

MARCEL FERRARI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES MONOCAMADA PEBDL E
PEAD ANTIMICROBIANOS E ATÓXICOS PARA APLICAÇÃO
EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Ciência e Engenharia Materiais –
PPGCEM, da Universidade do
Extremo Sul Catarinense – UNESC,
como requisito parcial para à
obtenção do título de Mestre em
Ciência e Engenharia de Materiais.**

Orientador: Marcio Antônio Fiori

CRICIÚMA, JUNHO DE 2013.

⊕ Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237d Santos, Marcel Ferrari dos.

Desenvolvimento de filmes monocamada PEBDL, e...
PEAD antimicrobianos e atóxicos para aplicação em
embalagens flexíveis / Marcel Ferrari dos Santos;
orientador: Márcio Antônio Fiori. – Criciúma, SC, Ed. do
Autor, 2013.

119 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais, Criciúma, SC, 2013.

1. Plásticos nas embalagens. 2. Embalagens
alimentícias - Toxicidade. 3. Embalagens flexíveis. I.
Titulo.

CDD. 22ª ed. 688.8

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

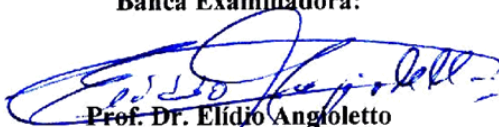
Marcel Ferrari dos Santos

Desenvolvimento de filmes monocamada PEBDL e PEAD antimicrobianos e atóxicos para aplicação em embalagens flexíveis

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (Área de concentração: Tecnologia de Materiais) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Criciúma, SC, 14 de junho de 2013.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Elídio Angioletto

Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



Prof. Dr. Michael Peterson

Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



Prof. Dr. Nivaldo Cabral Khunen

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas embalagens flexíveis para a indústria de alimentos com propriedades antimicrobianas e atóxicas desejadas. Foram utilizados dois *grades* comerciais de diferentes polímeros, PEAD e PEBDL, aditivados com dois princípios ativos de natureza química distinta: um composto inorgânico, de matriz vítrea dopado com íons de zinco - GZn; e um composto orgânico, conhecido como triclosan - TCS. Na caracterização dos princípios ativos foram aplicadas técnicas microbiológicas, toxicológicas e de migração. Ambos os princípios ativos demonstraram atividade antimicrobiana em bactérias do tipo gram-positiva *Staphylococcus aureus* (SA) e gram-negativa *Escherichia coli* (EC) sendo o TCS mais efetivo quando exposto aos microrganismos, em relação ao GZn. Os princípios também apresentaram capacidades de migração das espécies químicas para o meio externo, sendo que o TCS apresenta potencial de migração relativamente maior do que GZn. Porém, quanto as análises do tipo toxicológicas, o GZn não apresentou efeitos tóxicos quando exposto ao DNA devido aos menores valores de índice de fragmentação e frequência de danos. Em comparação, o TCS mostrou-se extremamente tóxico, com valores muito maiores nos índices de fragmentação e frequência nas concentrações utilizadas. Assim, o GZn foi definido e adotado como princípio ativo atóxico na produção de embalagens flexíveis de PEAD e PEBDL via processo de extrusão a balão monocamada. Foram empregadas análises microbiológicas e de absorção atômica na caracterização das embalagens a tóxicas. As análises apresentaram resultados satisfatórios de acordo com a temática do trabalho proposto. Ambas as embalagens de PEAD e PEBDL apresentaram efeito antimicrobiano desejável em bactérias gram-positivas (SA) e gram-negativas (EC) além de apresentar valores de migração na ordem de 2ppm, atendendo assim as exigências propostas pela ANVISA de até 25 ppm. Assim as embalagens mostraram-se adequadas quanto ao seu emprego pela indústria alimentícia no mercado de produtos cárneos, com propriedades antimicrobianas e atóxicas esperadas, sem riscos de interferir na segurança alimentar do produto.

Palavras-chave: Embalagens. Antimicrobianos. Atóxico. Alimentos.

ABSTRACT

In this work, it was developed flexible packaging for the food industry with antimicrobial properties and nontoxic desired. It was used two commercial grades of different polymers, HDPE and LLDPE, additives with two active principles of distinct chemical nature: an inorganic compound, glassy matrix doped with zinc ions - GZn, and an organic compound known as triclosan - TCS. In the characterization of the active techniques were applied microbiological, toxicological and migration. Both active agents have demonstrated antimicrobial activity on type bacteria Gram-positive *Staphylococcus aureus* (SA) and gram negative *Escherichia coli* (EC) being the most effective TCS when exposed to microorganisms, in relation to GZn. The principles also had capacities of migration of chemical species to the external environment, with the potential for migration TCS with relatively greater than GZn. But the type of toxicological analyzes, the GZn showed no toxic effects when exposed to the DNA due to lower levels of fragmentation index and frequency of damage. In comparison, TCS was shown to be extremely toxic, with much higher values of index fragmentation in the concentrations utilized. Thus, GZn was defined and adopted as nontoxic active in production of flexible packaging HDPE and LLDPE, in the process extrusion blow monolayer. Microbiological analyzes and atomic absorption were employed characterization of nontoxic packaging. The analyzes showed satisfactory results according to the theme of the proposed work. Both HDPE and LLDPE packaging showed antimicrobial effect desirable in gram-positive bacteria (SA) and gram negative (CE) and presents values of the order of 2 ppm migration, thus meeting the requirements proposed by ANVISA 25 ppm. Therefore, the packages show up as appropriate to their employment by the food industry in the market of meat products with antimicrobial properties and nontoxic expected, without risk of interfering with the food safety of the product.

Keywords: Packaging. Antimicrobians. Nontoxic. Foods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama do processo de extrusão plana.....	28
Figura 2 - Processo de extrusão tubular.	30
Figura 3 - Processo de extrusão “blow”.	32
Figura 4 - Estrutura molecular para o Triclosan.....	49
Figura 6 - estrutura molecular para o triclosan.....	57
Figura 7- Resultados microbiológicos de Difusão em Ágar para (a) GZn com <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) e (b) GZn com <i>Escherichia coli</i> (EC);	68
Figura 8 - Resultados de toxicidade tipo cometa para o GZn e TCS. (a) Índice de fragmentação e (b) frequência de dano (%) ao DNA humano.	69
Figura 9 - Análise de variância (ANOVA) aplicada aos resultados genotóxicos dos princípios ativos GZn e TCS por (a) índice de danos e (b) frequência de danos.	70
Figura 10 - Escala de danos ao DNA utilizada na leitura dos resultados toxicológicos via Teste Cometa.	71
Figura 12 - Resultados microbiológicos dos ensaios de Difusão em Ágar para os <i>masterbatches</i> : (a) e (b) PEAD/GZn com bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , respectivamente e (c) e (d) PEAD/TCS com bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , respectivamente.	74
Figura 13 - Resultados microbiológicos dos ensaios de Difusão e m Ágar para os <i>masterbatches</i> : (a) e (b) PEBDL/GZn com bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , respectivamente e (c) e (d) PEBDL/TCS com bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , respectivamente.	75
Figura 14 - Relação entre halos de inibição e o percentual de TCS e de GZn em testes de Difusão em Ágar com bactérias <i>Escherichia coli</i> (EC) e <i>Staphylococcus aureus</i> . (a) PEAD/GZn e (b) PEAD/TCS.....	77
Figura 15 - Relação entre halos de inibição e o percentual de TCS e de GZn em testes de Difusão em Ágar com bactérias <i>Escherichia coli</i> (EC) e <i>Staphylococcus aureus</i> . (a) PEBDL/GZn e (b) PEBDL/TCS.	77
Figura 16 - Nº de microrganismos sobreviventes do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) e <i>Escherichia coli</i> (EC) durante exposição por 4 horas em <i>masterbatches</i> antimicrobianos: (a) PEBDL/GZn e (b) PEBDL/TCS. ...	79
Figura 17 - Nº de microrganismos sobreviventes do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) e <i>Escherichia coli</i> (EC) durante exposição por 4 horas em <i>masterbatches</i> antimicrobianos: (a) PEAD/GZn e (b) PEAD/TCS...	80
Figura 18 - Espectros de absorção UV-Visível para a solução aquosa após 1 dia de imersão dos <i>masterbatches</i> contendo 0,4 % e 2,4 % em massa do composto TCS. (a) PEBDL/GZn e PEAD/GZn; (b) detalhe na região de	

absorção do zinco; (c) PEBDL/TCS e PEAD/TCS e (d) detalhe na região de absorção do triclosan.	82
Figura 19 - Espectros de absorção UV-Visível para a solução aquosa após 19 dias de imersão dos <i>masterbatches</i> contendo 0,4 % e 2,4 % em massa do composto GZn e TCS. (a) PEBDL/GZn e PEAD/GZn, (b) detalhe na região de absorção do zinco, (c) PEBDL/TCS e PEAD/TCS e (d) detalhe na região de absorção do triclosan.	84
Figura 20 - Concentração de espécies iônicas liberadas (ppm) para meio aquoso por <i>masterbatches</i> PEAD/GZn e PEBD/GZn contendo diferentes percentuais de GZn: 0,4; 1,4 e 2,4 wt% ; em após diferentes tempos de imersão: 1, 10 e 19 dias.	86
Figura 21 - Número de microrganismos sobreviventes do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) e <i>Escherichia coli</i> (EC) durante exposição por 4 horas em filmes antimicrobianos atóxicos de PEAD e PEBDL, aditivados com GZn.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos para IRGAGUARD B1000.....	50
Tabela 2 - Formulação do GZn.....	57
Tabela 3 - Níveis para as variáveis do planejamento experimental para análise de migração.....	61
Tabela 4 - Matriz de dados do planejamento experimental 2^k estrela.....	64
Tabela 5 - Resultados obtidos referente ao teste de migração para os <i>masterbatches</i> PEBDL/GZn e PEAD/GZn.....	86
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores de migração de PEAD.....	87
Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores de migração de PEBDL.....	87
Tabela 8 - Valores de espessura e percentual de GZn definidos nas amostras de filmes de PEBDL e de PEAD.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs - nanopartículas de prata
ANOVA - análise de variância
ANPI - Agência Nacional de Pesquisa Inovação
ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATP - trifosfato de adenosina
CECAM – Centro de Caracterização de Materiais
CuNPs - nanopartículas de cobre elementar
DNA - ácido desoxirribonucleico
EC - *Escherichia coli*
EC₅₀ - concentração média efetiva
EPA - *Environmental Protection Agency*
ETE - estação de tratamento de esgoto
EUA - Estados Unidos da América
EVOH - copolímero de etileno e de álcool vinílico
FDA - *Food and Drug Administration*
FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
GZn - espécies iônicas de zinco
LD - dose letal
LMPP – Laboratório de Materiais Avançados e Processamento de Polímeros
NOEC - concentração efetiva não-observada
PCT - Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes
PE - polietileno
PEAD - polietileno de alta densidade
PEBD - polietileno de baixa densidade
PEBDL - polietileno de baixa densidade linear
PEMD - polietileno de média densidade
PLGA - poli-(lactido-co-ácido glicólico)
PP - polipropileno ppm - parte por milhão
PVA - acetato de polivinila
PVC- cloreto de polivinila
R0 - raio inicial do filme
RF - raio final do filme soprado
RNA - ácido ribonucleico
SA - *Staphylococcus aureus*
TCS - triclosan[®]
Tg - temperatura de transição vítrea
UFC- unidade formadora de colônia
UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense
UV- ultra violeta

V - velocidade de puxamento

V0 - velocidade na saída da matriz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
4.1 POLIETILENO	25
4.2.2 Processo de extrusão tubular de filmes poliméricos	28
4.2.3 Processo de coextrusão de filmes multicamadas poliméricos ...	30
4.3 INTERAÇÃO PRODUTO – EMBALAGEM	33
4.3.1 Proteção de barreira e fenômenos de permeabilidade	34
4.3.2 Aspectos de migração	35
4.4 EMBALAGENS ATIVAS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	36
4.4.1 Tipos de embalagens antimicrobianas	37
4.5 AGENTES ANTIMICROBIANOS	37
4.5.1 Aditivos antimicrobianos a base de compostos inorgânicos	38
4.5.2 Compostos antimicrobianos a base de prata	39
4.5.3 Compostos antimicrobianos a base de cobre	41
4.5.4 Compostos antimicrobianos a base de titânio	42
4.5.5 Compostos antimicrobianos a base de zinco: propriedades, aplicações e toxicologia	43
4.5.5.1 Aplicações gerais	45
4.5.5.2 Aspectos toxicológicos	46
4.6 ADITIVOS ANTIMICROBIANOS A BASE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS	47
4.6.1 Compostos antimicrobianos a base de triclosan: propriedades, aplicações e toxicologia	48
4.6.1.1 Triclosan: aspectos toxicológicos	51
4.6.1.2 Toxicidade aguda do triclosan: organismos terrestres	51
4.6.1.3 Toxicidade Aguda: organismos aquáticos	52
4.6.1.4 Genotoxicidade e mutagenicidade	53
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
6.1 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS E DOS POLÍMEROS	67
6.1.1 Análise microbiológica	67
6.1.2 Análise toxicológica	68
6.1.3 Análise por espectroscopia UV-visível	72
6.2.1 Análise microbiológica	74

6.2.2 Ensaio de espectroscopia UV-visível	81
7 CONCLUSÃO	91
8 REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	113
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	115

1 INTRODUÇÃO

A história relata que o avanço da sociedade está associado com a capacidade do homem em desenvolver processos de engenharia mais aperfeiçoados e com o aprimoramento da sua habilidade de manipular os materiais. Assim, os materiais tornaram-se objeto de estudo das principais civilizações, por apresentarem a versatilidade de serem trabalhados para diversas finalidades, como para a fabricação de ferramentas, roupas, armamentos e muitos outros produtos de ampla utilidade.

Neste contexto, um produto que tem atenção especial por parte de pesquisadores na área do desenvolvimento e da inovação são as embalagens. Embalagens que garantam melhores condições de transporte, manuseio e de conservação (principalmente para alimentos) são indispensáveis atualmente para o desenvolvimento da sociedade. Foi preciso que um fato histórico, como a revolução industrial, ocorresse para que as embalagens adquirissem um importante espaço no mercado consumidor.

A Revolução Industrial ocorreu principalmente no setor têxtil no século XVIII e seus efeitos contribuíram mais tarde para a industrialização de outros setores, dentre eles o de alimentos e de embalagens. O alargamento do comércio foi uma das características dessa época que se deu com o aumento do mercado consumidor forçando o aumento na produção, já não mais suprida completamente pelo trabalho artesanal. A Revolução Industrial criou definitivamente uma nova realidade (MARIANO et. al, 2008). Assim, inicia-se a era das embalagens especiais com o aprimoramento das técnicas de fabricação e da seleção de materiais. Com o passar do tempo, o aprimoramento das embalagens foi cada vez mais intensificado para poder atender a demanda dos consumidores por produtos naturais e por produtos com menos conservantes.

Atualmente as embalagens estão classificadas em duas categorias: embalagens ativas e embalagens inteligentes. Embalagens ativas são aquelas que interagem de maneira intencional com o alimento, visando melhorar algumas de suas características (LOPEZ-DE-DICASTILLO et al, 2011; SING at. al., 2011). Enquanto as embalagens inteligentes podem ser definidas como aquelas que monitoram as condições do alimento acondicionado ou do ambiente externo à embalagem, comunicando-se com o consumidor (YAM et al., 2005; SILVESTRE et al., 2011; SING at. Al., 2011).

Dentre os principais tipos de embalagens ativas, destacam-se as

embalagens antimicrobianas, antioxidantes e aromáticas. A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa que apresenta substância antimicrobiana incorporada, ou imobiliza da no material da embalagem sendo capaz de eliminar ou inibir microrganismos deterioradores e, ou patogênicos (LOPEZ-DE-DICASTILLO et al, 2011; CRAN et al, 2010). Aplicações em alguns tipos de embalagens requerem polímeros com boas propriedades de barreira para que se obtenha longa vida de prateleira (*shelf-life*) para os produtos (BARBIROLI et al, 2012). Entretanto, se apenas um polímero é utilizado na composição de um filme de embalagem, é muito difícil se obter todas as propriedades requeridas para a conservação do produto. Neste caso uma opção é utilizar os filmes multicamadas (MAHAPRAMA et. al., 2011; SANTAMARIA et. al, 2012).

Nos últimos anos, têm se destacado os desenvolvimentos de embalagens com atividades antimicrobianas. Os filmes antimicrobianos empregados nestas embalagens são divididos em dois grupos: o primeiro, o agente migra para a superfície do produto, enquanto no segundo eles são efetivos contra o crescimento microbiano superficial sem a necessidade de migração para o produto. Em ambos, um intenso contato entre o produto e o agente antimicrobiano é necessário, logo, alimentos acondicionados a vácuo apresentam grande potencial de uso da tecnologia (VERMIREM et. al, 2002; BARBIROLI et al, 2012).

Deve-se considerar, na seleção do agente antimicrobiano, seu mecanismo de inibição, natureza química, cinética de migração e difusão do agente no alimento, características físico-químicas do alimento - como pH, umidade e composição- tipo e população de microrganismos, fisiologia do microrganismo alvo, processo de fabricação do material de embalagem, maquinabilidade e processabilidade do material de embalagem e aspectos relacionados à legislação (SINGH et. al., 2011; CHEN et. al., 2012; HAN 2002).

A tecnologia baseia-se no fato de que, na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial, necessitando de maior área de contato entre o produto e o agente antimicrobiano. Vários compostos naturais e sintéticos têm apresentado potencial antimicrobiano despertando interesse em inúmeras aplicações para embalagens: o uso de íons metálicos, por exemplo, como ouro, cobre, prata e zinco (BRUNA et al., 2012; LI et. al., 2012); ácidos orgânicos os benzoatos e sorbatos; e polímeros com atividades antimicrobianas naturais, como as quitosanas e as poliamidas, também estão sendo estudados neste sentido (JIPA et al, 2012; CHEN et al., 2012).

Como exemplo de agentes antimicrobianos, pode-se citar a linha comercial Irgaguard® B da CIBA/BASF, baseada em compostos de prata e triclosan e podendo ser usados em uma variedade de polímeros. Um dos produtos mais discutidos e estudados é a zeólita dotada de íons de prata (cristais de alumínio-silicatos com elementos da primeira e da segunda família de metais da Tabela periódica como sódio, potássio, magnésio ou cálcio), nos quais uma porção dos íons sódio é substituída usualmente por íons prata (Ag-zeólita), o que confere atividade bactericida ao produto (SANCHES et. al, 2012; LLORENS et al., 2011). O triclosan, por sua vez, pode ser incorporado a vários tipos de plásticos e precisa migrar para o alimento para exercer sua ação antimicrobiana. (GALOTTO et al., 2011). Contudo, de acordo com (VERMIREM et. al, 2002), temperaturas acima de 250°C devem ser evitadas devido à volatilidade do composto. Ainda assim, o triclosan incorporado em polietileno de baixa densidade (PEBD) em concentração de 1000 mg/kg apresenta alta atividade nos estudos desenvolvidos *in vitro*, porém pode apresentar toxicidade (CORTEZ et. al., 2012; PERRON et al., 2012). Por sua vez, o composto a base de zinco desenvolvido por pesquisadores do LMPP/UNESC e comercializado pela KHER Chemical and Research, desperta um interesse tecnológico e comercial já que tradicionais compostos como a base de prata e triclosan podem provocar o surgimento de doenças crônicas e cancerígenas, oferecendo riscos à saúde humana, enquanto o princípio ativo de zinco não é tóxico aos humanos em concentrações relativamente grandes (ARYOU et al., 2011; BRAUSCH et al., 2012; LI et. al., 2012; NFODZO et al., 2011).

