem para que haja a difusão do composto para a superfície, sendo, portanto, as características da superfície e a cinética de difusão de extrema importância nesse caso (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

O sucesso da ação do antimicrobiano depende da intensidade da atividade antimicrobiana, da liberação do composto e da cinética de crescimento dos microrganismos (SOARES *et al.*, 2009). É necessário conhecer a concentração mínima inibitória, pois a migração do agente antimicrobiano para o alimento pode causar redução de sua concentração, de modo que não se tenha mais o efeito no controle da deterioração microbiana. A solubilidade do agente antimicrobiano no alimento define o perfil de migração e a concentração na superfície do alimento ao longo do tempo (HAN, 2003), sendo importante considerar as mudanças de temperatura que ocorrem ao longo da cadeia de distribuição, pois isso certamente modifica o perfil de migração do composto ativo.

No caso de embalagens antimicrobianas não migratórias, o crescimento microbiano é suprimido por contato superficial com o alimento. Nesse caso, a ação antimicrobiana se restringe, praticamente, apenas à região de interface entre o alimento e a embalagem, tornando necessário o contato íntimo entre o filme e o produto alimentício (HAN, 2003).

Na literatura, constam inúmeros trabalhos descrevendo a incorporação de compostos ativos de natureza química diversa, sendo os principais ácidos e anidridos orgânicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extratos naturais e óleos essenciais, íons e outros compostos inorgânicos, os quais podem ser incorporados em diversas matrizes poliméricas sintéticas ou naturais (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Pranoto, Salokhe e Rakshit (2005), por exemplo, incorporaram 0,2% de óleo de alho em filmes à base de alginato que apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Bacillus cereus*, sem alteração significativa das propriedades físicas e mecânicas dos dispositivos poliméricos. Filmes ativos de celulose incorporando pediocina foram produzidos por Santiago-Silva *et al.* (2009), acrescentando-se o agente antimicrobiano à solução filmogênica. Os filmes ativos apresentaram efeito antimicrobiano contra *L. innocua* em testes *in vitro*. Marcos *et al.* (2007) desenvolveram filmes de alginato incorporando enterocinas, que apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* em presunto cozido fatiado, sendo eficientes no controle do agente patogênico em 8 dias, enquanto as amostras acondicionadas sem o agente microbiano apresentaram aumento da carga microbiana de 10^4 para 10^7 UFC/g.

No momento de escolha do composto antimicrobiano, é importante considerar sua afinidade química com a matriz polimérica e sua compatibilidade com o processo de manufatura do material de embalagem. O composto não pode ser degradado e deve permanecer ativo para que tenha a atividade antimicrobiana desejada. A compatibilidade química é de extrema importância para que o composto esteja distribuído uniformemente no material de embalagem e não prejudique as propriedades da embalagem (mecânicas, óticas, físico-químicas) (CHA; CHINNAN, 2004).

Ainda, as embalagens antimicrobianas devem, preferencialmente, apresentar propriedades de barreira satisfatórias e propriedades físicas similares às das embalagens tradicionais.

Na literatura científica, podem ser encontrados trabalhos relatando o desenvolvimento de filmes nanocompósitos à base de biopolímeros e nanopartículas de ZnO para aplicação como embalagens antimicrobianas. Espitia *et al.* (2013a), por exemplo, confeccionaram filmes nanocompósitos de celulose e ZnO_{nano} impregnados com pediocina, que apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Arfat *et al.* (2014) prepararam filmes nanocompósitos com atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* utilizando proteína isolada de peixe, gelatina de pele de peixe e nanopartículas de óxido de zinco. Filmes nanocompósitos à base de ágar, κ-carragena, carboximetilcelulose e nanopartículas de ZnO foram fabricados por Kanmani e Rhim (2014). Neste trabalho, observou-se atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Apenas dois trabalhos foram encontrados relatando o uso de alginato como constituinte da matriz polimérica para fabricação de filmes nanocompósitos com ZnO_{nano}. Bajpai, Chand e Chaurasia (2012) prepararam filmes antimicrobianos à base de alginato reticulados com cálcio contendo nanopartículas de ZnO 2,5% (m ZnO/m alginato), e utilizando glicerol como plastificante. As NPs foram sintetizadas pelo método hidrotérmico e adicionadas à solução de alginato de sódio a 4% (m/v). A reticulação foi realizada em duas etapas, de forma que a primeira foi executada adicionando-se uma solução de cloreto de cálcio a 5% à solução filmogênica. Após a secagem, obtiveram-se pré-filmes que foram, então, imersos em outra solução de cálcio de mesma concentração e mantidas por 1 minuto, sendo em seguida lavados com água destilada e secos. Esses filmes apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*.

Num segundo trabalho, filmes nanocompósitos com atividade antimicrobiana contra *S. typhimurium* e *S. aureus*, foram fabricados por Akbar e Anal (2014). Similarmente ao

trabalho de Bajpai, Chand e Chaurasia (2012), os filmes nanocompósitos de alginato foram reticulados em dois estágios. O primeiro foi realizado adicionando-se uma solução concentrada de CaCl_2 a 5% (m/v) à solução formadora do filme e em seguida, adicionou-se as nanopartículas de ZnO. Após a secagem e obtenção dos pré-filmes, 1 mL de cloreto de cálcio foi adicionado sobre a superfície dos filmes e então espalhados com auxílio de uma espátula de vidro por 1 minuto. Em seguida, os filmes foram lavados e secos. A presença de ZnO_{nano} nos filmes nanocompósitos diminuiu a tensão na ruptura (45 para 33 kPa) e o alongamento (de 602 para 455%).

Diferentemente dos trabalhos acima descritos, no presente trabalho de mestrado avaliou-se o efeito da adição de diferentes conteúdos de ZnO em filmes de alginato com diferentes graus de reticulação. Além disso, também foi avaliada a influência do diâmetro médio das partículas nas propriedades dos filmes. Neste sentido, foi possível determinar qual dos parâmetros, especificamente a concentração das nanopartículas e o grau de reticulação, tem maior influência nas propriedades dos filmes, que não foi abordado nos trabalhos de Bajpai, Chand e Chaurasia (2012) nem no trabalho de Akbar e Anal (2014).

Dessa maneira, o desenvolvimento de filmes nanocompósitos à base de alginato e ZnO_{nano} pode beneficiar o avanço tecnológico no campo embalagens de embalagens ativas.

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados e os métodos e procedimentos experimentais empregados no presente trabalho. Primeiramente é descrito o método de fabricação dos filmes controle e, na sequência, são apresentados os métodos de desagregação das nanopartículas de óxido de zinco e confecção dos filmes nanocompósitos à base de alginato e ZnO_{nano} . Ao final, também são detalhados os métodos de caracterização da atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos.

4.1 Matéria-prima

Para confecção dos filmes, utilizou-se o alginato de sódio de média viscosidade (A-2033, lote SLBM3663V), massa molar de 90 kDa (BIERHALZ; WESTIN; MORAES, 2016), adquirido da Sigma-Aldrich (EUA), obtido de algas *Macrocystis pyrifera* e, por essa razão, com alto conteúdo de blocos M (fração mássica de 0,6). O laudo do alginato de sódio encontra-se disponível no apêndice A1.

As nanopartículas de ZnO foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA), em dois tamanhos diferentes: nanopartícula I de tamanho nominal menor que 100 nm (referência 544906, lote MKBS19030V, tamanho médio descrito pelo fabricante como sendo 63 nm, com laudo disponibilizado no Apêndice A2) e nanopartículas II de tamanho nominal menor que 50 nm (referência 677450, lote MKBT7475V, tamanho médio descrito pelo fabricante como sendo menor que 50 nm, com laudo disponibilizado no Apêndice A3).

4.2 Reagentes

Como plastificante utilizou-se o glicerol, adquirido na empresa Synth (Brasil). Como agente reticulante utilizou-se o $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck, Alemanha).

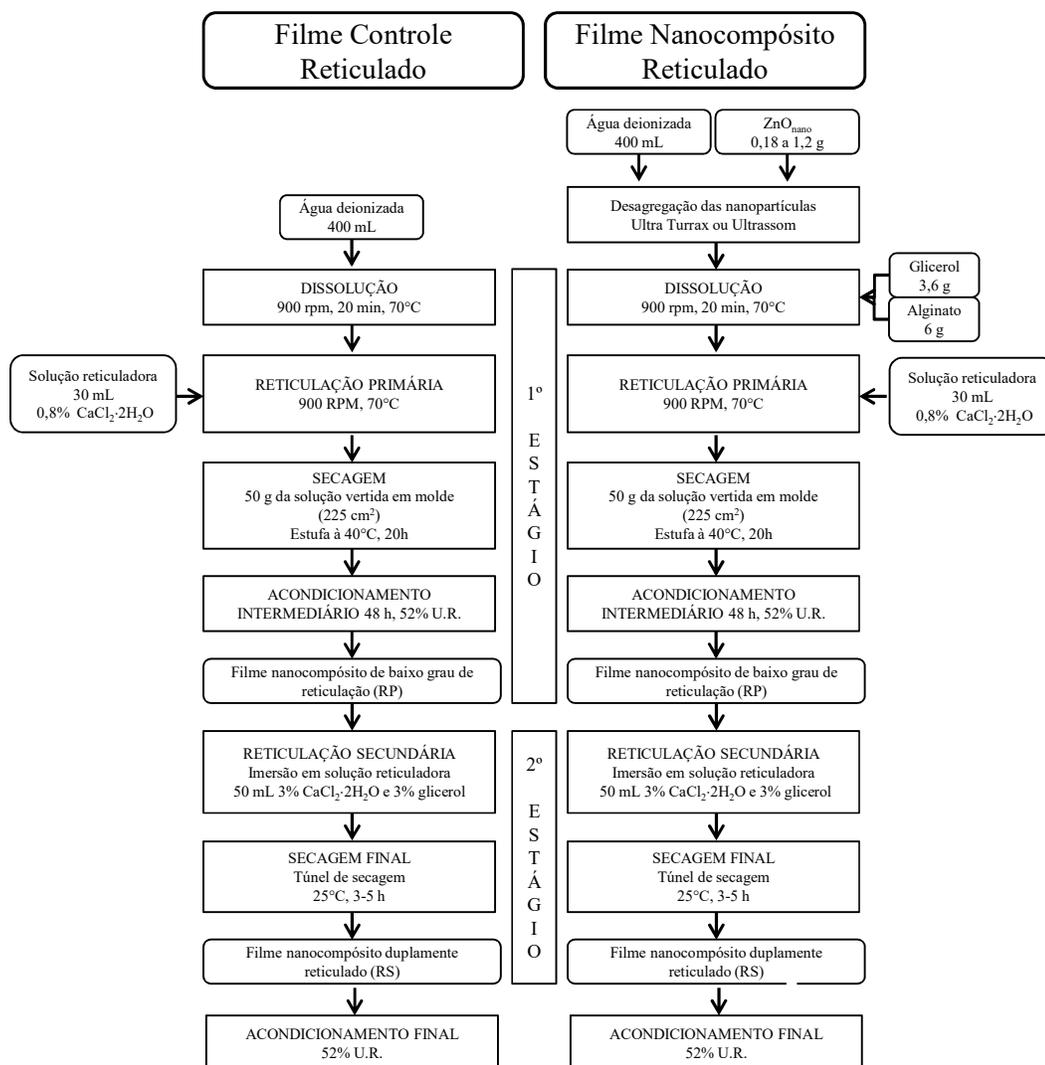
4.3 Processo de fabricação dos filmes

Nesta seção, são descritos os processos de fabricação de filmes à base de alginato e nanopartículas de ZnO, contendo glicerol como plastificante e reticulados ou não com íons cálcio. A produção dos filmes foi realizada por *casting* e baseada na metodologia proposta por

Zactiti e Kieckbusch (2005), na qual se obtém inicialmente um filme de baixa reticulação que é solúvel em água, no presente trabalho denominado de filme reticulado em primeiro estágio (RP).

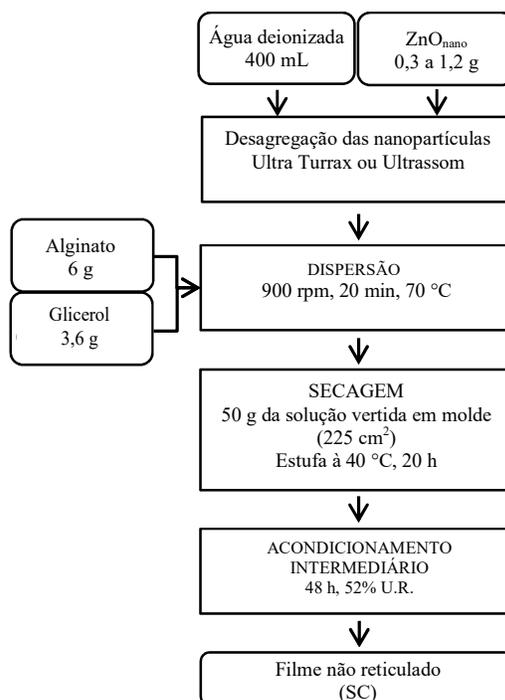
Em seguida, os filmes de baixo grau de reticulação são submetidos a uma reticulação complementar (ou secundária), obtendo-se filmes duplamente reticulados (RS) que apresentam propriedades mecânicas superiores e baixa solubilidade em água. Esse método foi adaptado para a confecção dos filmes compósitos contendo as nanopartículas de ZnO. Na Figura 4.1 são apresentadas, de forma comparativa, as etapas do processo de confecção dos filmes controle e nanocompósitos, ambos reticulados com cálcio.

Figura 4.1: Diagrama de fluxo do processo de confecção dos filmes controle e nanocompósito reticulados com cálcio (figura adaptada de BIERHALZ, 2014).



Com o objetivo de avaliar a influência da adição das nanopartículas na ausência do agente reticulante, foram fabricados filmes nanocompósitos não reticulados com cálcio (SC), conforme apresentado na Figura 4.2. Os processos de obtenção de cada tipo de filme são descritos a seguir.

Figura 4.2: Diagrama de fluxo do processo de confecção dos filmes nanocompósitos não reticulados com cálcio.



4.3.1 Filmes controle (sem ZnO)

A solução filmogênica foi preparada adicionando-se 3,6 g de glicerol a 400 mL de água deionizada sob agitação de 900 rpm. Um béquer de vidro (volume nominal de 600 mL e diâmetro de 10 cm) acoplado a um agitador mecânico (Tecnal, modelo TE-139, Brasil) foi utilizado com o objetivo de simular um reator do tipo tanque agitado de fundo chato. Como impelidor, uma hélice dispersora do tipo *Cowles* (roda dentada de 5 cm de diâmetro) foi utilizada, sendo posicionada a 2 cm de distância do fundo do reator. Após a adição do plastificante, 6 g de alginato foram lentamente adicionados à mistura de forma a evitar a formação de grumos e a solução foi mantida a 300 rpm por 15 minutos para garantir completa solubilização do polissacarídeo. A mistura foi, então, aquecida a 70 °C com o auxílio de uma manta de aquecimento (Fisatom, modelo 67, Brasil) e sob agitação de 900 rpm, 30 mL de uma

solução a 0,8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (m/v) foram adicionados à taxa de 0,6 mL/min, utilizando-se uma bomba peristáltica (Masterflex C/L, modelo 77120-70, EUA).

Após preparadas, alíquotas da solução formadora do filme (50 g) foram vertidas em moldes de acrílico de base quadrada (225 cm^2), e levadas à estufa com circulação de ar (Tecnal, modelo TE-394-2, Brasil) para secagem a 40°C por 20 horas. Logo após, os filmes foram removidos dos moldes e foram acondicionados em dessecadores contendo solução supersaturada de $\text{MgNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para controle da umidade relativa em 52% por 48 horas, obtendo-se os filmes reticulados em primeiro estágio (RP).

Para o preparo dos filmes duplamente reticulados (RS), cada filme RP foi imerso em 50 mL de solução a 3% de cloreto de cálcio dihidratado (m/v) contendo glicerol (3% m/v) por 20 minutos. Em seguida, os filmes foram rapidamente imersos em 50 mL de solução de glicerol a 3% (m/v) por 1 minuto para remoção do excesso de cálcio. Após o tratamento de reticulação secundária, os filmes foram colocados sobre placas de acrílico e conduzidos a um túnel de secagem estático (0,16 x 1 m) que opera com circulação de ar à temperatura ambiente e umidade relativa superior a 60%, nele sendo mantidos por um período entre 3 a 5 horas. Durante a secagem, as bordas dos filmes foram fixadas com hastes metálicas para evitar o enrugamento. Ao final, os filmes foram novamente acondicionados em ambiente com umidade relativa de 52%.

4.3.2 Filmes nanocompósitos

4.3.2.1 Desagregação das nanopartículas

Para a desagregação das nanopartículas, foram utilizados 400 mL de água deionizada como meio dispersante, de acordo com Espitia *et al.* (2013a). Os estudos iniciais foram conduzidos com 0,18 g e 1,2 g de ZnO_{nano} . Essas quantidades representam, respectivamente, 3 e 20% de nanopartículas pré-calculadas sobre o conteúdo de alginato, conforme otimização apresentada no trabalho de Arfat *et al.* (2014). A mistura foi colocada em um banho ultrassônico modelo Unique (Ultrasonic Cleaner, Brasil), até garantir a desagregação das nanopartículas (tempo de 45 minutos).

Como segundo método, testou-se o uso do homegeneizador Ultra Turrax (IKA, Alemanha), utilizando agitação de 10.000 rpm por um período de 5 minutos.

Um método alternativo combinando o uso dos dois mecanismos de desagregação foi utilizado, variando-se a velocidade de agitação do Ultra Turrax (10.000 a 26.000 rpm) e em

seguida realizando-se a sonicação (200 W) por 30 minutos.

4.3.2.2 Filmes sem cálcio (SC)

Após a desagregação das nanopartículas, adicionou-se à dispersão de ZnO_{nano} 3,6 g de glicerol. Sob agitação de 900 rpm, adicionou-se lentamente 6 g de alginato mantendo-se a agitação por 15 minutos adicionais a 300 rpm. A solução foi, então, aquecida a 70 °C, vertida nos moldes quadrados de acrílico (50 g/molde) e levada à estufa para secagem a 40 °C por 20 h. Após esse período, os filmes foram removidos dos moldes e, então, acondicionados a 52% de umidade relativa. Esses filmes não foram submetidos à reticulação primária e/ou secundária.

4.3.2.3 Filmes nanocompósitos reticulados (RP e RS)

Para a obtenção dos filmes nanocompósitos reticulados, em sequência à desagregação das nanopartículas, adicionou-se 3,6 g de glicerol à dispersão e, sob agitação (900 rpm), adicionou-se lentamente 6 g de alginato. O restante do procedimento foi realizado conforme já descrito no Item 4.4.1.

4.4 Caracterização físico-química dos filmes

Os filmes permaneceram por 72 horas em ambiente a 52% UR para que atingissem o equilíbrio, antes de serem caracterizados. As análises iniciais foram realizadas quanto ao aspecto visual, procedendo-se à quantificação de umidade, da massa solubilizável em água, da espessura, da permeabilidade ao vapor de água (PVA), da capacidade de absorção de soluções fisiológicas, da cor, da opacidade e da resistência mecânica. Também foi avaliada a distribuição de tamanho e o diâmetro médio das partículas dispersas.

Além das características citadas, esses filmes foram submetidos a observações de sua microestrutura por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica, e também foram analisados quanto à cristalinidade por difração de raios-X, por espectroscopia no infravermelho (FTIR), termogravimetria (TGA) e quanto à atividade antimicrobiana.

4.4.1 Aspecto visual

Realizou-se uma avaliação subjetiva considerando homogeneidade, continuidade,

flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e manuseio. O aspecto dos filmes foi registrado por fotografia digital (telefone celular Nokia Lumia 620).

4.4.2 Conteúdo de umidade

O conteúdo de água (ω) de filmes em equilíbrio com o ambiente a 52% de umidade relativa a 25 °C foi determinado por gravimetria usando estufa a vácuo (Lab-line, Squaroid, EUA), a 105 °C durante 24 h.

4.4.3 Massa solubilizável em água

A massa solubilizável em água (MS) dos filmes foi determinada segundo metodologia proposta por Irissin-Mangata *et al.* (2001). Inicialmente, a umidade de uma amostra de filme foi determinada, conforme item 4.4.2. Outra amostra equivalente do mesmo filme foi imersa em 50 mL de água destilada e o sistema foi mantido sob agitação (175 rpm) a 25°C por 7 dias, utilizando-se uma incubadora orbital (Lab-Line, EUA). Esse segundo filme foi seco em estufa para determinação da massa não solúvel. A matéria solubilizada foi calculada segundo a Equação 4.1:

$$MS = \frac{[m_0(1-\omega)] - m_f}{m_f} \quad (4.1)$$

onde: MS é a massa solubilizável em água [g/g filme seco];

m_0 é a massa total inicial do filme [g];

m_f é a massa não solúvel [g];

ω é a fração de umidade em base úmida [g H₂O/g filme].

4.4.4 Espessura

A espessura foi obtida através de um micrômetro digital (Mitutoyo, modelo MDC-25S, resolução 0,001 mm, Japão). O ensaio foi executado com 10 corpos de prova obtidos de filmes de 2 lotes diferentes (5 de cada lote) e foram realizadas 10 medidas da espessura de cada corpo de prova.

4.4.5 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi determinada gravimetricamente, de

acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995a) utilizando uma célula de acrílico com um volume interno de 30 mL e que dispõe de uma tampa rosqueável com abertura central de 46,24 cm² na qual o filme foi fixado. Cloreto de cálcio anidro granulado (Ecibra) foi utilizado para preencher o fundo da célula e esta foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado. O fundo desse recipiente continha uma solução supersaturada de NaCl para manter o ambiente a 75% UR. A variação de massa da célula com o tempo foi usada nas Equações 4.2 e 4.3 para calcular a PVA.

$$F_{VA} = \frac{G}{A_e} \cdot \quad (4.2)$$

$$PVA = \frac{F_{VA} \cdot \delta}{\Delta P_{H_2O}} \cdot C \quad (4.3)$$

onde:

F_{VA} é o fluxo de vapor d'água [g/m²·dia];

G é a taxa de permeação [g/dia] calculada por regressão linear de ganho de massa *versus* tempo;

A_e é a área exposta do filme [m²];

PVA é a permeabilidade ao vapor d'água [(g·mm/m²·dia·kPa)];

δ é a espessura do filme [mm];

ΔP_{H_2O} é a diferença de pressão parcial de vapor no ambiente dos dois lados do filme [kPa];

C é um fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o CaCl₂ e o filme (MCHUGH; AVENA-BUSTILLOS; KROCHITA, 1993). Nas condições do ensaio, o valor de C era muito próximo de 1,0.

4.4.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas através de ensaio de tração utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD). O alongamento na ruptura (E), a tensão de ruptura (TR) e o módulo elástico de Young (MY) foram determinados de acordo com a norma ASTM D882 (ASTM, 1995b). A separação inicial das garras foi de 5 cm e a velocidade de afastamento foi de 0,1 cm/s. A espessura foi determinada previamente ao ensaio pela média aritmética de 10 medidas em pontos aleatórios em cada corpo de prova. A tensão de ruptura e o alongamento na ruptura foram determinados de acordo com as Equações 4.4 e 4.5, respectivamente. O módulo elástico de Young foi calculado por regressão

linear da porção de deformação elástica do diagrama tensão *versus* alongamento. Os resultados são apresentados como média de 10 replicatas.

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (4.4)$$

$$E = \frac{d}{d_0} \cdot 100 \quad (4.5)$$

Nestas equações:

TR é a tensão de ruptura [MPa];

F_m é a força máxima no rompimento [N];

A_s é a área da seção transversal do corpo de prova do filme [mm²];

E é o alongamento na ruptura [%];

d é a distância final de separação das garras [cm];

d_0 é a distância inicial de separação das garras [cm].

4.4.7 Morfologia

A microestrutura da superfície e seção transversal dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (LEICA, modelo DMLM, EUA) acoplado ao computador LEICA Q500IW, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da FEQ/UNICAMP, operado com tensão de aceleração de 20 kV e corrente de feixe igual a 100 pA. Para conferir condutividade, os corpos de prova foram recobertos com uma fina camada de ouro, em um *Sputter Coater Polaron* (VG Microtech, Modelo SC7620, Inglaterra).

Com o objetivo de obter dados morfológicos micro-estruturais internos e superficiais relacionados ao tamanho e à distribuição das nanopartículas e seus aglomerados, foi também utilizado um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (FEI, modelo Quanta 650 FEG, EUA) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia Brasileira (LnNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) operado com tensão de aceleração de 5 kV e corrente de feixe menor que 200 nA. Os corpos de prova foram recobertos com carbono utilizando um *Sputter Coater* (Bal-Tec, SCD 005, EUA) através do método de evaporação de carbono metálico. A seção transversal foi avaliada após corte cuidadoso com bisturi.

A morfologia da superfície e seção transversal dos filmes à base de alginato também

foram avaliados utilizando um microscópio eletrônico de varredura (FEI, modelo 250 FEG, EUA) operado com tensão de aceleração de 3 kV. As amostras de filmes foram recobertas com ouro e paládio para aumentar a condutividade elétrica. A seção transversal foi avaliada após corte cuidadoso com bisturi.

Um microscópio de força atômica (AFM, Digital Instruments, modelo Nanoscope III) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia Brasileira (LnNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) foi utilizado para avaliar a topografia dos filmes. O microscópio foi operado em modo intermitente e preparação prévia da amostra não foi necessária.

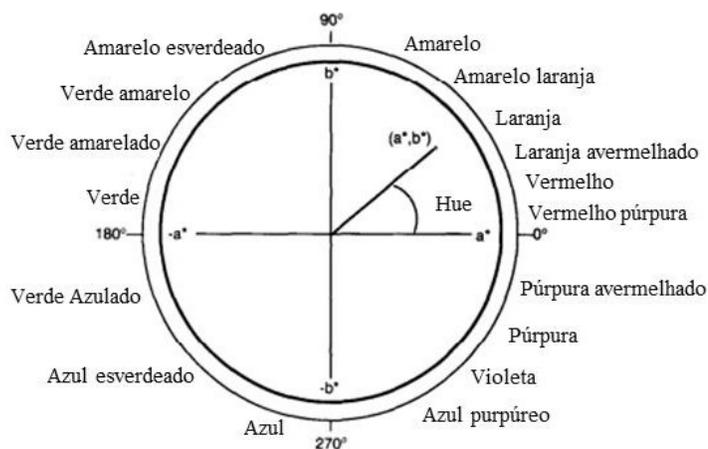
4.4.8 Cor e opacidade

A cor e a opacidade dos filmes foram avaliadas utilizando-se um colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Faifax, EUA) e padrões CIElab. Conforme apresentado na Figura 4.3, nesse sistema são obtidos os parâmetros de cor luminosidade L^* , variando de 0 (preto) ao 100 (branco); o a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo (+). A cor dos filmes nanocompósitos, expressa como diferença total de cor (ΔE^*), foi determinada utilizando-se a Equação 4.6. Os resultados foram expressos como média de cinco replicatas.

$$\Delta E^* = \left[(L^* - L_p^*)^2 + (a^* - a_p^*)^2 + (b^* - b_p^*)^2 \right]^{0,5} \quad (4.6)$$

Nesta equação: L_p^* , a_p^* e b_p^* são os parâmetros de cor do filme controle sem ZnO utilizado para comparação dos resultados.

Figura 4.3: Sequência Hue e orientação do ângulo Hue no diagrama CIElab (Voss, 1992; Bierhalz, 2014).



Também foram determinados os parâmetros Hue e Croma, que expressam a medida da tonalidade e a intensidade da cor, respectivamente, calculados segundo as Equações 4.7 e 4.8.

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (4.7)$$

$$\text{Croma} = \left[(a^*)^2 + (b^*)^2 \right]^{0,5} \quad (4.8)$$

4.4.9 Distribuição do tamanho de partícula

As análises de tamanho médio e da distribuição do tamanho de partícula foram realizadas em um Analisador de Tamanho de Partículas por Difração à Laser MASTERSIZER-3000 (modelo MAZ3000, MALVERN INSTRUMENTS, Reino Unido). Os ensaios foram realizados em triplicata no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP), utilizando água destilada como meio dispersante, agitação de 2.000 rpm e bombeamento de 2.000 rpm.

Os parâmetros de distribuição de tamanho de partícula e diâmetro médio foram calculados de acordo com o modelo matemático de Mie, que considera que as partículas são esféricas e não opacas. Foram determinados os seguintes parâmetros:

- a) $D(v, 0.1)$: diâmetro máximo apresentado por 10% das partículas [nm];
- b) $D(v, 0.5)$: diâmetro máximo apresentado por 50% das partículas [nm];
- c) $D(v, 0.9)$: diâmetro máximo apresentado por 90% das partículas [nm].

Os diâmetros médios de partícula, definidos como α e β , foram calculados de acordo com as equações 4.9 e 4.10.

$$\alpha = \frac{\sum_1^n (D_i^4 v_i)}{\sum_1^n (D_i^3 v_i)} \quad (4.9)$$

$$\beta = \frac{\sum_1^n (D_i^3 v_i)}{\sum_1^n (D_i^2 v_i)} \quad (4.10)$$

onde:

α é o diâmetro médio ponderado pela distribuição de área superficial [nm];

β é o diâmetro médio ponderado pela distribuição de volume [nm];

n é o número total de diferentes tamanhos de partícula, sendo cada tamanho atribuído a um número entre 1 e n ;

D_i é a média geométrica do diâmetro para o tamanho de partícula i , sendo $1 \geq i \leq n$ [nm];
 v_i é o percentual de partículas com o tamanho de partícula correspondente a i , sendo $1 \geq i \leq n$.

4.4.10 Capacidade de absorção de soluções fisiológicas

A capacidade de absorção de soluções fisiológicas foi analisada utilizando-se três tipos de solução: água, tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) e soro fetal bovino (pH 7,2). O ensaio consistiu na medida da massa inicial de amostras do filme (círculos de 2,5 cm de diâmetro) e da massa final do material úmido, após imersão em 10 mL de cada uma das soluções citadas, a 37 °C, pelo período de 24 horas e em água também a 25 °C. Os ensaios de capacidade de absorção de fluidos foram realizados em triplicata.

A avaliação em água foi realizada para verificar o efeito deste solvente no comportamento do filme, em um pH neutro. O PBS foi empregado para expor o filme à solução de concentração de sais e pH mais próximos aos do corpo humano. O soro fetal bovino apresenta composição complexa, tendo-se por meta simular com o mesmo a situação de contato do filme com fluidos corpóreos como o sangue humano e com alimentos de composição complexa.

A capacidade de absorção foi calculada de acordo com a Equação 4.11.

$$CA = \frac{m_u - m_0}{m_0} \quad (4.11)$$

onde:

CA é a capacidade de absorção;

m_u é massa do filme úmido [g];

m_0 é a massa inicial do filme [g].

4.4.11 Espectroscopia no Infravermelho

O espectro no infravermelho (FTIR) foi determinado utilizando um espectrofotômetro FT-IR (Thermo-Scientific, modelo Nicolet, Madison/EUA). Os filmes foram posicionados no suporte e expostos diretamente ao laser infravermelho.

O espectro no infravermelho dos filmes controle e nanocompósitos foi registrado à temperatura ambiente na faixa de 675 a 4.000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

O espectro das nanopartículas de ZnO também foi obtido. Antes do ensaio, as

nanopartículas foram maceradas com KBr (proporção 1:100) e a mistura foi prensada (7 ton) para análise. O espectro foi registrado à temperatura ambiente na faixa de número de onda entre 400 a 4.000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

4.4.12 Cristalinidade

Os ensaios de cristalinidade (XRD) foram executados utilizando um difratômetro Philips Analytical X'Pert PW 3050 (Almelo, Holanda), com radiação Cu-K α . A fonte de raios-X foi operada em 40 KV e 40 mA e a intensidade da difração foi medida no modo de reflexão a uma taxa de 0,6 °/min para 2 θ entre 5 e 70 °.

As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP).

4.4.13 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi conduzida com aproximadamente 6 mg de amostra em cadinhos de alumínio. A amostra foi aquecida desde a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) até 600 °C, a uma taxa de 10 °C/min. A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada, analisando-se a variação da massa em função da temperatura. Foi utilizado analisador termogravimétrico TGA 50 (Shimadzu, Japão). Os ensaios foram realizados em duplicata e em atmosfera de nitrogênio (vazão de 40 ml/min) no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP).

4.4.14 Atividade antimicrobiana

Dentre os patógenos de relevância tanto na área de alimentos, quanto na de infecções de lesões de pele destacam-se as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Dessa forma, a eficiência antimicrobiana dos filmes de alginato contendo partículas de óxido de zinco em diferentes concentrações foi avaliada contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) pelo teste de difusão em ágar, conforme método descrito por Pires *et al.* (2008) As linhagens foram adquiridas em forma de *slant* da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo.

Após diluições seriadas, a partir da cultura inicial, 0,1 mL das suspensões contendo 10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* foram inoculados nos meios de cultura Müeller-Hinton (Difco). Amostras de filmes foram colocadas assepticamente sobre a superfície da placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio inoculado e o conjunto foi incubado a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, o halo de inibição foi determinado pela medida do diâmetro formado ao redor do filme. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e como controle, filmes sem antimicrobiano e placas sem filme foram utilizados.

Alternativamente, adaptou-se o método descrito por Trandafilovič *et al.* (2012) para avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos. Discos de 5 cm de diâmetro dos filmes foram assepticamente colocados em tubos de ensaio com 10 mL de caldo Müeller-Hinton (Difco) contendo 10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *E. coli*. Os tubos foram então incubados a 35 °C sob agitação de 150 rpm e após 24 horas, procedeu-se à contagem total de mesófilos aeróbios totais. Tubos contendo as suspensões microbianas e sem filmes foram utilizados como controles negativos.

4.4.15 Análise estatística dos dados

A caracterização dos filmes obtidos tiveram, no mínimo, 4 repetições. Neste caso, todas as regressões foram realizadas com o uso do *Software* Statistica versão 7, usando o método de Quasi-Newton. Análise de variância e o teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas a um nível de probabilidade de 5% ($p < 0,05$) entre as médias.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO: EFEITOS DOS PROCESSOS DE RETICULAÇÃO E DESAGREGAÇÃO

Neste capítulo, é apresentada a avaliação da importância relativa da reticulação primária e secundária e da eficácia dos métodos de desagregação das partículas I de óxido de zinco. Para confecção dos filmes nanocompósitos, utilizou-se apenas a nanopartícula I de ZnO, cujo tamanho nominal segundo o fabricante é inferior a 100 nm. Como controle, foram também confeccionados filmes de alginato sem nanopartículas. Foram avaliados dois métodos de desagregação das partículas: uso de ultrassom (200 W) por 45 minutos e UltraTurrax (10.000 rpm) por 5 minutos. Após a desagregação, os filmes foram confeccionados conforme descrito no item 4.4.2. Os filmes cujas partículas foram desagregadas com ultrassom receberam a sigla US e os filmes com partículas tratadas com Ultra Turrax possuem a identificação T. Filmes identificados com as letras RP foram reticulados apenas em um estágio, o de reticulação primária, enquanto os filmes identificados com as letras RS foram duplamente reticulados, isto é, foram submetidos à reticulação primária e secundária. Os filmes nanocompósitos foram confeccionados com dois teores de partícula, 3 e 20%, sendo que os conteúdos de nanopartículas dizem respeito à massa de ZnO em relação à de polímero utilizada. A Tabela 5.1 sumariza as formulações avaliadas no presente capítulo.

Tabela 5.1: Descrição das legendas utilizadas para identificação dos filmes.

Identificação	Descrição do filme
Controle RP	Filme sem ZnO _{nano} reticulado em um estágio
X*% US RP	Filme reticulado em primeiro estágio contendo 3 ou 20% de ZnO _{nano} I tratado com ultrassom
X*% T RP	Filme reticulado em primeiro estágio contendo 3 ou 20% de ZnO _{nano} I tratado com Ultra Turrax
Controle RS	Filme sem ZnO _{nano} duplamente reticulado
X*% US RS	Filme duplamente reticulado contendo 3 ou 20% de ZnO _{nano} I tratado com ultrassom
X*% T RP	Filme duplamente reticulado contendo 3 ou 20% de ZnO _{nano} I tratado com Ultra Turrax

X refere-se à proporção mássica de nanopartículas adicionadas (g ZnO/g alginato), igual a 3 ou a 20.

5.1 Avaliação da importância relativa das reticulações primária e secundária em preparações com partículas desagregadas por diferentes métodos

O aspecto visual dos filmes obtidos com os diferentes tratamentos de desagregação e concentrações de ZnO está apresentado nas Figuras 5.1 e 5.2. É possível notar que as partículas tiveram influência no aspecto visual dos filmes, em especial, na cor e na transparência. A adição de ZnO_{nano} e o aumento de sua concentração deixaram os filmes nanocompósitos com aparência esbranquiçada, sem, no entanto, modificar sua maleabilidade e flexibilidade aparentes. O uso de diferentes tratamentos de desagregação não demonstrou interferir no aspecto visual dos filmes reticulados em primeiro estágio ou duplamente reticulados. A reticulação secundária também não alterou significativamente o aspecto visual dos filmes, os quais se apresentaram muito similares aos filmes reticulados em primeiro estágio.

Na Tabela 5.2, estão apresentados os resultados obtidos para a permeabilidade ao vapor d'água, absorção e massa solubilizável em água e conteúdo de umidade destas formulações. Os filmes reticulados em primeiro estágio não diferiram entre si em relação à permeabilidade ao vapor d'água. No entanto, observa-se, em média, uma redução de 44% nos valores de PVA dos filmes com reticulação secundária. Essa diminuição deve estar relacionada com o efeito do cálcio em estruturar e possivelmente compactar a matriz polimérica, dificultando o transporte de vapor d'água através da mesma.

Figura 5.1: Aspecto visual dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro estágio (RS).

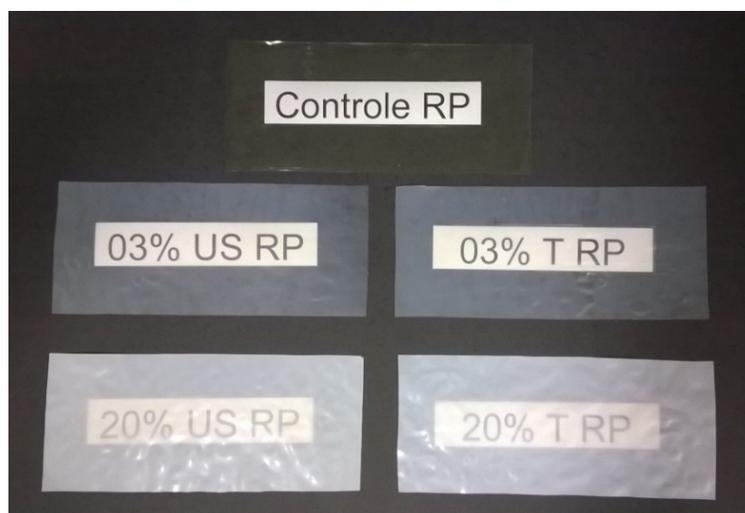


Figura 5.2: Aspecto visual dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro e segundo estágio: Controle (a), 3% US RS (b), 20% US RS (c), 3% T RS (d) e 20% T RS (e).



Tabela 5.2: Teor de umidade (ω), permeabilidade ao vapor d'água (PVA), massa solubilizável (MS) e absorção de água dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro estágio (RP) e duplamente reticulados (RS).

Filme	PVA (g·mm/m ² ·dia·kPa)	ω (%)	Absorção (%)	MS (%)
Controle RP	7,92 ± 0,42 ^b	25,08 ± 2,40 ^b	SF	1
03% US RP	8,55 ± 1,11 ^b	24,56 ± 1,81 ^b	SF	1
20% US RP	9,36 ± 1,45 ^b	25,01 ± 2,27 ^b	SF	1
03% T RP	9,33 ± 1,43 ^b	28,96 ± 1,18 ^c	SF	1
20% T RP	9,91 ± 0,71 ^b	31,78 ± 0,90 ^c	SF	1
Controle RS	4,94 ± 0,56 ^a	17,21 ± 1,53 ^a	126,0 ± 5,0 ^b	41,0 ± 5,0 ^b
03% US RS	5,09 ± 0,13 ^a	15,06 ± 0,32 ^a	94,0 ± 7,0 ^a	30,0 ± 4,0 ^a
20% US RS	5,63 ± 0,63 ^a	15,94 ± 0,25 ^a	92,0 ± 6,0 ^a	31,0 ± 4,0 ^a
03% T RS	4,38 ± 0,15 ^a	22,32 ± 0,47 ^b	96,0 ± 4,0 ^a	32,0 ± 1,0 ^a
20% T RS	5,09 ± 0,13 ^a	20,97 ± 1,19 ^b	90,0 ± 8,0 ^a	30,0 ± 5,0 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey. SF: Solubilização do filme.

Os resultados do teor de umidade apontam a mesma tendência observada para a PVA em relação à reticulação dos filmes. Entretanto, somente as amostras obtidas com partículas tratadas com ultrassom apresentaram teores de umidade estatisticamente iguais aos do controle, enquanto e as amostras tratadas com o Ultra Turrax apresentaram maior teor de

umidade. As partículas tratadas com ultrassom possivelmente apresentaram menor tamanho, e conseqüentemente maior área superficial, de forma que este incremento favorece uma maior interação com as cadeias polissacarídicas. As partículas maiores resultantes do processamento com Ultra Turrax interagem menos com as moléculas de alginato, de modo que há mais espaço para adsorção de água em sua superfície quando comparadas às partículas desagregadas com auxílio do ultrassom.

Os filmes reticulados em primeiro estágio não foram avaliados com relação à massa solubilizável em água e nem tampouco com relação à absorção, devido ao fato de serem solúveis em água. Os resultados demonstraram que os filmes nanocompósitos duplamente reticulados apresentaram-se mais estáveis quanto à perda de massa em água, diferindo significativamente do controle. A absorção de água dos filmes nanocompósitos foi aproximadamente 30% menor do que a dos filmes controle. Estes resultados indicam que a adição das nanopartículas à matriz de alginato contribuiu para aumento da estabilidade da rede polimérica, minimizando a perda de polímero para o meio aceptor. O aumento da estabilidade pode também estar relacionado com a diminuição da fração de alginato na mistura (devido à adição de partículas), com o fato de as partículas não serem tão solúveis em água quanto o polímero e também com um possível efeito de reticulação do ZnO_{nano}.

Os resultados das propriedades mecânicas e da espessura das diferentes amostras estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Propriedades mecânicas e espessura dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro estágio (RP) e reticulados em primeiro e segundo estágio (RS).

Filme	TR (MPa)	E (%)	MY (MPa)	Espessura (µm)
Controle RP	11,60 ± 1,74 ^a	23,21 ± 4,49 ^{bc}	134,03 ± 38,73 ^a	41,6 ± 9,2 ^{cde}
3% US RP	11,34 ± 1,62 ^a	21,97 ± 4,55 ^{bc}	124,23 ± 32,82 ^a	38,9 ± 6,1 ^{abcd}
20% US RP	13,21 ± 1,54 ^a	24,51 ± 4,20 ^{bc}	142,82 ± 29,51 ^a	46,3 ± 5,5 ^e
3% T RP	14,23 ± 1,34 ^a	20,64 ± 3,65 ^b	193,26 ± 53,46 ^a	38,4 ± 8,7 ^{abcd}
20% T RP	17,49 ± 2,13 ^b	27,12 ± 4,73 ^c	193,28 ± 51,21 ^a	44,3 ± 9,5 ^{de}
Controle RS	67,88 ± 10,73 ^c	1,87 ± 0,33 ^a	4.657,6 ± 411,81 ^c	34,7 ± 4,7 ^{ab}
3% US RS	80,49 ± 6,97 ^d	3,08 ± 0,81 ^a	4.074,1 ± 560,50 ^b	36,5 ± 7,3 ^{abc}
20% US RS	89,57 ± 16,16 ^d	3,27 ± 0,86 ^a	3.990,1 ± 338,43 ^b	40,3 ± 3,7 ^{bcde}
3% T RS	91,17 ± 7,17 ^d	2,86 ± 0,52 ^a	4.333,6 ± 432,60 ^{bc}	33,0 ± 4,9 ^a
20% T RS	91,75 ± 15,55 ^d	3,60 ± 1,31 ^a	4.220,9 ± 625,41 ^{bc}	36,1 ± 5,1 ^{abc}

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Dentre os filmes reticulados em primeiro estágio, não houve diferença significativa na tensão de ruptura e no módulo de elasticidade. Nenhum desses filmes diferiu significativamente do controle com relação ao alongamento

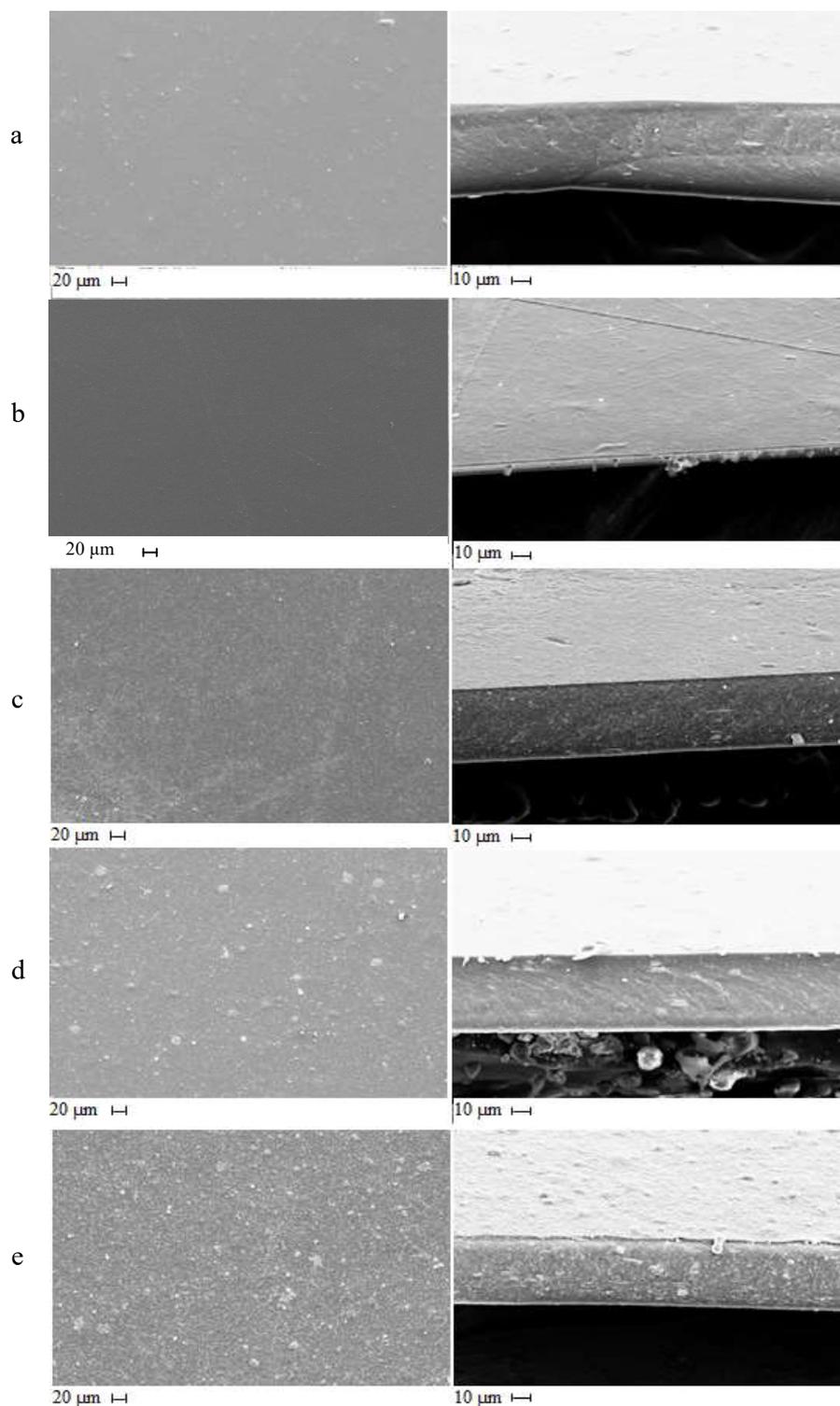
Similarmente aos filmes reticulados apenas em primeiro estágio, os filmes duplamente reticulados não se diferenciaram em relação ao alongamento. Com relação ao módulo de elasticidade, apenas o filme cujas nanopartículas foram desagregadas com o Ultra Turrax e contendo 20% das mesmas não diferiu em relação do controle, de forma que os demais filmes nanocompósitos apresentaram valores de módulo de elasticidade inferiores ao do controle. Entretanto, os filmes nanocompósitos duplamente reticulados apresentaram tensão na ruptura significativamente superior ao controle, o que significa um ganho com relação à formulação de partida.

Ao comparar filmes com reticulação primária e secundária, nota-se um aumento substancial da tensão na ruptura (aproximadamente 5 vezes) e do módulo de Young (mais que 20 vezes em média), e em contrapartida, observou-se uma redução, similar em extensão, no alongamento. Essas variações nas propriedades mecânicas indicam a ação de reforço da reticulação com íons cálcio, que reduzem a mobilidade das cadeias de alginato, diminuindo o alongamento, e incrementando a resistência à deformação. Essas propriedades, no entanto, não foram significativamente alteradas com a adição das nanopartículas, apesar de ter sido notada uma melhoria na tensão de ruptura. O conteúdo de nanopartículas nos filmes também não afetou consideravelmente o comportamento dos materiais.

Com relação à espessura, não foi possível identificar um padrão definido entre os dois grupos de filmes. Contudo, parece haver uma tendência de aumento da espessura com o aumento da concentração de ZnO_{nano} , apesar de não ter sido possível obter confirmação estatística. Além disto, é possível que as diferenças obtidas possam ser atribuídas às variações do processo de secagem dos filmes em estufa. Ademais, nota-se que os filmes tratados com o Ultra Turrax apresentaram maiores valores de desvio padrão, o que pode ser atribuído à variação no tamanho das partículas de ZnO e à sua distribuição ao longo do material.

Na Figura 5.3, são apresentadas as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes duplamente reticulados, enquanto na Figura 5.4 apresenta-se o mapeamento elementar obtido por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X.

Figura 5.3: Micrografias da superfície (imagens à esquerda) e seção transversal (imagens à direita) dos filmes: controle RS (a), 3% US RS (b), 20% US RS (c), 3% T RS (d) e 20% T RS (e).

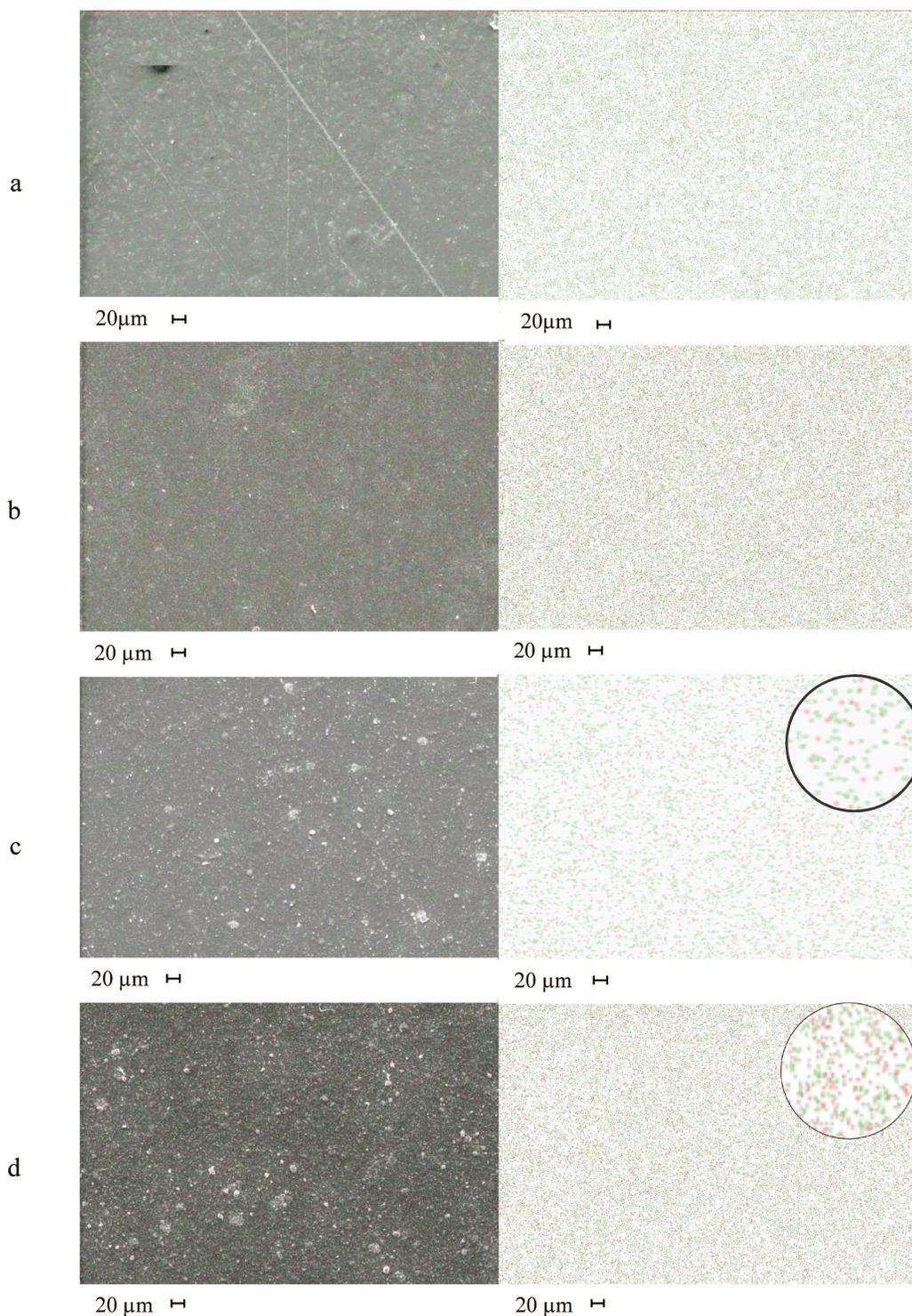


Pelas imagens apresentadas, nota-se que o filme controle (Figura 5.3a) apresentou superfície uniforme e lisa, sem muitas irregularidades. Os pontos esbranquiçados observados na imagem são, possivelmente, poeira aderida ao corpo de prova durante o armazenamento ou provenientes da própria luva utilizada na manipulação dos filmes. Pela micrografia da seção transversal, nota-se que a matriz polimérica apresenta-se em uma estrutura morfológicamente uniforme e de alta compactação. A compactação da matriz polimérica pode estar relacionada ao efeito do cálcio, que mantém as cadeias de alginato fortemente unidas através das zonas de junção, conforme evidenciado nas propriedades mecânicas e na permeabilidade ao vapor d'água. Nas micrografias dos filmes nanocompósitos, é possível notar a presença de partículas, em especial de agregados de tamanho muito superior ao anunciado pelo fabricante. Observa-se que há uma grande diferença no aspecto da fase dispersa tratada com ultrassom e com o Ultra Turrax. Claramente, as partículas tratadas no Ultra Turrax apresentaram maior grau de agregação em aglomerados de maior tamanho que as partículas tratadas com o ultrassom. O grande tamanho dos agregados de partículas parece não ter alterado o estado de compactação da matriz polimérica, como observado nas Figuras 5.3b a e.