De acordo com Galotto et al. (2011) e Galic et al. (2011), além de embalar, estes produtos plásticos têm as funções de atrair a atenção, descrever as características do produto, criar confiança do consumidor e produzir uma impressão global favorável. A evolução do processo de fabricação das embalagens permitiu ao homem atuar nos mais variados mercados de aplicações, transformando a embalagem de um produto simples e convencional, a um produto com maior valor agregado pelas propriedades especiais conferidas neste caso.

Nas últimas décadas, a utilização de polímeros como materiais para embalagem de alimentos aumentou muito, devido às suas vantagens sobre outros materiais tradicionais. No mercado global de polímeros, que aumentou de 5 milhões toneladas em 1950 para cerca de 100 milhões de toneladas atualmente, 42% é destinado a embalagens, sendo que a indústria de embalagem representa cerca de 2% do Produto Nacional Bruto nos países desenvolvidos (SILVESTRE et al., 2011).

O desenvolvimento de filmes monocamada com propriedades

antimicrobiana e atóxica são de extrema importância e potencialidade para o mercado de aplicações de embalagens destinadas a produtos cárneos, por exemplo. Estes tipos de embalagens visam garantir maior margem de segurança quanto à qualidade, manuseio, condicionamento e tempo de prateleira, em relação às embalagens convencionais, neste caso conhecidas como embalagens passivas. O desenvolvimento e a aplicação de materiais com ação antimicrobiana tem se apresentado como uma forma eficiente para o desenvolvimento de embalagens dotadas de propriedades bactericidas e fungicidas. Estas embalagens proporcionam a proteção dos alimentos ou demais produtos da ação de decomposição por bactérias e fungos, proporcionando o aumento no prazo de validade (*shelf life*) dos mesmos, devido à minimização das reações de deterioração por microrganismo (MASTROMATTEO et. al., 2012). Este desempenho apresentado pela embalagem garante não só apenas ao consumidor, mas também ao setor industrial, maior margem de segurança. Isto porque, as condições de manuseio, transporte e armazenamento interferem diretamente na qualidade do produto e na segurança alimentar.

Desta forma, este trabalho busca além de consolidar uma parceria de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento entre empresas/universidade, o sucesso total na obtenção de um produto com valor agregado de interesse comum entre ramos industriais dos setores alimentícios e de flexíveis. Para o desenvolvimento dos filmes será empregado o polietileno de Baixa Densidade Linear (PEBDL) e o Polietileno de Alta Densidade (PEAD). O PEBDL tem como principal função nas embalagens a estrutural e o PEAD atua como material de barreira. Para a incorporação da propriedade antimicrobiana serão empregados como aditivos dois compostos de natureza química distintas: um composto orgânico, o Triclosan, e outro inorgânico, um composto vítreo dopado com espécies de zinco. Estes dois aditivos serão comparados a nível microbiológico, toxicológico e migratório, quando puros e processados como *masterbatches*. Diante destes resultados comparados, este trabalho optou por um composto com efeito antimicrobiano desejável e atóxico, visando garantir o desenvolvimento de embalagens com tais propriedades para a indústria alimentícia de interesse.

2 JUSTIFICATIVA

Esta dissertação tem como objetivo principal o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas e atóxicas aplicadas à indústria alimentícia, especialmente no mercado de produtos cárneos. O mercado de produtos cárneos é responsável notoriamente por grande parte da geração de riquezas, investimentos e empregos no âmbito nacional. Assim este mercado já consolidado é responsável por uma contribuição significativa nas exportações brasileiras para o mercado consumidor. Desta forma, contribui com os interesses das empresas fabricantes de embalagens e ainda comerciantes de produtos alimentícios em vistas da concorrência e maior espaço no mercado, devido à inovação industrial apresentada. Quanto aos interesses acadêmicos, os resultados também são extremamente importantes. Os benefícios vão além da qualificação profissional e pessoal por parte do acadêmico. O trabalho também consiste na elaboração de uma patente via INPI (Agência Nacional de Pesquisa Inovação) registrado com PCT/BR2012/000291 como um dos resultados esperados por parte da equipe de pesquisadores, composta por alunos e professores, comprometidos com a proposta inicial, além é claro de publicações vinculadas ao grupo de pesquisa pertencente a instituição.

Esta inovação no setor de embalagens alimentícias trata de um grande diferencial em relação às embalagens convencionais e principalmente as embalagens do tipo ativas. Nesta dissertação, foram desenvolvidas embalagens antimicrobianas como funções principais de aumentar o tempo de prateleira (*shelf-life*) sem alterar as propriedades do alimento, como cor, sabor e aroma principalmente garantindo assim a viabilidade comercial e as exigências de órgãos máximos certificadores como ANVISA, por exemplo.

Basicamente o que se tem hoje no mercado no que diz respeito a este tipo de aplicação, são embalagens aditivadas com princípios ativos baseados em compostos metálicos como prata, ouro entre outros. Porém, algumas suspeitas apontadas por pesquisadores e empresas sobre compostos a base de prata, indicam a possibilidade de produzir efeitos tóxicos a saúde humana quando expostos ao alimento, além do risco real de apresentar capacidade de migração mesmo em concentrações baixas.

Quanto ao ouro, algumas pesquisas demonstram a sua atividade antimicrobiana, porém o seu custo alto inviabiliza totalmente o seu emprego em escala industrial. Outros compostos orgânicos apresentam risco quanto ao seu emprego. Composto de natureza fenólica vem

trazendo já há algum tempo enorme polêmica por parte dos setores de interesse devido aos riscos conhecidos apresentados tanto na manipulação e fabricação do aditivo quanto no emprego em embalagens flexíveis para alimentos. Assim sendo, o mercado de embalagens carece de alternativas convincentes em termos de qualidade e segurança alimentar, sem apresentar níveis de migração.

Neste contexto, embalagens baseadas em *grades* comerciais de PEAD e PEBDL comumente usados na indústria apresentam diferentes princípios ativos que permitem o seu emprego adequado no setor industrial. Por sua vez, este trabalho apresenta como diferencial as aplicações do mercado, a utilização de princípios ativos atóxicos com atividade antimicrobiana desejável e baixa capacidade de migração, quando comparada a outras embalagens já testadas. Além é claro, livre de discussões entre diversos setores sobre possíveis riscos oferecidos a saúde humana. O princípio ativo trata-se de um aditivo mineral, dopado com espécies de zinco, apresentando efeito antimicrobiano mesmo em níveis de migração relativamente baixos, tornando atrativo ao setor de interesse. De acordo com a ANVISA, os níveis de migração permitidos conforme RDC 105/99 são na ordem de 0,20% m/m (massa/massa).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar filmes poliméricos monocamadas antimicrobianos e atóxicos de PEBDL e PEAD via processo de extrusão para aplicação na fabricação de embalagens flexíveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos esta dissertação apresenta:

- Avaliar a capacidade de migração dos aditivos antimicrobianos para o meio aquoso em função do percentual e de espessura dos filmes poliméricos monocamadas.
 - Definir e caracterizar um aditivo orgânico a base de Triclosan e um aditivo inorgânico a base de Zn quanto a capacidade antimicrobiana e toxicidade
 - Desenvolver e produzir *masterbatches* do tipo PEBD-Zn e PEBDL-Triclosan; PEAD-Zn e PEAD-Triclosan;
 - Avaliar a ação microbiológica dos *masterbatches* PEBDL-Zn e PEBD-Triclosan em função do percentual de Zn e do Triclosan;
 - Avaliar a capacidade de migração dos aditivos a base de Zn e de Triclosan para meios externos aquosos;
 - Obter filmes de PEBDL e PEAD via o processo de extrusão em escala laboratorial;
 - Definir as variáveis de processo de extrusão para o processamento de filmes de PEBDL e PEAD;
 - Obter filmes de PEBDL e PEAD aditivados com diferentes percentuais de *masterbatches* antimicrobianos e atóxicos e realizar a caracterização microbiológica;
 - Avaliar a capacidade de migração dos princípios ativos atóxicos dos filmes de PEBDL e dos filmes de PEAD em função do percentual *masterbatches*;
- Avaliar a capacidade de migração dos princípios ativos antimicrobianos e atóxicos dos filmes de PEBDL PEAD em função da espessura;
- Estabelecer as composições e condições de processamento para a produção de filmes de PEBDL e de PEAD antimicrobianos e atóxicos em sistema de extrusão de porte industrial;

Avaliar o desempenho antimicrobiano e a toxicidade dos filmes de PEBDL e de PEAD antimicrobianos em sistema de extrusão de porte industrial.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta seção apresenta a fundamentação teórica referente ao tema desenvolvido a fim de garantir melhor entendimento possível ao leitor. Nesta seção constam alguns aspectos técnicos que foram levados em consideração durante a execução e discussão da dissertação.

4.1 POLIETILENO

O polietileno (PE) entre os polímeros comerciais é o que tem a estrutura mais conhecida e mais simplificada. Os polietilenos são polímeros parcialmente cristalinos e flexíveis, cujas propriedades são acentuadamente influenciadas pelas quantidades relativas das fases amorfa e cristalina. Em condições normais, os polímeros etilênicos não são tóxicos, podendo inclusive ser utilizados em contato com produtos alimentícios e farmacêuticos. Atualmente, os polietilenos são mais apropriadamente descritos como polietilenos ramificados e polietilenos lineares (COUTINHO et. al., 2003; ALI DADFAR et al., 2011).

O mais importante parâmetro de controle das propriedades do polietileno é a densidade, sendo em virtude disso classificados da seguinte forma (HERNANDEZ et. al., 2000):

- Polietileno de Baixa Densidade (PEBD): 0,910 - 0,940 g/cm³;
- Polietileno de Baixa Densidade Linear (PEBDL): 0,910 - 0,925 g/cm³;
- Polietileno de Média Densidade (PEMD): 0,925 - 0,940 g/cm³;
- Polietileno de Alta Densidade (PEAD): 0,940 - 0,970 g/cm³;

O precursor da família das poliolefinas foi o polietileno de baixa densidade (PEBD), obtido acidentalmente em 1933 durante uma experiência do Dr. A. Michels. *AImperial Chemical Industrial Ltda* foi a pioneira na produção comercial do PEBD em 1939, empregando o processo de polimerização na fase gasosa, com altas temperaturas e pressões. Em 1955, o polietileno de alta densidade (PEAD) foi produzido pela primeira vez com os catalisadores organometálicos de Ziegler-Natta, através do processo de polimerização na fase líquida, com temperaturas mais baixas e pressões próximas da pressão atmosférica.

Na década de 70, a *Union Carbide* introduziu o polietileno linear de baixa densidade (PEBDL) utilizando tecnologia própria de fase gasosa. Nos anos 90, a *Dow Química* lançou os plastômeros poliolefinicos e os polietilenos produzidos pela tecnologia *insite* de catálise metalocênica (SARANTÓPOULOS et. al., 2002; SANTAMARIA et. al, 2012). As propriedades ideais do *grade* do

polietileno para cada aplicação específica dependem do balanço adequado de características obtidas no processo de polimerização. O polietileno é essencialmente um material composto, constituído da fase cristalina rígida (responsável pela resistência) e da fração amorfa elástica (responsável pela elasticidade, maciez e flexibilidade). Portanto, é necessário controlar a estrutura molecular do polietileno, o que passou a ser possível com a evolução dos processos de polimerização (MERGEN, 2003; SANTAMARIA et. al, 2012; FORTE et. al., 1996; HONG et. al., 2012; SANTAMARIA et. al, 2012; SELKE et. al., 2004; HONG et. al., 2012; SANTAMARIA et. al, 2012).

Dentre os polímeros mais utilizados na fabricação de filmes extrudados, encontra-se o polietileno de baixa densidade (PEBD), o qual na forma de filme possui boas propriedades óticas e boa processabilidade, porém baixa resistência mecânica. O contrário ocorre com o polietileno de baixa densidade linear (PEBDL), o qual, como filme possui propriedades óticas inferiores, processabilidade difícil, mas boa resistência mecânica. Assim, é comum a utilização de misturas físicas (blendas) destes dois polímeros para a obtenção de filmes com boa processabilidade, boas propriedades óticas e boa resistência mecânica. O valor da cristalinidade “aparente” do filme de PEBDL puro é levemente maior do que o das blendas, ou seja, o percentual de cristalinidade não é o único fator determinante das propriedades óticas do filme (GUERRINI et. al., 2004; HONG et. al., 2012; SANTAMARIA et. al, 2012; PRASANNA et. al., 2012).

O PEBD é um polímero parcialmente cristalino (50-60%), cuja temperatura de fusão está na faixa de 110 a 115°C. Este polietileno contém cadeias ramificadas, sendo que estas ramificações são, na maioria das vezes, tão longas quanto à cadeia principal do polímero. A presença dessas ramificações determina o grau de cristalização, as temperaturas de transição e afeta os parâmetros cristalográficos tais como o tamanho dos cristalitos (COUTINHO et al., 2003; HONG et. al., 2012; SANTAMARIA et. al, 2012).

O PEBD também apresenta muitas propriedades importantes do ponto de vista industrial, tais como a tenacidade à temperatura ambiente e a baixas temperaturas (com resistência mecânica suficiente para muitas aplicações), a excelente resistência à corrosão, as ótimas propriedades de isolamento, a ausência de cheiro e sabor, e a baixa permeação de vapor d'água (SMITH, 1998; HONG et. al., 2012). Por sua vez, o PEBDL é mais cristalino que o PEBD, consequência do baixo teor de ramificações curtas e da ausência de ramificações longas.

As ramificações de cadeia curta têm influência, tanto no PEBDL como no PEBD, sobre a morfologia e em algumas propriedades físicas, tais como, rigidez, densidade e resistência à tração. Com cadeias lineares de baixo grau de ramificações curtas, o PEBDL cristaliza em lamelas mais ordenadas e mais espessas do que o PEBD. Conseqüentemente, o PEBDL apresenta melhores propriedades mecânicas e maior temperatura de fusão. Ainda, o PE BDL é um termoplástico com elevada capacidade de selagem a quente, sendo muito utilizado em embalagens de gêneros de primeira necessidade, substituindo o PEBD em várias aplicações (COUTINHO et. al., 2003; HONG et. al., 2012; MARAPRANA et. al., 2011; SANTAMARIA et. al, 2012; BECKER et al., 2002; HONG et. al., 2012; MAHAPRAMA et. al., 2011).

Misturas de PEDB com PEBDL são utilizadas comercialmente na produção de filmes para diversas aplicações como sacaria industrial, empacotamento automático de alimentos, termoencolhíveis, esticáveis e outros. Ambas as resinas apresentam propriedades físicas e características de processamento particulares devido às diferenças em suas estruturas moleculares, principalmente quanto ao grau e comprimento das ramificações e polidispersão (BECKER et. al., 2002; HONG et. al., 2012; NOBREGA et. al., 2011).

O PEAD, por sua vez, é altamente cristalino (acima de 90%), pois apresenta baixo teor de ramificações. Sua temperatura de fusão cristalina é de aproximadamente 132°C. Devido à cristalinidade e a diferença de índice de refração entre as fases amorfa e cristalina, os filmes de PEAD são translúcidos e menos transparentes que os filmes de PEBD, que são menos cristalinos. O aumento no teor de ramificações reduz a cristalinidade e é acompanhado por variação significativa das características mecânicas, uma vez que causa um aumento no alongamento na ruptura e uma redução da resistência à tração. Enfim, o PEAD e o PEBD têm muitas aplicações em comum, mas em geral, o PEAD é mais duro e resistente e o PEBD é mais flexível e transparente (COUTINHO et al., 2003; HONG et. al., 2012; MAHAPRAMA et. al., 2011; SANTAMARIA et. al, 2012).

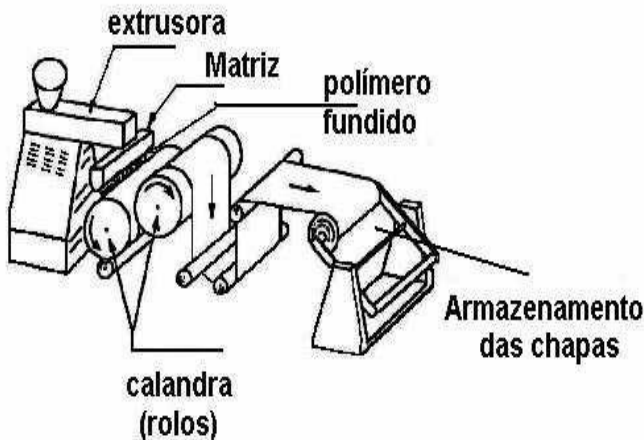
4.2 PROCESSO DE EXTRUSÃO E COEXTRUSÃO DE FILMES POLIMÉRICOS

No processo de extrusão plana de filmes poliméricos os polímeros são extrusados através de uma matriz plana e larga, cuja espessura da abertura é regulável. O filme é constantemente puxado por

rolos de tração, que estiram, reduzindo sua espessura em até 10 vezes. Entre os rolos puxadores e a matriz, o filme é resfriado por imersão em tanques de água e pelo contato com rolos metálicos refrigerados internamente. Após passar pelo rolo de tração o filme é bobinado por um cilindro.

Antes do bobinamento, as laterais do filme são aparadas para definir a regularidade da largura do extrusado (em alguns casos, também porque as laterais podem ser mais espessas que o restante do filme). As aparas, ou refiles, são bobinadas para o futuro reprocessamento. Algumas linhas de extrusão possuem um sistema que transporta o refile para um moinho de alimentação forçadas ao lado da extrusora, permitindo seu quase imediato reprocessamento. Quando uma bobina é completada, corta-se transversalmente o filme, troca-se a bobina e enrola-se a extremidade do filme em outro cilindro bobinador, dando continuidade a produção. (CEFET, 2000). Na Figura 1, segue uma ilustração do processo de extrusão plana.

Figura 1 - Diagrama do processo de extrusão plana.



Fonte: BLASS (1988).