Na Figura 5.4 é possível observar a presença de cálcio e zinco distribuídos em toda a superfície dos filmes nanocompósitos. Com o aumento da concentração de ZnO_{nano} de 3 para 20%, independente do método de desagregação utilizado (Figuras 5.4b e 5.4d), notou-se o aumento da presença de zinco evidenciado pela análise de EDS. No entanto, é possível notar que ambos os elementos, cálcio e zinco, apresentaram a formação de aglomerados. No caso do zinco, a formação de aglomerados pode estar relacionada tanto à agregação das nanopartículas, conforme observado pelas micrografias de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.3b a 5.3e), assim como pelo fato de o ZnO constituir a fase dispersa no filme nanocompósito.

Já no caso do cálcio, a aglomeração pode estar relacionada à distribuição dos blocos G e M da matriz de alginato. Conforme já apresentado por Smidsrød (1974), os blocos G apresentam maior seletividade aos íons Ca^{++} , além de mecanismo de coordenação auto-cooperativo, diferentemente do que ocorre com os blocos M e MG. Dessa forma, uma maior concentração de cálcio seria observada nas regiões com maior quantidade de blocos G. Além disso, a aglomeração de cálcio observada pela análise de EDS pode, também, ter relação com o próprio processo de reticulação realizado pela imersão dos filmes de alginato em solução de Ca^{+2} , de forma que a coordenação dos íons divalentes se dá de fora para dentro, formando uma estrutura mais rígida na parte mais externa ao filme, causando, possivelmente, um acúmulo de Ca^{++} nessa região.

Figura 5.4: Mapeamento elemental das superfícies em fundo branco dos filmes nanocompósitos: 3% US RS (a), 20% US RS (b), 3% T RS com aumento (c) e 20% T RS (d). Cálcio marcado em verde e zinco marcado em vermelho. Imagem com aumento de tamanho de duas vezes na região circular destacada nas figuras (c) e (d).

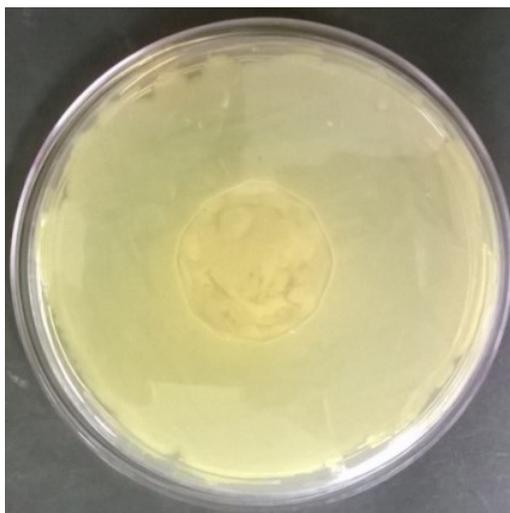


Outra possibilidade para a aglomeração de cálcio em determinadas regiões pode estar associada ao fato de a reticulação poder ocorrer de forma cooperativa, em um processo similar ao que se verifica no fechamento de um zíper (Grant *et al.*, 1973). Segundo essa abordagem, durante a formação das zonas de junção, a coordenação do íon subsequente é facilitada após a ligação do primeiro. Nesse sentido, é razoável esperar que haja uma distribuição desigual do íon divalente, resultante da formação de zonas de junção em processo cooperativo.

De posse das observações resultantes das micrografias dos filmes controle e dos nanocompósitos, notou-se a necessidade de avaliar o uso de estratégias alternativas de redução de tamanho das partículas agregadas, por exemplo, variando as condições de operação em ambos os métodos testados (ultrassom e dispersão com Ultra Turrax), com o objetivo de maximizar o uso área específica das partículas em contato com a matriz de alginato. Estes resultados serão apresentados no capítulo 6.

Dando sequência à análise preliminar da formulação dos filmes, foi avaliada a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* dos filmes duplamente reticulados pelo método de difusão em ágar. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.5 a 5.8. Crescimento celular sob o filme controle foi observado, evidenciado pela turbidez do filme, conforme mostrado na Figura 5.5.

Figura 5.5: Análise da atividade antimicrobiana contra *S. aureus* no filme controle RS, indicando crescimento em profusão sob o filme e à sua volta.



Não foi observada, para os filmes nanocompósitos, uma região de inibição devido à baixa difusão do ZnO para o meio de cultura (halo de inibição) (Figuras 5.6 e 5.7). No entanto, foi difícil discernir por observação direta se houve ou não crescimento celular sob o filme, devido à cor e à opacidade original dos corpos de prova. Por essa razão, os filmes nanocompósitos foram removidos, e a área abaixo deles foi investigada, notando-se ausência de crescimento microbiano sob os mesmos, conforme apresentado na Figura 5.8. Logo, o efeito inibitório dos filmes contendo as nanopartículas I de ZnO ocorreu por contato superficial. Os efeitos nos demais microrganismos serão discutidos no decorrer do estudo.

Figura 5.6: Atividade antimicrobiana contra *S. aureus* dos filmes (a) 3% US RS e (b) 20% US RS.

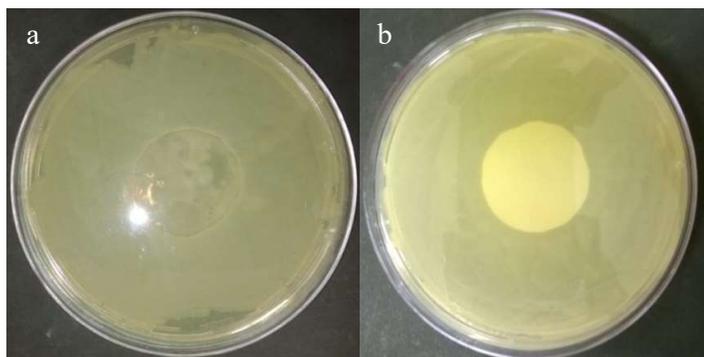


Figura 5.7: Atividade antimicrobiana contra *S. aureus* dos filmes (a) 3% T RS e (b) 20% T RS.

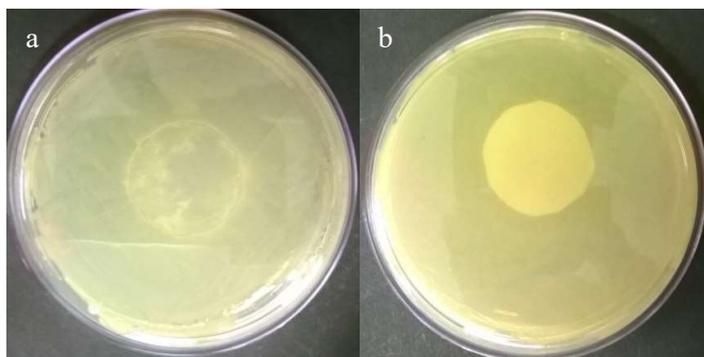
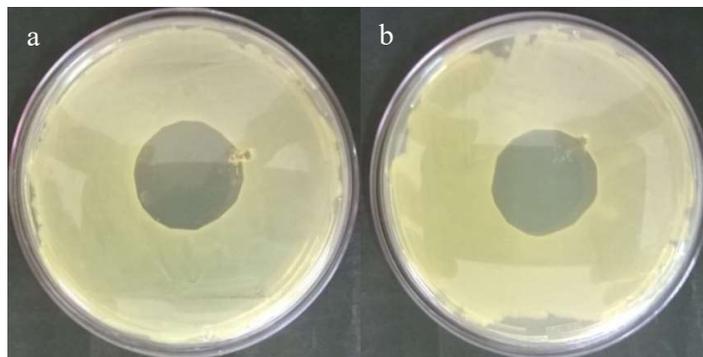


Figura 5.8: Atividade antimicrobiana contra *S. aureus* evidenciada pela remoção dos filmes, notando-se ausência de crescimento celular sob as amostras de (a) 3% US RS e (b) 20% US RS.



5.2 Análise geral da importância relativa das reticulações primária e secundária

Com base nos resultados obtidos, nota-se que a reticulação com íons cálcio exerce grande influência nas propriedades do filme com e sem nanopartículas. Nos filmes reticulados em primeiro estágio e nos filmes duplamente reticulados, notou-se pequena influência da concentração do material de enchimento. Esperava-se, no entanto, que as partículas exercessem um papel de maior extensão no material, contribuindo para maior melhoria de suas propriedades, em especial das propriedades mecânicas e de barreira ao vapor d'água.

Os métodos utilizados para desagregação das partículas não foram eficientes, e por essa razão, as partículas podem não ter apresentado efeito esperado, visto que a redução de seu tamanho favorece grandemente a interação entre as partículas e as cadeias do polímero.

Verificou-se atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, cujo crescimento foi inibido por contato com o filme nanocompósito. O estado de aglomeração do ZnO_{nano} , associado à ação reticuladora do Ca^{++} , que pode ter mantido as partículas fortemente presas à matriz polimérica, resultou na baixa transferência de ZnO para o meio de cultura.

A partir do acima exposto, os ensaios subsequentes foram conduzidos buscando-se a determinação de uma abordagem de desagregação mais efetiva das partículas e, de posse deste método mais eficaz para redução de tamanho dos agregados, propôs-se avaliar a função dos componentes estruturantes (partículas de ZnO e íons cálcio), nas propriedades dos filmes.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO NA REDUÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS

Este capítulo foi dividido em três seções: na primeira, é apresentada a avaliação do efeito de diferentes condições de processamento na redução do tamanho das partículas de ZnO_{nano} I (tamanho nominal inferior a 100 nm), definindo-se, ao final, uma estratégia de desagregação dessas nanopartículas utilizando-se os recursos disponíveis no Laboratório de Engenharia de Desenvolvimento de Produtos e Processos em Biorrecursos e no Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides. Em seguida, na segunda parte, são apresentados os resultados dos ensaios de desagregação das nanopartículas II de óxido de zinco (tamanho nominal inferior a 50 nm), partindo-se, a princípio, da metodologia definida para dispersão do ZnO_{nano} I, e definindo-se, finalmente, um procedimento para desagregação do ZnO_{nano} II. Ao final deste capítulo, uma análise sumarizada dos resultados obtidos para dispersão das nanopartículas I e II é apresentada.

6.1 Efeito das condições de processamento na redução do tamanho das partículas de ZnO_{nano} I

Para simular as condições de preparo dos filmes, as nanopartículas I de ZnO foram suspensas em 400 mL de água deionizada, e dispersas por ultrassom ou exposição ao sistema Ultra Turrax por períodos (5 a 35 minutos) ou velocidades de homogeneização (5.000 a 24.000 rpm) distintas das utilizadas na fase anterior do estudo. O teor de ZnO utilizado nas análises foi equivalente ao de 3% em relação à quantidade de polímero utilizada na fabricação dos filmes. Apenas as nanopartículas do tipo I (< 100 nm) foram utilizadas nessa parte do trabalho.

Os resultados são apresentados nas Tabelas 6.1 e 6.2, nas quais constam também os resultados obtidos nas condições testadas anteriormente (descritas no Item 4.4.2.1). O símbolo α representa o tamanho médio medido em relação à área superficial e β , o tamanho médio em relação ao volume da partícula. Os valores de $D(v, 0.1)$, $D(v, 0.5)$ e $D(v, 0.9)$ indicam que 10, 50 e 90% das partículas presentes na amostra estão abaixo do referido tamanho de partícula, respectivamente. As Figuras nas quais constam as distribuições do tamanho de partícula

encontram-se no Apêndice B.

Tabela 6.1: Tamanho médio de partícula após emprego de diferentes condições de desagregação utilizando os métodos de ultrassom e Ultra Turrax (tamanho nominal anunciado pelo fabricante: < 100 nm).

Tratamento	Condição de operação	Tempo (min)	α (nm)	β (nm)
Turrax	10.000 rpm	5	334 ± 12	1.067 ± 46
Turrax	10.000 rpm	20	335 ± 56	1.276 ± 56
Banho ultrassônico	200 W	45	346 ± 12	426 ± 12
Turrax	22.000 rpm	5	485 ± 1	597 ± 1
Turrax	22.000 rpm	10	496 ± 2	647 ± 31
Turrax	22.000 rpm	20	480 ± 1	553 ± 2
Turrax	22.000 rpm	30	478 ± 1	545 ± 1
Turrax	22.000 rpm	35	465 ± 1	503 ± 1
Turrax e Banho ultrassônico	24.000 rpm e 200W	T 5 min + US 30 min	410 ± 2	435 ± 1

Tabela 6.2: Distribuição de tamanho de partícula após emprego de diferentes condições de desagregação utilizando os métodos de ultrassom e Ultra Turrax (tamanho nominal anunciado pelo fabricante: < 100 nm).

Tratamento	Condição de operação	Tempo (min)	D(v,0.1) (nm)	D(v,0.5) (nm)	D(v,0.9) (nm)
Turrax	10.000 rpm	5	168 ± 10	404 ± 12	3.815 ± 832
Turrax	10.000 rpm	20	152 ± 6	456 ± 9	5.007 ± 198
Banho ultrassônico	200 W	45	214 ± 8	385 ± 13	714 ± 8
Turrax	22.000 rpm	5	346 ± 19	491 ± 1	770 ± 3
Turrax	22.000 rpm	10	342 ± 2	499 ± 4	807 ± 18
Turrax	22.000 rpm	20	337 ± 1	489 ± 1	755 ± 3
Turrax	22.000 rpm	30	337 ± 1	489 ± 1	745 ± 1
Turrax	22.000 rpm	35	334 ± 1	480 ± 1	705 ± 1
Turrax e banho ultrassônico	24.000 rpm e 200W	T 5 min + US 30 min	304 ± 1	424 ± 1	583 ± 4

Os resultados demonstraram que o Ultra Turrax operado a 10.000 rpm foi o método menos eficiente, resultando em altos valores de tamanho médio de partícula (ordem de 1 μ m),

além de distribuição heterogênea, com dois tamanhos médios, como pode ser observado nas Figuras B.1 a B.9 do anexo B. O uso de um maior tempo de exposição não possibilitou reduzir satisfatoriamente o tamanho dos aglomerados.

A aplicação de ultrassom (200 W) por 45 minutos para desagregação das partículas resultou em distribuição menos polidispersa e menor tamanho médio de agregados, com valores entre 346 e 426 nm. Esses dados estão de acordo com as observações feitas por microscopia eletrônica de varredura, nas quais foi verificado que os agregados de partículas tratadas com UltraTurrax (10.000 rpm por 5 minutos) apresentaram-se maiores do que os das tratadas com ultrassom (200 W por 45 minutos), conforme já apresentado na Figura 5.3.

Apesar dos resultados pouco satisfatórios, estudou-se a possibilidade de empregar menores tempos de desagregação, utilizando maiores velocidades de agitação no Ultra Turrax, visto que seria estrategicamente favorável para a redução do tempo de dispersão. Com agitação de 22.000 rpm por 5 minutos, foi possível reduzir o tamanho de partícula e homogeneizar sua distribuição. Contudo, o aumento no tempo de exposição apresentou mínimo efeito, de forma que os resultados obtidos após 35 minutos de agitação não diferiram consideravelmente daqueles após 5 minutos. A ação redutora do Ultra Turrax, nesse caso, pode ser devida ao efeito mecânico que força as partículas a passar entre os orifícios de seu impelidor, de forma que esse efeito foi obtido logo no início do tratamento.

Tendo em vista os resultados apresentados, optou-se pela combinação dos dois métodos. Assim, utilizou-se o Ultra Turrax em sua velocidade máxima (24.000 rpm) por 5 minutos e sonicação (200W) por 30 minutos. Esse foi o procedimento que resultou em menor tamanho de partícula e distribuição menos polidispersa. Todavia, não foi possível alcançar o tamanho de partícula anunciado pelo fabricante. Resultados similares foram obtidos por Zhang *et al.* (2007 e 2008), Espitia *et al.* (2013a e 2013b), Ann *et al.* (2014) e Pasquet *et al.* (2014), que obtiveram tamanho médio de nanopartículas de ZnO superiores ao tamanho nominal divulgado pelos fabricantes.

Além do mais, observou-se que, conforme a dispersão da distribuição de tamanho das partículas foi reduzida, os valores de α e β convergiram. Apesar disso, é importante mencionar que os parâmetros α e β não levam às mesmas conclusões, visto que conforme β foi reduzido utilizando os diferentes tratamentos de desagregação, α apresentou leve aumento. É possível que o parâmetro β (diâmetro médio ponderado pela distribuição de volume) favoreça o deslocamento da distribuição de tamanho de partícula para faixas de maior tamanho.

A combinação dos dois métodos de desagregação foi a condição na qual esses parâmetros se apresentaram mais próximos. Reduções adicionais poderiam eventualmente ser alcançadas pela alteração do pH, de forma a propiciar a repulsão entre as partículas ou mesmo pela adição de agentes estabilizantes da dispersão, mas ambas as situações poderiam acarretar efeitos indesejáveis na estrutura dos filmes de alginato.

6.2 Efeito das condições de processamento na redução do tamanho das partículas de ZnO_{nano} II

Para melhorar a desagregação das nanopartículas e melhorar a estabilidade do nanofluido resultante, também foi avaliado o uso do próprio alginato de sódio como agente dispersante. Para isso, uma alíquota de 0,36 g de alginato foi previamente adicionada a 400 mL de água deionizada e a mistura foi mantida sob agitação até completa solubilização. Em seguida, adicionou-se o ZnO_{nano} (0,18 g) e o processo de desagregação foi realizado combinando-se o emprego do Ultra Turrax (24.000 rpm por 5 minutos) e ultrassom (200 W por 30 minutos). Essa estratégia foi utilizada apenas para a desagregação das nanopartículas do tipo II (<50 nm), devido ao seu tamanho reduzido e, portanto, maior potencial em modificar os atributos funcionais dos filmes biodegradáveis. Para efeito de comparação, foi realizado o mesmo ensaio de desagregação das nanopartículas do tipo II sem o uso do alginato como agente dispersante.

A quantidade de alginato foi escolhida com base no trabalho de Hwang *et al.* (2008), no qual a desagregação de nanopartículas de carbono foi significativamente melhorada empregando-se uma massa de dodecil sulfato de sódio (SDS) correspondente a 2 vezes a massa de partículas. O SDS é um surfactante aniônico contendo uma extremidade polar negativamente carregada e uma extremidade apolar contendo 12 carbonos. Devido ao seu caráter anfifílico, as moléculas do SDS podem adsorver à superfície das partículas e reduzir o potencial zeta das mesmas, garantindo repulsão eletrostática suficiente para evitar a re-aglomeração das nanopartículas. O alginato, por outro lado, é um polissacarídeo que quando em solução aquosa apresenta conformação helicoidal semirrígida e ordenada, além de possuir muitos grupos O-H e grupos carboxílicos ionizados disponíveis formação cooperativa de interações inter e intracadeia (RINAUDO, 2008). O alginato também apresenta grupos C-H que lhe permite formar domínios hidrofóbicos para reduzir o contato com outras moléculas polares, como, por exemplo, a água (RINAUDO, 2006). Pelas diferenças estruturais e conformacionais descritas entre o SDS e o alginato, esperava-se menor ação redutora no estado de aglomeração das nanopartículas com o uso de alginato. No entanto, outros agentes

dispersantes não foram utilizados de forma a não prejudicar a subsequente confecção dos filmes nanocompósitos à base desse poliuronato. Os resultados de tamanho e de distribuição de tamanho de partícula estão apresentados na Tabela 6.3.

As nanopartículas de ZnO_{nano} II apresentaram diâmetro médio muito superior ao anunciado pelo fabricante e maior que o determinado para a nanopartícula I. A distribuição do tamanho de partícula pode ser observada na Figura B.10 do Apêndice B.

A presença de alginato contribuiu para dispersão das nanopartículas do tipo II e, apesar de não ter sido possível obter um estado de mínima aglomeração do ZnO_{nano}, o uso desse polímero também pode contribuir para melhoria da estabilidade da dispersão. Zhang *et al.* (2007) observaram melhoria da estabilidade de suspensões de ZnO_{nano} ao empregar polietileno glicol e polivinilpirrolidona em quantidade correspondente a 10% do total de nanopartículas. No entanto, os autores desse trabalho não observaram melhoria na redução da agregação das partículas. Em outro trabalho, Witharana *et al.* (2013) utilizaram diversas macromoléculas como goma arábica, copolímero em blocos, ácido graxo policondensado e dioctil sulfosuccinato de sódio para dispersão de nanopartículas de TiO₂ em soluções aquosas de etileno glicol ou propileno glicol. De acordo com os autores, o uso de moléculas de alta massa molar permitiria a interação com diversas regiões superficiais das partículas, formando camadas duráveis de adsorção. No entanto, foi observada melhoria na estabilidade das dispersões apenas com o uso do dioctil sulfosuccinato de sódio. Apesar de os autores desse estudo não fornecerem explicações para a baixa estabilidade observada utilizando os demais dispersantes, é possível que as macromoléculas escolhidas apresentassem pouca afinidade ao óxido de titânio, resultando em menor estabilização da dispersão. O dioctil sulfosuccinato de sódio é um agente tensoativo, podendo ter contribuído para estabilidade do nanofluido de TiO₂ através de estabilização estérica.

Tabela 6.3: Tamanho médio e distribuição de tamanho de partícula (tamanho nominal anunciado pelo fabricante: < 50 nm) após tratamento de desagregação empregando-se o Ultra Turrax (24.000 rpm por 5 minutos) seguido de sonicação (200 W por 30 minutos) na presença ou ausência de alginato de sódio como dispersante

Quantidade de alginato (g)	α (nm)	β (nm)	D(v,0.1) (nm)	D(v,0.5) (nm)	D(v,0.9) (nm)
0,00	6.356 ± 23	23.259 ± 975	2.698 ± 7	12.589 ± 54	30.482 ± 2.320
0,36	626 ± 1	3.450 ± 808	368 ± 4	574 ± 8	5.848 ± 301

Não se descarta, entretanto, a possibilidade de a presença de alginato na superfície das partículas ter causado maior efeito no espalhamento da luz, resultando em maiores diâmetros médios.

6.3 Análise geral do efeito da estratégia de desagregação das partículas

Utilizando os recursos disponíveis nos Laboratórios de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos e de Engenharia de Bioreações e Colóides, não foi possível obter o tamanho de partícula anunciado pelo fabricante. O método que se apresentou mais eficiente para desagregação das partículas foi a combinação do uso de Ultra Turrax (24.000 rpm por 5 minutos) seguido de sonicação (200 W por 30 minutos). Nessas condições, o tamanho médio de partícula ficou entre 410 e 435 nm, e dentre todas as condições examinadas, esta foi a que apresentou distribuição menos polidispersa (Figura B.9).

Dessa forma, os ensaios subsequentes de produção dos filmes nanocompósitos foram realizados utilizando essas condições de tratamento.

O uso do alginato como agente dispersante contribuiu para minimizar a agregação das nanopartículas do tipo II (<50 nm), no entanto, os resultados de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula foram superiores aos determinados para o ZnO_{nano} do tipo I. Contudo, em ensaios preliminares, filmes de alginato não reticulados com cálcio foram fabricados utilizando-se o ZnO_{nano} do tipo II disperso com auxílio do mesmo biopolímero e melhorias nas propriedades como cor, transparência e manuseio foram observadas. Por essa razão, o uso das nanopartículas do tipo II dispersas com alginato foi incluído para fabricação dos filmes nanocompósitos. Esses filmes foram identificados com a sigla AL e a quantidade total de alginato utilizada foi de 6 g adicionadas em duas etapas: 0,36 g para dispersão das nanopartículas, e o restante adicionado como descrito no item 4.3.1.

Além disso, o custo da nanopartícula tipo I é de R\$ 12,44/g, enquanto o da nanopartícula tipo II é de R\$ 64,00/g. Assim, a formulação contendo 20% das nanopartículas do tipo I apresenta um custo de nanopartículas (R\$ 14,93) similar a uma formulação contendo 3% das nanopartículas tipo II (R\$ 11,52). Por essa razão, apenas o conteúdo de 3% do ZnO_{nano} II foi utilizado nos ensaios subsequentes, de modo a verificar se a adição das nanopartículas de menor tamanho médio traria benefícios funcionais com um custo compatível com o obtido com o outro material de reforço.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO: INFLUÊNCIA DO AGENTE RETICULANTE E DO TIPO DE MATERIAL CONSTITUINTE DA FASE DISPERSA

Neste capítulo, foi avaliada a influência do agente reticulante e do material constituinte da fase dispersa, explicitamente o cálcio e partículas de ZnO I e II, respectivamente, nas propriedades dos filmes de alginato, empregando-se as condições de desagregação das nanopartículas explicitadas no Capítulo 6. Para isso, os filmes foram confeccionados em três grupos principais, conforme apresentado a seguir e sumarizado na Tabela 7.1:

- a) Filmes não reticulados com cálcio contendo nanopartículas I (SC) e contendo nanopartículas II dispersas utilizando-se o próprio alginato como agente dispersante (SC AL II);
- b) Filmes reticulados em primeiro estágio contendo nanopartículas I (RP), contendo nanopartículas II (RP II) e contendo nanopartículas II dispersas com auxílio do alginato como agente dispersante (RP AL II);
- c) Filmes duplamente reticulados contendo nanopartículas I (RS) e contendo nanopartículas II dispersas empregando-se o alginato como agente dispersante (RSAL II).

Tabela 7.1: Descrição das legendas utilizadas para identificação dos filmes.

Identificação	Descrição do filme
X*% SC I	Filme não reticulado com cálcio contendo 5, 10 ou 20% de ZnO _{nano} I
X*% SC AL II	Filme não reticulado com cálcio contendo 3% de ZnO _{nano} II dispersas utilizando-se o próprio alginato como agente dispersante
Controle RP	Filme sem ZnO _{nano} reticulado em um estágio
X*% RP I	Filme reticulado em primeiro estágio contendo 3, 10 ou 20% de ZnO _{nano} I
X*% RP AL II	Filme reticulado em primeiro estágio contendo 3% de ZnO _{nano} II dispersas utilizando-se o próprio alginato como agente dispersante
Controle RS	Filme sem ZnO _{nano} duplamente reticulado
X*% RS I	Filme duplamente reticulado contendo 3, 10 ou 20% de ZnO _{nano} I
X*% RS AL II	Filme duplamente reticulado contendo 3% de ZnO _{nano} II dispersas utilizando-se o próprio alginato como agente dispersante

X refere-se à proporção mássica de nanopartículas adicionadas (g ZnO/g alginato), igual a 3, 5, 10 ou 20.

7.1 Filmes não reticulados com cálcio

Não foi possível obter filmes sem reticulação com cálcio e isentos de nanopartículas de ZnO, de forma que não há um filme “controle” para comparação com os filmes nanocompósitos. No entanto, essa se torna uma primeira evidência do papel estruturante das partículas de ZnO, visto que foi possível obter filmes a partir da concentração de 5% de nanopartículas I. Entretanto, ao empregar a nanopartícula II, notou-se a formação do filme a partir da concentração de 3%, provavelmente devido à ocorrência de maior número de interações entre a fase dispersa e a fase contínua.

Nas Tabelas 7.2 e 7.3 são apresentados os resultados de cor dos filmes confeccionados sem reticulação primária com íons cálcio. Os resultados demonstram que as nanopartículas I têm grande influência na cor, de modo que o aumento de sua concentração diminuiu o parâmetro L*, referente à luminosidade e aumentou os parâmetros a* e b*. Com relação ao ângulo Hue (Tabela 7.3), os filmes apresentaram tonalidade entre o amarelo e o amarelo esverdeado. Com o aumento da concentração de partículas, houve aumento do Cromo, indicando aumento da intensidade da cor. Também se notou o aumento da opacidade com o aumento da concentração de partículas. O filme confeccionado com 3% da nanopartícula II apresentou menor influência da cor e menor opacidade. Isso se deve ao menor tamanho das partículas utilizadas, que tem menor influência no espalhamento da luz.

A diferença na cor é observada na Figura 7.1 na qual se pode avaliar o aspecto visual dos filmes produzidos sem cálcio.

Tabela 7.2: Parâmetros de cor L*, a* e b* dos filmes nanocompósitos não reticulados com cálcio.

Filmes	L*	a*	b*
05% SC I	92,20 ± 0,82 ^c	-0,22 ± 0,03 ^a	8,72 ± 1,35 ^b
10% SC I	87,76 ± 1,02 ^b	0,37 ± 0,09 ^b	12,68 ± 1,10 ^c
20% SC I	80,12 ± 1,30 ^a	0,87 ± 0,02 ^c	16,31 ± 1,05 ^d
03% SC AL II	96,59 ± 0,14 ^d	-0,25 ± 0,04 ^a	2,86 ± 0,48 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Observou-se também que, com o aumento da concentração de partículas I, o manuseio e a remoção dos filmes dos moldes foram facilitados. Ainda, os filmes contendo menor concentração de nanopartículas I (5%) apresentaram maior tendência à auto-adesão. O filme

contendo 3% da nanopartícula II foi mais facilmente removido dos moldes e mais fácil de manipular que os demais filmes do grupo SC, resultante do maior efeito de reforço do ZnO_{nano} II. Além disso, foi o filme que apresentou menor tendência à auto-adesão.

Tabela 7.3: Parâmetros de cor °Hue, croma e opacidade dos filmes nanocompósitos não reticulados com cálcio.

Filmes	°Hue	Croma	Opacidade (%)
05% SC I	-88,45 ± 0,43 ^a	8,72 ± 1,35 ^b	8,72 ± 1,35 ^b
10% SC I	88,36 ± 0,34 ^d	12,68 ± 1,10 ^c	16,12 ± 0,47 ^c
20% SC I	86,91 ± 0,21 ^c	16,34 ± 1,00 ^d	17,97 ± 0,10 ^d
03% SC AL II	-85,00 ± 0,07 ^b	2,87 ± 0,49 ^a	6,50 ± 0,47 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Figura 7.1: Aspecto visual dos filmes nanocompósitos não reticulados cálcio (SC).



Na Tabela 7.4, são apresentados os dados de permeabilidade e teor de umidade dos filmes não reticulados com cálcio. Não foram observadas diferenças no teor de umidade entre os filmes preparados sem cálcio e com diferentes concentrações de ZnO.

Houve aumento da permeabilidade ao vapor d'água com o incremento da concentração de ZnO de 5 para 10%. Com adicional aumento da concentração de nanopartículas, não foi observada alteração na permeabilidade ao vapor d'água, conforme valor observado para o filme 20% SC. O filme contendo 3% da nanopartícula II dispersa com alginato não diferiu do filme 5% SC em relação à PVA.

Tabela 7.4: Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e teor de umidade (ω) dos filmes nanocompósitos não reticulados com cálcio.

Filme	PVA (g·mm/m ² ·dia·kPa)	ω (%)
05% SC I	9,57 ± 0,72 ^a	31,3 ± 3,8 ^a
10% SC I	13,98 ± 0,56 ^b	31,7 ± 1,7 ^a
20% SC I	15,52 ± 0,20 ^b	32,6 ± 1,7 ^a
03% SC Al II	11,22 ± 1,11 ^a	33,7 ± 3,5 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Na Tabela 7.5, são apresentados os resultados de propriedades mecânicas dos filmes nanocompósitos não reticulados com Ca⁺⁺. Não houve diferença significativa no alongamento dos filmes, entretanto, os filmes com 5% de ZnO apresentaram maior tensão na ruptura e módulo de elasticidade que os demais filmes. Com 20% de ZnO, o filme apresentou espessura significativamente maior que os filmes formulados com quantidades menores do óxido.

Tabela 7.5: Propriedades mecânicas e espessura dos filmes nanocompósitos não reticulados com cálcio.

Filme	TR (MPa)	E (%)	MY (MPa)	Espessura (μ m)
05% SC I	12,17 ± 1,92 ^b	18,75 ± 5,25 ^a	131,97 ± 10,05 ^c	35,3 ± 2,6 ^a
10% SC I	8,02 ± 1,42 ^b	26,89 ± 2,85 ^a	42,91 ± 5,49 ^b	36,9 ± 3,2 ^a
20% SC I	7,54 ± 1,48 ^{ab}	26,38 ± 11,52 ^a	51,15 ± 9,65 ^b	49,1 ± 4,6 ^b
03% SC Al II	5,81 ± 1,26 ^{ab}	27,16 ± 6,97 ^a	26,23 ± 8,99 ^a	34,7 ± 4,7 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

O filme fabricado com a nanopartícula II apresentou tensão na ruptura e módulo de Young inferiores aos demais filmes, sem, no entanto, se observar alteração no alongamento. Apesar do maior efeito de reforço obtido com o ZnO_{nano} II, é possível que a redução do tamanho das cadeias de alginato, resultante do processo de desagregação utilizado, tenha sido responsável pela queda observada no módulo de elasticidade. Tal efeito de redução das cadeias do polímero torna-se mais crítico devido à ausência do processo de reticulação que tem grande influência na estruturação do material.

A produção dos filmes sem cálcio e com nanopartículas de ZnO é possível, provavelmente, pela interação entre as partículas e as cadeias do polímero, em um

comportamento similar à reticulação. Nessa perspectiva, as partículas de ZnO são capazes de manter as cadeias de alginato unidas através de ligações de hidrogênio e formar uma matriz tridimensional organizada.

Um efeito de reforço no filme foi observado com a proporção de 5% de ZnO, tendo em vista as propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor d'água superiores às demais formulações. Nessa concentração, há proporção suficiente de partículas disponíveis para interagir com as cadeias poliméricas, obtendo-se uma mínima estruturação da matriz de alginato. Adicionalmente, é possível ainda que nessa concentração menor, permita-se a interação entre as cadeias de alginato por ligações de hidrogênio, o que explicaria a tendência à auto-adesão mais pronunciada nessa formulação.

A ausência de cálcio, possivelmente, reduz a compactação da matriz polimérica, de forma que a uma elevada carga de partículas (i.e., 20%) seja observada maior espessura.

7.2 Filmes Reticulados em primeiro estágio (RP) e Filmes Reticulados em primeiro e segundo estágio (RS)

Como o emprego da reticulação incipiente permitiu a obtenção dos filmes de alginato, as concentrações de ZnO foram definidas de forma a permitir a comparação com dados encontrados na literatura, ou seja, no intervalo de 3 a 20%, conforme descrito nos trabalhos de Arfat *et al.* (2014) e Espitia *et al.* (2013a), respectivamente, não sendo necessário o uso da concentração de 5% nessa etapa do estudo.

Nas Tabelas 7.6 e 7.7 são apresentados os valores dos parâmetros de cor para os filmes reticulados em primeiro estágio (RP) e submetidos às reticulações primária e secundária (RS). Assim como para os filmes SC, os atributos de cor dos filmes RP e RS foram significativamente alterados pelo conteúdo de ZnO_{nano} nos filmes nanocompósitos. Enquanto os filmes controle, RP e RS, apresentaram-se transparentes, os filmes com nanopartículas de óxido de zinco apresentaram aparência branca ou amarelada.

Os parâmetros Hue e Chroma foram similarmente afetados pelo aumento da concentração de ZnO, independente do grau de reticulação (conforme apresentado nas Tabelas 7.2, 7.3, 7.6 e 7.7). O incremento de ZnO_{nano} de 3 para 20% alterou a tonalidade (Hue) de azul para amarelo e gradualmente a intensidade dessa tonalidade (Chroma) foi acentuada. Quando comparados aos filmes controle, a diferença total de cor (ΔE^*) apresentou incremento gradual com a adição de maiores conteúdos de ZnO, de forma que tendência similar foi observado para os filmes reticulados em primeiro estágio. Dentre os filmes

nanocompósitos, o filme preparado com a nanopartícula II apresentou menor ΔE^* , provavelmente devido ao menor tamanho de partícula.

Tabela 7.6: Parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ΔE^* dos filmes controle e nanocompósitos reticulados somente em primeiro estágio (RP) e em primeiro e segundo estágio (RS).

Filmes	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
Controle RP	$95,45 \pm 0,20^d$	$-0,17 \pm 0,02^b$	$1,69 \pm 0,37^{ab}$	-
3% RP	$93,80 \pm 0,25^c$	$-0,43 \pm 0,03^a$	$6,69 \pm 0,55^c$	5,27
10% RP	$88,13 \pm 1,22^b$	$0,32 \pm 0,12^d$	$12,34 \pm 1,38^f$	12,93
20% RP	$82,40 \pm 1,96^a$	$0,89 \pm 0,04^f$	$15,19 \pm 1,54^g$	18,81
3% RP II	$95,70 \pm 0,35^{dc}$	$-0,38 \pm 0,06^a$	$3,82 \pm 0,75^d$	2,15
3% RP AL II	$96,75 \pm 0,14^f$	$-0,20 \pm 0,04^b$	$2,39 \pm 0,45^{bc}$	1,47
Controle RS	$96,16 \pm 0,07^c$	$-0,05 \pm 0,01^c$	$1,59 \pm 0,23^a$	-
3% RS	$93,26 \pm 0,37^c$	$-0,16 \pm 0,05^b$	$6,63 \pm 0,74^c$	5,82
10% RS	$88,53 \pm 0,23^b$	$0,63 \pm 0,05^c$	$10,69 \pm 0,33^f$	11,9
20% RS	$82,38 \pm 0,89^a$	$1,52 \pm 0,03^g$	$15,06 \pm 1,93^g$	19,33
3% RS AL II	$96,17 \pm 0,12^c$	$-0,18 \pm 0,02^b$	$3,05 \pm 0,33^{cd}$	1,46

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 7.7: Parâmetros de cor $^\circ\text{Hue}$, croma e opacidade dos filmes controle e nanocompósitos reticulados somente em primeiro estágio (RP) e em primeiro e segundo estágio (RS).

Filmes	$^\circ\text{Hue}$	Croma	Opacidade (%)
Controle RP	$-84,07 \pm 0,72^d$	$1,69 \pm 0,37^{ab}$	$3,80 \pm 0,12^b$
3% RP	$-86,26 \pm 0,05^b$	$6,70 \pm 0,55^c$	$6,20 \pm 0,25^c$
10% RP	$88,40 \pm 0,34^g$	$12,54 \pm 1,48^f$	$16,33 \pm 1,23^f$
20% RP	$86,59 \pm 0,20^f$	$15,21 \pm 1,80^g$	$17,77 \pm 0,14^g$
3% RP II	$-84,34 \pm 0,18^d$	$3,84 \pm 0,75^d$	$4,60 \pm 0,60^b$
3% RP AL II	$-85,30 \pm 0,02^c$	$2,40 \pm 0,45^{bc}$	$6,53 \pm 0,64^{cd}$
Controle RS	$-88,14 \pm 0,46^a$	$1,59 \pm 0,23^a$	$1,37 \pm 0,47^a$
3% RS	$-88,64 \pm 0,37^a$	$6,64 \pm 0,74^c$	$10,07 \pm 0,64^c$
10% RS	$86,62 \pm 0,34^f$	$10,71 \pm 0,33^f$	$18,43 \pm 0,16^h$
20% RS	$84,16 \pm 0,69^c$	$15,14 \pm 1,92^g$	$22,1 \pm 0,15^i$
3% RS AL II	$-86,66 \pm 0,19^c$	$3,06 \pm 0,33^{cd}$	$7,35 \pm 0,30^d$

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Essa mudança substancial nas propriedades de cor se deve ao tamanho reduzido das nanopartículas II comparadas às nanopartículas I, visto que com a diminuição do tamanho das

partículas, as mesmas se tornam menos susceptíveis aos efeitos óticos da luz visível. Além disso, o uso do alginato como agente dispersante pode ter contribuído para aumentar a estabilidade do nanofluido, resultando em menor diferença de cor em relação ao controle. A mudança da cor pode ser observada no aspecto visual dos filmes, conforme apresentado nas Figuras 7.2 e 7.3.

Além disso, a opacidade dos filmes foi afetada pela concentração de ZnO_{nano} e pelo grau de reticulação. O aumento no conteúdo de cálcio reduziu a opacidade do filme controle de 3,80 para 1,17%, comportamento esperado devido à formação de uma matriz polimérica mais compacta, reduzindo a difração e refração da luz. No caso dos filmes nanocompósitos, notou-se que ao aumentar o grau de reticulação (comparando-se os resultados de opacidade dos filmes RP e filmes RS) houve aumento da opacidade, de forma que a possível redução na distância entre as nanopartículas, decorrente do maior empacotamento das cadeias poliméricas, pode ter sido responsável pela diminuição da transparência.

Figura 7.2: Aspecto visual dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro estágio (RP).

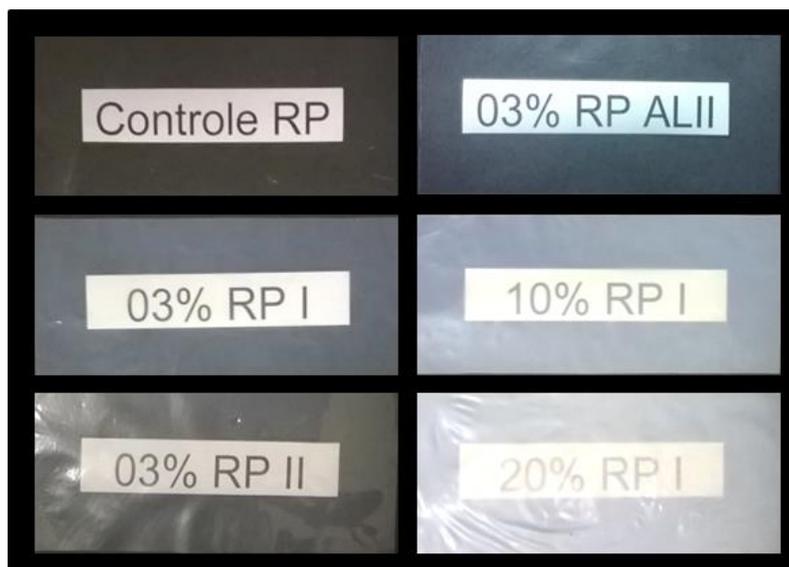
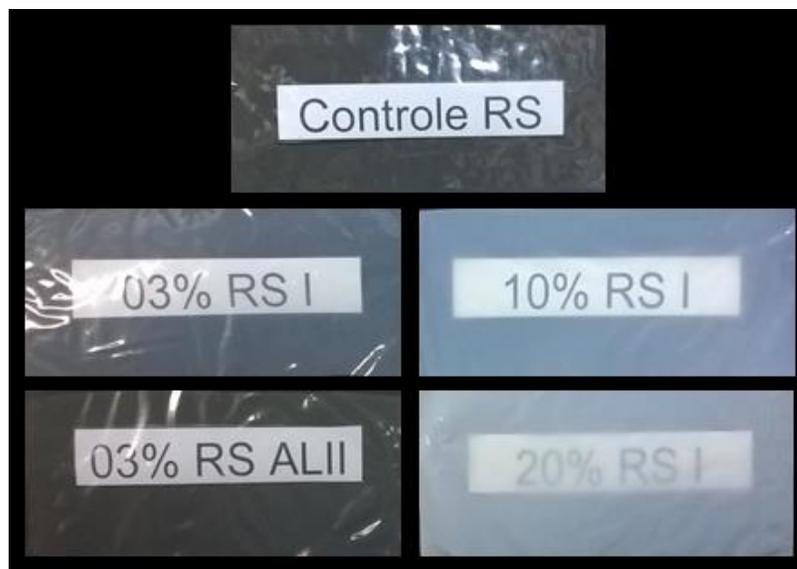


Figura 7.3: Aspecto visual dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro e segundo estágio (RS).



A opacidade é um atributo de grande importância para materiais usados em coberturas e embalagens de alimentos (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992), visto que possibilita o monitoramento do aspecto do produto e também pode chamar a atenção do consumidor. Para o tratamento de lesões de pele, o monitoramento do processo de cicatrização é altamente desejável, tornando a transparência um importante atributo funcional (BIERHALZ; WESTIN; MORAES, 2016). Apesar do aumento da opacidade com a adição de ZnO_{nano} , é possível observar pela Figura 7.3 que até a concentração de 3% os filmes apresentam transparência satisfatória para seu emprego em embalagem de alimentos ou curativos, especialmente a formulação 3 RS AL II, devido aos menores resultados de diferença de cor e opacidade.

Espitia *et al.* (2013a) também observaram que o aumento na concentração de ZnO_{nano} em filmes nanocompósitos de metil celulose e ZnO resultou no incremento da opacidade. Além disso, o acréscimo da concentração de ZnO foi responsável por reduzir os valores dos parâmetros L^* e b^* , alterando a luminosidade e a coloração azul/verde. Rhim *et al.* (2006) observaram uma redução na transparência, além de redução dos parâmetros L^* and b^* após adição de 5% de nanopartículas de prata em filmes nanocompósitos à base de quitosana. Arfat *et al.* (2014) também descreveram resultados similares para a adição de 3% de ZnO_{nano} a filmes de proteína isolada de peixe e gelatina de pele de peixe.

Na Tabela 7.8 são apresentados os resultados de PVA, umidade e absorção em água, PBS e FBS dos filmes reticulados em primeiro estágio e dos filmes reticulados em primeiro e

segundo estágio. Diferentemente dos filmes sem cálcio, não foram observadas diferenças significativas de PVA e umidade entre os filmes submetidos aos mesmos tratamentos de reticulação. Observou-se, também, uma redução na PVA e na umidade dos filmes controle e nanocompósitos após a realização da reticulação secundária.

Tabela 7.8: Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e teor de umidade (ω) dos filmes controle e nanocompósitos reticulados em primeiro estágio (RP) e reticulados em primeiro e segundo estágio (RS).

Filme	PVA (g·mm/m ² ·dia·kPa)	ω (%)	Absorção H ₂ O (%)	Absorção PBS (%)	Absorção SFB (%)
Controle RP	8,35 ± 1,26 ^b	33,8 ± 2,7 ^b	SF	SF	SF
3% RP I	9,35 ± 0,26 ^b	35,3 ± 1,2 ^b	SF	SF	SF
10% RP I	10,32 ± 0,63 ^b	33,9 ± 0,5 ^b	SF	SF	SF
20% RP I	10,65 ± 0,85 ^b	32,5 ± 5,0 ^b	SF	SF	SF
3% RP II	9,30 ± 0,49 ^b	31,0 ± 5,9 ^b	SF	SF	SF
3% RP AL II	11,22 ± 1,11 ^b	36,7 ± 3,5 ^b	SF	SF	SF
Controle RS	3,16 ± 0,37 ^a	23,2 ± 2,0 ^a	132,7 ± 7,1 ^b	SF	905,6 ± 49,7 ^b
3% RS I	3,31 ± 0,36 ^a	20,4 ± 0,7 ^a	130,4 ± 12,9 ^b	2786,3 ± 461,7 ^a	971,5 ± 51,2 ^b
10% RS I	3,29 ± 0,14 ^a	22,2 ± 1,3 ^a	122,1 ± 5,5 ^b	SF	1060,2 ± 65,7 ^b
20% RS I	3,25 ± 0,05 ^a	19,3 ± 2,1 ^a	120,0 ± 6,0 ^b	3107,3 ± 332,5 ^b	957,9 ± 92,3 ^b
3% RS AI II	3,36 ± 0,20 ^a	23,6 ± 1,7 ^a	113,0 ± 5,2 ^a	2886,4 ± 297,3 ^a	833,0 ± 81,0 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey. SF: solubilização do filme.

Rhim (2004) e Olivas e Barbosa-Cánovas (2008) também observaram uma redução da PVA com o aumento do grau de reticulação em filmes de alginato de cálcio. Isso se deve provavelmente à redução da mobilidade segmental das cadeias poliméricas que pode reduzir a permeação de moléculas de água através do filme (RHIM, 2004).

Kanmani e Rhim (2014) fabricaram filmes de ágar, carragena ou CMC e seus respectivos nanocompósitos com ZnO e observaram que a incorporação de óxido de zinco não afetou significativamente a PVA. O valor médio encontrado nesse trabalho foi de 164 g·mm/m²·dia·kPa. No entanto, Arfat *et al.* (2014) notaram uma redução de 50% no valor da PVA após a incorporação de ZnO_{nano} (tamanho médio entre 20 e 40 nm) a filmes de proteína isolada de peixe e gelatina de pele de peixe, atribuindo tal comportamento à natureza

hidrofóbica das nanopartículas e à introdução de caminhos tortuosos dentro da matriz polimérica. Esses autores não utilizaram plastificante na formulação de seus filmes, componente que pode contribuir para o aumento da PVA.

Um curativo ideal deve controlar a perda de água por evaporação, de forma tanto a prevenir a desidratação excessiva quanto o acúmulo de fluido (RUIZ-CARDONA *et al.* 1996). A taxa de transmissão de vapor (TTV), i. e., a taxa de evaporação de água por unidade de área da pele é de aproximadamente $0,003 \text{ gm}^{-2}\text{s}^{-1}$ para queimaduras de primeiro grau e pode alcançar valores de $0,06 \text{ gm}^{-2}\text{s}^{-1}$ para lesões em granulação (CHIU *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2010), enquanto a pele normal possui TTV ao redor de $0,002 \text{ gm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LAMKE; NILSSON; REITHNER, 1977).

A TTV média dos filmes RP e RS foi de 0,002 e 0,001 $\text{gm}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Considerando esses valores, os curativos nanocompósitos poderiam ser recomendados para lesões apresentando de baixa a média exsudação.

No que se refere à discussão enfocando a aplicação dos materiais obtidos no campo de embalagens de alimentos, pode-se comparar os resultados obtidos aos descritos por Bajpal *et al.* (2012) para filmes de alginato contendo ZnO_{nano} (2,5% e tamanho médio de 54 nm) e reticulados com cálcio. O valor médio de PVA divulgado nesse trabalho foi de $1.011 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa}$, muito superior ao obtido no presente estudo. Essa grande diferença pode estar relacionada ao alto conteúdo de glicerol (aproximadamente 5%, v/v) e o maior teor de alginato utilizado (4% na solução filmogênica, m/v) utilizados pelos autores quando comparados às condições utilizadas no presente trabalho. Esses componentes contribuem fortemente para o aumento da hidrofobicidade e, conseqüentemente, da própria PVA. Os autores também relataram que com a adição de ZnO aos filmes, houve aumento na taxa de transmissão de vapor, sendo observados valores de $0,61 \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-2}$ para o filme controle e $0,82 \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-2}$ para o filme nanocompósito contendo 2,5% de ZnO_{nano} . Apesar de não ter sido observado aumento do PVA com a adição de ZnO_{nano} aos filmes RP e RS, notou-se um aumento dessa propriedade nos filmes SC com o aumento da concentração de óxido de zinco. Isso se deve possivelmente ao efeito de compactação da matriz polimérica devido ao processo de reticulação, além de maior uniformidade da distribuição de Ca^{++} no processo adotado na confecção dos filmes do que no trabalho dos autores mencionados. Para embalar produtos processados são desejáveis baixos valores de PVA, de forma a evitar a troca de massa com o ambiente externo. Neste sentido, dentre os grupos de filmes fabricados, as formulações do grupo RS seriam as mais adequadas quanto a esse requisito.

Os estudos de intumescimento demonstraram que ambos os tipos de filmes, controle e nanocompósitos, se comportaram de maneira diferente dependendo da composição do fluido. Os dados de intumescimento dos filmes SC e RP não foram apresentados, pois estes filmes se solubilizaram por completo nos três fluidos testados. Em água e SFB, os filmes controle e nanocompósitos duplamente reticulados apresentaram intumescimento similar. Todavia, o intumescimento em SFB foi sete vezes superior que em água, provavelmente devido à diferença de pH e a uma possível solubilização dos íons cálcio. George e Abraham (2007) observaram uma elevação na razão de intumescimento de hidrogéis de alginato e goma guar com o aumento do pH de 1,2 para 7. Além disso, os filmes fabricados com nanopartículas do tipo II (formulação 3% RS AL II) apresentaram intumescimento significativamente menor que os demais filmes. A maior interação decorrente da maior área interfacial do ZnO_{nano} II pode ter sido responsável pela redução do intumescimento. Como já mencionado na avaliação dos filmes SC, um mecanismo similar à reticulação pode ocorrer com interação entre a fase dispersa e a fase contínua, resultando em uma menor quantidade de alginato disponível para interagir com a água. Espitia *et al.* (2013a) observaram que a incorporação de ZnO_{nano} reduziu o intumescimento de 21,3 para 16,4 g de H₂O/g de filme.

Quando imerso em PBS, o filme controle RS foi completamente solubilizado e intumescimento intenso foi observado também para os filmes nanocompósitos. Isso pode ser atribuído à troca iônica do cálcio a partir da matriz de alginato, por exemplo, por sódio presente na solução ou ainda devido ao deslocamento de Ca⁺⁺ por grupos fosfato, resultando em dissolução do filme controle RS. Entretanto, os filmes nanocompósitos se mostraram estáveis devido à interação das nanopartículas de ZnO com as moléculas do polímero, assegurando a integridade dos filmes durante os ensaios de intumescimento. Esses resultados demonstram o potencial de materiais nanocompósitos de alginato para aplicações como curativos para lesões de pele. Quando em contato com fluidos contendo sódio, como o exsudato de feridas dérmicas, os filmes nanocompósitos de alginato-ZnO podem manter sua integridade, assegurando altos níveis de absorção de fluidos, ideais para lesões de média a média-alta exsudação.

Membranas liofilizadas de alginato, quitosana e ZnO_{nano} foram preparadas por Mohandas *et al.* (2015). Nesse estudo, os autores observaram que a presença de ZnO em concentrações acima de 0,75% reduziu o intumescimento das membranas em PBS. Ao contrário dos filmes nanocompósitos preparados na presente dissertação de mestrado, o material preparado pelos autores não foi reticulado com íons divalentes e, por essa razão, é

possível que, devido às interações com ZnO, as cadeias dos polissacarídeos estivessem menos disponíveis para interagir com o fluido. Nesse sentido, as nanopartículas de óxido de zinco possivelmente atuaram como agente reticulante das moléculas de alginato e quitosana.

Na Tabela 7.9, são apresentados os resultados de massa solubilizável nos três fluidos utilizados para os ensaios de intumescimento.

Tabela 7.9: Massa solubilizável (MS) dos filmes controle e nanocompósitos duplamente reticulados (RS) após 7 dias em diferentes soluções: água (25°C), tampão fosfato salino (PBS, 37°C) e soro fetal bovino (SFB, 37°C).

Filme	MS H ₂ O (%)	MS PBS (%)	MS SFB (%)
Controle RS	33,22 ± 2,42 ^a	100	15,06 ± 2,88 ^c
3% RS I	31,83 ± 0,31 ^a	23,95 ± 5,33 ^b	3,64 ± 0,89 ^a
10% RS I	32,76 ± 0,80 ^a	100	5,55 ± 0,24 ^b
20% RS I	32,46 ± 1,41 ^a	14,08 ± 1,85 ^a	4,74 ± 1,13 ^b
3% RS AL II	29,40 ± 2,60 ^a	11,80 ± 2,10 ^a	15,10 ± 3,20 ^c

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Não foi observada diferença significativa entre os filmes duplamente reticulados quando intumescidos em água. Em PBS, o aumento da concentração de partículas de 3 para 20% resultou em redução da massa solubilizável, provavelmente devido ao maior número de interações entre as nanopartículas e a matriz de alginato. Contudo, observa-se que o filme preparado com nanopartículas do tipo II apresentou menor massa solubilizável em relação ao filme preparado com mesma concentração de nanopartículas I. Isso provavelmente se deve à maior interação da matriz de alginato com o ZnO_{nano} II, ocasionando o aumento da estabilidade dos filmes. Diferentemente dos demais filmes, o filme fabricado com 10% de ZnO_{nano} I foi totalmente solubilizado em PBS. É possível que uma distribuição não homogênea das partículas e efeitos de percolação tenham resultado em menor estabilidade dessa formulação.

Em SFB, foi observada menor perda de massa em comparação com o comportamento dos filmes em água. Esse fenômeno pode estar associado à adsorção e absorção dos componentes do soro fetal bovino aos filmes de alginato. Além disso, a maior interação entre a matriz de alginato e o ZnO_{nano} pode reduzir a disponibilidade das nanopartículas e do polímero para interagir com os componentes do SFB. Por outro lado, os filmes duplamente reticulados e contendo o ZnO_{nano} I apresentaram menor massa solubilizável, indicando maior

absorção das espécies químicas presentes no fluido.