4.2.2 Processo de extrusão tubular de filmes poliméricos

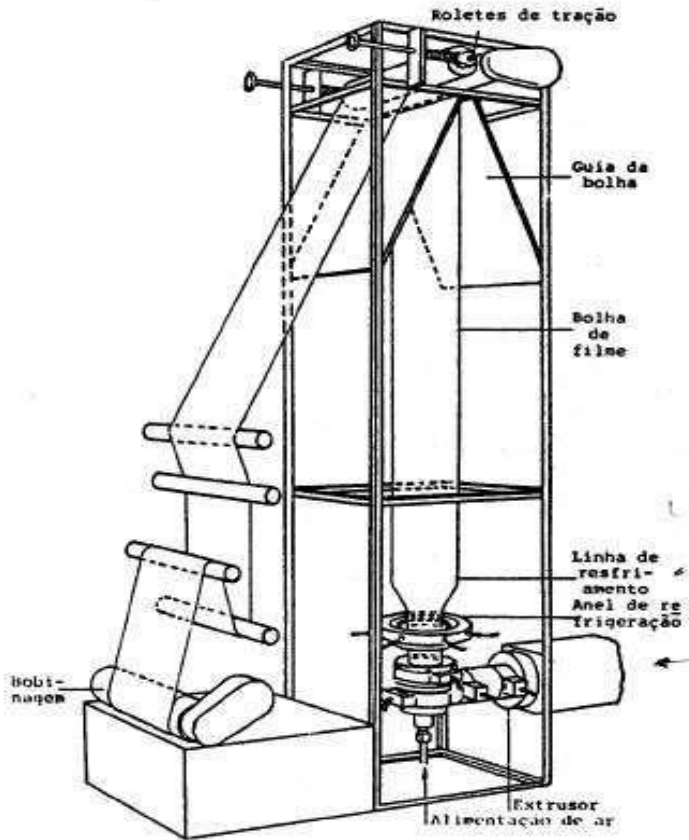
A extrusão de filmes tubulares é um método muito usado na fabricação de filmes com aplicação em diversos produtos, assim como para embalagens alimentícias, de vestuários, sacola e outros. Nessa

técnica, o material é extrusado por uma matriz anular e o perfil tubular largo é obtido e inflado verticalmente ao se introduzir ar em sua extremidade inferior. O filme inflado forma um balão que é puxado e esticado simultaneamente e estirado longitudinal e transversalmente (CBIP, 1998; BLASS, 1988).

Controlando a velocidade de estiramento e o diâmetro do balão é possível controlar a largura e a espessura do filme final. A extrusão de filmes permite a obtenção de filmes mais largos do que os produzidos por outros métodos. O filme extrusado também pode ser laminado entre cilindros resfriados (CBIP, 1998; BLASS, 1988).

Na indústria de filmes, as resinas de PEBD e PEBDL são previamente misturadas na forma de *pellets* e extrusadas em percentuais de interesse e com aditivos que agreguem propriedades específicas aos filmes (BECKER et al., 2002). Após a sua extrusão o filme é submetido a um tratamento de superfície por tratamento corona que oferece boa adesão para os vernizes e impressões. O tratamento corona converte a superfície de um substrato não-polar em uma superfície polar pela interação de gás ozônio gerado pelo efeito corona e as moléculas poliméricas de superfície. As moléculas de ozônio da área de descarga corona estão livres para se ligar quimicamente as terminações das moléculas no substrato em tratamento. Como resultando ocorre o aumento da tensão superficial dos filmes poliméricos, possibilitando assim a ancoragem das tintas e vernizes empregados no processo de impressão sobre sua superfície (BLASS, 1998; SARANTÓPOULOS et al., 2002; POLITENO, 1991). Na Figura 2, segue demonstrado uma ilustração do processo de extrusão tubular.

Figura 2 - Processo de extrusão tubular.



Fonte: BLASS (1988).

4.2.3 Processo de coextrusão de filmes multicamadas poliméricos

O processo de coextrusão combina duas ou mais camadas de polímeros fundidos, que formam um único filme multicamada e atendem às necessidades específicas de desempenho para uma determinada aplicação. A coextrusão desenvolveu-se inicialmente em pequenos nichos de mercado, tais como para a fabricação de filmes com barreira ao oxigênio, utilizando resinas de poliamida, revestidas com polietileno para se obter características de termo-selagem.

O aumento da demanda em termos de propriedades dos produtos

plásticos promoveu o desenvolvimento da tecnologia de coextrusão, processo em que duas ou mais camadas de resina são extrusadas através da mesma matriz. Como resultados, são obtidos filmes, chapas, tubos ou perfis contínuos, que combinam as propriedades dos materiais processados. Já é possível com apenas uma única operação de processamento e a um custo mais baixo substituir a laminação de filmes de polietileno com folha de alumínio ou com outros materiais de barreira (DEMAY et. al., 2011; NOBREGA et. al., 2011; KAARIANEN et. al., 2011).

O principal fator limitante da técnica da coextrusão é representado pelo fenômeno de fluxo, ou instabilidade interfacial, que representa um tipo interno de instabilidade, ocorrendo no interior do produto, deixando as superfícies exteriores lisas. Diversos pesquisadores sugerem o uso da tensão de cisalhamento interfacial crítica como um critério para definir o limiar das instabilidades interfaciais, sendo que materiais com ampla distribuição de peso molecular são mais sensíveis à instabilidade, em comparação com o PEBD, com distribuição estreita de peso molecular (ZATLOUKAL, 2006; KOLARIK et. al., 2012; NOBREGA et. al., 2011).

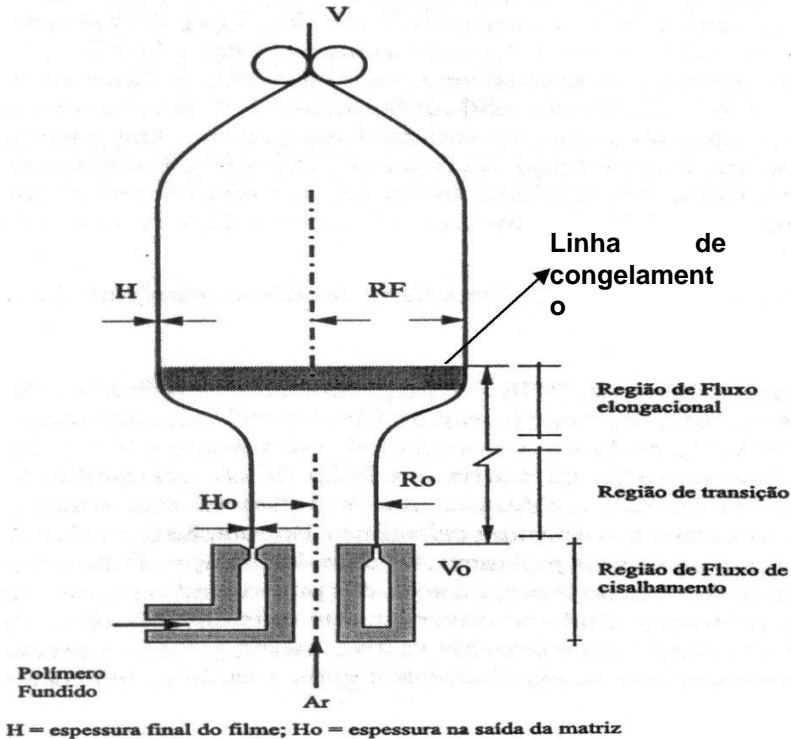
A coextrusão permite otimizar as características dos polímeros mais caros, minimizando a quantidade necessária para desenvolver finalidades específicas de selagem, aderência, rigidez, resistência ao impacto, rasgo, perfuração, brilho, entre outras, e em comparação com um filme monocamada onde os componentes estão misturados (DEMAY et. al., 2012; KOLARIK et. al., 2012).

No processo de coextrusão, a resina termoplástica é introduzida em um cilindro aquecido e o material plástico amolecido é forçado, por um veio roscado ou parafuso rotativo, a entrar através de uma abertura em uma matriz, para a obtenção de formas contínuas. Depois de sair do molde, a peça extrusada deve ser resfriada abaixo da temperatura de transição vítrea do material, de modo a assegurar a estabilidade dimensional requerida. O resfriamento é geralmente realizado com jato de ar ou com água (SMITH, 1998; KOLARIK et. al., 2012).

Filmes soprados são produzidos pela extrusão do polímero fundido, na forma de um tubo, através de uma matriz anelar, no centro da qual ar é injetado, inflando o tubo até este atingir um diâmetro maior. Um “balão” então é formado, cujas paredes são estiradas na circunferência (pelo ar injetado) e na vertical, por rolos puxadores, ao mesmo tempo em que são resfriadas, conferindo então ao filme soprado uma orientação biaxial. A Figura 3 demonstra esquematicamente o processo de extrusão de filmes em sistema “

blow” (GUERRINI et. al., 2004).

Figura 3 - Processo de extrusão “blow”.



Fonte: GUERRINI et. al. (2004).

Os parâmetros mais importantes deste processo são: a razão de sopro (RF/R_0 , onde RF = raio final do filme soprado e R_0 = raio inicial do filme); a razão de estiramento (V/V_0 , onde V = velocidade de puxamento e V_0 = velocidade na saída da matriz); e a linha de congelamento (em negrito na Figura 1). Acima da linha de congelamento, considera-se que o polímero está solidificado, com a sua estrutura cristalina e orientação, congeladas. Estes dois últimos parâmetros moleculares dependerão então das condições do fluxo, ou seja, das propriedades reológicas do polímero. Existem três tipos de fluxos durante o sopro: na matriz anelar o fluxo é predominantemente de

cisalhamento; entre a saída da matriz e o início da “bolha”, o fluxo é uma mistura de cisalhamento com fluxo elongacional; e até a linha de congelamento, o fluxo é predominantemente elongacional (GUERRINI et. al., 2004; DEMAY et. al., 2011).

4.3 INTERAÇÃO PRODUTO – EMBALAGEM

Hotchkiss (1997) e Galic et al. (2011) define as interações produto-embalagem como uma inter-relação entre produto, embalagem e o meio que os cercam, a qual produz efeitos sobre o produto e/ou sobre a embalagem. Esta interação nada mais é que a transferência de componentes entre o meio, produto e a embalagem.

Os processos de transferência de massa em sistemas de embalagem normalmente referem-se aos fenômenos de permeação, migração e absorção. A permeação é resultado de dois mecanismos básicos: difusão de moléculas através da parede do filme, e absorção/dessorção para o meio interno/externo. Migração é a liberação de componentes da embalagem para o produto embalado. A migração de componentes do polímero (por exemplo, monômeros, tintas, aditivos e solventes) para o alimento, foi o primeiro tipo de interação estudada devido aos efeitos sobre a saúde humana. Mais tarde, a absorção, ou *scalping*, de componentes originalmente contidos no produto pelo material da embalagem passou a chamar a atenção. Esses componentes do produto, quando absorvidos pela embalagem podem causar perda de aroma, ou de barreira, alteração nas propriedades mecânicas, resultando em uma redução da qualidade do produto embalado (VAN WILLIGE, 2002; GALIC et al., 2011).

A água absorvida, por exemplo, tem um efeito similar sobre a permeabilidade de alguns polímeros higroscópicos, tais como EVOH e a maioria das poliamidas. Acredita-se que as moléculas de água, absorvidas em altos teores de umidade relativa combinam-se com os grupos hidroxila da matriz polimérica e enfraquecem as pontes de hidrogênio já existentes entre as cadeias do polímero. Como resultado a distância intercadeias aumenta, e com isso, aumenta o volume livre, facilitando a difusão do oxigênio e outros gases. A presença de água na matriz de polímeros higroscópicos não apenas influencia na maneira como o permeante é absorvido e difunde-se, mas também determina a diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero devido ao efeito plastificante da água. Nestes polímeros, quando a T_g diminui para valores inferiores ao da temperatura ambiente é esperado o aumento da permeabilidade ao oxigênio. (ZHANG et. al. 1999; GALIC et al, 2011).

4.3.1 Proteção de barreira e fenômenos de permeabilidade

A capacidade de uma embalagem de resistir à adsorção ou à liberação de gases e vapores, resistir à permeação de lipídeos e a passagem de luz é definida como barreira. As características de barreira de uma embalagem estão intimamente relacionadas à estabilidade química, física, sensorial, microbiológica, e biológica dos produtos. Por exemplo, o contato do oxigênio com alguns produtos pode causar uma série de alterações indesejáveis, como a rancificação de óleos e gorduras presentes nos alimentos, o que acarreta a produção de aromas desagradáveis, que logo tornam o produto inaceitável para o consumidor (SARANTÓPOULOS et. al., 2002).

O oxigênio oxida as gorduras, decompõe as vitaminas, desnatura as proteínas e afeta o sabor, o odor e a cor. Neste sentido, as estruturas otimizadas de filmes multicamadas oferecem alta estanqueidade contra gases e vapor d'água, mesmo apresentando pequenas espessuras, conseguidas através da coextrusão de poliolefinas com copolímero de etileno e álcool vinílico e suas blendas (SCHENCK et. al., 2000; ALI DADFAR et. al., 2012; DUNCAN, 2011).

Por sua vez, o transporte de gases e vapores em polímeros e nas estruturas de filmes poliméricos em monocamadas e em multicamadas é um tema importante sob o ponto de vista científico e tecnológico. Aplicações incluem revestimentos protetores, materiais de embalagens para alimentos, e barreiras seletivas para misturas de gases ou líquidos. O processo de permeação envolve dissolução de gás de um lado da membrana, difusão de gás através dela, e liberação de gás a partir do outro lado da membrana.

Quando trabalhado com polímeros cristalinos, é importante notar que as características de permeabilidade dependerão da história térmica do polímero. Um método convencional de determinação dos coeficientes de permeabilidade e difusão em polímeros envolve a medida do ganho de peso da membrana versus o tempo até que o equilíbrio de massa final seja alcançado (POLEY et al., 2004; ALI DADFAR et. al., 2012). A redução do consumo de material e a substituição dos polímeros clorados utilizados como camadas de barreira já são realidades nos filmes para embalagens. Filmes compostos de múltiplas camadas contendo camadas de barreira poliméricas feitas de, por exemplo, EVOH, possibilitam a utilização de menor quantidade de material, mantendo inalteradas as características de barreira da

embalagem (RÖSCH et al., 2000; KAARIANEN et al., 2011). As taxas de permeabilidade ao oxigênio dos filmes de EVOH são relativamente menores que dos filmes de PA e extremamente menores que dos filmes de PE. Filmes de PA ou de PE com blendas de EVOH têm suas taxas de permeabilidade ao oxigênio reduzido significativamente, sendo que estas reduções de taxa de permeabilidade são proporcionais ao aumento da quantidade de EVOH na mistura. A menor permeabilidade típica dos materiais com propriedades de barreira possibilita resolver também, em muitos casos, problemas de migração e proteção contra odores estranhos (YEH et al., 2006; PETTERSEN et al., 2004; DUNCAN, 2011; RÖSCH et al., 2000).

As propriedades de barreira dos materiais indicam suas resistências à difusão e adsorção de substâncias. Um polímero de boa barreira tem baixos valores de coeficientes de difusão e solubilidade. O coeficiente de difusão é uma medida de velocidade de penetração e movimento dentro do polímero, enquanto o coeficiente de solubilidade fornece a quantidade de penetração obtida pelo polímero a partir da fase de contato. O coeficiente de permeabilidade combina os efeitos dos coeficientes de difusão e solubilidade, sendo que as características de barreira de um polímero são comumente associadas com os valores dos coeficientes de permeabilidade (HERNANDEZ et al., 2000; PETTERSEN et al., 2004; DUNCAN, 2011; ALI DADFAR et al., 2012).

4.3.2 Aspectos de migração

Quanto à migração, o aditivo não deve volatilizar durante o processamento, nem exudar para a superfície do material. Consequentemente deve ter baixa pressão de vapor a altas temperaturas e não deve com o tempo, precipitar ou cristalizar fora da matriz polimérica ou formar depósitos em determinadas regiões do plástico. O aditivo também não deve ser passível de extração por líquidos, com os quais a matriz venha a entrar em contato. Esses fenômenos além de produzir efeitos estéticos indesejáveis e contaminar os produtos em contato com o plástico também reduzem a eficiência dos aditivos. Estes fatos estão relacionados com a cinética de difusão e conseqüentemente dependem de parâmetros como compatibilidade do aditivo com o polímero, tamanho e formato molecular do aditivo, interações físico-químicas entre o aditivo e as moléculas do polímero, configuração das cadeias do polímero, espaço intermolecular, etc.

Na perspectiva da embalagem alimentar, isto é, da compatibilidade alimentar, dois tipos de estudo se tornam indispensáveis para conhecimento e aceitabilidade do material: a migração possível dos constituintes do material de embalagem e sua eventual toxicidade. A migração é aqui, usada para definir a transferência de compostos do material plástico para o alimento, quer que seja pelo mecanismo de difusão, de penetração ou de ambos. Designa-se por migração global, a soma de todos os componentes da embalagem transferidos para o alimento, enquanto, a migração específica se refere a um ou vários compostos identificáveis, que tenham interesse do ponto de vista toxicológico, ou que sejam utilizados na análise do mecanismo de migração. Em princípio, a migração é determinada colocando uma área conhecida do material plástico em contato com o alimento, sob condições definidas de tempo e temperatura. No fim do teste, usa-se uma técnica apropriada para determinar a quantidade do composto presentes no alimento. Calcula-se a migração, expressa normalmente em mg/dm^2 de área de contato, ou em mg/kg de alimento (CASTRO. et. al., 2002; FERNANDES, et. al., 1987).

4.4 EMBALAGENS ATIVAS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Uma embalagem ativa para alimentos trabalha em conjunto com o produto alimentício e seu ambiente para produzir o efeito desejado. Enquanto a embalagem passiva simplesmente fornece uma barreira capaz de proteger o produto, a embalagem ativa desempenha um papel ativo na manutenção ou mesmo na melhoria da qualidade dos alimentos fechados. De fato, a opção para o uso de embalagens ativas foi para fornecer uma margem maior de segurança e qualidade. A geração seguinte de embalagens alimentícias inclui materiais com propriedades antimicrobianas. Esta tecnologia de embalagens pode desempenhar a função de estender a vida de prateleira de alimento se reduzir o risco de patogenias (VERNAUD et al, 2006; MOREIRA et al, 2011; LOPEZ-DE-DICASTILLO et al, 2011).

Uma embalagem antimicrobiana é uma forma de embalagem ativa, que interage com o produto ou com o espaço que se localiza entre a embalagem e o alimento, para obter um resultado desejado. Da mesma forma, embalagens antimicrobianas de alimentos agem para reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos que podem estar presentes nos alimentos embalados ou no material de embalagem

(VERNAUD et. al, 2006; MOREIRA et al, 2011; LOPEZ-DE-DICASTILLO et al, 2011).

4.4.1 Tipos de embalagens antimicrobianas

A característica antimicrobiana é uma das muitas aplicações de embalagens ativas em que se baseia num sistema capaz de matar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos que podem contaminar os alimentos (LOPEZ-DE-DICASTILLO et al, 2011; UZ et al, 2011). A embalagem antimicrobiana é projetada especificamente para controlar o crescimento de microrganismos ao contrário dos sistemas de embalagem alimentícias, do tipo convencional, que são utilizados para estender *shelf-life* (tempo de prateleira), garantir a qualidade e a segurança no manuseio (SING et al, 2011; HAUSER et. al., 2011).

A tecnologia empregada na fabricação de embalagens antimicrobianas é baseada em agentes do tipo preservativo e conservante. Nos agentes preservativos, o princípio é liberado lentamente a partir da embalagem para a superfície. Quanto aos agentes conservantes, estes são fixados na embalagem e não migram para os produtos alimentares (APPENDINI et. al, 2002; SUPPAKUL et al., 2011; UZ et al, 2011).

Uma grande variedade de substâncias, por exemplo, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, extratos de especiarias, tiossulfatos, enzimas, proteínas, isotiocianatos, os antibióticos, fungicidas, agentes quelantes, parabens e metais, tem apresentado atividade antimicrobiana quando incorporadas ou revestidas em materiais destinados a fabricação de embalagens alimentícias (KUORWEL et al, 2011; BARBIROLI et al., 2012; LLORENS et al., 2011; CHEN et al., 2012).