Os resultados da análise de massa solubilizável indicam a manutenção e aumento da estabilidade dos filmes nanocompósitos quando em contato com ambientes de diferentes composições. Ressalta-se que a perda de glicerol dos filmes pode ter maior cômputo na massa solubilizável, devido à alta solubilidade deste plastificante nos três fluidos utilizados nos ensaios de estabilidade e também à proporção de perda de massa do glicerol corresponder, aproximadamente, à sua fração nos filmes controle e nanocompósitos (entre 20 e 30%).

Na Tabela 7.10 são apresentados os resultados de resistência mecânica e espessura dos filmes reticulados em primeiro estágio e submetidos às etapas de reticulação primária e secundária.

Tabela 7.10: Propriedades mecânicas e espessura dos filmes controle e nanocompósitos reticulados somente em primeiro estágio (RP) e reticulados em primeiro e segundo estágio (RS).

Filme	TR (MPa)	E (%)	MY (MPa)	Espessura (μm)
Controle RP	15,79 \pm 2,20 ^b	27,23 \pm 8,13 ^d	175,46 \pm 38,25 ^b	43,8 \pm 4,2 ^b
3% RP I	15,12 \pm 2,20 ^b	25,48 \pm 7,53 ^d	177,81 \pm 25,69 ^b	46,5 \pm 3,5 ^b
10% RP I	7,27 \pm 1,47 ^a	26,62 \pm 5,80 ^d	21,59 \pm 3,04 ^a	42,3 \pm 3,9 ^b
20% RP I	17,22 \pm 3,10 ^b	23,09 \pm 8,37 ^d	168,39 \pm 33,33 ^b	43,0 \pm 4,6 ^b
3% RP II	16,99 \pm 2,25 ^b	7,27 \pm 2,25 ^b	490,45 \pm 66,67 ^c	35,3 \pm 3,3 ^a
3% RP AL II	7,81 \pm 0,94 ^a	13,90 \pm 2,96 ^c	165,50 \pm 12,20 ^b	44,9 \pm 5,4 ^b
Controle RS	62,4 \pm 14,0 ^c	1,7 \pm 0,5 ^a	5.001 \pm 808 ^c	30,5 \pm 4,1 ^a
3% RS I	61,7 \pm 9,8 ^c	1,5 \pm 0,4 ^a	4.797 \pm 688 ^c	33,1 \pm 4,1 ^a
10% RS I	69,2 \pm 14,0 ^c	1,9 \pm 0,6 ^a	4.807 \pm 626 ^c	32,3 \pm 3,5 ^a
20% RS I	62,8 \pm 10,6 ^c	2,3 \pm 0,8 ^a	4.313 \pm 531 ^c	36,1 \pm 3,9 ^a
3% RS AL II	64,6 \pm 12,7 ^c	1,5 \pm 0,3 ^a	4.580 \pm 441 ^c	34,7 \pm 4,7 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Em relação aos filmes reticulados apenas em primeiro estágio, notou-se que os filmes contendo 3% da nanopartícula I não diferiram do controle em relação à tensão de ruptura, e com uma carga de 20% houve aumento significativo dessa propriedade, embora o valor final alcançado não tenha sido muito elevado. Os filmes com 3 e 20% de carga de partículas de ZnO I não diferiram entre si e nem do controle com relação ao módulo de elasticidade. Os filmes preparados com 10% de ZnO I apresentaram propriedades mecânicas de tensão na ruptura e módulo de elasticidade inferiores aos demais. Esses filmes também não diferiram

dos demais em relação ao alongamento. Os valores inferiores na tensão de ruptura e módulo de elasticidade foram confirmados pela repetição do ensaio de avaliação das propriedades mecânicas de diferentes lotes de filmes contendo 10% de ZnO_{nano} I.

Conjectura-se que o efeito do cálcio como agente estruturante dos filmes é sobreponente e não aditivo ao efeito das nanopartículas, de forma que o efeito do agente reticulante é mais acentuado que o efeito da fase dispersa com o tamanho de partícula apresentado. Isso pode ser observado pelo efeito mínimo observado em relação ao filme controle e os filmes produzidos com ZnO I. Contudo, esse efeito é dependente do tamanho das partículas que constituem a fase dispersa. Ao se utilizar as nanopartículas do tipo II, cujo tamanho nominal é de 50 nm, notou-se uma alteração drástica nas propriedades do material. Observou-se redução na espessura, redução pronunciada no alongamento e aumento de 300% no módulo de elasticidade em relação aos filmes fabricados com mesma carga de nanopartículas I. Dessa forma, acredita-se que a mudança observada se deve à intensificação das interações polímero-nanopartícula, resultante do aumento da área superficial específica do material da fase dispersa.

No entanto, nota-se que ao se utilizar o alginato como agente dispersante das nanopartículas II, uma redução da tensão de ruptura e do módulo de Young foi observada, além do aumento da espessura. É possível que a presença de segmentos de cadeias de alginato na superfície do ZnO ocasione redução da interação polímero-partícula, que é substituída pela interação polímero-polímero. No entanto, o menor alongamento observado para esses filmes em relação ao filme controle sugere a ocorrência de maior número de interações entre a matriz e a fase dispersa do que o observado quando se utiliza a nanopartícula I.

Com o emprego da reticulação secundária, a espessura dos filmes foi reduzida, provavelmente devido ao desenvolvimento de uma matriz polimérica mais compacta, em concordância com os resultados de MEV previamente apresentados (Figura 5.4). Tendências similares foram observadas por da Silva, Bierhalz e Kieckbusch (2009) para filmes de alginato e pectina com diferentes graus de reticulação com Ca⁺².

A adição de ZnO_{nano}, independentemente de seu diâmetro médio, aos filmes de alginato RS não alterou a espessura ou as propriedades mecânicas dos filmes nanocompósitos. Contudo, o grau de reticulação com íons cálcio teve um maior efeito nas propriedades mecânicas, sobretudo no alongamento e módulo de Young, devido à formação de uma estrutura polimérica mais rígida (PAVLATH; VOISIN; ROBERTSON, 1999). O alongamento foi reduzido de 25 para 1,8% (em média) e o módulo de elasticidade foi

incrementado de 173 para 4.700 MPa com o emprego do segundo estágio de reticulação. Conforme também observado por da Silva, Bierhalz e Kieckbusch (2009), a TR está relacionada com a coesividade das cadeias macromoleculares, enquanto o alongamento diz respeito à plasticidade do material, de forma que, geralmente, o incremento nos valores de TR resultam em redução do alongamento na ruptura. Especificamente para filmes de alginato, o aumento no número de reticulações induzidas por íons divalentes resulta na redução da flexibilidade e mobilidade molecular, ocasionando a redução do alongamento (CHAN; LEE; HENG, 2006; ZACTITI; KIECKBUSCH, 2006).

Com base nos resultados apresentados, é razoável concluir que o efeito da reticulação nas propriedades mecânicas foi mais pronunciado que o efeito da adição de ZnO_{nano} I ou II. Além disso, a aglomeração das nanopartículas, como apresentado nos resultados de análise por MEV, provavelmente impediu um efeito mais intenso na resistência mecânica devido ao menor aproveitamento da área interfacial entre as fases dispersa e contínua do compósito.

Vicentini, Smania e Laranjeira (2010) desenvolveram um filme nanocompósito de quitosana e PVA com ZnO_{nano} e observaram uma redução na tensão de ruptura que foi atribuída à redução na distância interatômica entre cadeias dos polímeros. De acordo com Liu e Kim (2012) a redução de ligações de hidrogênio intra/intercadeia e a formação de ligações de hidrogênio entre ZnO e quitosana foram responsáveis pelo aumento no alongamento de filmes nanocompósitos à base de quitosana, PEG e ZnO_{nano} , levando ao aumento de movimento molecular. Esses autores também notaram que o aumento de ZnO resultou na redução das propriedades mecânicas (alongamento e tensão na ruptura). Por outro lado, Espitia *et al.* (2013a) afirmaram que as propriedades mecânicas de filmes nanocompósitos de CMC e ZnO_{nano} não foram afetadas pela adição das nanopartículas.

Arfat *et al.* (2014) observaram aumento de 11,94 para 14,7 MPa na tensão de ruptura e redução no alongamento de 68 para 56% em filmes proteicos nanocompósitos contendo 3% de ZnO_{nano} . Em contrapartida, Kanmani e Rhim (2014) observaram, em filmes de ágar e ágar/ ZnO_{nano} diminuição na tensão de ruptura de 34 para 13 MPa, aumento no alongamento de 25 para 56% e redução no módulo de elasticidade de 1.005 para 110 MPa. Nos filmes de carragena e seu respectivo nanocompósito, o valor da tensão na ruptura foi reduzido de 45 para 13 MPa, o alongamento aumentou de 24 para 42% e o módulo de elasticidade de 1.112 para 130 MPa. Em filmes à base de CMC, a adição de ZnO_{nano} reduziu a tensão de ruptura de 6,4 para 5 MPa, o alongamento foi modificado de 69 para 73% e o módulo de elasticidade foi reduzido de 20 para 14 MPa. Nesse trabalho contemplando a avaliação de filmes de ágar,

carragena, CMC e seus respectivos nanocompósitos, os pesquisadores atribuíram a diminuição da resistência mecânica à interação precária entre os polímeros e as nanopartículas.

Em filmes de alginato, Akbar e Anal (2014), observaram redução na tensão de ruptura de 0,047 para 0,033 MPa após a incorporação de ZnO_{nano}. Esses valores são muito menores aos obtidos no presente trabalho, possivelmente devido à maior concentração de cálcio e quantidade de glicerol muito inferior utilizado nesta dissertação de mestrado. Nesse estudo, os autores não mencionam a massa molar do alginato de sódio utilizado, sendo possível que diferença nessa propriedade também possa ser responsável pela baixa resistência mecânica obtida pelos autores.

A resistência mecânica para curativos deve assegurar sua integridade durante a aplicação. A tensão de ruptura da pele encontra-se na faixa entre 2,5 a 16 MPa e seu módulo de elasticidade varia de 6 a 40 GPa (WANG *et al.*, 2002). Nota-se que todos os filmes desenvolvidos neste trabalho apresentaram tensão na ruptura na faixa citada, e que os filmes duplamente reticulados apresentaram-se em conformidade com o esperado valor de módulo de elasticidade. Dessa forma, os filmes nanocompósitos de alginato e ZnO desenvolvidos apresentam propriedades mecânicas adequadas para aplicação como curativos de lesão de pele. Todavia, como os filmes duplamente reticulados apresentaram baixos valores de alongamento, seu uso não seria apropriado para regiões com articulações.

Dentre os trabalhos citados relatando o desenvolvimento de nanocompósitos à base de biopolímeros para embalagens alimentícias, os filmes duplamente reticulados contendo ZnO_{nano} desenvolvidos no presente trabalho apresentaram resistência mecânica superior. Isso reforça o potencial do uso dos filmes nanocompósitos de alginato para aplicação como embalagens de alimentos.

Além disso, os resultados de determinação das propriedades mecânicas, tanto no campo das embalagens para produtos alimentícios quanto para o desenvolvimento de curativos, são importantes para correlacionar o desempenho do material frente às diversas solicitações mecânicas às quais o material possa ser submetido ao longo do seu ciclo de vida. Nesse sentido, o material obtido não poderia ser submetido a operações e manuseios envolvendo estiramento, tendo em vista os baixos valores de alongamento obtidos. Além do mais, as propriedades mecânicas determinadas no presente trabalho contribuem também para determinação de especificações técnicas quando do aumento da escala de produção dos filmes nanocompósitos.

7.3 Caracterizações complementares

Nesta seção são apresentados os resultados de caracterização complementar para os três grupos de filmes apresentados nos itens 7.1 e 7.2, de forma a por em melhor perspectiva o efeito do grau de reticulação, conteúdo de ZnO_{nano} e diâmetro médio das nanopartículas na estrutura e propriedades dos filmes nanocompósitos.

7.3.1 Microestrutura dos filmes

A microestrutura dos filmes controle e nanocompósitos está apresentada nas Figuras 7.4 a 7.12. Nessas figuras, a morfologia da superfície e da seção transversal foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e a topografia da superfície dos filmes foi analisada por microscopia de força atômica.

Como pode ser visto na Figura 7.4, o filme Controle RP apresentou superfície lisa e a avaliação de sua seção transversal revelou a presença de uma estrutura típica de deposição de camadas organizadas de alginato.

Na Figura 7.5a é apresentada a microestrutura de um filme de alginato preparado sem cálcio e contendo glicerol, enquanto na Figura 7.5b é apresentado um filme de alginato produzido sem o glicerol, porém contendo cálcio (adicionado pelo primeiro estágio de reticulação).

A diferença morfológica entre esses dois materiais, apresentados na Figura 7.5a e b, é notável. No entanto, a estrutura desses filmes não se assemelhou à estrutura do filme controle RP apresentada na Figura 7.4b. Isso permite considerar a hipótese de que a combinação da reticulação, que tende a deixar a matriz de alginato mais coesa, e o glicerol resultam na microestrutura observada. Ainda, é possível que separação de fases tenha ocorrido. Zactiti (2004) verificou a existência de três transições vítreas em filmes de alginato parcialmente reticulados com Ca⁺² e contendo glicerol como plastificante. De acordo com a autora, a formação das zonas de junção resultantes da reticulação com cálcio ocorre em detrimento da interação polímero-glicerol, levando à possível separação de fases. Além disso, a condição de vácuo imposta durante o ensaio de microscopia eletrônica pode ter ocasionado a expansão do material pouco reticulado.

O emprego do segundo estágio de reticulação afetou fortemente a microestrutura dos filmes à base de alginato, reduzindo a rugosidade da superfície (Figura 7.6a e 7.6d) e

compactando a matriz polimérica, como pode ser observado na seção transversal das Figuras 7.6b e 7.6c. Essas observações corroboram com os resultados de espessura, que foi significativamente reduzida após o segundo estágio de reticulação.

Figura 7.4: Microestrutura do filme controle RP analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários), (c) seção transversal (feixe de elétrons retroespalhados) e (d) topografia 3D.

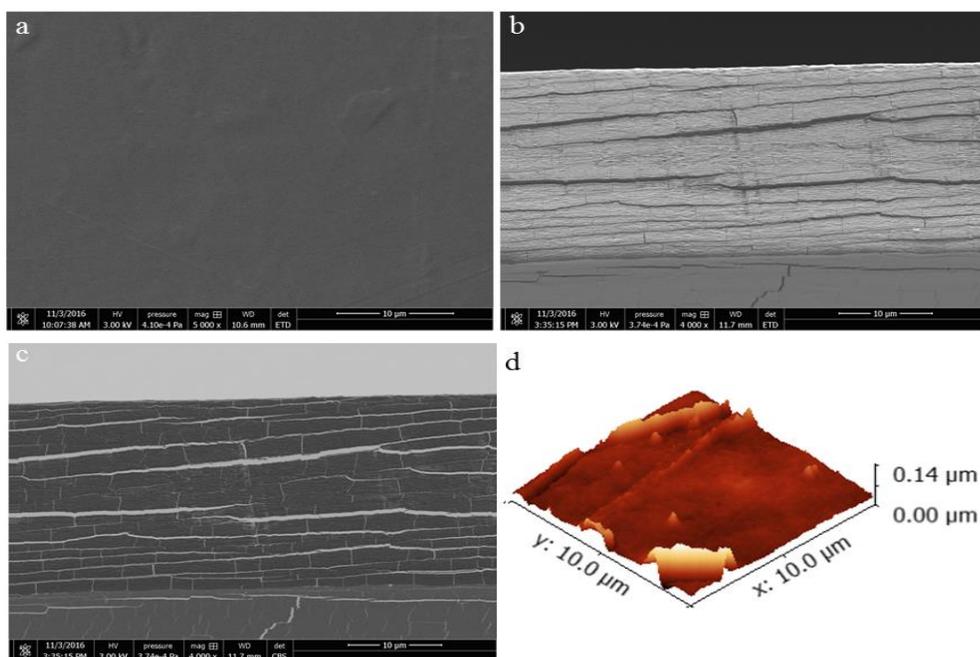


Figura 7.5: Seção transversal do filme de Controle RP analisada por microscopia eletrônica de varredura: (a) sem cálcio superfície, (b) sem glicerol

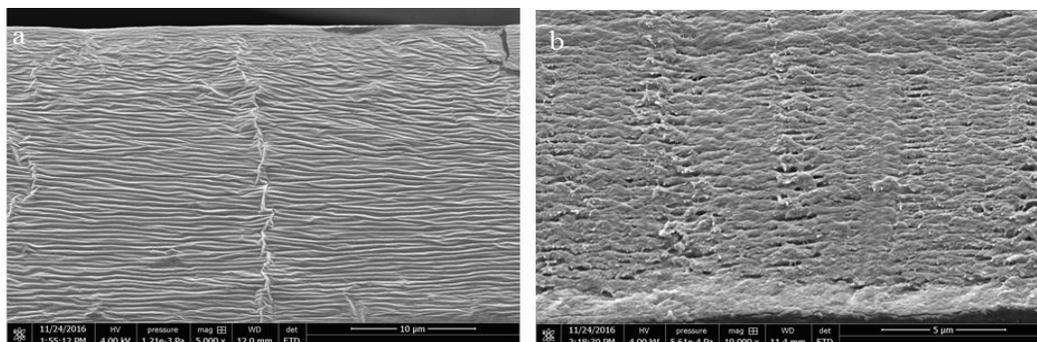
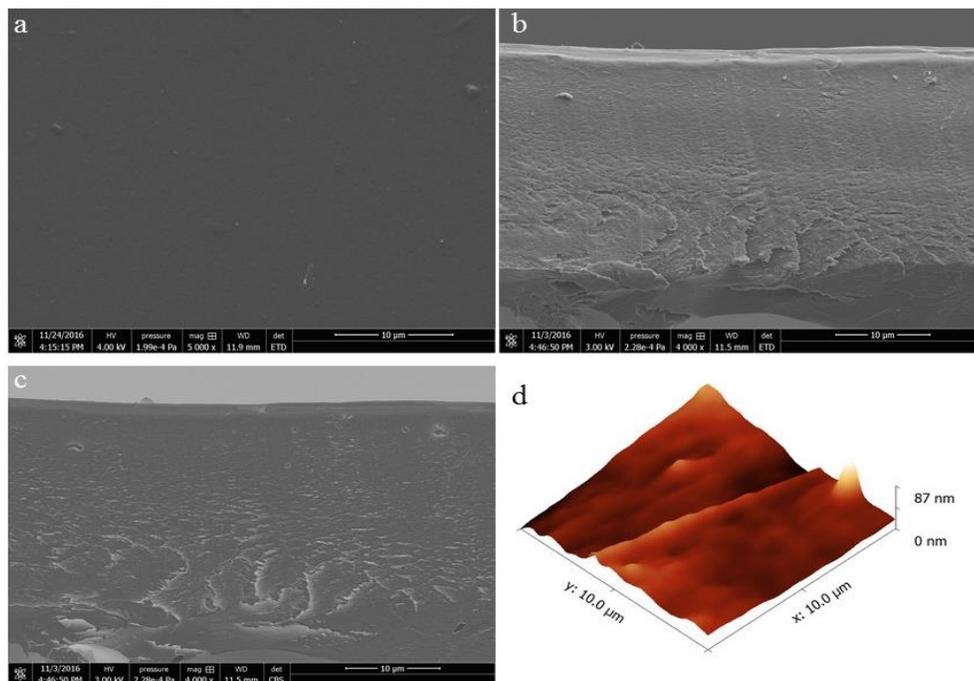


Figura 7.6: Microestrutura do filme Controle RS analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários), (c) seção transversal (feixe de elétrons retroespalhados) e (d) topografia 3D.

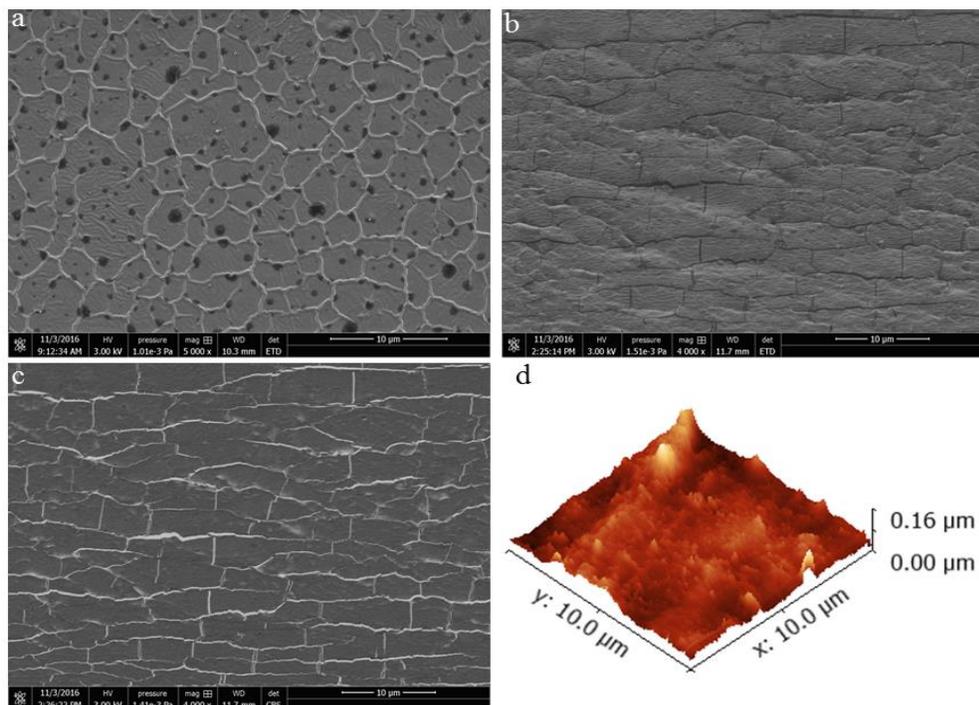


No caso de filmes sem cálcio ou reticulados apenas em primeiro estágio, as modificações na morfologia devido à presença do ZnO_{nano} I foram similares. Como pode ser observado nas Figuras 7.7a e 7.8a, aumento da rugosidade da superfície foi observado com adição das nanopartículas. Esses resultados também estão de acordo com a análise de microscopia de força atômica (Figuras 7.7d e 7.8d) que demonstram a modificação da topografia em comparação à topografia do filme controle RP (Figura 7.4d). Além disso, a presença das nanopartículas também reduziu a organização da matriz de alginato, como pode ser observado nas Figuras 7.7b e 7.8b.

O ZnO_{nano} teve grande influência na morfologia dos filmes nanocompósitos. Os elétrons retroespalhados são aqueles emitidos a partir da amostra devido a espalhamento elástico. Apesar de este feixe fornecer imagens menos ricas em termos de resolução, a intensidade de seu sinal está fortemente correlacionada com o número atômico do corpo de prova. Por essa razão, a presença de ZnO_{nano} I é evidenciada como pontos claros em contraste com a matriz de alginato na seção transversal dos filmes nanocompósitos, conforme apresentado nas Figuras 7.7c, 7.8c e 7.9c. Nas imagens obtidas com o feixe de elétrons secundários, como pode ser

notado nas Figuras 7.7a, 7.8a e 7.9a, as nanopartículas de ZnO podem ser observadas como pontos escuros, porém com menor nitidez.

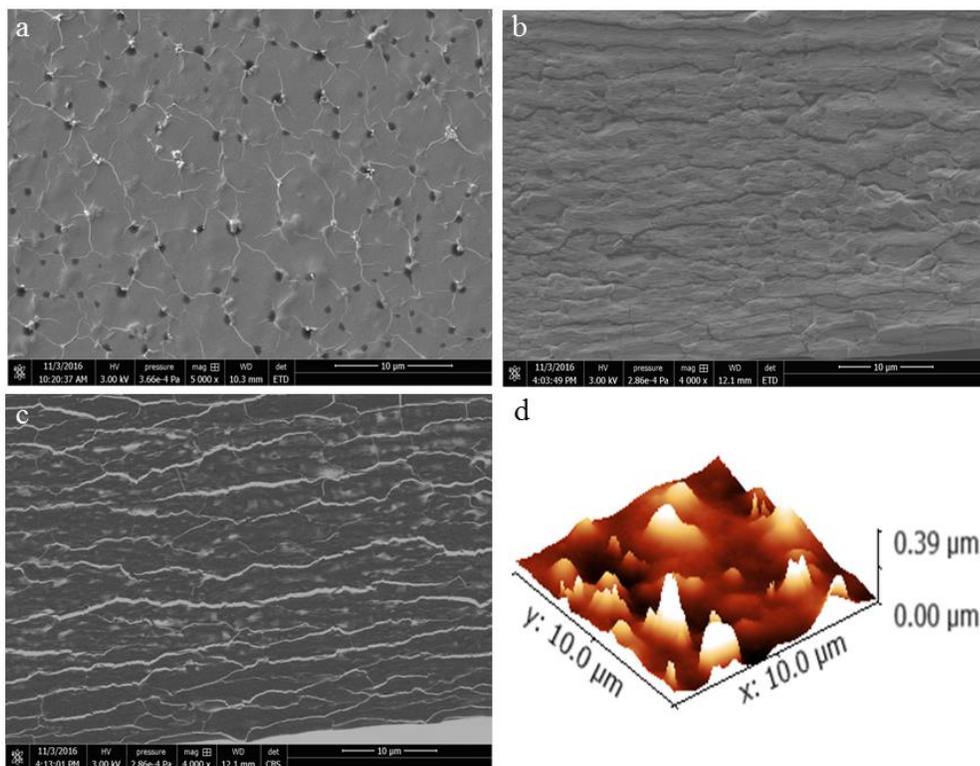
Figura 7.7: Microestrutura do filme 5% SC I analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários), (c) seção transversal (feixe de elétrons retroespalhados) e (d) topografia 3D.



A morfologia do filme duplamente reticulado também foi alterada com a adição das nanopartículas I. Nas Figuras 7.9.a e 7.9d é possível notar o aumento da rugosidade da superfície em relação ao controle RS (Figuras 7.6.a e 7.6d). Com relação à microestrutura, nota-se também que o filme 3% RS I diferiu em comparação ao seu respectivo controle, sendo inclusive possível identificar aglomerados das nanopartículas.

Mesmo com a presença ZnO_{nano} , nota-se uma redução da rugosidade da superfície após a reticulação secundária, como pode ser observado na comparação das Figuras 7.9a e 7.9d com as Figuras 7.8a e 7.8d.

Figura 7.8: Microestrutura do filme 3% RP I analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários), (c) seção transversal (feixe de elétrons retroespalhados) e (d) topografia 3D.



Nas Figuras 7.10 a 7.12 são apresentadas, respectivamente, as micrografias obtidas para os filmes SC AL II, RP AL II e RS AL II.

A primeira observação importante é que mesmo utilizando o alginato como agente dispersante, não foi possível desagregar eficientemente as nanopartículas II. Por essa razão, é possível detectar aglomerados de partículas na superfície e seção transversal desses filmes (Figuras 7.10a a 7.12a e Figuras 7.10b a 7.12b). Além disso, é possível observar também que os filmes RP AL II e RS AL II apresentaram microestrutura que se assemelha à dos filmes nanocompósitos preparados com o ZnO_{nano} I (Figuras 7.8 e 7.9), reforçando o papel de estruturação do cálcio, conforme pode ser observado nas Figuras 7.11b e 7.12b, respectivamente. No entanto, é importante ressaltar que as microestruturas desses nanocompósitos diferem em termos de organização quando comparados aos filmes confeccionados com nanopartícula do tipo I. Essa diferença pode estar relacionada com a maior interação das nanopartículas II e as cadeias de alginato.

Figura 7.9: Microestrutura do filme 3% RS I analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários), (c) seção transversal (feixe de elétrons retroespalhados) e (d) topografia 3D.