As embalagens podem assumir várias formas, incluindo: i) adição de sachês ou pastilhas contendo antimicrobianos voláteis nas embalagens; ii) incorporação antimicrobianos de voláteis e não voláteis diretamente no polímero; iii) adsorção ou revestimento antimicrobiano em superfícies de polímeros; iv) a imobilização de agentes antimicrobianos aos polímeros por ligações covalentes ou íons; v) utilização de polímeros que são inerentes aos agentes (VERNAUD et. al, 2006; SING et al, 2011; CHEN et al., 2012).

4.5 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Especialistas em alimentos e agências de saúde pública deram

ênfase ao controle de doenças de origem alimentar em indústrias durante o processamento. Os agentes patogênicos mais frequentemente detectados são *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae*. *E. coli* é um agente do trato gastrointestinal onde está presente em grandes números. *E. coli* 0157: H7 é uma causa emergente de potogenias em alimentos e é agora reconhecida como uma importante patogenia ao ser humano. Em muitos países, o *Staphylococcus aureus* é a segunda ou terceira causa comum de intoxicação alimentar atrás de *Salmonella* e em concorrência com *Clostridium perfringens*. A presença de enterotoxinas de *S. Aureus* em produtos alimentares é considerada como um perigo para a saúde pública, devido à capacidade desta bactéria produzir sintomas de intoxicação estafilocócica ou intoxicação alimentar. Esta toxina pode ser produzida quando a população de *S. aureus* excede 10^5 ufc/g. Para controlar as bactérias patogênicas o uso convencional de agentes antimicrobianos nos últimos anos tornou-se uma grande alternativa (WAHAB et al., 2012). Antimicrobianos impedem o crescimento de microrganismos em polímeros empregados nos mais diversos produtos. Modernas aplicações em embalagens são projetadas de modo que a substância estritamente regulamentada com um limite de migração para alimentos $<5\text{mg/kg}$ tenha um efeito antimicrobiano direto mesmo no alimento (NAGY et al, 2011) (LLORENS et al., 2011)(MOEZZI et al., 2012) (JIN, et. al, 2011).

4.5.1 Aditivos antimicrobianos a base de compostos inorgânicos

Materiais metálicos com base em micro e nano-estruturados são incorporados em polímeros em contato com alimentos para melhorar propriedades de barreira e mecânica para impedir a fotodegradação de plásticos. Além disso, os metais pesados são agentes antimicrobianos eficazes sob a forma de sais, óxidos, e colóides, complexos tais como zeólito-prata, ou como nanopartículas elementares. Eles são incorporados para fins de preservação de alimentos e para descontaminar superfícies em ambientes industriais. Outras propriedades relevantes em embalagens ativas de alimentos, tais como capacidade para a oxidação de etileno ou eliminação de oxigênio, pode ser usado para estender a *shelf-life* dos alimentos. Materiais de nano-engenharia a base de prata são atualmente mais comumente usados em *commodities*, devido à sua capacidade antimicrobiana. Nanoestruturas de cobre, zinco e titânio estão também demonstrando perspectivas de

segurança e tecnologia para os alimentos. As propriedades antimicrobianas do óxido de zinco em nanoescala fornecem estratégias inovadoras e seguras. O cobre tem demonstrado ser um sensor eficiente para a umidade, e óxido de titânio tem a resistência à abrasão e desempenho anti-UV. A migração de cátions das matrizes poliméricas é o ponto chave para determinar a sua eficácia antimicrobiana, no entanto, esta migração dos cátions pode afetar o status legal do polímero como um material para contato em alimentos (LLORENS et al, 2011; JAISWAL et. al., 2012; SINHA et al., 2011).

4.5.2 Compostos antimicrobianos a base de prata

Entre os cátions metálicos, a prata iônica é conhecida por ter a maior capacidade antimicrobiana contra um amplo espectro antimicrobiano de bactérias, vírus e fungos (COSTA et. al., 2012). Além de apresentar propriedades biocidas, baixa volatilidade apresenta ainda baixa toxicidade às células eucarióticas. Nos anos recentes, a prata tem ganhado popularidade por causa da propagação da resistência do *Staphylococcus aureus* aos antibióticos. Por conseguinte, o desenvolvimento de superfícies antimicrobianas, recipientes alimentares assépticos, e sistemas de embalagem ativos com base em uma versão sustentável de íons Ag são visto como promissor. No entanto, o mecanismo bactericida permanece para ser entendido. (LLORENS et al, 2011). Alguns estudos sugerem que a prata pode causar a destruição da membrana celular pela formação de pites. Outros trabalhos têm indicado outros mecanismos de ação para a prata: alta permeabilidade celular causando rompimento da célula; penetração na parede celular causando ao dano DNA da célula; e interação com grupos tióis inativando as proteínas (RATHNAYAKE et. al., 2012).

Prata no seu estado metálico pode reagir com as células e tecidos de seres humanos e animais, liberando íons Ag^+ altamente reativos. A prata ionizada pode ligar-se a proteínas que causam alterações estruturais na parede celular e também nas membranas nucleares provocando a morte celular. O Ag^+ também forma complexos com bases contidas no DNA e RNA inibindo a replicação dos microrganismos. Além da preparação de complexos organometálicos de prata, existem diversas técnicas para incorporar prata em uma matriz polimérica. Vários nanocompósitos poliméricos antimicrobianos tem sido preparados pela mistura de partículas pré-formadas com polímeros. Como um exemplo, nanocompósitos contendo poliamida, polipropileno e pó de prata foram

produzidos por processo de plastificação a quente. A liberação de Ag^+ dos nanocompósitos de poliamida, um polímero mais hidrofóbico, foi maior do que PP. A cristalinidade do polímero também afeta a liberação de Ag^+ . Estes resultados podem ser explicados pela absorção de água; a maior liberação de Ag^+ apresentou a maior captação de água entre todos os nanocompósitos (LLORENS et al., 2011). Além disso, existe uma boa relação entre a liberação de Ag^+ e atividade antimicrobiana. Filmes multicamadas com propriedades antimicrobianas foram preparados a partir de nanocompósitos de PE/prata pela dispersão de pó de prata na solução de polímero. A liberação de Ag^+ e, por conseguinte, a atividade antimicrobiana foi dependente de nanopartículas de prata e do método de deposição. A forma do método de pulverização em minúsculos poros na superfície melhora a atividade biocida para a bactéria *Pseudomonas oleovorans* e o fungo *A. Niger*. Como mencionado anteriormente, o tamanho das nanopartículas de prata afeta a atividade, e esforços estão sendo feitos para diminuir o seu diâmetro (MUNOZ-BONILLA et al., 2012; RAMOS et al., 2012; TANKHIWALE et al., 2011). No entanto, as propriedades dos nanomateriais podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio, alteração no DNA e gentoxicidade (LI et al., 2012).

Pequenas quantidades de prata, em torno 50-100 mg Ag^+ /kg, são necessárias para atingir efeitos biocidas em sistemas de baixa concentração ou na água; mas a capacidade antimicrobiana da prata diminui rapidamente na presença de proteínas, e cerca de 10-100 mg/kg Ag^+ são necessários em aplicações alimentícias reais (FERNANDEZ et al., 2010; LLORENS et al., 2011; ARYOU et al., 2011; LI et al., 2012; PARK et al., 2012).

Apesar da ampla variedade de aplicações que estão sendo desenvolvidas e investigadas para materiais a base de prata, muito pouco é sabido a respeito dos efeitos da prata no ambiente e na saúde humana em geral. A prata coloidal foi removida oficialmente da Farmacopéia dos Estados Unidos em 1975, quando se descobriu que o uso em longo prazo das preparações de prata levaria a uma doença conhecida como *Argyria*; uma condição que torna a pele com a coloração acinzentada, causada pelo depósito de sais de prata na epiderme e nos órgãos internos. Nanopartículas de prata com 15nm de diâmetro são capazes de reduzir drasticamente a função das mitocôndrias, que são responsáveis em converter nutrientes em energia em forma de ATP. O estudo sugeriu que a prata nanoparticulada poderia ser tóxica para ossos e outros

tecidos que poderiam estar em contato direto com dispositivos médicos implantados (LLORENS et al, 2011; ARYOU et al., 2011; LI et. al., 2012; PARK et al., 2012).

4.5.3 Compostos antimicrobianos a base de cobre

O cobre é um elemento essencial e está presente na maioria dos alimentos na forma de íons ou em níveis de sais, em na maioria dos casos, abaixo de 2mg Cu²⁺/kg (carne, peixe, nozes, verduras, etc), mas até 39 mg em Cu /kg de cacau e fígado. Em baixas concentrações, cobre é um co-fator para metaloproteínas e enzimas, e também demonstra notável propriedade antimicrobiana. Neste contexto, em fevereiro de 2008, o Environmental Protection Agency (EPA) aprovou o registro de ligas de cobre com base na alegação de reduzir as bactérias associadas a infecções microbianas potencialmente fatais, e confirmou a eficácia antimicrobiana de cobre contra *E. coli* O157: H7, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes* e *P. aeruginosa*. Embora o cobre é tipicamente aplicado para manter dispositivos médicos não contaminados, e superfícies livres de microrganismos contaminantes, aplicações diretas na segurança alimentar têm sido relatada por os sais de cobre. Ligas de cobre foram avaliadas em superfícies de trabalho durante o processamento de alimentos diminuindo os riscos associados com a *E. coli* O157: H7, embora a presença de resíduos de carne bovina foi um fator limitante para a inibição do crescimento alcançado. O crescimento do *Salmonella*, *E. coli* O157: H7 e *Cronobacter spp.* poderia ser prejudicado por concentrações subletais de íons de cobre (II) (50 mg/kg) combinado com outros antimicrobianos, tais como ácido láctico, em fórmula infantil e suco de cenoura (Al-Holoy et al., 2010; JO et. al., 2012).

Comparado com prata, a atividade biocida potencial de cobre é menor (cerca de 10 mg Cu²⁺/kg em água é necessária para matar 10⁶ células de *Saccharomyces cerevisiae*). No entanto íons de cobre podem ser facilmente mobilizado devido à oxidação. Nanopartículas de cobre elementar (CuNPs) ou óxido de cobre antimicrobianos podem ser gerados por procedimentos diferentes. O cobre tem sido incorporado, por exemplo, em polietileno de alta pressão. Além disso, vários polímeros de base biológica têm sido usados como transportadores de cobre antimicrobiano. Os tecidos de algodão foram impregnados com nano-partículas de cobre como solução coloidal (CHATTOPADHYAY et al, 2010). Nanopartículas de cobre coloidal também foram distribuídos regularmente em filmes de quitosana destinados para aplicações em embalagens de alimentos. E foram imobilizados em quitosana covalentemente ligado a fibras de celulose depois da redução

com boro-hidreto. As nanopartículas foram eficazes contra *E. coli* em feridas, e podendo ser úteis em condições de higiene para embalagens de alimentos e caso típicos (LLORENS et al., 2011; JAISWAL et al., 2012; AL-HOLY et al., 2010; CHATTOPADHYAY et al., 2010).

4.5.4 Compostos antimicrobianos a base de titânio

O titânio foi avaliado positivamente como um aditivo (DIRECTIVA 94/36/CE, 1994). Nano-partículas de Ti mostram propriedades fotocatalíticas, sendo úteis como autolimpantes, agentes anti-bacterianos e contra a luz UV. A atividade fotocatalítica Ti está fortemente relacionada com a estrutura de cristal, que está relacionada com “gap” característico (BOTTERO et. al., 2011). O titânio pode ser encontrado em três formas diferentes (rutilo ou anatasio: tetragonal ; e brookita: ortorrômbica), com uma reatividade diferente dependendo de seu gap característico. A irradiação no de titânio em níveis de energias maiores do que o gap induz a formação de buracos eletrônicos, dando origem a reações redox. Elétrons negativos geram O^{2-} , e buracos eletricamente positivos geram radicais hidroxilas. Espécies reativas de oxigênio oxidam moléculas orgânicas, e matam as bactérias e vírus. Nano-partículas de Ti são produzidas seguindo diferentes metodologias com o processamento sol-gel mais comumente utilizado (IBRAHIM et al., 2011). Nanopartículas de Ti (Anatasio ou rutilo) também têm sido associadas à celulose. Nanotubos de Ti pode ser formado hidrotermicamente a 180 ° C, aquecendo óxido de titânio com NaOH. Os melhores resultados de atividade antimicrobiana são alcançados na presença de luz UV-A ou em lâmpadas de luz-negra (CHORIANOPOULOS et al., 2011).

Atividade fotocatalítica do titânio foi particularmente útil para descontaminar água e também água de lavagem, utilizado para limpeza produtos minimamente processados. Em processamento de alimentos, um das aplicações mais promissoras feitas sob escala de nanopartículas de titânio como antimicrobiana é diminuir os riscos associados em superfícies de biofilmes em contato com alimentos (ex.: biofilmes de *L. Monocytogenes*) (CHORIANOPOULOS et al., 2011), ou para melhorar a capacidade de limpeza de aço inoxidável (VERRAN et al., 2010). A capacidade biocida de nanocompósitos Ti como materiais de embalagem típicos também foi testada. Por exemplo, nanomateriais dopados com titânio, por exemplo, EVOH (copolímero de etileno e de álcool

vinílico)-TiO₂ foram razoavelmente bem dispersos e as propriedades mecânicas foram melhoradas. Eles foram eficientes contra microorganismos *Gram-positivos* e *Gram-negativos*, mantendo sua auto-esterilidade. Nanotubos Ti para enchimento de filmes a base quitosana semitransparente foram produzidas como anti-UV (DIAZ-VISURRAGA et al., 2010); sem excitação via UV, a atividade bactericida foi relatada como discreta *contra E. coli, S. enterica e S. Aureus*, sendo mais eficaz contra microorganismos *gram-negativos*. Pelo menos dois estudos relataram o potencial de materiais a base de Ti para reduzir os riscos associados à superfície de produtos alimentares sólidos. Vidro de quartzo revestido com partículas de titânio em um reator de UV com 5 lâmpadas emitindo a 254 nm, foi eficaz para reforçar a atividade antimicrobiana da luz UV, com uma diminuição notável até 2,8 log₁₀ UFC/g em *E. coli, L. monocytogenes, S. Aureus e S. typhimurium* em alface inoculado (LLORENS et al, 2011; VERRAN et al., 2010; CHORIANOPOULOS et al., 2011). Recentemente foram testadas intensamente as propriedades antimicrobianas de sistemas poliméricos baseados em compostos contendo 2% em peso de TiO₂ como agente biocida. A preparação de filmes a base de nanocompósito foi realizada pela incorporação de nanopartículas TiO₂ na produção do copolímero álcool etileno-vinil (EVOH), através de um processo térmico. Esses nanocompósitos apresentam extraordinárias propriedades antibacterianas *contra E. faecalis e P. aeruginosa*, com redução de 5 até 8 log₁₀, respectivamente, 10⁹ UFC/mL. Além disso, eles não exigem a sua liberação no meio, uma vantagem importante sobre os a base de Ag e todos agentes biocidas. Esta capacidade biocida é consequência da presença de novos estados eletrônicos não existentes nos componentes individuais.

Neste sentido, nanopartículas de titânio têm sido preparadas por fotodeposição de prata ou por adição de precursores de nitrato de Cu e Zn em um teor de 1% a 2% em peso de nanopartículas de titânio. Esses nanocompósitos demonstraram a atividade germicida muito eficaz *contra bactérias E. coli, P. putida, S. aureus e levedura Pichia Jadini* usando ambas as fontes de radiação UV e luz visível, este último até para comprimentos de onda de 500 nm (MUNOZ-BONILLA et al., 2012; RAMOS et al., 2012; TANKHIWALE et al., 2011).

4.5.5 Compostos antimicrobianos a base de zinco: propriedades, aplicações e toxicologia

O zinco é um metal presente e essencial para um largo espectro de metaloenzimas. Partículas Zn em nanoescala apresentam atividade biocida e algumas vantagens comparadas as nanopartículas de prata (AgNPs), tais como seu baixo custo, aparência branca e veículos inorgânicos, tais como hidróxiapatita fornecendo novas estruturas com atividades antimicrobianas contra *E. coli*, *S. aureus* e *Cândida albicans* (LLORENS et al., 2011) e baixa toxicidade.

A viabilidade do zinco incorporado em nanocompósito s poliméricos destinado a embalagens alimentícias tem sido testada. Até então, (LI et al., 2009) revestiram filme de poli-(cloreto de vinila) com nanopartículas de ZnO e relataram a atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, Emamifar et al. (2011) informou sobre a atividade antimicrobiana de nanocompósitos de polietileno de baixa densidade (PEBD) contendo AGNPS e Zn, mostrando um impacto significativo da proposta de nano-embalagem na vida de prateleira de suco de laranja. Estudos também demonstraram que as combinações de nanopartículas de alil isotiocianato, nisina e óxido de zinco revestidas em frascos de vidro foram capazes de inativar efetivamente *Salmonella* em ovo líquido (JIN, et. al, 2011; NAGY et al, 2011; MOZZI et al., 2012; ARYOU et al., 2011; KAO et al., 2011).

Óxido de zinco também é um semicondutor com um “*band gap*” muito perto do anatásio (TiO₂) e com um mecanismo de ação bactericida semelhante. Da mesma forma, o ZnO é também um fotocatalisador. Sua iluminação com “*band gap*” cria pares de elétrons e buracos, que podem oxidar diretamente matrizes orgânicas ou oxidar peróxido de hidrogênio produzindo radicais tais como OH• ou O₂•⁻, com propriedades antimicrobianas, uma vez que interferem nas membranas celulares microbianas. Contudo os mecanismos responsáveis pela atividade antibacteriana de nanoestruturas de óxido metálicos não são totalmente compreendidos, e alguns mecanismos propostos implicam na liberação de Zn⁺². Embora a atividade antibacteriana do zinco é conhecida, apenas alguns exemplos de nanocompósitos poliméricos impregnados com nanopartículas de óxido de zinco têm sido relatados na última década.

Nanopartículas de zinco foram incorporados em polímeros termoplásticos, poliamida 6 e PEBD. Em ambos os casos, os nanocompósitos mostram grande atividade antimicrobiana com baixo teor de Zn, 1%, o qual aumenta à medida que aumenta o teor de zinco no nanocompósito. No entanto, a adição de nanopartículas de ZnO não

produz qualquer atividade contra o fungo *A. niger*. Mais tarde, substratos de algodão foram revestidos com nanocompósitos de PU/Zn para dar proteção UV e função antimicrobiana. Os autores concluem que o mecanismo antimicrobiano envolve o contato direto entre o substrato e os microrganismos, que atuam como uma barreira, em vez de difusão do agente (MUNOZ-BONILLA et al., 2012; RAM OS et al., 2012; SONTAKKE et. al., 2012; TANKHIWALE et al., 2011).

4.5.5.1 Aplicações gerais

Uma vasta gama de produtos cosméticos como, por exemplo, hidratantes, produtos para os lábios, pós faciais, pomadas, loções e cremes para as mãos fazem uso de zinco, na forma iônica ou de óxido. Um razão para este fato é que as espécies de zinco auxiliam os cosméticos a aderirem na pele, no entanto uma motivação mais importante é que o zinco é um absorvedor de UV de largo espectro que efetivamente atenua a radiação UV, tanto UVA (3 20-400 nm) quanto UVB gama (290-320 nm). É foto-estável e tem um dos espectros mais amplos para atenuação UV entre os bloqueadores sola res aprovados pelas autoridades reguladoras como nos EUA a FDA. Desempenho de partículas de zinco para atenuação UV depende do tamanho da partícula com um tamanho de 20-30 nm. Todavia, é geralmente usado em faixa de tamanho de partícula de 30-200 nm. Para facilitar a sua dispersão nas composições, as partículas geralmente são tratadas na superfície com materiais de revestimento inertes, tais como óleos de silício, SiO₂ ou Al₂O₃. Clinicamente, as partículas de zinco promovem a cicatrização de feridas e mantendo úmidas e limpa. Por exemplo, a alta área de superfície de ZnO (grau ativo) pode ser usado em loções ou cremes para o tratamento de acne ou de infecções fúngicas, como “pés de atleta” (*Tinea pedis*). Espécies ativas de zinco iônico, por exemplo, inibe o crescimento de bactérias tais como *Propionibacterium acnes* que resulta em menos sebo (uma substância oleosa secretada pelas glândulas sebáceas da pele dos mamíferos) sendo dividido em ácidos graxos livres que por sua vez, agem para inflamar a parede do folículo. Compostos a base de zinco pode também ser utilizado em shampoos anti-caspa e no tratamento de erupção da fralda (KIM et al., 2012 ; MOEZZI et al., 2012).

Como um ingrediente em desodorantes secos para reduzir

molhamento sob o braço, o zinco pode ser usado entre 0,05 a 10%, em peso, com tamanho médio de partícula na faixa de 0,02 a 200 micra. O zinco pode ser usado para fornecer uma gama de pH desejável para desodorizantes destinados para utilização em peles sensíveis. Os sais de zinco tais como cloreto e sulfato são úteis em materiais dentários, tais como pastas dentária, material de enchimento. O uso de íons de zinco pode aliviar este problema na pasta de dente, ao regular o pH desejado, por exemplo. Em composições para pastas, 0,1-10% o zinco é geralmente adicionado como um agente anti-placa, anti-gengivite, antibacteriana ou anti-tártaro. As propriedades anti-placa das composições contendo zinco são melhoradas pela formação de íons de zinco, que retarda a formação de tártaro. Composições típicas de pasta de dente, gel e pó íons de zinco são divulgadas na literatura de patentes. Reconhece-se no campo de aplicações que o efeito do Zn é útil a partir de íons Zn^{+2} solúveis (MOEZZI et al., 2012; LLORENS et al., 2011).

Os compostos a base de zinco tem uma longa história de utilização em composições de protetores solares par a bloqueio de UV, com as nanopartículas tendo sido introduzidas para esta aplicação mais tarde na década de 90. Tem sido demonstradas preocupações com os possíveis efeitos adversos na saúde humana e no meio ambiente. No entanto, evidências apontam que partículas ou nanopartículas de zinco não penetram nas células da pele, permanecendo na camada externa da pele intacta (o estrato córneo) com baixa toxicidade sistêmica (BURNETT, et. al., 2011; LLORENS et al.,2011; MOEZZI et al., 2012; SONTAKKE et. al., 2012).

4.5.5.2 Aspectos toxicológicos

O zinco é geralmente classificado como material não-tóxico. O zinco não causa irritação nos olhos e na pele e não existe evidência de carcinogenicidade, genotoxicidade e a reprodução de toxinas em seres humanos. No entanto, por inalação ou por ingestão, o zinco em nível iônico ou combinado pode ser tóxico devido às condições conhecidas como febre do zinco e malária do zinco. Os sintomas desta síndrome são arrepios, febre, tosse e aperto no peito. Portanto existem medidas de segurança quanto ao preparo, embalo, transporte e manuseio dos compostos a base de zinco. De acordo com a recente classificação da EU Hazard o zinco é classificado como N; R50-53 (muito tóxico para ambientes aquáticos e/ou ecotóxico). Assim, embalagens aditivadas com

zinco iônico ou não sob esta jurisdição deve ser rotuladas “UM 3077-Classe 9, substância ambientalmente perigosa”. Compostos solúveis de zinco são considerados ecotóxicos para organismos aquáticos apesar de eles serem necessários para humanos, animais e plantas em pequenas quantidades. O corpo humano, por exemplo, contém cerca de 2g de zinco e diariamente é ingerido 10-15 mg para o metabolismo. Tem sido demonstrado que a ecotoxicidade do zinco para o modelo aquático protozoário *Tetrahymena Thermophila* tem sido causado inteiramente pelas espécies iônicas de zinco. Outra característica importante é o coeficiente de difusão do zinco na ordem de 10^{-9} cm²/s, medido especificamente em embalagens no sentido de monitorar a migração destas espécies químicas de zinco para o meio interno (produto) e externo (ambiente) (MOEZZI et al., 2012; MUNOZ-BONILLA et al., 2012; SONTAKKE et. al., 2012; KAO et. al., 2012).

4.6 ADITIVOS ANTIMICROBIANOS A BASE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Vários agentes antimicrobianos orgânicos têm sido nos introduzidos polímeros. Um dos agentes antimicrobianos conhecidos é a clorexidina normalmente na sua forma de diacetato. É usada para a liberação controlada em materiais poliméricos para aplicações em produtos dentários. Derivados de metacrilato foram empregados como polímeros reticulados em que o agente antimicrobiano clorexidina foi introduzida. Micropartículas de poli-(lactido-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo clorexidina foram também testadas contra bactérias *P. gingivalis* e *Bacteroides forsythu*. Os resultados experimentais mostraram que o encapsulamento e a liberação do agente antimicrobiano não são ambos modulados por complexação de ciclodextrinas. Outro agente antimicrobiano conhecido entre os mais utilizados é o triclosan. Triclosan incorporado em PS foi testado contra *E. coli* e bactérias *B. thuringiensis*. Embora a quantidade de triclosan incorporado é elevada, a atividade antibacteriana não é muito eficaz, uma vez que o agente não imobilizado na superfície de PS não contribui para a atividade do sistema. Além disso, o triclosan foi incorporado em PVC. As medições antimicrobianas contra bactérias *E. coli* e *S. Aureus* foram analisadas e comparadas com as amostras que contêm agentes inorgânicos tais como complexos Ag⁺. Estes estudos sugerem que a hidrofobicidade da superfície de PVC é o fator importante para a adesão bacteriana. Soluções de triclosan foram misturadas com emulsões a base de água e

acrilato-estireno, sendo os sistemas resultantes testados contra *E. Faecalis*. Foi demonstrada por ensaio de difusão em ágar que a liberação do triclosan depende do solvente, sendo quase inexistente ou muito lenta na água e muito rápido em *n*-heptano. Este antimicrobiano também foi incorporado nanopartículas de PVA dispersas em água, que apresentaram maior atividade antibacteriana para *Corynebacterium* do que as soluções de triclosan. (MUNOZ-BONILLA et al., 2012; RAMOS et al., 2012; TANKHIWALE et al., 2011).

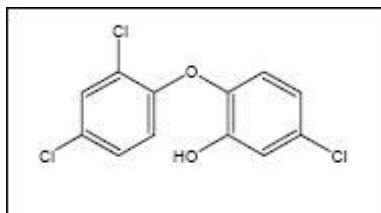
4.6.1 Compostos antimicrobianos a base de triclosan: propriedades, aplicações e toxicologia

O Triclosan é um composto químico muito utilizado pela indústria devido as suas propriedades especiais bactericidas e fungicidas. Este agente antibacteriano vem sendo estudado e aplicado em diferentes segmentos industriais há mais de 20 anos. O composto é aplicado na fabricação de detergentes líquidos, sabonetes, desodorantes, cosméticos, loções, cremes antimicrobianos, creme dental e como aditivo em polímeros e produtos para a indústria têxtil (NFODZO et al., 2011; JUNG et al., 2011; SVENNINGSEN et. al., 2011).

Por apresentar elevada eficiência na ação antimicrobiana, aplica-se o Triclosan com concentrações relativamente baixas, da ordem de 0,05 a 2,00 % em massa, de acordo com as funções solicitadas pelos produtos de interesse. O mesmo apresenta um largo espectro de ação antimicrobiana, envolvendo bactérias *Gram-negativas* e *Gram-positivas*, sendo de ação bacteriostática em baixas concentração e bactericida em altas concentrações (RUSSELL, 2004; TOMS et al, 2012).

A estrutura molecular do Triclosan corresponde a um derivado de um éter difenílico, conhecido por 2,4,4'- triclóro-2'-hidróxi-difenil éter. A molécula apresenta peso molecular de 289,50 g/mol, ponto de fusão entre 55°C e 58°C, aparência de pó branco com odor suave e levemente aromático (DAN e HONTELA, 2011). A estrutura molecular do triclosan pode ser visualizada na figura 4.

Figura 4 - Estrutura molecular para o Triclosan.



Fonte: RAGHAVAN et. al. (2003).

Nos dois últimos anos, o Triclosan tem gerado um especial interesse para estudos, destacando-se em temas envolvendo os possíveis mecanismos de ação e resistências antibióticas. Neste contexto, tem-se direcionados estudos especiais nos seguintes temas: i) os mecanismos de ação do triclosan; ii) os mecanismos de resistência bacteriana para o triclosan; iii) a possível associação entre o uso de triclosan em produtos direcionados a clínicas e domicílios e resistência antibiótica; e iv) a aplicação atual e futura do triclosan (RUSSELL, 2004; HEDGESPETH et. al., 2012; RIVA et. al., 2012; TOMS et al, 2012).

Muitos estudos revisados por Russel sugeriram que a membrana citoplasmática das bactérias tem sido o maior alvo para ação do triclosan. (RUSSELL, 2003). No entanto, demonstrou-se que também em bactérias do tipo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e outros organismos susceptíveis ao triclosan, que o aumento da atividade inibitória resultou do bloqueamento da síntese lipídica pela inibição da proteína em enoil-ACP redutase (GUO et al., 2012; MUNOZ et. al., 2012; RIVA et. al., 2012). Tais estudos são extremamente delicados e vem sendo investigado pela comunidade científica.

Questões como se a inibição de uma simples enzima pelo triclosan é responsável pela ação inibitória ou pela morte das bactérias (RUSSELL, 2002; RUSSELL, 2003) tem sido levantadas e avaliadas. Ao mesmo tempo, é sabido também, que para determinadas concentrações, o triclosan apresenta-se rapidamente bactericida e induz a fuga rápida de íons K através da membrana, fato que pode promover danos à membrana (SULLER et. al., 1999). Os efeitos de desestabilização da membrana promovidos pela ação do triclosan também têm sido estudados e demonstrados por trabalhos realizados por Villalain et. al. (2001). Estudos com este composto indicaram que o

triclosan apresenta efeitos de adsorções, os quais são indicativos da quebra de uma estrutura, presumidamente da membrana, e a geração de novos sítios de adsorção (DENYER et. al., 2002).

De modo geral, como outros agentes, o triclosan apresenta mais que um tipo de mecanismo associado com sua ação, se do possível delinear a sua eficácia na inibição e efeito de morte através de estudos bastante detalhados e específicos dos mecanismos. Tratando-se de aditivação de materiais poliméricos, em particular, a *Ciba Specialty Chemicals* desenvolveu diversos compostos antimicrobianos com tal finalidade, sendo específicos para determinados tipos de polímeros. Entre eles, com aplicação direta no homopolímero de polipropileno (PP), o IRGAGUARD B1000[®]. Este composto é apresentado à base de triclosan, sendo recomendadas para aplicação em PP concentrações entre 0,1 e 0,5 % (CUTTER, 1999). O IRGAGUARD B1000[®] é registrado no mercado mundial de acordo com os códigos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Códigos para IRGAGUARD B1000.

IRGAGUARD B1000		
Austrália	AICS	3380-34-5
Canadá	DSL	3380-34-5
Europa	EINECS	222-182-2
Japão	MITI	9-381
Korea	MOE	3-2436
USA	TSCA	3380-34-5

Fonte: FIORI (2008).

Outra característica importante do triclosan é a capacidade difusiva medida em embalagens em diferentes valores de temperatura. Para temperatura de 5°C, o coeficiente de difusão do triclosan em embalagens é na ordem de $1,6 \cdot 10 \text{ cm}^2/\text{s}$; para temperatura de 25 °C, o valor do coeficiente de difusão medido é na ordem $3,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. São informações de extrema relevância no sentido de conduzir os experimentos com o composto, quando utilizado em embalagens.

4.6.1.1 Triclosan: aspectos toxicológicos

Na avaliação realizada pela EPA (Environmental Protection Agency) em 2008, em relação à segurança do triclosan, a EPA concluiu que o triclosan não oferecia riscos inaceitáveis quando exposto a saúde humana. No entanto, após um artigo demonstrando os potenciais efeitos estrogênicos do triclosan em ratos divulgados em 2009, a agência tem atualmente se preocupado com a resistência a antibióticos e disfunções endócrinas reexaminando os riscos potenciais do triclosan (NFODZO et al., 2011; LEE et. al., 2012). De acordo com Brausch et al. (2012) PCP “*products care personal*”, ou simplesmente, produtos aplicados a higiene e cuidados pessoais tem sido motivo de estudos por apresentar características como, longo tempo de permanência nomeio ambiente, bioativo e potencial de bioacumulação. Segundo Chen et al. (2012) estes produtos estão entre os compostos mais detectados e m águas no mundo, no entanto em comparação com produtos fármacos, pouco se sabe sobre sua toxicidade. Atualmente cerca de 1500 t de triclosan são produzidos em todo mundo e desses 350 t são apenas destinadas para a Europa, sendo que a nível mundial a principal via de emissão após o uso se dá em águas residuais. A geração em águas residuais provenientes de ETE (estação de tratamento de esgoto) em níveis relativamente elevados de triclosan (2,3 µg/L) bem como a sua degradação tem despertado muita preocupação (BRAUSCH et al., 2012; BUTH et. Al., 2011; WANG et. al., 2012). A segurança do composto tem sido questionada em relação a saúde humana e a presença no meio ambiente devido a fatores como por exemplo: a conversão por fotodegradação em dioxinas e furanos; a similaridade estrutural com o bisfenol-A; metilação biológica em mais compostos tóxicos; potencial de bio-acumulação e; toxicidade a organismos não-seleto (CORTEZ et. al., 2012; PERR ON et al., 2012; HEDGESPEETH et. al., 2012; LEE et. al., 2012).

4.6.1.2 Toxicidade aguda do triclosan: organismos terrestres

Para (DAN et al., 2011; PIRARD et. al., 2012), a toxicidade do triclosan tem sido avaliada em diversas espécies incluindo plantas, algas, invertebrados, anfíbios e mamíferos. Em ambiente terrestre, estudos ecotoxicológicos foram feitos aonde o triclosan inibiu o crescimento de plantas (EC_{50} 57-108 mg/kg) e interferiu na respiração do solo, possivelmente em virtude do mecanismo de degradação (Liu et. al, 2009). Segundo Waller et al. (2011) o triclosan em

concentrações abaixo de 10mg/kg perturba o ciclo do nitrogênio. Sobre mamíferos, estudos de toxicidade tem sido revisados por Rodricks et al. (2010). Resultados obtidos anteriormente indicam baixa toxicidade aguda do triclosan em níveis de $LD_{50} > 1g/kg$. Um dos primeiros estudos de toxicidade aguda do triclosan em mamíferos foi realizado pela Ciba-Geigy em quatro diferentes espécies: ratos, camundongos, coelhos e cachorros. De acordo com estes resultados, o triclosan demonstrou não ser uma substância tóxica via oral, sem efeito cancerígeno e mutagênico (KUGEL et al, 2012). De acordo com Tamura et al (2012) e Clayton et al. (2011), ações celulares do triclosan em concentrações micromolares e submicromolares foram examinados em células humanas gengivais, células de cancro da mama e células mortas naturalmente. A superexposição ao triclosan pode influenciar o sistema imunológico humano, porque os jovens com maior níveis de triclosan eram mais propensos a serem diagnosticados com alergias e febre do Feno (MUNOZ et. al., 2012). Níveis de efeito tóxico em concentrações entre 4,3-28,6 mg/L já foram reportados além de que os produtos da degradação do triclosan apresentam efeitos como de rupitores endócrino (CHEN et al., 2012). A presença de triclosan pode ser verificada no leite materno (60-300 $\mu g/kg$) (TAMURA et al, 2012; TOMS et al., 2011; LEE et. al., 2012; PANNU et. al, 2012).

4.6.1.3 Toxidade Aguda: organismos aquáticos

Para organismos aquáticos, a toxicidade do triclosan tem sido estudada e confirmada em relação a pequenos organismos como também em algas e peixes. As espécies aquáticas mais vulneráveis foram algas, como *Scenedesmus subspicatus*: a exposição em 96h apresentou concentração média efetiva (EC_{50}) 1,4 $\mu g/L$; e concentração efetiva não-observada (NOEC) 0,69 $\mu g/L$. Em invertebrados, algumas espécies já apresentam vulnerabilidade á ação do triclosan. Para *Daphnia Magna*, uma importante espécie de invertebrado, a concentração média efetiva em 48h foi de 390 $\mu g/L$. A toxicidade no mosquito *Chironomus tetans*, e o crustáceo de água doce *Hylella azteca* foram avaliadas por 10 dias em teste de exposição (LC_{50} 0,4 e 0,2 mg/L, respectivamente). O triclosan foi mais tóxico do que carbamazepina, um anticonvulsivo, e atorvastatina, um lipídio regulador. Em peixes, alguns estudos crônicos tem relatado o efeito do triclosan durante a nataçã o dos peixes. O triclosan tem induzido alterações na performance do *Oncorhynchus*

mykiss, *Danio rerio*, e *Oryzias latipes* em concentrações menores que 71µg/L. A EC₅₀ em peixes está entre 240 e 410µg/L. Segundo (Palesnke et al., 2010) quanto aos anfíbios, os efeitos do comportamento toxicológico foram avaliados em girinos, demonstrando serem muito específicos para esta espécie. Espécies típicas com *Acris crepitans blanchardii*, *Bufo woodhousii woodhousii*, *Rana sphenoccephala* e *Xenopus laevis* foram submetidas a avaliações via método FETAX. No entanto, os anfíbios apresentam maior sensibilidade em relação aos peixes, mas não tanto quanto às algas durante o tempo de exposição (RODRICKS et. al., 2010; RIVA et al., 2012; PERRON et al., 2012; MUNOZ et. al., 2012; TOMS et al, 2012).