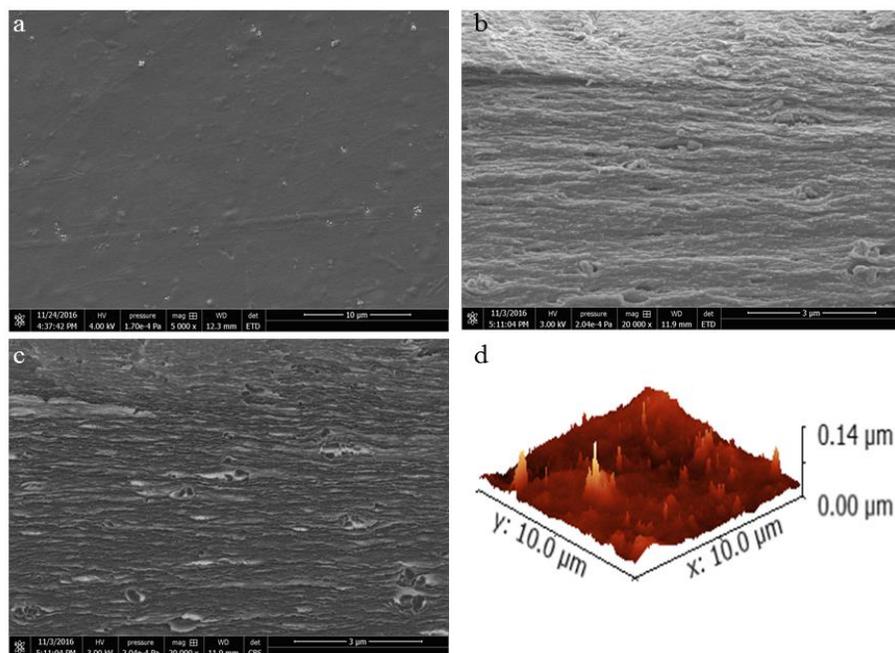


Figura 7.10: Microestrutura do filme 3% SC AL II analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários) e (c) topografia 3D.

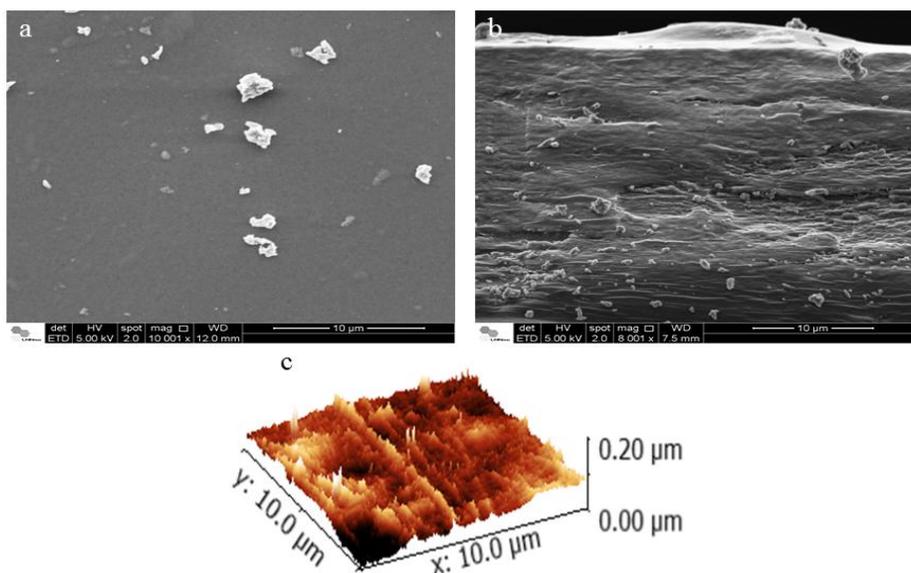


Figura 7.11: Microestrutura do filme 3% RP AL II analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários) e (c) topografia 3D.

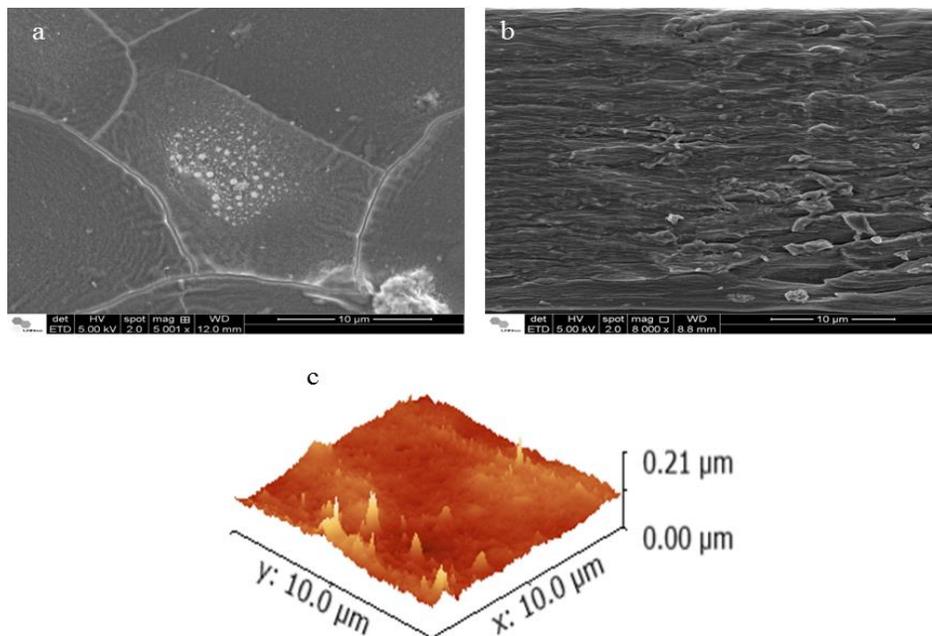
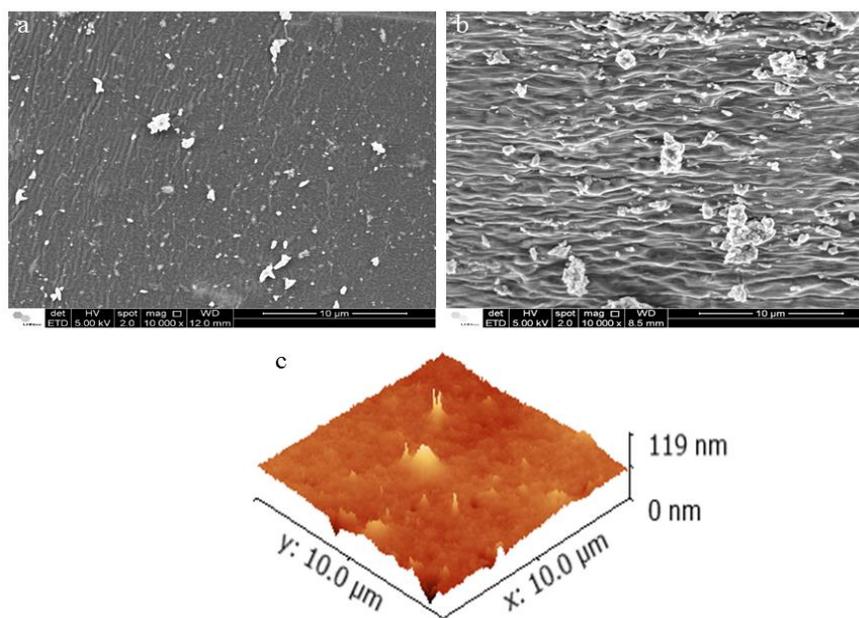
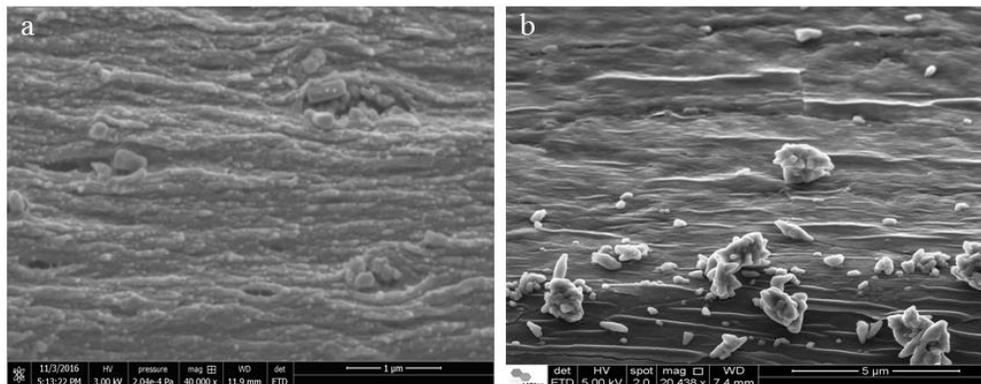


Figura 7.12: Microestrutura do filme 3% RS AL II analisada por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica: (a) superfície (feixe de elétrons secundários), (b) seção transversal (feixe de elétrons secundários) e (c) topografia 3D.



Também é importante mencionar que as nanopartículas do tipo I e II diferem entre si em relação à morfologia, como pode ser observado na Figura 7.13. A geometria das partículas também pode ter influência na interação com as moléculas poliméricas.

Figura 7.13: Morfologia das nanopartículas de óxido de zinco (a) tipo I e (b) tipo II dispersas em filmes nanocompósitos duplamente reticulados (3% de ZnO_{nano} tipo I ou II).



O aumento da rugosidade da superfície de nanocompósitos biopoliméricos já foi relatado na literatura científica. Abdollahi *et al.* (2013) observaram aumento da rugosidade da superfície após adicionar nanopartículas de montmorilonita (MMT) ou nanopartículas de celulose a filmes nanocompósitos de alginato e Liu e Kim (2012) tiveram observações similares em nanocompósitos de quitosana/PEG/ZnO/Ag. Archana *et al.* (2013) observaram aglomeração de nanopartículas de óxido de titânio e modificação da morfologia superficial de filmes nanocompósitos de quitosana/PVP/TiO₂.

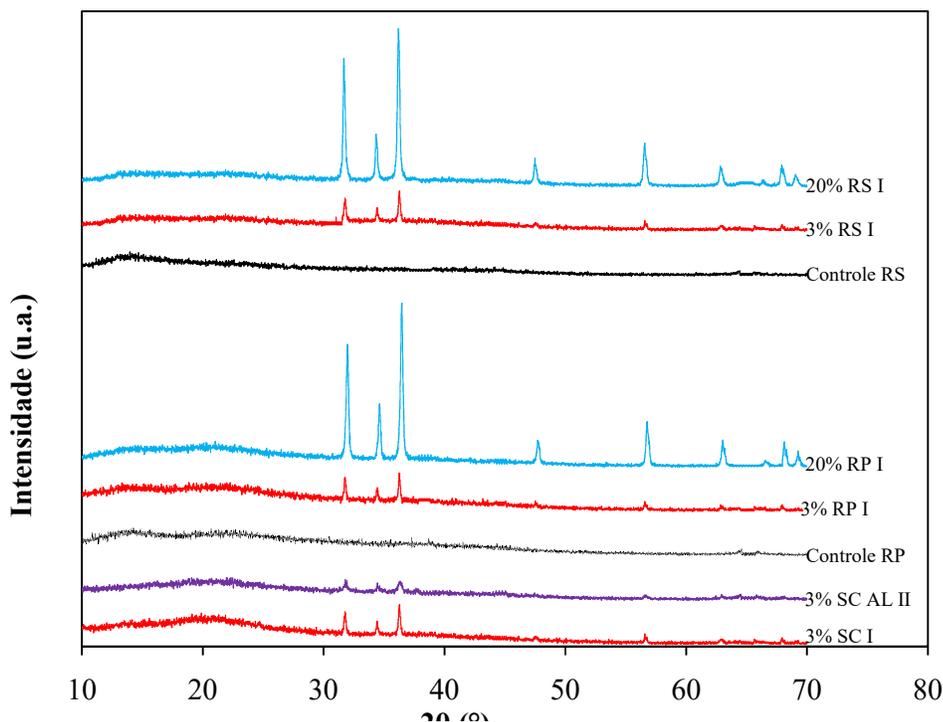
7.3.2 Difração de raios-X

Na Figura 7.14 são apresentados os resultados de difração de raios-X obtidos para os filmes controle e nanocompósitos com diferentes graus de reticulação, diferentes conteúdos de ZnO_{nano} e diferentes tamanhos médio das nanopartículas.

Os filmes controle (RP e RS) não apresentaram picos de difração bem definidos, confirmando sua natureza amorfa e os filmes contendo ZnO_{nano} exibiram picos de difração cuja intensidade foi acentuada com o aumento da concentração das nanopartículas. Os filmes nanocompósitos apresentaram picos de difração em 2θ igual a 31,6; 34,6; 36,5; 47,7; 56,7; 62,9; 67,9 e 69,2°, correspondendo aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200) e (112) do óxido de zinco, respectivamente (KHORSAND *et al.*, 2011). Isso indica que a

estrutura hexagonal (característica das wurtzitas) das nanopartículas de ZnO não foi alterada após sua incorporação à matriz de alginato.

Figura 7.14: Difratoograma dos filmes controle e nanocompósitos fabricados sem tratamento de reticulação com cálcio (SC), reticulados em primeiro estágio (RP), ou reticulados em primeiro e segundo estágio (RS) e contendo 3 ou 20% (g ZnO/g alginato) das nanopartículas do tipo I e 3% das nanopartículas do tipo II dispersas com alginato (AL).



Tais padrões de difração estão em boa concordância com dados de outros autores que sintetizaram ou utilizaram ZnO_{nano} em matrizes biopoliméricas (TRANDAFILOVIĆ *et al.*, 2012; THIRUMAVALAVAN; HUANG; LEE, 2013; PREDA; ENCULESCU; ENCULESCU, 2014; MOHANDAS *et al.*, 2015).

Ademais, a adição das nanopartículas de ZnO não alterou a cristalinidade da matriz de alginato, assim como observado por Li *et al.* (2010) ao sintetizar ZnO_{nano} em filmes de quitosana.

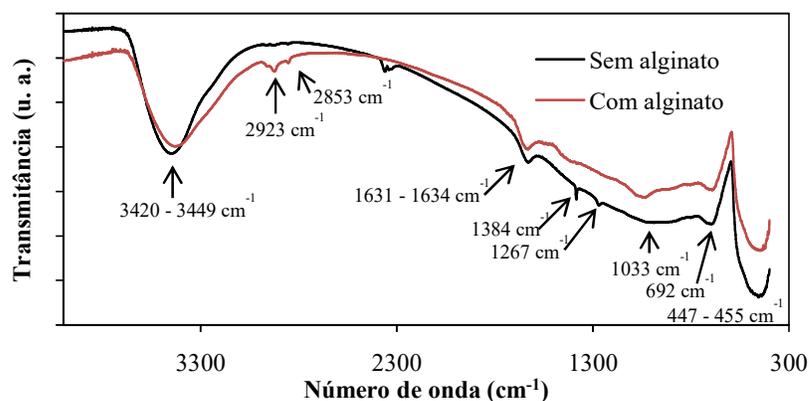
7.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

foram conduzidas de forma a avaliar grupos funcionais específicos e fornecer evidência sobre a interação entre o alginato e as nanopartículas.

Inicialmente, analisou-se por FTIR a possível adsorção de segmentos de cadeia de alginato às nanopartículas após a dispersão do ZnO_{nano} II. Após a desagregação das nanopartículas com o biopolímero, 1 mL do nanofluido de ZnO-água-alginato foi centrifugado 3.500 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o produto no fundo do tubo foi re-suspendido com água deionizada e o procedimento foi repetido até que 10 ciclos fossem sido concluídos de forma a remover o alginato não adsorvido à superfície das nanopartículas. A suspensão foi então seca em estufa (105°C/24 h) e encaminhada para avaliação por espectroscopia. Na Figura 7.15, compara-se o espectro no infravermelho das nanopartículas II desagregadas apenas na presença de água e após sua dispersão com alginato.

Figura 7.15: Espectro de FTIR das nanopartículas II dispersas na presença e ausência de alginato.



Foi possível observar picos de absorção característicos de vibração do ZnO em 447 e 455 cm^{-1} para as amostras dispersas sem e com o auxílio de alginato, respectivamente, similarmente ao observado por Becheri *et al.* (2008). Uma ampla banda de absorção na região entre 3420 e 3449 cm^{-1} foi observada para as nanopartículas tratadas por ambas as formas, correspondente ao estiramento de grupos O-H. A presença de grupos O-H pode ser atribuída à natureza higroscópica do ZnO e sua habilidade de ser acceptor de ligações de hidrogênio que leva à adsorção de água na superfície das partículas (XIONG *et al.*, 2006). O espectro das nanopartículas dispersas com o auxílio de alginato apresentou picos de absorção em 2924,

2854 e 1034 cm^{-1} referentes ao estiramento de grupos C-O, indicando a presença de alginato adsorvido à superfície das nanopartículas de ZnO.

Nas Figuras 7.16 a 7.18, são apresentados os espectros de FTIR dos filmes controle e nanocompósitos contendo diferentes concentrações de ZnO_{nano} e diferentes graus de reticulação. Nesses espectros não foi possível registrar os picos de absorção do óxido de zinco, pois no modo de atenuação, o espectrofotômetro utilizado pode ser operado na faixa espectral de 4.000 a 675 cm^{-1} .

Observou-se, ainda, uma ampla banda de absorção entre 3290 e 3346 cm^{-1} que pode ser atribuído ao estiramento de grupos hidroxil (O-H) (XIAO; WENG; ZHANG, 2002). Outro pico intenso foi observado entre 1597 e 1604 cm^{-1} e pode estar relacionado com a vibração assimétrica de grupos carboxila (KANMANI; RHIM, 2014). Na região entre 1412 e 1418 cm^{-1} , foi observada a vibração de estiramento simétrico de C-O dos grupos carboxílicos com contribuição da vibração de deformação dos grupos C-OH (LEAL *et al.*, 2008). O estiramento dos grupos C-H foi registrado entre 2930 e 2882 cm^{-1} nos espectros (VALENTIN *et al.*, 2006). Ao redor de 1080 cm^{-1} e em 1033 cm^{-1} , todos os filmes apresentaram picos de absorção relacionados ao estiramento dos grupos C-O e C-C do anel piranosil, respectivamente (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011).

Figura 7.16: Espectro de FTIR dos filmes reticulados em primeiro estágio: controle e nanocompósitos contendo 3% (g ZnO/g alginato) das nanopartículas do tipo I e 3% das nanopartículas do tipo II dispersas com alginato (AL).

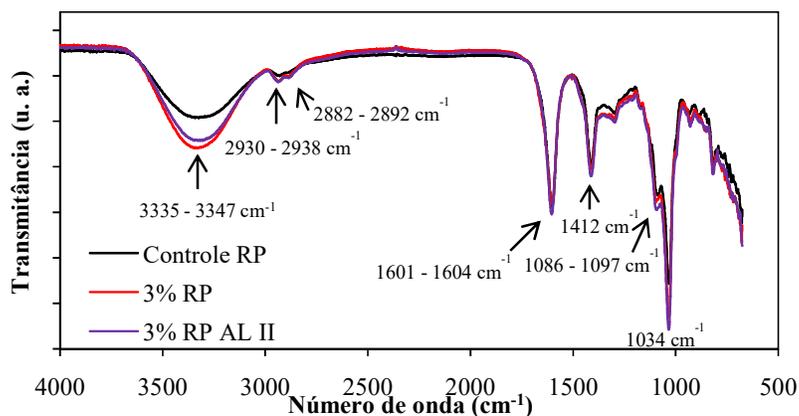


Figura 7.17: Espectro de FTIR dos filmes reticulados em primeiro e segundo estágio (RS): controle e nanocompósitos contendo 3 e 20% (g ZnO/g alginato) das nanopartículas do tipo I e 3% do tipo II dispersas com alginato (AL).

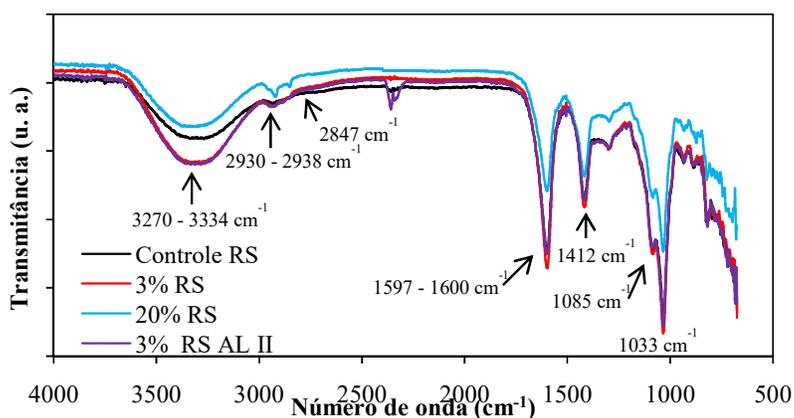
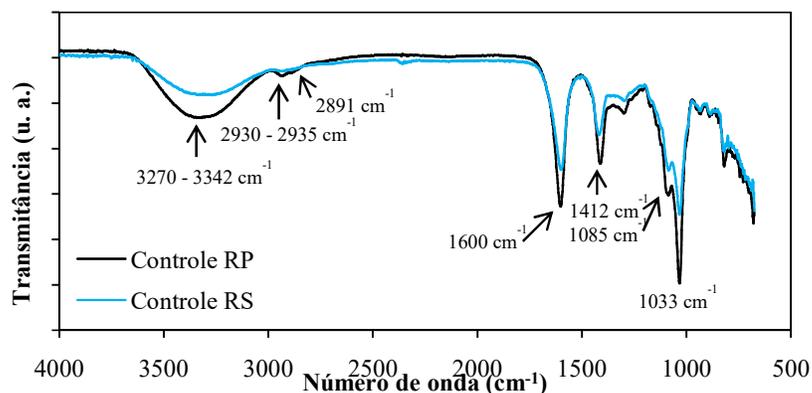


Figura 7.18: Espectro de FTIR dos filmes controle reticulado somente em primeiro estágio (RP) e reticulado em primeiro e segundo estágio (RS).



A intensidade dos picos característicos foi reduzida com o aumento do grau de reticulação, fenômeno atribuível à limitação da mobilidade molecular, com consequente redução da vibração dos grupos funcionais. A adição de 3% de ZnO aos filmes de alginato aumentou a intensidade dos picos de absorção, de forma que essa observação possa estar relacionada com uma possível redução na densidade de reticulação das cadeias de alginato. Contudo, o aumento da concentração de ZnO_{nano} resultou em redução da absorção (como pode ser visto no espectro de absorção do filme 20% RS), o que provavelmente indica um aumento na interação entre as cadeias poliméricas e as nanopartículas. Mohandas *et al.* (2015) também

observaram a redução da intensidade do pico característico de estiramento do grupo O-H após a adição de ZnO_{nano} a bandagens liofilizadas de hidrogéis à base de alginato e quitosana. Os autores atribuíram os resultados à formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias dos biopolímeros e o óxido de zinco.

Outra evidência da interação entre o ZnO_{nano} e o alginato é o aumento do estiramento dos grupos C-H (picos entre 2919 e 2847 cm⁻¹). É reconhecido que tais grupamentos conferem aos polissacarídeos leve hidrofobicidade (RINAUDO, 2006 e 2008), sendo possível a formação de pequenas regiões hidrofóbicas resultantes da interação polímero-ZnO.

7.3.4 Análise Termogravimétrica

Análise de TGA foi conduzida com intuito de avaliar a estabilidade térmica dos filmes controle e nanocompósitos, e os termogramas resultantes são apresentados na Figura 7.19.

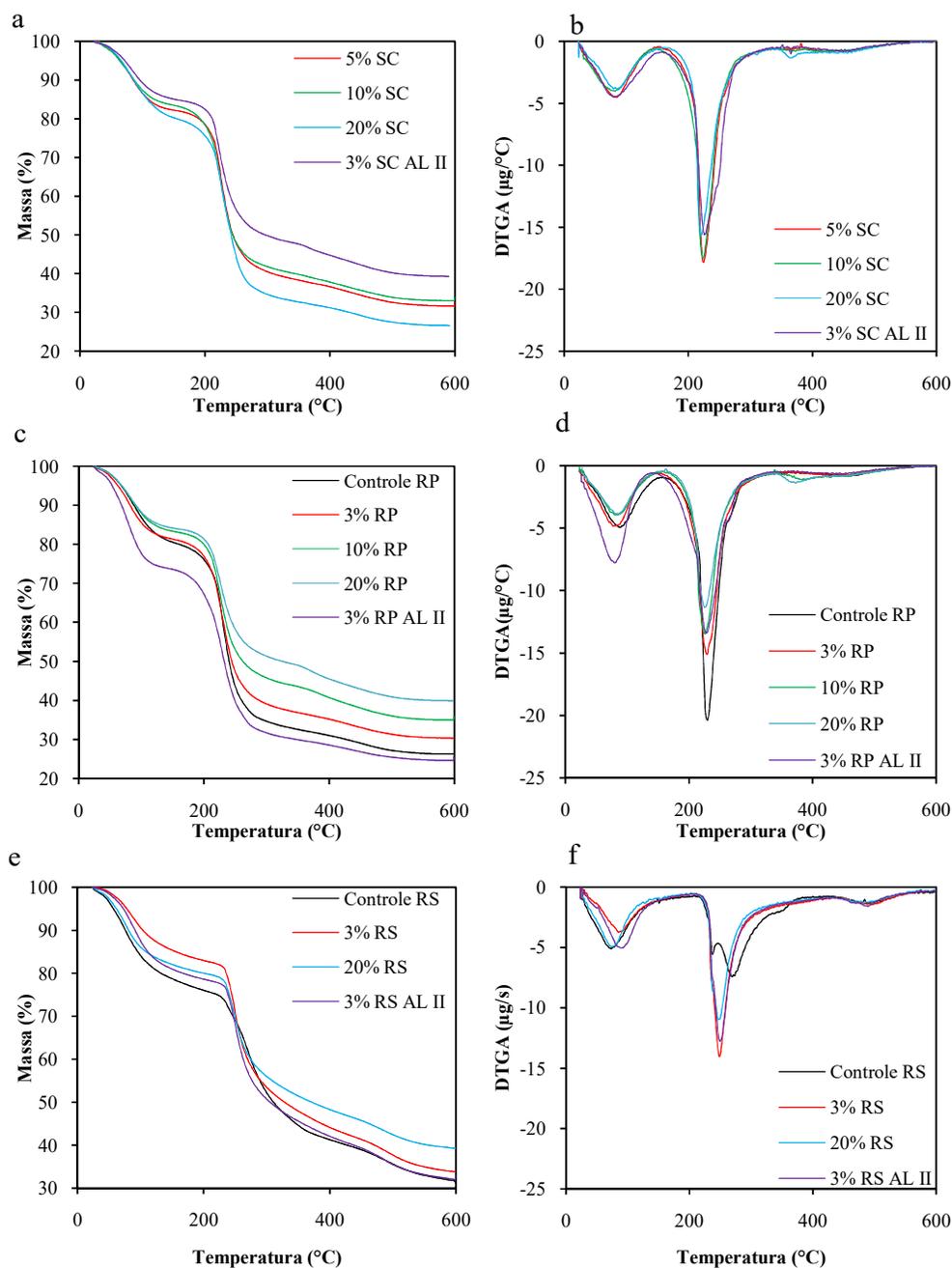
Foram observados dois eventos térmicos principais para os três grupos de filmes estudados (SC, RP e RS), ou seja, de filmes com diferentes graus de reticulação e diferentes conteúdos de nanopartículas. O primeiro ocorreu entre 77 e 89°C para os filmes nanocompósitos SC controle e nanocompósitos RP e entre 73 e 85°C para os filmes RS, que está associado com a perda de água (SHALUMON *et al.*, 2011). O segundo evento térmico ocorreu a 220°C para os filmes nanocompósitos SC (Figura 7.19b) e a 229°C para o filme controle RP (Figura 7.19d), e está relacionado com a degradação do glicerol e do alginato (WONG *et al.*, 1996). O aumento no grau de reticulação deslocou o pico de decomposição do alginato para 270°C, como pode ser observado nos termogramas dos filmes RS (Figura 7.19f). O aumento da estabilidade térmica de filmes de alginato com o aumento do grau de reticulação também foi verificada por Wong *et al.* (1996). Para filmes de alginato e carboximetil glucomanana, Xiao, Weng e Zhang (2002) observaram um aumento de 50°C na estabilidade térmica após a reticulação com íons cálcio.