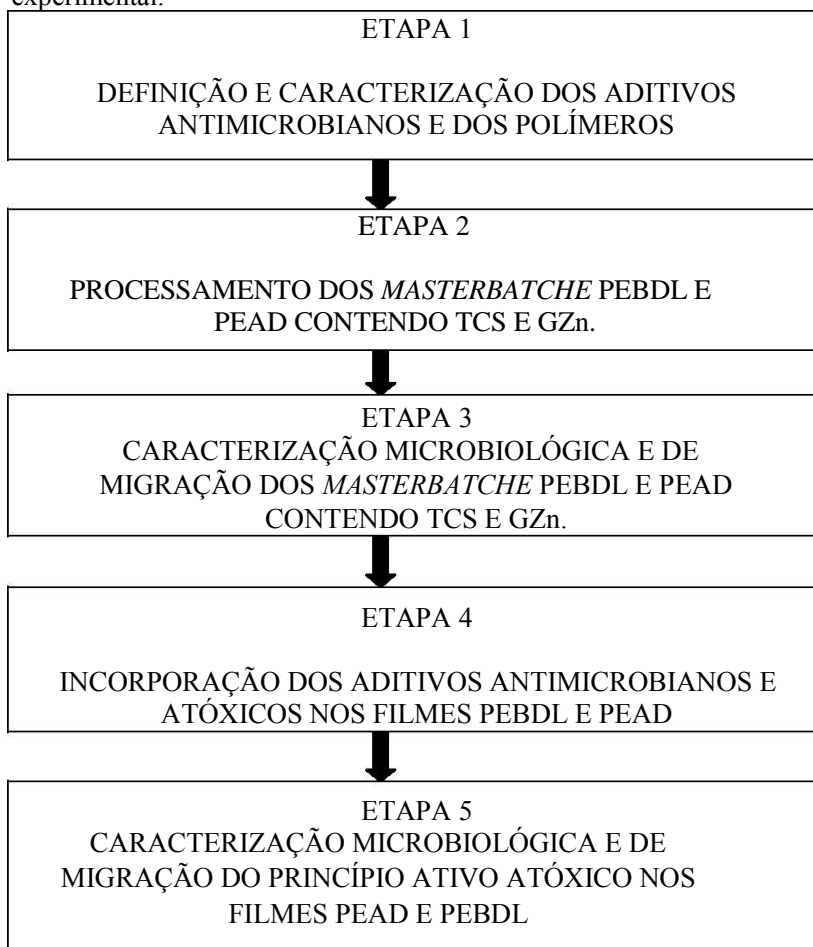
4.6.1.4 Genotoxicidade e mutagenicidade

A genotoxicidade do triclosan tem sido avaliada também usando o teste cometa em espécies de algas *Closterium ehrenbergii*. Células de algas foram expostas em contato com o triclosan por 96 h em concentrações na faixa de 0,125 – 1mg/L. A dissolução completa do núcleo foi observada em concentrações de 0,5 mg/L, embora a toxicidade do triclosan foi observada em concentrações maiores (RODRICKS et. al., 2010). A genotoxicidade e toxicidade do triclosan têm sido testadas em células Smulow-Glickman (células S-C) que são derivadas da gengiva humana. O triclosan danificou a integridade do plasma das membranas ocasionando a morte de células apoptóticas. O teste com células da gengiva humana é muito importante uma vez que o triclosan é diversamente empregado em produtos de higiene bucal. A maioria dos pesquisadores parece aceitar a idéia de que o triclosan não é um agente mutagênico e que sua utilização em produtos pessoais de higiene não representa riscos à saúde humana. O potencial mutagênico já foi testado em duas cepas de *Salmonella*, não apresentando nenhum efeito mutagênico. Atualmente métodos clássicos aplicados na avaliação do triclosan indicam sua não genotoxicidade, mutagenicidade ou carcinogenicidade. No entanto, existem algumas evidências de que o triclosan é capaz de provocar genotoxicidade em animais não mamíferos, como algas e moluscos. Devido ao número limitado de estudos quanto genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade é difícil concluir com certeza de que o triclosan não apresenta risco potencial em causar danos (RODRICKS et. al., 2010; GUO et al., 2012; PERRON et al., 2012; PIRARD et. al, 2012; TOMS et al, 2012).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Na busca de ações objetivas e eficientes para a execução desta dissertação, foram definidas etapas como forma de organização da metodologia experimental. O fluxograma apresentado na Figura 5 representa, de forma organizada, as etapas previstas, sendo seu detalhamento apresentado posteriormente nesta seção.

Figura 5 - Fluxograma das principais etapas da metodologia experimental.



Fonte: O Autor.

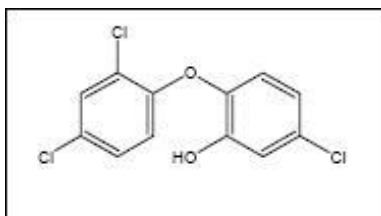
Detalhamento da ETAPA 1: Definição e caracterização dos aditivos antimicrobianos e dos polímeros.

A primeira etapa da metodologia experimental trata da pesquisa e da escolha dos materiais adequados para a produção dos filmes antimicrobianos e atóxicos. Neste sentido, realizou-se uma busca detalhada na literatura científica adotada neste trabalho e no mercado a respeito de alternativas e de inovações que pudesse m ser empregadas na definição dos aditivos antimicrobianos e dos polímeros. Em relação aos polímeros foram avaliadas diversas resinas disponíveis no mercado, levando em consideração alguns aspectos relevantes quanto ao seu uso: tipo de embalagem destinada; concepção de tecnologia empregada (monocamada e multicamada); tipo de processo, propriedades físicas e químicas necessárias, entre outros aspectos considerados no processamento. Após a realização da pesquisa nível científico e comercial e de discussões com fabricantes de embalagens, optou-se por dois tipos de polímeros: polietileno de baixa densidade linear - PEBDL (NG 1045.11) e polietileno de alta densidade – PEAD (GM 9450F).

Quanto aos aditivos antimicrobianos, foram discutidos aspectos relevantes como a aplicação desejada, condições de armazenamento e ambiente, ação antimicrobiana desejável, custo no mercado, possíveis danos e riscos oferecidos a saúde humana, estabilidade no processo de transformação, compatibilidade nos polímeros empregados e principalmente a sua toxicidade. Assim sendo, em discussão conjunta com pesquisadores da área de biomateriais e materiais antimicrobianos, optou-se pela escolha de dois aditivos de natureza química distinta: um aditivo orgânico, conhecido mundialmente como triclosan[®] (TCS), produzido pela Ciba Specialty Chemicals Corporation; um aditivo basicamente inorgânico, de matriz vítrea dopado com espécies iônicas de zinco (GZn). Este composto sintetizado via processo de troca iônica em meio reacional contendo água destilada, matriz vítrea e sulfato de zinco foi desenvolvido pelo Laboratório de Materiais Avançados e de Processos – LMPP e produzido pela Kher Chemical and Research.

O TCS é um composto orgânico e de baixo ponto de fusão comumente empregado em muitos produtos de higiene pessoal como princípio ativo. Apresenta uma estrutura chamada de 2,4,4'-Tricloro-2'-éter hidroxidifenil, de acordo com a Figura 6.

Figura 6 - estrutura molecular para o triclosan.



Fonte: RAGHAVAN et. al (2008).

Por sua vez, o GZn é constituído por uma matriz vítrea rica em sódio conforme Tabela 2, dopada de espécies iônicas de zinco pelo processo de troca iônica.

Tabela 2 - Formulação do GZn.

Óxidos	Percentual (wt%)
Al ₂ O ₃	3
SiO ₂	72
Li ₂ O	5
Na ₂ O	20

Fonte: FIORI at. al (2009).

Na caracterização dos aditivos antimicrobianos, denominados também por princípios ativos, foram empregadas diversas técnicas, de acordo com os objetivos e necessidades deste trabalho. Para a caracterização microbiológica foram empregadas as técnicas de Difusão em Ágar, Concentração Inibitória Mínima e Curva de Morte. O Teste Cometa foi empregado para avaliar a toxicidade dos aditivos. A técnica de espectroscopia de FTIR – (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foi empregada para a avaliação das estruturas químicas. A técnica de Absorção Atômica foi empregada para avaliar a migração das espécies de zinco da matriz vítrea.

Nas análises microbiológicas foram utilizadas as espécies de bactérias do tipo *Escherichia coli* (ATCC 25922 – gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 – gram positiva). O ensaio de

Difusão em Ágar foi empregado para avaliar a presença do efeito antimicrobiano dos materiais testados. Em uma placa de Petri contendo um meio de cultura sólido (ágar) com quantidade padronizada da bactéria teste, as amostras são preparadas em quantidades de 1,00 g no formato de disco (sólido) ou depositadas em um poço (na forma de pó). Durante a incubação a 37°C por 24h, as espécies químicas difundem-se para o ágar. O efeito antimicrobiano foi medido em função da presença e dimensões dos halos inibitórios formados no ágar em torno da amostra, adotando a área do halo de difusão em ágar como proporcional ao efeito antimicrobiano das amostras testadas. Outras técnicas microbiológicas utilizadas também neste trabalho como, por exemplo, Curva de Morte, foram empregadas em etapas posteriores. O teste cometa foi aplicado para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos ao DNA humano. Os procedimentos foram submetidos pelo comitê de ética da UNESC, de acordo com o N° do protocolo 12882713.0.0000.0119 e aprovado conforme parecer emitido pelo comitê de ética, disponibilizado em anexo a dissertação. Foram coletadas amostras de sangue de 4 indivíduos, com idade entre 18 e 35 anos, não fumantes e dispostos a colaborar com este trabalho. Três concentrações (0,1 g/L; 1,0 g/L e 10,0 g/L) para cada princípio ativo foram preparadas em meio aquoso. Após 72 h foram coletadas alíquotas de cada concentração e colocadas em contato com o sangue (DNA) sobre lâminas de vidro por 24 h. Foram utilizados neste método dois controles: água oxigenada (positivo) e água destilada (negativo). Após este período, foram realizadas as leituras por análise de imagem das lâminas com o auxílio de um microscópio ótico e as análises realizadas de acordo com a escala de danos (GUECHEVA et al., 2001). A realização desta análise teve por objetivo obter resultados referentes genotoxicidade de cada princípio ativo, ou seja, a presença ao DNA humano. Assim estes resultados irão definir a viabilidade técnica desejável quanto emprego do TCS e GZn como princípios ativos atóxicos no desenvolvimento de embalagens antimicrobianas.

Para a caracterização por FTIR foi utilizado um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo IRPREST IGLE-21. A técnica foi aplicada para definir os padrões dos polímeros PEBDL e PEAD e os padrões dos princípios ativos GZn e TCS antes do processamento dos filmes. A técnica foi empregada também nos filmes de polímero-aditivo após o processamento com o objetivo de avaliar a integridade química das matrizes poliméricas e dos aditivos após o processamento por extrusão.

Os testes microbiológicos e toxicológicos foram realizados no

Laboratório de BIOMATERIAIS – LADEBIMA, localizado no IDT/i-Parque/UNESC. Os ensaios de FTIR foram realizados no CECAM – Centro de Caracterização de Materiais, localizado no IDT/i-Parque/UNESC.

Detalhamento da ETAPA 2: Processamento dos *masterbatches* de PEBDL e PEAD contendo GZn e TCL.

Após a definição dos princípios ativos (aditivos) foram estabelecidos planejamentos experimentais para a produção dos compostos de PEBDL e de PEAD contendo percentuais em massa dos aditivos TCS e GZn. Assim sendo, a partir desta etapa foi estabelecido um conceito a respeito destas misturas denominado *masterbatches*. Este termo fixado nesta etapa é comumente conhecido e empregado na indústria de transformação de plástico no que diz respeito ao uso de compostos misturados e homogenizados (grãos) a base de um polímero conhecido e um aditivo em geral. Esta etapa na obtenção de *masterbatches* visa facilitar a incorporação e homogeneização do aditivo, por meio destes grãos, no processo final de fabricação das embalagens. Todos os polímeros utilizados nesta etapa foram secos em estufa a 90°C, por um período de 1 h, para evitar que a umidade comprometesse o processo de mistura dos materiais durante a extrusão. Além de secos o PEAD e PEBDL, também foi secado o GZn, por 24 h em estufa em iguais condições. O TCS não foi seco, pois apresenta temperatura baixa de volatilização.

A mistura e homogeneização foram realizadas em uma extrusora monorosca, modelo Oryzon OZ-E-EX-L22, L/D=17. Diversos parâmetros de máquina foram testados e observados, como a temperatura de massa, velocidade de rotação de rosca, aspectos físicos do *masterbatche* (porosidade e inchamento), a fim de se obter a melhor condição de processo. Após estes procedimentos foram definidas as seguintes configurações de temperatura e de velocidade de rosca: temperaturas de processo: $Z_1=165\text{ }^\circ\text{C}$, $Z_2=175\text{ }^\circ\text{C}$, $Z_3=175\text{ }^\circ\text{C}$ e $Z_4=185\text{ }^\circ\text{C}$, sendo Z_1 a zona de alimentação; Z_2 a zona de homogeneização; Z_3 a zona de compressão e Z_4 a zona do bico. Para a velocidade de rotação de rosca definiu-se 90 rpm.

O principal objetivo desta etapa foi a homogeneização dos compostos poliméricos contendo os princípios ativos antimicrobianos e estabelecer as melhores condições de processamento para a produção dos *masterbatches* antimicrobianos. Neste contexto, ficaram assim definidos os seguintes *masterbatches*: PEAD/TCS, PEAD/Zn,

PEBDL/TCS e PEBDL/Zn. Esta etapa experimental foi realizada nas dependências do Laboratório de Processamento de Polímeros-LAPRO-LMPP, localizado no IDT/i-Parque/UNESC.

Detalhamento da ETAPA 3: Caracterização microbiológica e migração dos princípios ativos dos *masterbatches* de PEBDL e PEAD contendo GZn e TCL.

Para a caracterização dos *masterbatches* a base de PEAD e PEBDL contendo os princípios ativos TCS e GZn foram empregadas técnicas microbiológicas e de migração. Os resultados obtidos após esta caracterização, associados aos resultados das análises genotóxicas, definiram o tipo de princípio ativo empregado para o desenvolvimento das embalagens antimicrobianas.

Nas análises microbiológicas foram utilizadas as técnicas Difusão em Ágar e Curva de Morte. Nos procedimentos da técnica de Curva de Morte as amostras de *masterbatches* foram colocadas em contato direto com as bactérias durante 4h e o número de bactérias viáveis (sobreviventes) determinado por um contador de colônias manual, modelo CP 608, marca Phoenix. Nesta análise foram utilizadas espécies de bactérias *Escherichia coli* (EC) e *Staphylococcus aureus* (SA).

As análises de migração foram realizadas empregando os procedimentos estabelecidos pela normatização da AN VISA, RDC 105/99. A norma prevê a imersão em meio aquoso com diferentes períodos de tempo (1 dia; 10 dias e 19 dias) e avalia como resposta a concentração do composto de interesse em parte por milhão (ppm) no meio aquoso após este período de tempo.

Para as análises da capacidade de migração dos princípios ativos para o meio externo das matrizes poliméricas foi elaborado um planejamento experimental 2^k estrela para cada possibilidade de combinação de matriz polimérica e de princípio ativo. Para a escolha, foram considerados alguns aspectos importantes como números de variáveis presentes e respostas a serem obtidas. Assim, optou-se pelo o planejamento do tipo 2^k estrela adotando como variáveis o percentual do princípio ativo na matriz polimérica (x) e tempo de imersão em meio aquoso (x₂). A Tabela 3 apresenta os níveis de máximo, de mínimo e médio para cada variável do planejamento.

Tabela 3 - Níveis para as variáveis do planejamento experimental para análise de migração.

Fatores	Símbolo	Código dos níveis		
		-1	0	1
Princípio ativo (%wt)	x_1	0,4	1,4	2,4
Tempo de Imersão (dias)	x_2	1	10	19

Fonte: O AUTOR.

O ensaio de migração dos princípios ativos basicamente dividiu-se em duas sequências: i) imersão do meio aquoso do *masterbatche* e ii) análise da concentração das espécies de princípio ativo liberadas para o meio. Nestas análises, as amostras foram preparadas tomando como padrões a massa de 10,00 g de *masterbatche* para um volume de 80 ml de água deionizada.

Para a análise de migração dos princípios ativos no meio aquoso, foram empregadas técnicas de caracterizações diferentes e disponíveis no IDT/i-Parque/UNESC. Nas amostras contendo Triclosan foi empregada a técnica espectroscopia de UV-Visível e para as amostras contendo GZn as técnicas de espectroscopia de UV-Visível e espectroscopia de absorção atômica.

Nas análises de Absorção Atômica indicada para espécies de zinco, utilizou-se o espectrofotômetro da marca Varian Australian Pty, modelo AA240FS. Quanto à detecção de espécies químicas de triclosan e de zinco foi utilizada a técnica de absorção UV-Visível com um espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo UV1800. Estes procedimentos foram empregados com o principal objetivo de avaliar a capacidade de migração dos princípios ativos para o meio externo às matrizes poliméricas em função do percentual de aditivo e tempo de imersão.

Os ensaios foram realizados nas dependências dos laboratórios do LMPP/IDT/i-Parque/UNESC. As análises microbiológicas e toxicológicas foram realizadas no LADEBIMA/IDT/i-Parque/UNESC; as análises de UV-Visível foram realizadas no CECAM/IDT/i-Parque/UNESC; as análises de absorção atômica foram realizadas nos laboratórios do IPAT/i-Parque/UNESC.

Detalhamento da ETAPA 4: Incorporação dos aditivos antimicrobianos e atóxicos nos filmes PEBDL e PEAD.

Nesta etapa foram processados filmes monocamadas de PEBDL e de PEAD em uma co-extrusora de três camadas e de porte laboratorial e fabricada pelo LMPP/IDT/i-Parque/UNESC. Foi utilizada a extrusora central da co-extrusora com L/D 22. Nestes procedimentos foram avaliados e estabelecidos os principais parâmetros de máquina para a produção seguinte dos filmes monocamadas antimicrobianos. Os parâmetros avaliados e estabelecidos foram a temperatura de massa, velocidade de rotação de rosca, altura da linha de névoa, pressão de ar no balão e velocidade de puxamento. Foram observados durante os procedimentos de processamento a estabilidade de balão e os limites de espessura para os respectivos filmes e para os diferentes materiais poliméricos (PEBDL e PEAD). Além dos parâmetros de máquina, também foi avaliada a ausência de defeitos nos filmes, típicos no processo de fabricação de filmes, como a presença de géis, rugas e “casca de laranja”.

Diversos ajustes foram realizados nestes parâmetros, a fim de obter a melhor processabilidade das matérias primas e a ausência de defeitos nos filmes monocamadas. Após avaliar o desempenho do processamento dos filmes monocamadas de PEBDL e PEAD foi possível estabelecer as condições adequadas de processo, principalmente de temperatura e de velocidade de rotação de rosca. Deste modo, foram definidas para as cinco zonas de temperatura, as seguintes configurações mínimas: $Z_1=150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Z_2=160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Z_3=160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Z_4=170\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $Z_5=185\text{ }^{\circ}\text{C}$ e como configuração máxima $Z_1=160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Z_2=180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Z_3=180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Z_4=185\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $Z_5=185\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sendo Z_1 a zona de carregamento do canhão da co-extrusora, Z_2 a zona de compressão, Z_3 a zona de dosagem, Z_4 a zona correspondente ao bico do canhão e Z_5 a zona da matriz (cabecote). Como velocidade de rotação da rosca de extrusão, as configurações ficaram assim estabelecidas: como velocidade mínima 165 rpm e como velocidade máxima 235 rpm para o PEBDL e 285 rpm e 335 rpm para o PEAD.

Nesta etapa, foi realizada a incorporação apenas dos *masterbatches* com capacidade antimicrobiana, porém atóxicos, de acordo com o objetivo deste trabalho. Informações complementares seguem na seção de resultados e discussões.

Sendo assim, para a produção dos filmes poliméricos em co-extrusora de escala laboratorial, foi definido um percentual de 1,5 % em massa de GZn a ser incorporado em matrizes de PEAD e PEBDL.

A definição deste percentual levou em consideração os percentuais empregados de *masterbatches* na produção, em escala industrial, de filmes monocamadas de PEBDL e de PEAD. Desta forma,

a incorporação dos *mastebatches* foi realizada da seguinte maneira: *masterbatche* PEAD/Zn em matriz de PEAD e *masterbatche* PEBDL/Zn em matriz de PEBDL.

Vale ressaltar que a partir desta etapa foi registrado o pedido de proteção intelectual por meio de um Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes) código PCT/BR2012/000291, protegendo a invenção de embalagens antimicrobianas e atóxicas multicamadas. Esta etapa experimental foi realizada nos Laboratório de Processamento de Polímeros - LAPRO, localizado no LMPP/IDT/i-Parque/UNESC.

Detalhamento da ETAPA 5: Caracterização microbiológica e de migração do princípio ativo atóxico dos filmes mono camadas de PEBDL e de PEAD.

Nesta etapa foi avaliada a presença do efeito antimicrobiano e a capacidade de migração do princípio ativo para o meio externo dos filmes de PEAD e PEBDL. Estes estudos levaram em consideração as variáveis: percentual do *masterbatche* e a espessura dos filmes monocamadas, considerando o tempo máximo de 19 dias.

Para tanto, foi adotado um planejamento experimental 2^K estrela, tendo como variáveis o percentual de *masterbatche* e a espessuras dos filmes monocamadas. Este planejamento segue apresentado na Tabela 4. Como resposta foi avaliada de forma qualitativa a presenças das espécies no meio aquoso após a imersão por 19 dias por meio de espectrofotometria de absorção de UV-Visível. Como resposta quantitativa foi avaliada a área do pico corresponde às espécies de zinco no espectro de UV-Visível, porém, representando de forma qualitativa a concentração de espécies de zinco no meio aquoso.

Tabela 4 - Matriz de dados do planejamento experimental 2^k estrela.

Níveis		Espessura (mm)	Princípio ativo (%wt)
-1,41	0,00	0,36	5
-1,00	1,00	0,5	8
0,00	0,00	0,85	5
0,00	0,00	0,85	5
1,00	-1,00	1,2	2

0,00	1,41	0,85	9,23
0,00	-1,41	0,85	0,77
-1,00	-1,00	0,5	2
1,41	0,00	1,34	5
Níveis		Espessura (mm)	Princípio ativo (%wt)
1,00	1,00	1,2	8

Fonte: O AUTOR.

A caracterização microbiológica foi realizada com o objetivo de comprovar a presença dos efeitos antimicrobianos. Foram realizadas análises microbiológicas do tipo Difusão em Ágar e Curva de Morte para avaliar o efeito antimicrobiano seguindo os procedimentos adotados nos testes similares com os *masterbatches*.

Para as análises microbiológicas foram selecionados apenas alguns experimentos específicos do planejamento experimental estrela, em particular os experimentos relativos às codificações: (-1/-1), (1/1). Para o ensaio de difusão em ágar os filmes foram preparados na forma de disco e depositados nas placas, já semeadas com as bactérias testes (EC) e (SA). O efeito antimicrobiano foi medido em função dos halos inibitórios formados no meio de cultura (ágar) em torno da amostra, adotando a área do halo de difusão apresentado como proporcional ao efeito antimicrobiano.

O teste de curva de morte foi realizado de acordo com (JIS Z 2801:2000 – *Japanese Standards Association*) e utilizado para verificar o efeito bactericida dos compostos testados. Nesta análise, o filme foi colocado em contato com uma concentração conhecida de bactérias durante 4 h de exposição, um tempo considerado curto e que pode comprovar a rápida eficiência antimicrobiana através da redução no percentual de microrganismos sobreviventes.

A técnica de absorção de UV-Visível foi empregada nas mesmas codificações submetidas aos testes microbiológicos: níveis (-

1/-1), (1/1), para avaliar o potencial de migração das espécies de zinco. Os ensaios de migração foram realizados com filmes de PEBDL e PEAD aditivados com *masterbatches* de GZn foram preparados no formato de discos com área de 38,47 cm² e expostos e imersos em meio aquoso, com volume de 200 ml de água deionizada, durante um período de 20 dias conforme normatização vigente (RDC 105/99). Após este período, as soluções foram coletadas e submetidas à análises por absorção de UV-Visível para verificar a presença de espécies de zinco.

Ainda, os filmes poliméricos antimicrobianos e atóxicos foram submetidos a análises por FTIR para verificar a existência de alterações químicas na estrutura química, induzidas pelo processo ou pela interação do aditivo com as estruturas poliméricas. As análises microbiológicas foram realizadas no LADEBIMA/IDT/i-Parque/UNESC e as análises de absorção de UV-Visível e de FTIR foram realizadas no CECAM/IDT/i-Parque/UNESC.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho, que estão organizados em concordância com a metodologia experimental empregada.

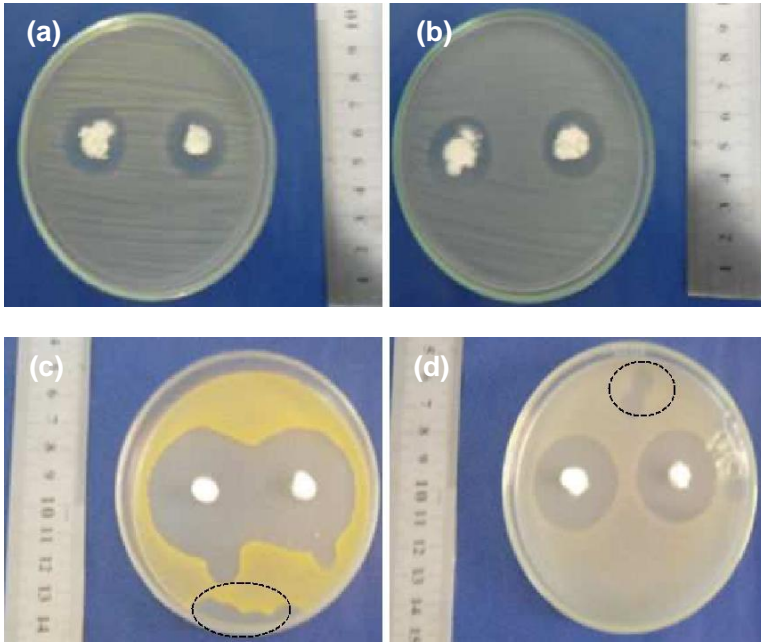
6.1 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS E DOS POLÍMEROS

Nesta seção estão apresentados os resultados de estudos e de caracterizações dos compostos TCS e GZn que contribuíram para a tomada de decisão do melhor aditivo antimicrobiano a ser aplicado nos filmes poliméricos com vistas na propriedade antimicrobiana e ausência de toxicidade.

6.1.1 Análise microbiológica

A Figura 7 mostra os resultados microbiológicos de difusão em Ágar com bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC) para os princípios ativos antimicrobianos empregados, triclosan (TCS) e material vítreo dopado com zinco (GZn). Os resultados indicam a presença do efeito antimicrobiano para o TCS e para o GZn com ambos os tipos de bactérias. A presença e as dimensões dos halos de migração do TCS mostram que as moléculas de triclosan se difundem para o meio externo com maior facilidade que as espécies de zinco e apresentando conseqüentemente maior efeito antimicrobiano. As regiões em destaque (tracejadas) indicam a presença de halos de inibição formados devido à queda acidental de princípios ativos durante o manuseio das amostras.

Figura 7- Resultados microbiológicos de Difusão em Ágar para (a) GZn com *Staphylococcus aureus* (SA) e (b) GZn com *Escherichia coli* (EC); (c) TCS com *Staphylococcus aureus* (SA) e (d) TCS com *Escherichia coli* (EC).

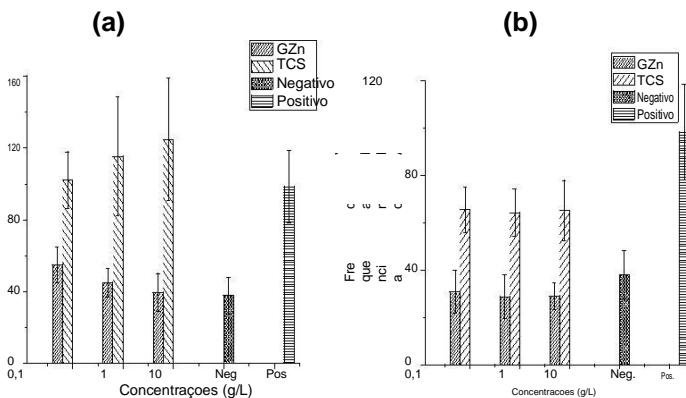


Fonte: O AUTOR.

6.1.2 Análise toxicológica

A partir de testes do tipo cometa observa-se que os princípios ativos GZn e TCS apresentam efeitos de danos distintos ao DNA humano. As Figuras 8a e 8b mostram o índice de fragmentação e a frequência de dano ao DNA de células de sangue humano, respectivamente.

Figura 8 - Resultados de toxicidade tipo cometa para o GZn e TCS. (a) Índice de fragmentação e (b) frequência de dano (%) ao DNA humano.



Fonte: O AUTOR.

Os resultados mostram que o TCS apresentou maior índice de fragmentação ao DNA humano comparado ao GZn nas concentrações testadas de 0,1g/L, 1g/L e 10g/L. O aumento da concentração de TCS provoca maiores índices de fragmentação do DNA, com valores variando de 102 a 125. Este comportamento sugere a presença de mecanismos de toxidez desenvolvidos especificamente pelo triclosan, que tem a capacidade de bloquear a síntese de ácidos graxos, inibição da atividade enzimática ou até mesmo alteração no sistema endócrino (NFODZO et al., 2011; LEE et. al., 2012; BRAUSCH et al., 2012; RODRICKS et. al., 2010; GUO et al., 2012; PERRON et al., 2012; PIRARD et. al, 2012; TOMS et al, 2012).

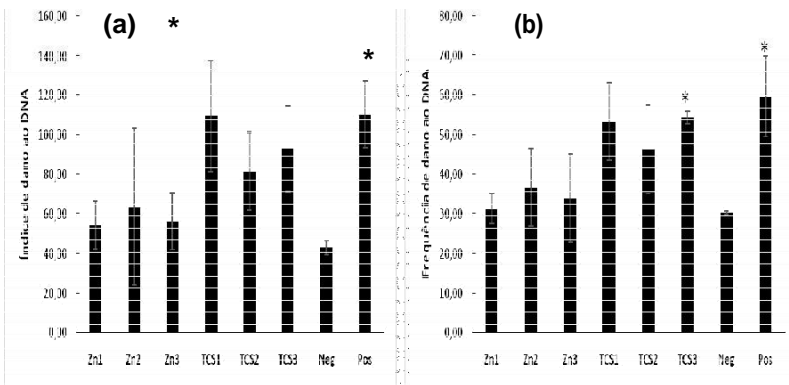
O efeito toxicológico apresentado pelo TCS, na ordem de 100, é estatisticamente equivalente ao efeito toxicológico apresentado pelo controle positivo (água oxigenada) em todas as concentrações, empregado nesta análise para comparação dos máximos efeitos na estrutura do DNA humano. Este efeito pode ser considerado de elevada toxicidade. Por sua vez, em todas as concentrações testadas de GZn os valores de índices de fragmentação não apresentaram magnitudes estatisticamente diferentes entre si e superiores aos índices de fragmentação ao controle negativo, que é da ordem de 38. Estes resultados indicam a característica atóxica do composto GZn nas concentrações testadas, estando de acordo com as evidências sugeridas pela literatura a respeito das propriedades atóxicas quanto ao uso de

materiais antimicrobianos a base de zinco (MOEZZI et al., 2012; MUNOZ-BONILLA et al., 2012; SONTAKKE et al., 2012; KAO et al., 2012).

Quanto aos resultados de frequência de danos, apresentados na Figura 8b, o TCS apresentou maior ocorrência de danos no DNA humano, com valor médio de 56,3, que o GZn, com valor médio de 23,5. Ambos os compostos testados apresentaram valores de frequência de danos inferiores ao controle positivo, de valor médio 100,5. Porém o TCS apresentou valor superior de frequência de danos, em todas as concentrações, que o controle negativo, de valor médio 39,0.

Na Figura 9, esta apresentado o gráfico referente a análise de variância (ANOVA) aplicada aos resultados genotóxicos dos princípios GZn e TCS, após a realização do teste cometa. (*= $p < 0,05$).

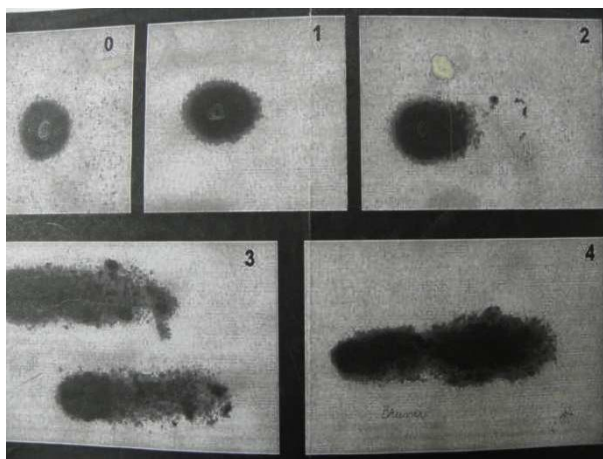
Figura 9 - Análise de variância (ANOVA) aplicada aos resultados genotóxicos dos princípios ativos GZn e TCS por (a) índice de danos e (b) frequência de danos.



Fonte: O AUTOR.

Ambas as análises estatísticas foram aplicadas aos princípios ativos em comparação com o controle negativo empregado. O GZn não apresentou atividade genotóxica significativa, tanto por frequência de danos quanto por índice de danos. Porém, o TCS apresentou atividade genotóxica significativa, quando submetido aos ensaios de índice de danos e frequência de danos. Para índice de danos a amostra TCS1; para frequência de danos a amostra TCS3. Na Figura 10 é representada a escala de danos típicos causados ao DNA, utilizada na leitura dos resultados do teste cometa.

Figura 10 - Escala de danos ao DNA utilizada na leitura dos resultados toxicológicos via Teste Cometa.



Fonte: O AUTOR.

De acordo com a Figura 10, são apresentados um conjunto de números variando de 0 a 4 que correspondem aos índices de fragmentação obtidos durante a leitura dos resultados. De acordo com o índice, quanto maior o número maior o dano ao DNA. Por sua vez, a denominação do Teste Cometa é justificada pelo formato do dano obtido durante a leitura, especialmente do nº 3 para o 4, em que observa-se com maior nitidez a formação semelhante de um “cometa”. Ainda neste contexto, a frequência de danos ao DNA é obtida a partir de um cálculo simples de porcentagem das células utilizadas no Teste Cometa que tenham sido fragmentadas (danificadas). Neste contexto, estas informações foram utilizadas na escolha definitiva do princípio ativo atóxico a ser utilizado na continuidade deste trabalho.

De acordo com os resultados toxicológicos, os princípios ativos testados apresentaram comportamentos completamente distintos quando expostos ao contato com DNA humano. Os resultados indicam que o TCS apresenta toxicidade significativa e elevada por apresentar índices de fragmentação e frequência superiores aos controles positivos adotados na realização dos testes. Ao contrário do GZn, que não apresenta toxicidade, apresentando seus valores de índice e de frequência de fragmentação com magnitude da ordem dos controles negativos.

Quando incorporados em filmes poliméricos ambos os princípios ativos poderão migrar para a superfície e para o meio externo. Se aplicados para a fabricação de embalagens, principalmente para embalagens de alimentos, caso ocorra a migração os efeitos e consequências poderão interferir nas propriedades dos produtos acondicionados, prejudicando a segurança alimentar, o sabor, a coloração e o aroma entre outras.

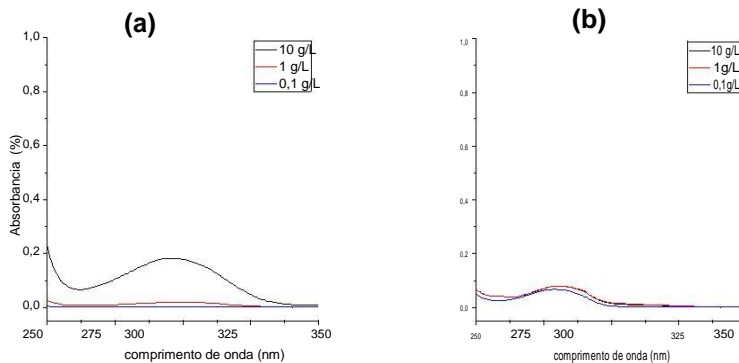
Desta forma, o uso do TCS como aditivo antimicrobiano aos filmes poliméricos pode representar um grande risco para a indústria de embalagens, tendo em vista o seu elevado caráter tóxico. Sua migração, mesmo em concentrações pequenas, agregará a característica tóxica para os filmes poliméricos. Por sua vez, a aplicação do composto GZn como aditivo antimicrobiano é mais segura quanto ao risco de toxicidade, mesmo com a ocorrência de migração para o meio externo, por apresentar ausência de toxicidade mesmo em percentuais elevados da ordem de 10 g/L.

Além da capacidade de migração dos princípios ativos puros para o meio se faz necessário a avaliação da capacidade de migração dos princípios quando incorporados nos filmes poliméricos, principalmente nos polímeros de Polietileno de Baixa Densidade e Polietileno de Alta Densidade, os mais aplicados atualmente pelo segmento de embalagens. Os polímeros PEBDL e PEAD não apresentam toxicidade e são amplamente aplicados para a fabricação de filmes poliméricos para embalagens de alimentos devido a estas características, além das propriedades mecânicas e da viabilidade econômica. (DOW CHEMICAL COMPANY, NG 1045-11B) (BRASKEM, GM 9450 F)

6.1.3 Análise por espectroscopia UV-visível

As Figuras 11a e 11b mostram os espectros de absorção UV-Visível obtidos para o TCS e para o GZn imersos com diferentes concentrações entre 0,1 g/L, 1 g/L e 10 g/L, em meio aquoso por 72 h. Os espectros de UV-Visível servem como padrões para a caracterização por UV-Visível do TCS e do GZn ou para a caracterização dos compostos que contenham estes princípios ativos.

Figura 11 - Resultados dos ensaios de migração das amostras GZn (a) e TCS (b) submetidas a técnica de UV-Visível.



Fonte: O AUTOR.

Os espectros de absorção UV-Visível mostram um pico principal característico do TCS em 280 nanômetros, em acordo com os resultados apresentados na literatura científica. (CABRALES et. al., 2012). O aumento da concentração do composto TCS pouco influência na magnitude da amplitude e da área do pico característico. Os espectros de absorção de UV-Visível para o GZn apresenta picos característico em 300 nanômetros, estando associados a presença de espécies de zinco na solução aquosa. (BARRETO et. al., 2007).