Nos filmes SC, é possível notar um leve aumento na estabilidade térmica com o aumento do teor de nanopartículas I. Além disso, o uso das nanopartículas II foi mais efetivo em diminuir a taxa de degradação térmica (Figura 7.19a e b).

A presença de ZnO_{nano} nos filmes RS diminuiu a temperatura do pico de decomposição do alginato provavelmente devido a uma redução na densidade de reticulação. A taxa de decomposição do filme 3% RS foi superior à do filme 20% RS, de forma que o filme controle RS apresentou menor taxa de degradação. Esses resultados estão em concordância com os resultados de absorção no infravermelho, que indicaram que a adição de 3% de ZnO aos

filmes RS resultou em aumento da absorção, sugerindo um possível incremento na mobilidade molecular quando comparado ao filme controle RS.

Figura 7.19: Análise termogravimétrica dos filmes controle e nanocompósitos: (a) TGA dos filmes SC, (b) derivada da TGA dos filmes SC, (c) TGA dos filmes RP, (d) derivada da TGA dos filmes RP, (e) TGA dos filmes RS e (f) derivada da TGA dos filmes RS.



Resultados similares foram obtidos no trabalho publicado por Bharadwaj *et al.* (2002), no qual nanocompósitos de poliéster e montmorilonita (MMT) reticulados com metiletil cetona foram fabricados. Os autores notaram que a presença da nanoargila acelerou a degradação térmica dos nanocompósitos e o grau de esfoliação da MMT também comprometeu outras características do material, tais como a resistência mecânica, possivelmente devido à redução na densidade de reticulação com o aumento do conteúdo de nanopartículas. No entanto, a adição de 20% do ZnO_{nano} tipo I nos filmes RS resultou em redução da absorção no infravermelho (redução da vibração dos grupos funcionais), assim como reduziu a taxa de degradação térmica quando comparado ao filme fabricado com 3% dessas nanopartículas. Esses resultados sugerem que o ZnO_{nano} também tem efeito similar ao de reticulação, porém em intensidade menor que ao da realizada com íons cálcio.

Outra evidência nesse sentido é fornecida por Vicentini, Smania e Laranjeira (2010), que relataram um aumento na estabilidade térmica após a adição de ZnO a filmes de quitosana e polivinil. Isto foi atribuído a uma redução na distância interatômica das cadeias poliméricas, de forma que uma quantidade maior de energia é necessária para decompor os filmes. De forma similar, Espitia *et al.* (2013a) observaram que a incorporação de ZnO_{nano} a filmes de CMC também aumentou a estabilidade térmica quando comparado ao filme controle devido à interação entre o ZnO e a CMC. Apesar de os autores não descreverem em maiores detalhes o tipo de interação entre o ZnO e a metilcelulose, é possível que as nanopartículas de óxido de zinco tenham mantido as cadeias do polímero unidas através de ligações de hidrogênio, assim como observado para os filmes SC descritos no presente trabalho. Shalumon *et al.* (2011) observaram que a adição de nanopartículas de ZnO a nanofibras de alginato de sódio e PVA não contribuiu para o acréscimo da estabilidade térmica do compósito. Esses autores também não indicaram as possíveis razões para a pouca influência do ZnO na estabilidade térmica do material, porém, observaram forte interação entre o alginato e o PVA através da análise de FTIR. Dessa forma, é possível que, devido à intensa interação entre os polímeros, houvesse pouca disponibilidade por parte das cadeias poliméricas para interação com as nanopartículas, resultando em pouca contribuição das mesmas no aumento da estabilidade térmica.

Portanto, a estabilidade térmica do material compósito resultante dependerá da estrutura e composição da matriz polimérica, assim como da interação entre as nanopartículas e a matriz. No caso dos filmes nanocompósitos de alginato e ZnO, as nanopartículas de óxido de zinco melhoram a estabilidade térmica se o grau de reticulação é baixo. Contudo, a presença de ZnO_{nano} na matriz de alginato pode dificultar o processo de reticulação se uma maior

concentração de cálcio é utilizada, levando a uma redução na estabilidade térmica. Além disso, também é possível que o ZnO seja reduzido pela liberação de carbono em temperaturas acima de 230°C (BAJPAI; CHAND; CHAURASIA, 2012).

Tendência similar foi observada ao reduzir o tamanho médio das nanopartículas. Nas matrizes sem reticulação ou reticuladas somente em primeiro estágio (filmes SC e RP), o uso das nanopartículas do tipo II reduziu a taxa de degradação térmica, como pode ser visto nas Figuras 7.19a a 7.19d. Em ambos os filmes SC e RP o efeito da adição de 3% do ZnO_{nano} II na estabilidade térmica foi similar ao da adição de 10% da nanopartícula I, visto que as curvas das derivadas estão sobrepostas. Quando a matriz está altamente reticulada, como no caso dos filmes RS, o uso de 3% da nanopartícula II aumentou a taxa de degradação de aproximadamente 7 µg/°C para 12 µg/°C, de forma similar à adição de 3% do ZnO tipo I.

Os resultados de TGA obtidos também podem contribuir para coletar dados de “impressão digital” de composição de relevância para o controle de qualidade (FORREST, 2003), especialmente com relação a polímeros de origem natural que podem apresentar variação na composição de lote para lote.

7.3.4 Atividade Antimicrobiana In Vitro

A atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi preliminarmente avaliada utilizando a formulação de filme nanocompósito contendo 3% de nanopartículas I de ZnO. Foi escolhida a menor concentração de ZnO_{nano} para verificar se, nesta condição, o material já apresentaria atividade antimicrobiana. O ensaio foi conduzido de forma similar ao descrito no item 4.5.16, utilizando corpos de prova de 1 cm de diâmetro. Os resultados podem ser observados nas Figuras 7.20 a 7.22.

Assim como havia sido observado para os filmes 3% US RS, 20% US RS, 3% T RS e 20% T RS (descritos no item 5.1), a inibição do crescimento microbiano pelos filmes nanocompósitos se deu por contato. No entanto, notou-se aumento da zona de inibição em 30% (aumento no diâmetro da zona clara ao redor do filme), possivelmente, devido à dissolução do filme nanocompósito com a absorção da água do meio de cultura, tornando-se um gel capaz de escoar sobre a superfície do meio de cultivo. Nesse processo, as partículas de zinco são transportadas, de forma que a região de inibição corresponde à região de migração do gel. Os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* são importantes indicadores da qualidade sanitária de alimentos e comumente envolvidos em surtos de origem alimentar. Além do mais, *S. aureus* é uma bactéria também de ocorrência comum em lesões de pele, associada a

infecções.

Figura 7.20: Atividade antimicrobiana contra *E. coli* dos filmes (a) controle RP e (b) 3% RP I.

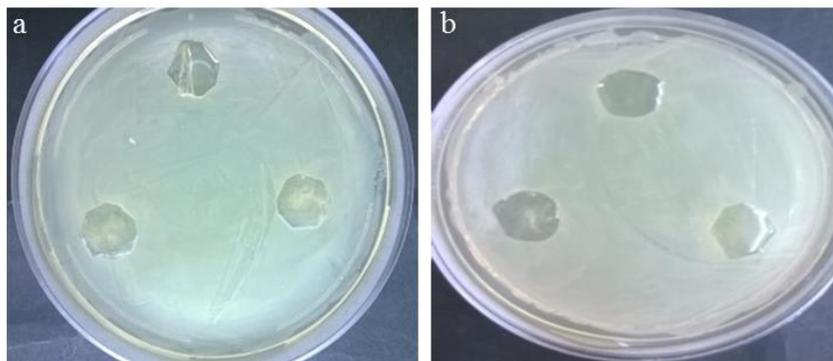


Figura 7.21: Atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* dos filmes (a) controle RP e (b) 3% RP I.

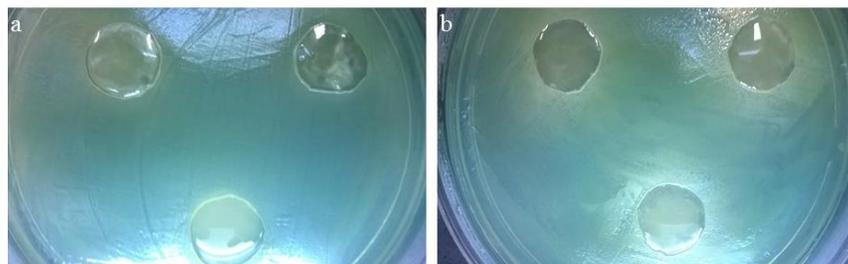
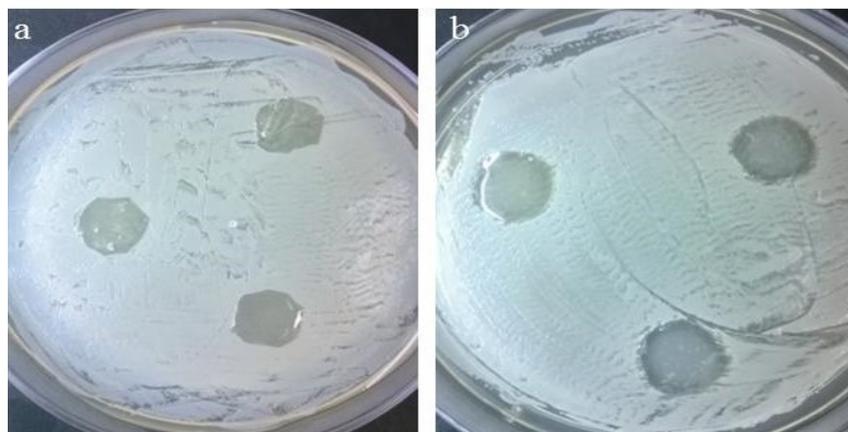


Figura 7.22: Atividade antimicrobiana contra *S. aureus* dos filmes (a) controle RP e (b) 3% RP I.

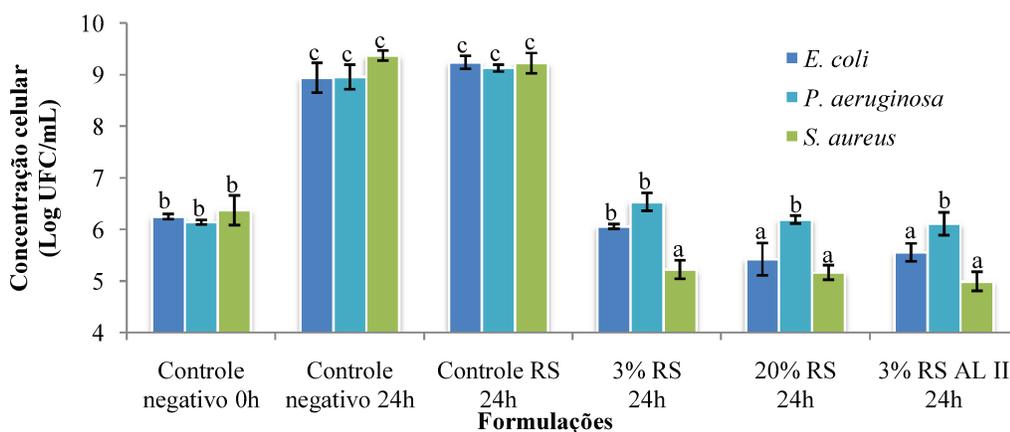


Os resultados são, portanto, satisfatórios, tendo em vista o poder inibitório do filme nanocompósito em relação à alta carga dos microrganismos avaliados. É esperado que com o aumento da proporção de ZnO_{nano} os filmes sejam capazes de inibir cargas mais elevadas dos microrganismos testados. Além disso, também é esperado que o efeito antimicrobiano seja potencializado com a redução do tamanho de partícula, que resultaria em aumento da área específica e, conseqüentemente, aumento de sua reatividade e facilite sua difusão da matriz de alginato.

Como os filmes RP foram instáveis em meio aquoso, o que aumentaria a disponibilidade de ZnO_{nano} para inibição do crescimento microbiano, a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada utilizando-se de uma abordagem mais conservadora, utilizando apenas os filmes RS, como apresentado na Figura 7.23.

O filme controle não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhuma das bactérias utilizadas no presente trabalho. Em contrapartida, os filmes nanocompósitos reduziram a contagem celular de *S. aureus*, enquanto para *E. coli* e *P. aeruginosa* apenas efeito bacteriostático foi observado. Como observado nos ensaios de difusão em ágar (Figuras 7.20 a 7.22), a inibição do crescimento microbiano se deu principalmente por contato, não sendo observada uma região de inibição evidente, resultante da difusão de ZnO_{nano} para o meio de cultura.

Figura 7.23: Atividade Antimicrobiana dos filmes controle nanocompósitos contendo 3 ou 20% de nanopartículas (g ZnO /g alginato).



Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade em estudo de acordo com o teste de Tukey.

Pasquet *et al.* (2014) observaram que nanopartículas comerciais de ZnO apresentam

baixa difusão em discos de filmes de celulose. Essa baixa difusão pode estar relacionada a uma série de fatores, tais como aglomeração das nanopartículas, afinidade das partículas para com a matriz de alginato e natureza relativamente empacotada dos filmes, que potencialmente podem ter contribuído para coibir o transporte de ZnO_{nano} para o meio de cultura. Por outro lado, Liu e Kim (2012) detectaram difusão de ZnO a partir de uma matriz de quitosana e PEG com concentração de 4% do total de polímeros e com partículas de diâmetro médio de 100 nm. Difusão de ZnO_{nano} a partir de nanofibras de alginato e PVA foi observada por Shalumon *et al.* (2011) em várias concentrações de partícula (0,5 a 5%). Nesse trabalho, ZnO_{nano} com diâmetro médio igual a 164 nm foram sintetizadas utilizando o método sol-gel, o que pode ter contribuído para evitar a aglomeração das partículas.

A atividade antibacteriana do ZnO está relacionada à formação de espécies ativas de oxigênio (ROS), como H₂O₂, O₂⁻, OH[•] e OH⁻, que podem causar dano à parede celular e aumento do estresse oxidativo, levando à alteração prejudicial de proteínas, lipídeos e DNA (Ann *et al.*, 2014).

S. aureus foi mais susceptível ao ZnO_{nano} que a *P. aeruginosa*, resultado que está em concordância com os trabalhos de Ann *et al.* (2014) e Pasquet *et al.* (2014). Os últimos autores observaram que a concentração mínima inibitória (MIC) de ZnO_{nano} para *P. aeruginosa* foi cinco vezes superior à MIC para *S. aureus*, o que foi atribuído à presença de citocromo-oxidase na primeira bactéria e que rapidamente reduz oxigênio a água e auxilia na redução de ROS, como H₂O₂. O *S. aureus* também expressa catalase, que direciona a redução de peróxido de hidrogênio e minimiza o estresse oxidativo, mas, provavelmente, não de forma suficiente a suportar o dano oxidativo imposto pelo ZnO_{nano} (Espitia *et al.*, 2013b). Outros autores também observaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (LI *et al.*, 2010; VICENTINI; SMANIA; LARANJEIRA, 2010; SHALUMON *et al.*, 2011; MOHANDAS *et al.*, 2015) e atividade contra *P. aeruginosa* foi descrita nos trabalhos de Arfat *et al.* (2014) e Liu e Kim (2012).

Efeito bacteriostático também foi observado para *E. coli*. De acordo com Pasquet *et al.* (2014), a MIC para *E. coli* é 50% do valor determinado para *S. aureus*. Os autores afirmaram que a bicamada lipídica que envolve as bactérias Gram-negativas é mais susceptível à ação oxidante do ZnO do que as bactérias Gram-positivas que apresentam uma camada protetora de peptidoglicano. Contudo, Espitia *et al.* (2013b) observaram maior susceptibilidade da *S. aureus* à ação do ZnO_{nano} que a *E. coli* e apontaram que a diferença entre a sensibilidade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas ao óxido de zinco pode também estar relacionada

a processos intracelulares, visto que a membrana de ambos os tipos celulares são semelhantemente permeáveis aos ROS.

Atividade antimicrobiana de nanocompósitos de biopolímeros e óxido de zinco contra *E. coli* foi observada nos trabalhos de Li *et al.* (2010), Shalumon *et al.* (2011), Liu e Kim (2012), Trandafilovič *et al.* (2012), Kanmani e Rhim (2014) e Mohandas *et al.* (2015).

Os filmes nanocompósitos de alginato e ZnO produzidos neste trabalho foram capazes de controlar a população bacteriana por contato, o que suporta seu uso como curativos para prevenção da invasão e proliferação de bactérias. Além disso, os filmes nanocompósitos também poderiam ser utilizados como embalagem antimicrobiana para alimentos, visto sua habilidade de inibir o crescimento de microrganismos na superfície de produtos alimentícios e evitar a invasão de microrganismos contaminantes.

O aumento na concentração de ZnO nos filmes nanocompósitos não faz parte do escopo do presente trabalho, e por essa razão, a atividade antimicrobiana de filmes nanocompósitos com maiores concentrações de ZnO_{nano} não foi avaliada.

7.4 Discussão geral da influência do agente reticulante e do material constituinte da fase dispersa nas propriedades do material

O efeito do cálcio sobre as propriedades mecânicas dos filmes é superior ao efeito da adição de ZnO_{nano} do tipo I, considerando o tamanho de partícula utilizado (tamanho médio de agregados de 410 a 435 nm).

No entanto, esse fenômeno é dependente do tamanho de partícula e do grau de reticulação utilizado. Com a redução do diâmetro médio das partículas, e conseqüentemente, o aumento da área superficial, observa-se uma mudança acentuada nas características do material, em especial das propriedades mecânicas. Contudo, ao incrementar a concentração de cálcio, produzindo-se assim um filme de alto grau de reticulação (filmes RS), a adição das nanopartículas, nas condições utilizadas no presente trabalho, teve pouco efeito na mudança dos atributos funcionais dos filmes, independentemente do tamanho médio de partícula utilizado. Além do mais, a presença das nanopartículas nos filmes contendo alta concentração de cálcio pode ter ocasionado redução da densidade de reticulação, em certo grau, agindo em sentido contrário ao que seria esperado pela adição de cálcio. No entanto, a adição das nanopartículas de óxido de zinco aos filmes de alginato contribuiu para o aumento da estabilidade quando em contato com meios líquidos de composição complexa (como SFB), o que indica seu potencial para aplicação como envoltório de matrizes alimentícias de

constituição similarmente complexa, tais como produtos cárneos e lácteos, por exemplo.

Os filmes nanocompósitos contendo o ZnO I e II apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e efeito bacteriostático contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, de forma que o uso de ZnO em materiais biopoliméricos pode ser direcionado para o desenvolvimento de materiais que visem ao controle do crescimento microbiano, como por exemplo curativos e embalagens antimicrobianas.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

8.1 Conclusões

Em decorrência da realização deste trabalho foi possível concluir que:

- a) A adição de nanopartículas de ZnO em filmes finos de alginato exercem uma função de reforço na estrutura da matriz polimérica por ocorrer interação entre a fase dispersa e as cadeias do polissacarídeo, possivelmente por ligações de hidrogênio e também pela possível formação de pequenas regiões hidrofóbicas resultante da interação entre os grupos C-H do alginato e ZnO. Este efeito é potencializado com a redução do diâmetro médio das nanopartículas;
- b) A reticulação com íons cálcio tem grande influência nas propriedades dos filmes nanocompósitos. O aumento da concentração de Ca^{++} , empregando-se o segundo estágio de reticulação, mostrou-se superior à adição de nanopartículas de ZnO, independente do tamanho de partícula utilizado (tamanhos nominais de 50 ou 100 nm);
- c) Os filmes duplamente reticulados apresentaram, em média, tensão na ruptura de 64 MPa, alongamento de 1,8%, módulo de Young igual a 4700 MPa e permeabilidade ao vapor d'água de $3,30 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa}$;
- d) Os filmes nanocompósitos se mostraram estáveis quando em contato com fluidos de diferentes composições (água, tampão fosfato salino e soro fetal bovino), confirmando o aumento da estabilidade por ação das nanopartículas mesmo em ambientes de composição altamente complexa;
- e) A cor e opacidade foram as propriedades mais influenciadas pelo conteúdo de nanopartículas. O aumento da concentração de nanopartículas de ZnO resultou em redução da luminosidade, alteração da tonalidade, aumento da intensidade da tonalidade, e aumento da opacidade;
- f) Os filmes nanocompósitos duplamente reticulados apresentaram ação bactericida contra *S. aureus*, enquanto contra *E. coli* e *P. aeruginosa* foi observado efeito bacteriostático;
- g) O filme contendo 3% da nanopartícula (tamanho nominal $< 100 \text{ nm}$) e duplamente

reticulado é o mais adequado para aplicação como curativos para lesões de pele, devido à maior estabilidade quando comparado ao filme controle, além de apresentar atividade antimicrobiana similar à formulação contendo maior conteúdo da mesma nanopartícula;

- h) O filme contendo 3% da nanopartícula de óxido de zinco (tamanho nominal < 50 nm) e duplamente reticulado é o mais adequado para aplicação como embalagens antimicrobianas para alimentos, pois dentre os filmes nanocompósitos foi o que apresentou maior transparência e menor diferença de cor em relação ao filme controle, além de ter atividade antimicrobiana conferida pela adição das nanopartículas.

8.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para dar continuidade aos estudos nesta linha de pesquisa, recomenda-se:

- a) Avaliar a eficiência de desagregação das nanopartículas de ZnO utilizando outras condições de pH, uma vez que a modificação do potencial zeta das partículas influencia significativamente seu estado de agregação;
- b) Avaliar a eficiência de desagregação das nanopartículas de ZnO utilizando surfactantes, visto que tais moléculas podem contribuir para a estabilização estérica das nanopartículas;
- c) Avaliar a eficiência de desagregação das nanopartículas de ZnO utilizando outros métodos físicos como sonicação com sonda, alta pressão ou redução do tamanho de partícula com auxílio de moinhos, pois aplicando-se maior energia espera-se melhoria na redução do estado de agregação das nanopartículas;
- d) Avaliar a viabilidade de síntese das nanopartículas de óxido de zinco pelo método sol-gel e verificar a possibilidade de fabricação de filmes a partir da mesma matriz polimérica. Na literatura científica há relatos descrevendo a síntese de nanopartículas de pelo método sol-gel para a fabricação de nanocompósitos poliméricos com adequada condição de desagregação e distribuição uniforme das nanopartículas (PANDEY; MISHRA, 2011);
- e) Avaliar as concentrações remanescentes de cálcio e de zinco na solução reticuladora e na solução de lavagem utilizadas na etapa de reticulação secundária, através da técnica de espectrometria de emissão atômica com de plasma indutivo (ICP), para verificar a possível perda de Ca^{++} e ZnO_{nano} ;

- f) Avaliar métodos de fabricação de filmes de alginato que facilitem o transporte das nanopartículas para o meio com o qual estão em contato, como, por exemplo, através da confecção de membranas porosas para a produção de curativos. O aumento da difusão das nanopartículas para o meio com o qual estas estão em contato pode potencializar o efeito antimicrobiano dos filmes nanocompósitos;
- g) Avaliar o comportamento da citotoxicidade do material a células epiteliais humanas para direcionar sua aplicação como curativos e, caso apresente-se promissor, realizar avaliação de seu desempenho *ex vivo* em lesões infectadas. Os resultados dessa avaliação fornecerão melhores evidências sobre o potencial dos filmes nanocompósitos de alginato e ZnO para aplicação em lesões de pele infectadas;
- h) Avaliar o desempenho do material quando em contato com alimentos que apresentem alta atividade de água (maior que 0,96) e alto pH (maior que 6,5) como queijos e embutidos cárneos, realizando-se o teste do desafio em tais produtos alimentícios contaminados com microrganismos patógenos relevantes como *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados desses ensaios contribuirão para avaliação do desempenho dos filmes nanocompósitos de alginato e óxido de zinco em condições mais próximas às de uso do material.

CAPÍTULO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M.; ALBOOFETILEH, M.; REZAEI, M.; BEHROOZ, R. Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, v.32, p.416–424, 2013.
- 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.
- ALLEN, L.; NELSON, A I.; STEINBERG, M.P.; MCGILL, J.N. Edible corn-carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch-alginate coating. *Food Technology*, v.17, p. 1437, 1963.
- ANN, L. .; MAHMUD, S.; BAKHORI, S. K. M.; 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.
- ANVISA, Resolução RDC n° 91 de 11 de maio de 2001. Regulamento Técnico - Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos. *Diário Oficial da União*, 15 de maio de 2001.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.3, p. 113-126, 2002.
- ARCHANA, D.; SINGH, B. K.; DUTTA, J.; DUTTA, P. K. In vivo evaluation of chitosan-PVP-titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydrate Polymers*, v.95, p.530–539, 2013.
- ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SUMPAVAPOL, P. Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oils and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, v.41, p.265-273, 2014.
- ARORA, A.; PADUA, G. W. Review: Nanocomposites in food packaging. *Journal of Food Science*, v.75, p.R43-R49, 2010.
- ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, D882 – 12, 1995b.
- ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, E 96-95, 1995a.
- BAJPAI, S. K.; CHAND, N. CHAURASIA, V. Nano zinc oxide-loaded calcium alginate films with potential antibacterial properties. *Food Bioprocess Technology*, v.5, p.1871-881, 2012.

- BECHERI, A.; DURR, M.; NOSTRO, P. L.; BAGLIOLI, P. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, p.679-689, 2008.
- BHARADWAJ, R. K.; MEHRABI, A. R.; HAMILTON, C.; TRUJILLO, C.; MURGA, M.; FAN, R.; CHAVIRA, A.; THOMPSON, A. K. Structure-property relationship in cross-linked polyester-clay nanocomposites. *Polymer*, v.43, p.3699-3705, 2002.
- BI, L.; NARSIMHAN, G.; BHUNIA, A. K.; YAO, Y. Designing carbohydrate nanoparticles for prolonged efficacy of antimicrobial peptide. *Journal of Controlled Release*, v.150, p.150-156, 2011.
- BIERHALZ, A. C. K. *Desenvolvimento de biofilmes de alginato impregnados com natamicina e aferição de seu potencial antimicótico*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Tese de doutorado, 2014.
- BIERHALZ, A. C. K.; WESTIN, C. B.; MORAES, A. M. Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. *Journal of Biological Macromolecules*, v.91, p.496-504, 2016.
- BOATENG, J. A.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.97, p.2892-2923, 2008.
- BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; TEN VOORDE, S. E. C. G.; WIJINHOVEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P. Review of Health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.53, p.52-62, 2009.
- BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺: Induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, v.2, p.1089-1096, 2001.
- BROUSSARD, K. C.; POWERS, J. G. Wound dressings: Selecting the most appropriate type. *American Journal of Clinical Dermatology*, v.14, p.449-459, 2013.
- BUENO, C. Z.; MORAES, A. M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v.122, p.624-631, 2011.
- CAMPOS, C. A., GERSCHENSON, L. N., FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, v.4, p.849-875, 2011.
- CHA, S.D.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.44, p.223-237, 2004.
- CHABY, G.; SENET, P.; VANEAU, M.; MARTEL, P.; GUILLAUME, J.; MEAUME, S.; TÉOT, L.; DEBURE, C.; DOMPMARTIN, A.; BACHELET, H.; CARSIN, H.; MATZ, V.; RICHARD, J. L.; ROCHET, J. M.; SALES-AUSSIAS, N.; ZAGNOLI, A.; DENIS, C.; GUILLOT, B.; CHOSIDOW, O. Dressings for acute chronic wounds: A systematic review. *Archives of Dermatology*, v.143, p.1297-1304, 2007.

- CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, v.63, p.176–187, 2006.
- CHIU, C. T.; LEE, J. S.; CHU, C. S.; CHANG, Y. P.; WANG, Y. J. Development of two alginate-based wound dressings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.19, p.2503–2513, 2008.
- DA SILVA, M. A.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, v.77, p.736–742, 2009.
- DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; PHILLIPS, T. Choosing a wound dressing based on common wound characteristics. *Advances in Wound Care*, v.5, p.32-41, 2016.
- DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOUS, D.; DEN BEUKEN, E. Z-V.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, v.19, p.S0103-S112, 2008.
- DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. *Biomedicine*, v.5, p.24-28, 2015.
- DONATI, I.; HOLTAN, S.; MØRCH, Y.A.; BORGOGNA, M.; DENTINI, M.; SKJÅK-BRÆK, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, v.6, p.1031-1040, 2005.
- DONATI, I.; PAOLETTI, S. Material Properties of Alginates. In: *Alginates: Biology and Applications*. Ed.: REHM, B. H. A. Berlin: Springer Heidelberg, v.1, p.35-37, 2009.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.363, p.1-24, 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 Bioprocess Technology*, v.5, p.1447-1464, 2012.
- ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; TEÓFILO, R. F.; COIMBRA, J. S. R.; VITOR, D. M.; BATISTA, R. A.; FERREIRA, S. O.; ANDRADE, N. J.; MEDEIROS, E. A. A. Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v.94, p.199-208, 2013a.
- ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; TEÓFILO, R. F.; VITOR, D. M.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. SOUZA, F. B.; SINISTERRA, R. D.; MEDEIROS, E. A. A. Optimized dispersion of ZnO nanoparticles and antimicrobial activity against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *Journal of Nanoparticle Research*, v.15, p.1324-1340, 2013b.
- FDA, Code of Federal Regulations Title 21 – Food and Drugs, *Part 182 substances generally recognized as safe*. 2016. Disponível em: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=a120086b77efbd848ead504952428835&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5>. Acesso em: 08/08/2016.

- FORREST, M. J. Overview of analytical techniques. *In: Analysis of thermoset materials, precursors and products*. Shawbury: Rapra Technology Limited, 2003, p.87.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.335, p.123–129, 2007.
- GOMÉZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, v.25, p.1514-1520, 2011.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, v.57, p.190-195, 1992.
- GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, v.32, 195-198, 1973.
- GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, v.5, p. 1-16, 2003.
- HAIPOUR, M. J.; FROMM, K. M.; ASHKARRAN, A. A.; ABERASTURI, D. J.; LARRAMENDI, I. R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W. J.; MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, v.30, p.499-511, 2012.
- HAN, J. H. Antimicrobial Food Packaging. *In: Novel food packaging techniques*. CRC Press, 2003, p.50-70.
- HENRIETTE, M. C. A. Nanocomposite for food packaging applications. *Food Research International*, v.42, p.1240-1253, 2009.
- HINMAN, C. D.; MAIBACH, H. Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. *Nature*, v. 200, p.377-378, 1963.
- HWANG, Y.; LEE, J.; JEONG, Y.; CHEONG, S.; AHN, Y.; KIM, S. H. Production and dispersion stability of nanoparticles in nanofluids. *Powder Technology*, v.186, p. 145-153, 2008.
- IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, v.37, p.1533-1541, 2001.
- JIE, J.; WANG, G.; CHEN, Y.; HAN, X.; WANG, Q.; XU, B. Synthesis and optical properties of well-aligned ZnO nanorod array on an undoped ZnO film. *Applied Physics Letters*, v.86, 2005.
- KANMANI, P.; RHIM, J. Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v.106, p.190-199, 2014.

- KHORSAND ZAK, A., MAJID, W. H. A.; ABRISHAMI, M. E.; YOUSEFI, R. X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods. *Solid State Sciences*, v.13, p.251–256, 2011.
- LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.13, p.1-69, 1989.
- LAI-CHEONG, J.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, v.41, p.317-320, 2013.
- LAMKE, L. O.; NILSSON, G. E.; REITHNER, H. L. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns*, v.3, p.159–165, 1977.
- LEAL, D., MATSUHIRO, B.; ROSSI, M.; CARUSO, F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, v.343, p.308-316, 2008.
- LEE, K.Y., MOONEY, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v.37, p.106-126, 2012.
- LENCINA, S.M.M., ANDREUCETTI, N.A., GÓMEZ, C.G., VILLAR, M.A. Recent studies on alginates based blends, composites and nanocomposites. In: *Advances in Natural Polymers: Composites and nanocomposites*. Eds.: THOMAS, S., VISAKH, P.M., MATHEW, A.P. New York: Springer Heidelberg, v.18, p.193-254, 2013.
- LI, L. H.; DENG, J. C.; DENG, H. R.; LIU, Z. L.; XIN, L. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. *Carbohydrate Research*, v.345, p.994–998, 2010.
- LIMA, A. M.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. *Química Nova*, v.30, p.832-837, 2007.
- LIU, Y.; KIM, H.-I. Characterization and antibacterial properties of genipin-crosslinked chitosan/poly(ethylene glycol)/ZnO/Ag nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v.89, p.111-116, 2012.
- MANALILI, N. M.; DORADO, M. A.; VAN OTTERDIJK, R. *Appropriate food packaging solutions for developing countries*. FAO, 2014. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/015/mb061e/mb061e00.pdf>, acesso em 26 de abril de 2016.
- MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, v.120, p.152-158, 2007.
- MARTINS, M. A.; TIPPLE, A. F. V.; REIS, C.; SANTIAGO, S. B.; BACHION, M. M. Úlcera crônica de perna de pacientes: análise microbiológica e de susceptibilidade antimicrobiana. *Ciência, Cuidado e Saúde*, v.9, p.464-470, 2010.

- McHUGH, H. T.; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHITA, J. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, v.58, p.899-903, 1993.
- MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; HE, C. N.; XING, N.; LI, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.21, p. 1751–1759, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11220-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 20/06/2016.
- MOHANDAS, A.; PT KUMAR, S.; RAJA, B.; LAKSHMANAN, V.-K.; JAYAKUMAR, R. Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds. *International Journal of Nanomedicine*, v.10, p.53-66, 2015.
- MØRCH, Ý.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca⁺², Ba⁺² and Sr⁺² on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, v.7, p.1471-1480, 2006.
- MORGAN, D. Alginate dressings. *Journal of Tissue Viability*, v.7, p.4-9, 1996.
- MULTON, G. The Role of Packaging in Preserving Foodstuffs. In: *The Role of Packaging in Preserving Foodstuffs*. VCH Publishers, 1996.
- NIETO, M. Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. In: *Edible films and coatings for food applications*. Western Regional Research Center, 2009.
- OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *Food Science and Technology*, v.41, p.359-366, 2008.
- PANDEY, S.; MISHRA, S. B. Sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials: synthesis, characterizations and applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 59, p.73-94, 2011.
- PASQUET, J.; CHEVALIER, Y.; COUVAL, E.; BOUVIER, D.; NOIZET, G.; MORLIÈRE, C.; BOLZINGER, 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.
- PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer*, v.49, p.3187-3204, 2008.
- PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressing: A short review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, v.18, p.18-23, 2004.
- PAVLATH, A. E.; VOISIN, A.; ROBERTSON, G. H. Pectin-based biodegradable water insoluble films. *Macromolecules Symposia* 40, p. 107-113, 1999.

- PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging and Science*, v.21, p.375-383, 2008.
- PRANOTO, Y.; SALOKHE, V. M.; RAKSHIT, S. K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, v.38, p.267-272, 2005.
- PREDA, N.; ENCULESCU, M.; ENCULESCU, I. Polysaccharide-assisted crystallization of ZnO micro/nanostructures. *Materials Letters*, 115, 256–260, 2014.
- PREMANATHAN, M.; KARTHIKEYAN, K.; JEYASUBRAMANIAN, K.; MANIVANNAN, G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid oxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v.7, p.184-192, 2011.
- RAGHUPATHI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*, v.27, p.4020-4028, 2011.
- RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.37, p.323-330, 2004.
- RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; NG, P. K. W. Preparation and Characterization of Chitosan-based nanocomposite Films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.5814-5822, 2006.
- RHIM, J.-W.; PARK, H.-M.; HA, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, v.38, p.1629-1652, 2013.
- RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, v.57, p.397-430, 2008.
- RINAUDO, M. Non-covalent interactions in polysaccharide systems. *Macromolecular Bioscience*, v.6, p.590-610, 2006.
- RUIZ-CARDONA, L., SANZGIRI, Y. D., BENEDITTI, L. M., STELLA, V. J., TOPP, E. M. Application of benzyl hyaluronate membranes as potential wound dressings: evaluation of water vapour and gas permeabilities. *Biomaterials*, v.17, p.1639-1643, 1996.
- SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; JÚNIOR, M. A. W.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WURLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, v.20, p.85-89, 2009.
- SCHMIDT-MEND, L.; MACMANUS-DRISCOLL, J. L. ZnO – nanostructures, defects, and devices. *Materials Today*, v.10, p.40-48, 2007.

SHALUMON, K. T.; ANULEKHA, K. H.; NAIR, S. V.; NAIR, S. V.; CHENNAZHI, K. P.; JAYAKUMAR, R. Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.49, p.247–254, 2011.

SIGMA-ALDRICH, *Ficha de informações de segurança de produtos químicos, produto referência* 544906, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=544906&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D544906%26interface%3DProduct%2520No.%26N%3D0%2B%26mode%3Dmode%2520matchpartialmax%26lang%3Dpt%26region%3DBR%26focus%3DproductN%3D0%2520220003048%2520219853286%2520219853075>. Acesso em: 25/07/2016. 2016a.

SIGMA-ALDRICH, *Ficha de informações de segurança de produtos químicos, produto referência* 677450, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=677450&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F677450%3Flang%3Dpt>. Acesso em: 25/07/2016. 2016b.

SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, v.57, p.263-274, 1974.

SOARES, N. F. F.; DA SILVA, W. A.; PIRES, A. C. S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações de embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, v.56, p.370-378, 2009.

SORRETINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of biocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, v.18, p.84-95, 2007.

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

STOKKE, B. T.; SMIDSRØD, O.; BRUHEIM, P.; SKJAKBRAEK, G. Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties. *Macromolecules*, v.24, p.4637–4645. 1991.

STROMBERG, H.-E.; AGREN, M. S. Topical zinc oxide treatment improves arterial and venous leg ulcers. *British Journal of Dermatology*, v.111, p.461-468, 1984.

SUPPAKUL, P.; MILTZ J.; BIGGER, S. W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, v.68, p.408-420, 2003.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, v.14, p.71-78, 2003.

- THIRUMAVALAVAN, M.; HUANG, K. L.; LEE, J. F. Synthesis and properties of nano ZnO using polysaccharides as chelating agents: effects of various parameters on surface modification of polysaccharides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.417, p.154–160, 2013.
- THOMAS, S. Alginate dressing in surgery and wound management - part 1. *Journal of Wound Care*, v.9, p.56–60, 2000.
- TRANDAFILOVIĆ, L. V.; BOŽANIĆ, D. K.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOIVĆ, S.; LUYT, A.S.; DJOKOVIĆ, V. Fabrication and antibacterial properties of ZnO-alginate nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v.88, p.263-269, 2012.
- TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Chitosan–silver oxide nanocomposite film: preparation and antimicrobial activity. *Bulletin of Materials Science*, v.34, p.29-35, 2011.
- UMAR, A.; SUH, E. K.; HAHN, Y. Growth and optical properties of large-quantity single-crystalline ZnO rods by thermal evaporation. *Journal of Applied Physics D: Applied Physics*, v.40, p.3478-3484, 2007.
- VAZ; J. M. *Preparação e caracterização de biofilmes ativos à base de alginato de diferentes estruturas poliméricas reticulados com cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de mestrado, 2012.
- VALENTIN, R.; HORGA, R.; BONELLI, B.; GARRONE, E.; DI RENZO, F.; QUIGNARD, F. FTIR spectroscopy of NH₃ on acidic and ionotropic alginate aerogels. *Biomacromolecules*, v.7, p.877-882, 2006.
- VENUS, M.; WATERMAN, J.; MACNABE, I. Basic physiology of the skin. *Surgery*, v.29, p.471-474, 2011.
- VICENTINI, D. S.; SMANIA, A.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. *Materials Science and Engineering C*, v.30, p.503–508, 2010.
- VIMALA, K.; MOHAN, M.; SIVUDU, K. S.; VARAPRASAD, K.; RAVINDRA, S.; REDDY, N. N.; PADMA, Y; SREEDHAR, B.; MOHANARAJU, K. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: a facile approach for superior antibacterial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.76, p.248-258, 2010.
- VOSS, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society colour chart. *HortScience*, v.27, p.1256-1260, 1992.
- WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L. Y. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v.63, p.610–618, 2002.
- WANG, Z. L. Nanostructures of zinc oxide. *Materials Today*, v.7 p.26-33, 2004a.
- WANG, Z. L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of Physics: Condensed*, v.16, p.R829-R858, 2004b.

- WANG, X.; SPENCER, H. G. Calcium alginate gels: formation and stability in the presence of an inert electrolyte. *Polymer*, v.39, p.2759-2764, 1998.
- WHO (World Health Organization). *Wound and Lymphoedema Management*. 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44279>. Acesso em: 21/06/2016.
- WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pigs. *Nature*, v.193, p.293-294, 1962.
- WITHARANA, S.; PALABIYIK, I.; MUSINA, Z.; DING, Y. Stability of glycol nanofluids – The theory and experiments. *Powder Technology*, v.239, p.72-77, 2013.
- WONG, D. W. S.; GREGORSKI, K. S.; HUDSON, J. S.; PAVLATH, A. E. Calcium alginate films: Thermal properties and permeability to sorbate and ascorbate. *Journal of Food Science*, v.61, p.337–341, 1996.
- XIAO, C.; WENG, L.; ZHANG, L. Improvement of physical properties of crosslinked alginate and carboxymethyl konjac glucomannan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 84, p.2554–2560, 2002.
- XIONG, G.; PAL, U.; SERRANO, J. G.; UCER, K. B.; WILLIAMS, R. T. Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: the impurity and defect perspective. *Physica Status Solid C*, v. 3, p.3577-3581, 2006.
- YANG, B.; KUMAR, A.; ZHANG, H.; FENG, P.; KATIYAR, R. S.; WANG, Z. Growth of ZnO nanostructures on metallic and semiconducting substrates by pulsed laser deposition technique. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v.42, p.1-7, 2009.
- YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Silver nanoparticle-loaded chitosan–starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Material Science and Engineering: C*, v.30, p.891-897, 2010.
- ZACTITI, E. M. *Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de alginato de cálcio sem e com sorbato e potássio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Tese de doutorado, 2004.
- ZACTITI, E. M., KIECKBUSCH, T. G. *Processo de produção de filmes plásticos ativos biodegradáveis de alginato de cálcio de baixa solubilidade*. Pedido de Privilégio de Patente. INPI, Prot. 01850064015 - 12/2005.
- ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, v.77, p.462–46, 2006.
- ZHANG, L.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. ZnO nanofluids – a potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*, v.18, p.939-944, 2008.
- ZHANG, L.; JIANG, Y.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behavior of ZnO nanoparticles (nanofluids). *Journal of Nanoparticle research*, v.9, p.479-489, 2007.

APÊNDICE A

Apêndice A1: Certificado de análise do alginato de sódio (Sigma-Aldrich, referência A2033, lote SLBM3663V):

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Alginate sodium salt from brown algae - Medium viscosity

Product Number: A2033
 Batch Number: SLBM3663V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 9005-38-3
 MDL Number: MFCD00081310
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 03 FEB 2015
 Recommended Retest Date: FEB 2017

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Beige and Faint Brown to Brown	Faint Beige
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Faint Yellow to Yellow	Faint Yellow
Solubility (Turbidity)	Slightly Hazy to Very Hazy	Slightly Hazy
100 mg plus 10 mL of Water		
Brookfield Viscosity	≥ 2000 cps	3080 cps
2% in water at 25 Deg C		



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Apêndice A2: Certificado de análise das nanopartículas tipo I (Sigma-Aldrich, referência 544906, lote MKBS193V):

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Zinc oxide - nanopowder, <100 nm particle size

Product Number: 544906
Batch Number: MKBS1930V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 1314-13-2
MDL Number: MFCD00011300
Formula: ZnO
Formula Weight: 81.39 g/mol
Quality Release Date: 27 JUN 2014

ZnO

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
X-Ray Diffraction	Conforms to Structure	Conforms
Complexometric Titration	79.1 - 81.5 %	80.5 %
% Zn		
Size	≤ 100 nm	63 nm
Average Particle Size		
Size	15 - 25	17
Specific Surface Area (m ² /g)		

Ali Ataei

Ali Ataei, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Apêndice A3: Certificado de análise das nanopartículas tipo II (Sigma-Aldrich, referência 677450, lote MKBT7475V):

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

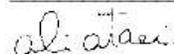
Certificate of Analysis

Product Name:
Zinc oxide nanopowder, 97%

Product Number: 677450
Batch Number: MKBT7475V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 1314-13-2
MDL Number: MFCD00011300
Formula: OZn
Formula Weight: 81.39 g/mol
Quality Release Date: 21 JAN 2015

ZnO

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Yellow and Faint Green to Green and Yellow-Green	Off-White
Appearance (Form)	Powder	Powder
X-Ray Diffraction	Conforms	Conforms
Particle Size	< 50 nm	< 50 nm
BET		
Miscellaneous Assay	Conforms	Conforms
XRF Analysis		
>97 wt% Zinc and Aluminum (Metals Basis)		
8% Aluminum doped		



Ali Ataei, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

APÊNDICE B

As Figuras B.1 a B.10 apresentam os resultados de distribuição de tamanho de partícula descritos no item 4.2.

Figura B.1: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 10.000 rpm e 5 minutos no Ultra Turrax.

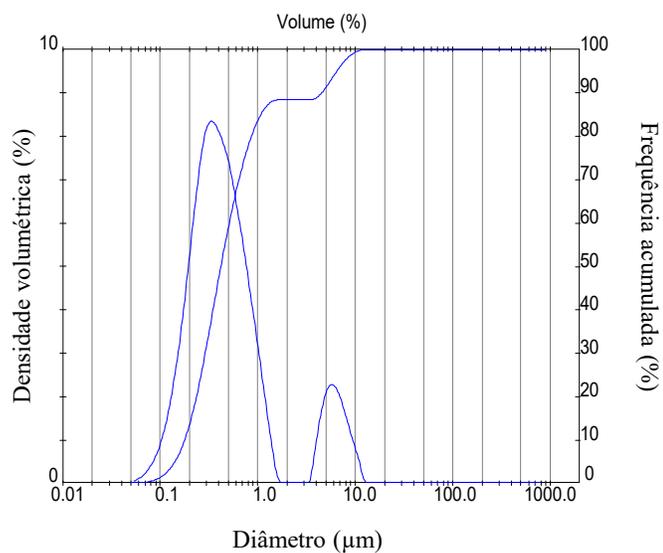


Figura B.2: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 10.000 rpm e 20 minutos no Ultra Turrax.

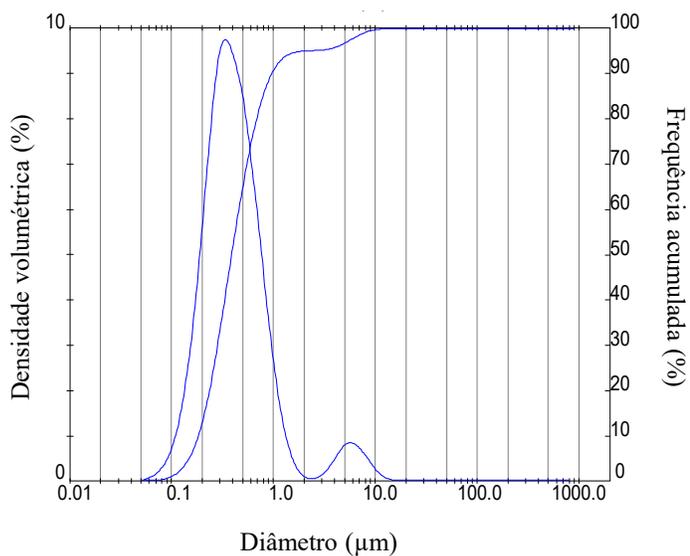


Figura B.3: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento por 45 minutos em banho ultrassônico (200 W).

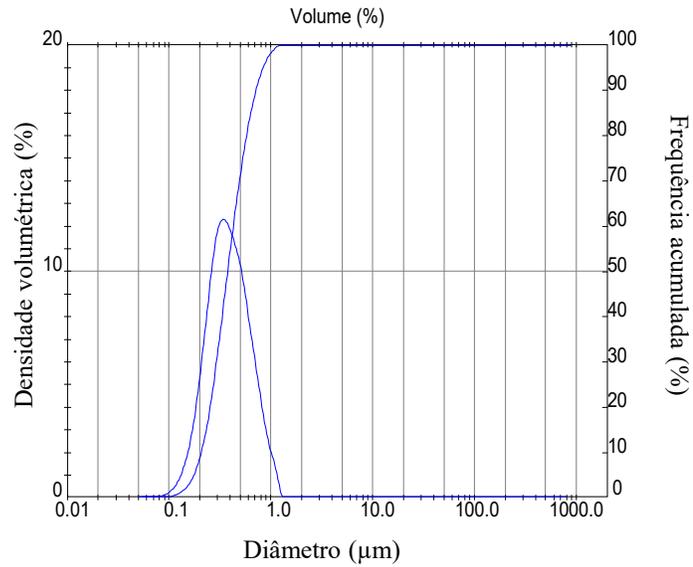


Figura B.4: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 22.000 rpm e 5 minutos no Ultra Turrax.

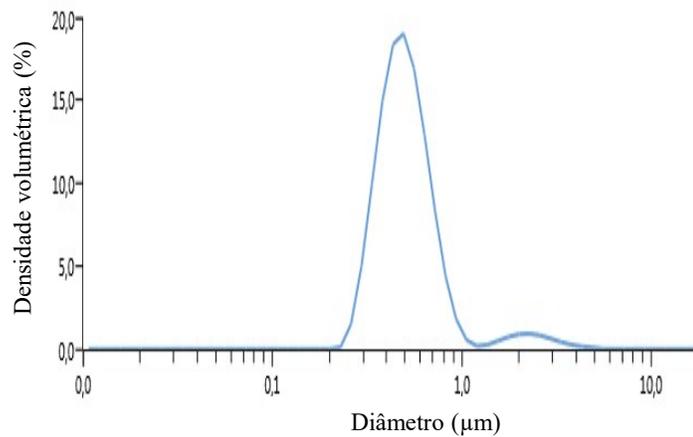


Figura B.5: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 22.000 rpm e 10 minutos no Ultra Turrax.

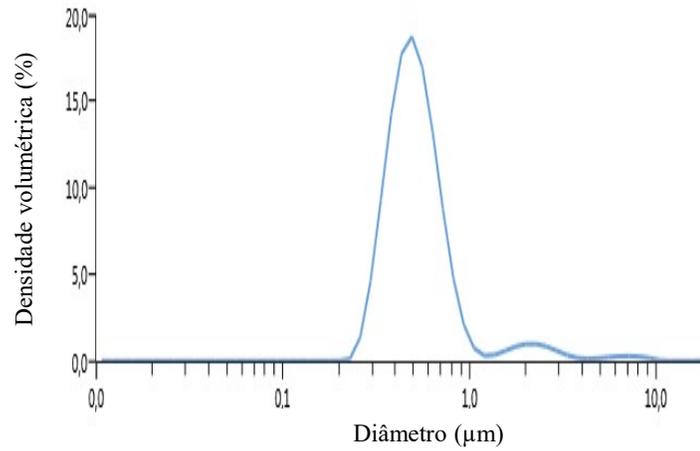


Figura B.6: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 22.000 rpm e 20 minutos no Ultra Turrax.

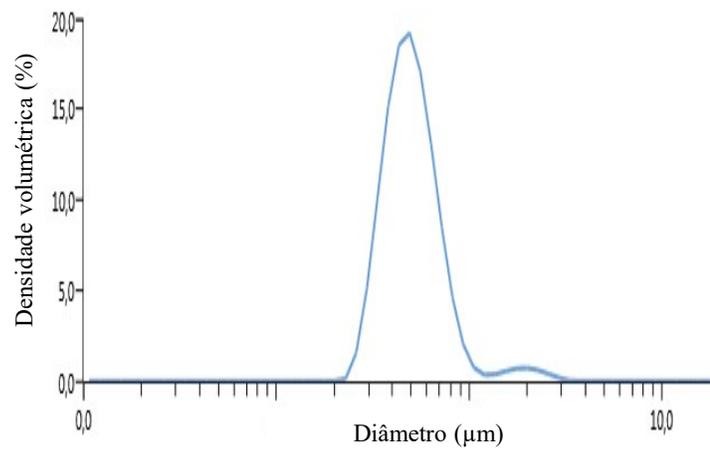


Figura B.7: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 22.000 rpm e 30 minutos no Ultra Turrax.

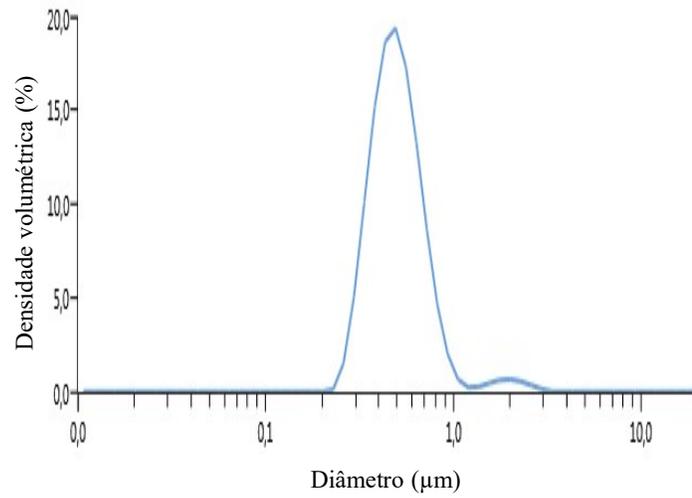


Figura B.8: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 22.000 rpm e 35 minutos no Ultra Turrax.

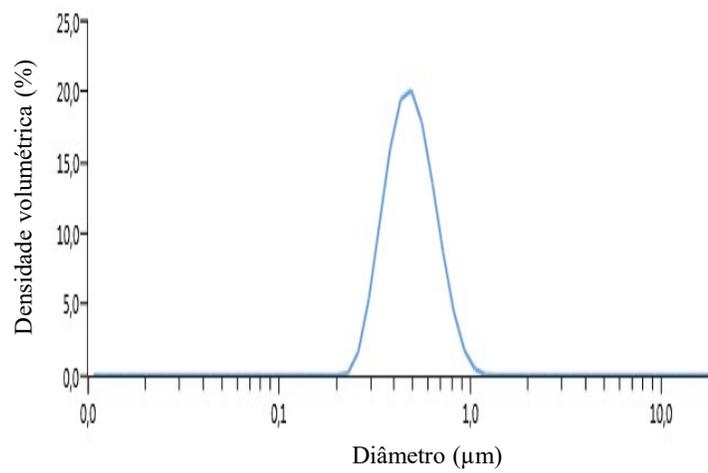


Figura B.9: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} I após tratamento a 24.000 rpm e 5 minutos no Ultra Turrax e 30 minutos em banho ultrassônico (200 W).

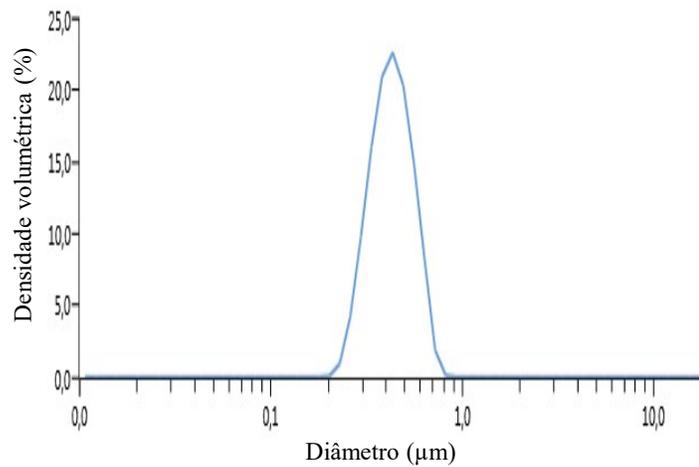


Figura B.10: Distribuição do tamanho de partícula de ZnO_{nano} II após tratamento a 24.000 rpm e 5 minutos no Ultra Turrax e 30 minutos em banho ultrassônico (200 W) utilizando 0,36 g de alginato como agente dispersante.