À medida que se aumenta a concentração de GZn ocorre um acréscimo na magnitude das regiões associadas aos picos de absorção, sendo mais sensível em 300 nanômetros. Esta informação sugere um aumento na presença de espécies de zinco na solução aquosa devido a capacidade de migração do composto GZn para o meio externo. Os espectros de absorção de UV-Visível dos compostos TCS e de GZn servem como padrões e podem ser aplicados nos estudos de migração destes compostos para meios aquosos.

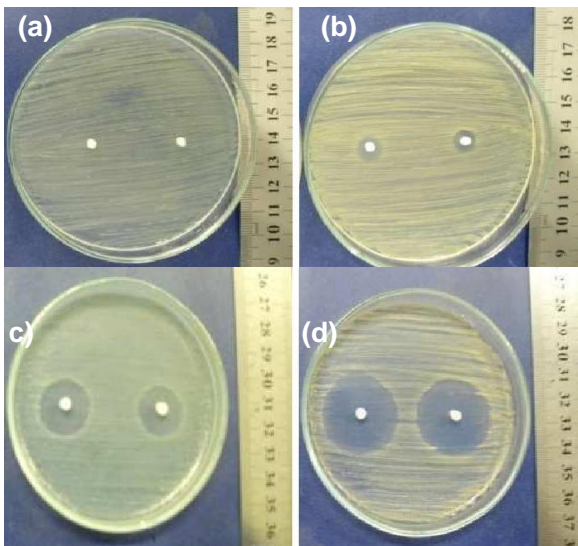
6.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE MIGRAÇÃO DOS MASTERBATCHES PEBDL E PEAD CONTENDO GZn E TCS

Nesta seção são apresentados os resultados e discussões referentes ao desenvolvimento e caracterização microbiológica dos *masterbatches* de PEBDL e de PEAD contendo GZn e TCS e a avaliação da capacidade de migração dos princípios ativos para o meio externo.

6.2.1 Análise microbiológica

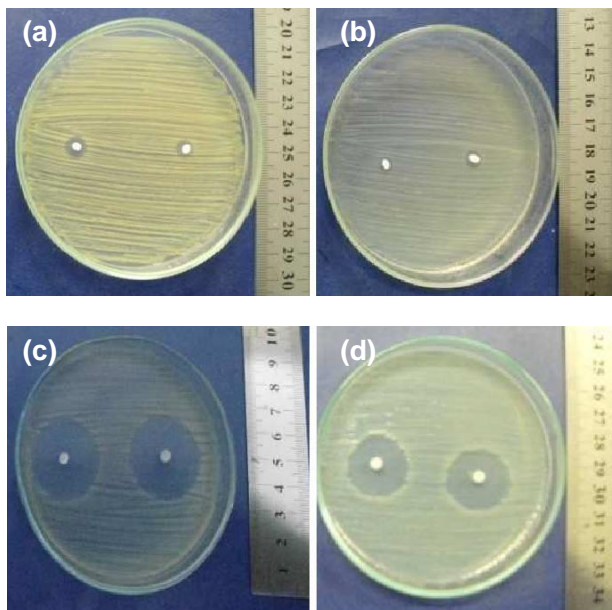
As Figuras 12 e 13 mostram os resultados das análises microbiológicas de Difusão em Ágar para os *masterbatches* de PEAD/GZn, PEAD/TCS, PEBD/GZn e PEBD/TCS, respectivamente.

Figura 12 - Resultados microbiológicos dos ensaios de Difusão em Ágar para os *masterbatches*: (a) e (b) PEAD/GZn com bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente e (c) e (d) PEAD/TCS com bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.



Fonte: O AUTOR.

Figura 13 - Resultados microbiológicos dos ensaios de Difusão e m Ágar para os *masterbatches*: (a) e (b) PEBDL/GZn com bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente e (c) e (d) PEBDL/TCS com bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.



Fonte: O AUTOR.

Os resultados microbiológicos indicam diferentes efeitos bactericidas para o composto TCS e GZn. Para os *masterbatches* contendo TCS, o efeito é maior, provavelmente devido ao seu caráter tóxico, já comprovado anteriormente pelas análises de toxicidade. Mesmo com efeito inferior, os *masterbatches* contendo o composto GZn ainda apresentam efeito antimicrobiano, principalmente em bactérias SA. É observada a formação de halos de inibição, porém menores comparados ao TCS, o que caracteriza ainda assim capacidade de liberação de espécies de zinco iônico para o meio externo dos *masterbatches* contendo GZn.

A diferença entre os halos de inibição dos *masterbatches* constituídos por GZn e por TCS pode ser também atribuído possivelmente a capacidade de difusão das espécies de zinco ou de TCS ao longo da matriz polimérica ou da quantidade destas espécies na superfície dos

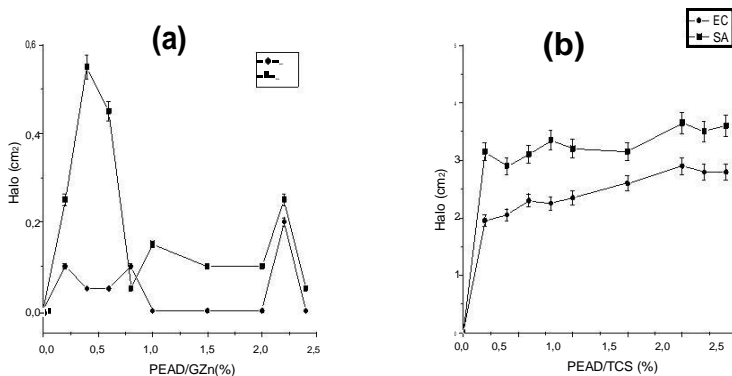
compostos. Nos *masterbatches* contendo moléculas de TCS a sua capacidade antimicrobiana depende apenas da migração da molécula orgânica através da matriz polimérica durante ou após o processamento, enquanto que nos compostos contendo GZn as espécies de zinco iônico, que são os princípios ativos, necessitam serem liberados da matriz vítrea para posteriormente se difundirem através da matriz polimérica e para serem então liberados para o meio externo.

Desta forma, além da toxicidade dos compostos, a capacidade antimicrobiana para os *masterbatches* contendo TCS depende apenas de um mecanismo de difusão das moléculas do próprio triclosan pela matriz polimérica, enquanto que para os compostos contendo GZn é dependente de dois mecanismos, a liberação pela matriz vítrea dos íons de zinco e a difusão dos íons de zinco pela matriz polimérica. Assim, considerando os *masterbatches* antimicrobianos os seus efeitos dependerão do tempo, do tipo da matriz polimérica e do percentual do TCS e do GZn na matriz polimérica.

Os resultados de Difusão em Ágar também dão indicativos que os *masterbatches* de PEBDL apresentam efeito antimicrobiano maiores, tanto para a composição com TCS quanto com GZn. Embora não possam ser tomados como resultados conclusivos estas informações são indicativas de que a matriz polimérica afeta diretamente a capacidade antimicrobiana. Uma vez dependente de mecanismos de difusão para a migração dos princípios ativos para a definição da capacidade antimicrobiana a matriz polimérica pode influenciar com diferentes coeficientes de difusão. O PEAD é um polímero de maior densidade e maior grau de cristalinidade que o PEBDL e, como consequência, oferece menor coeficiente de difusão que o PEBDL. Assim, qualquer princípio ativo incorporado na matriz de PEAD terá maior dificuldade de migração por difusão para o meio externo do polímero, consequentemente menor será o efeito antimicrobiano apresentado.

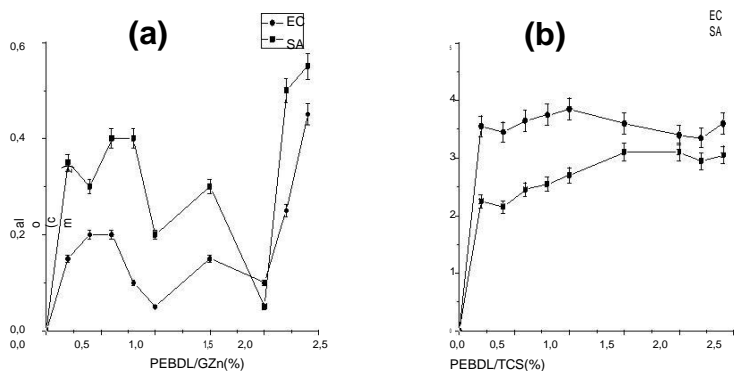
As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados microbiológicos de Difusão em Ágar com as bactérias do tipo *SA* e *EC* para as amostras de *masterbatches* de PEAD e PEBDL contendo diferentes concentrações de TCS e de GZn.

Figura 14 - Relação entre halos de inibição e o percentual de TCS e de GZn em testes de Difusão em Ágar com bactérias *Escherichia coli* (EC) e *Staphylococcus aureus*. (a) PEAD/GZn e (b) PEAD/TCS.



Fonte: O AUTOR.

Figura 15 - Relação entre halos de inibição e o percentual de TCS e de GZn em testes de Difusão em Ágar com bactérias *Escherichia coli* (EC) e *Staphylococcus aureus*. (a) PEBDL/GZn e (b) PEBDL/TCS.



Fonte: O AUTOR.

Os resultados confirmam o efeito antimicrobiano para todos os *masterbatches* e sendo dependentes do percentual dos compostos GZn e TCS. O aumento do percentual dos compostos contendo o princípio ativo proporciona maior efeito antimicrobiano devido à presença de

maiores quantidades do princípio ativo nos *masterbatches*.

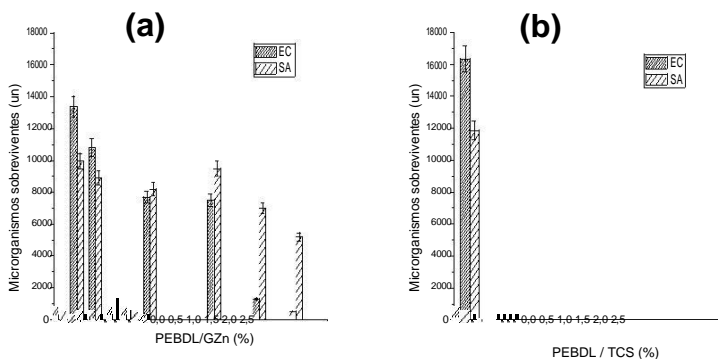
A capacidade antimicrobiana dos *masterbatches* contendo GZn, embora apresente grande dispersão nas magnitudes, aumenta na média sua magnitude com o aumento do percentual de GZn. A grande dispersão dos valores em função do percentual deve-se, provavelmente, a falta de homogeneização do composto GZn na matriz polimérica. Como as espécies iônicas (princípios ativos) necessitam de dois mecanismos para sua migração, a falta de homogeneização prejudica a regularidade da propriedade antimicrobiana para estes *masterbatches*. Estes compostos foram processados por extrusoras monoroscas, sendo mais indicadas as extrusoras com dupla rosca, para a homogeneização destes sistemas.

Os resultados mostram maiores efeitos antimicrobianos para os compostos contendo TCS, especialmente em bactérias do tipo SA em relação a bactérias do tipo EC, que esta de acordo com resultados já apresentados em literaturas científicas (GUO et al., 2012; MUNOZ et. al., 2012; RIVA et. al., 2012). Com percentuais maiores o acréscimo na capacidade antimicrobiana é muito pequeno ou não significativo. Este comportamento é típico para ambos os tipos de matriz polimérica, para os *masterbatches* PEAD/TCS e PEBDL/TCS. As magnitudes apresentam regularidade nos seus valores em função do aumento do percentual, tendo em vista a necessidade de apenas um mecanismo para a migração do TCS e a sua capacidade lubrificante n o processamento por extrusão, que facilita a sua dispersão de forma homogênea na matriz polimérica mesmo em extrusoras monoroscas.

Verifica-se ainda maior magnitude na capacidade antimicrobiana do *masterbatche* PEBDL/GZn do que PEAD/GZn. Este efeito pode estar associado com a maior facilidade de migração dos princípios ativos pela matriz de menor grau de cristalinidade e menor densidade, neste caso, as matrizes de PEBDL. Vale ressaltar que alguns relatos na literatura já demonstraram a atividade de zinco em relação a bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (LI, 2009) e principalmente incorporados em poliolefinas como PEBDL (EMAMIFAR et al.,2011).

A Figura 16 apresenta resultados referentes ao percentual de bactérias sobreviventes quando expostas ao contato durante 4h, com *masterbatches* antimicrobianos a base de PEBDL contendo diferentes concentrações de GZn e de TCS, respectivamente.

Figura 16 - Nº de microrganismos sobreviventes do tipo *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC) durante exposição por 4 horas em *masterbatches* antimicrobianos: (a) PEBDL/GZn e (b) PEBDL/TCS.

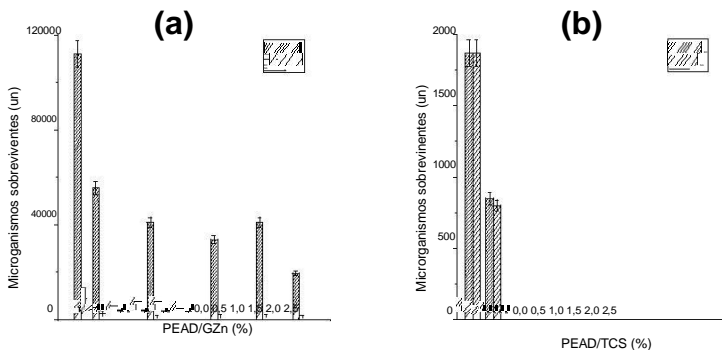


Fonte: O AUTOR.

Os resultados indicam ótima eficácia para os *masterbatches* PEBDL/TCS e PEAD/TCS. No período de 4 horas de exposição ocorreu a morte total das bactérias para os compostos contendo percentuais acima de 0,2 % em massa. Estas características estão de acordo com os resultados microbiológicos de Difusão em Ágar e de toxicidade para o TCS puro. Os *masterbatches* produzidos com triclosan apresentam maior capacidade antimicrobiana, porém associados a propriedades toxicológicas específicas do composto. A elevada toxicidade do TCS agrega a propriedade antimicrobiana aos *masterbatches* PEAD/TCS e PEBDL/TCS, porém é uma característica negativa para a aplicação em filmes poliméricos para a fabricação de embalagens antimicrobianas e atóxicas destinadas a indústria alimentícia.

A Figura 17 apresenta resultados referentes ao percentual de bactérias sobreviventes quando expostas ao contato durante 4h, com *masterbatches* antimicrobianos a base de PEAD contendo diferentes concentrações de GZn e de TCS, respectivamente.

Figura 17 - Nº de microrganismos sobreviventes do tipo *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC) durante exposição por 4 horas em *masterbatches* antimicrobianos: (a) PEAD/GZn (a) e (b) PEAD/TCS.



Fonte: O AUTOR.

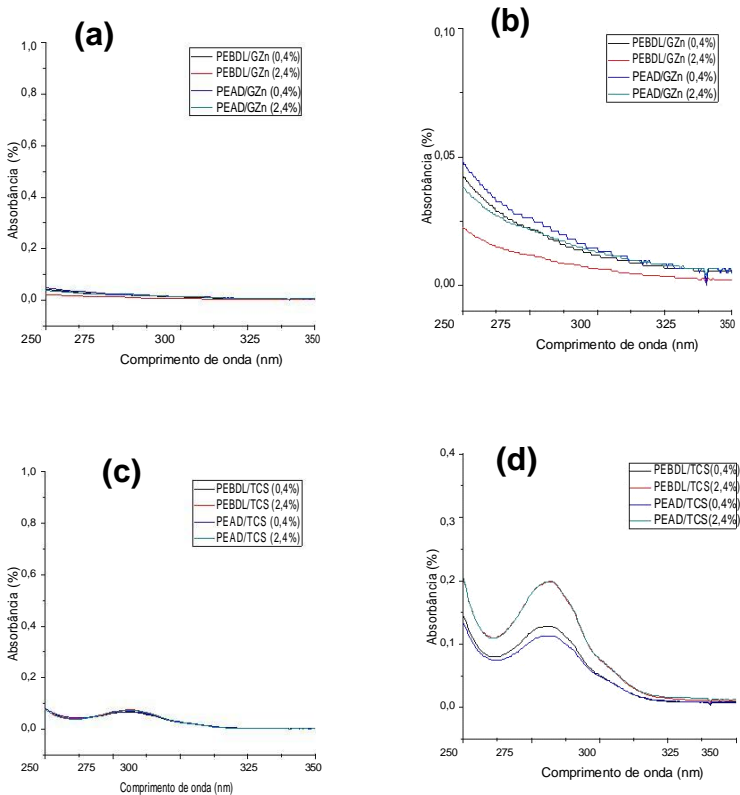
Quanto aos *masterbatches* PEAD/GZn e PEBDL/GZn é possível verificar o efeito antimicrobiano com menor intensidade em relação ao PEAD/TCS e PEBDL/TCS, apesar de apresentarem a capacidade difusiva das espécies de zinco para o meio externo. Este aspecto torna-se ainda mais importante tendo em vista que o GZn apresenta dois estágios para sua difusão: i) da matriz vítrea para a matriz polimérica e ii) da matriz polimérica para o meio externo. Ainda assim, é possível ressaltar que as matrizes poliméricas empregadas no preparo dos *masterbatches* não influenciaram diretamente na atividade antimicrobiana, principalmente quando se observa que os princípios ativos incorporados a PEAD e PEBDL continuam a apresentar capacidade de migração e conseqüentemente efeito antimicrobiano. Esta característica torna-se extremamente interessante e atraente para aplicações como embalagens. O GZn se apresenta como uma alternativa principalmente por apresentar efeito antimicrobiano desejável em diferentes polímeros, associado aos níveis tóxicos insignificantes apresentados.

6.2.2 Ensaios de espectroscopia UV-visível

A Figura 18 apresenta os espectros de absorção UV-Visível para a solução aquosa após 1 dia de imersão dos *masterbatches* contendo 0,4 % e 2,4 % em massa do composto GZn e TCS.

As Figuras 18a e 18b mostram que não há picos característicos das espécies de zinco nos espectros, um indicativo de que não ocorreu a migração de espécies de zinco em percentuais significativos para o meio externo com ambos os tipos de matrizes poliméricas. Porém, os espectros de UV-Visível indicam a presença do composto triclosan em quantidade significativa no meio aquoso após a imersão dos *masterbatches* PEAD/TCS e PEBD/TCS, Figuras 18c e 18d. A magnitude do pico de absorção característico em 280 nanômetros é da ordem do padrão da solução aquosa com triclosan puro após 72 horas. Esta característica sugere que grande parte das moléculas de triclosan presentes nas superfícies dos *masterbatches* são liberadas para o meio externo em períodos de tempo muito curtos. Este comportamento explica a grande eficácia do efeito antimicrobiano dos *masterbatches* contendo triclosan em curto período de tempo.

Figura 18 - Espectros de absorção UV-Visível para a solução aquosa após 1 dia de imersão dos *masterbatches* contendo 0,4 % e 2,4 % em massa do composto TCS. (a) PEBDL/GZn e PEAD/GZn; (b) detalhe na região de absorção do zinco; (c) PEBDL/TCS e PEAD/TCS e (d) detalhe na região de absorção do triclosan.



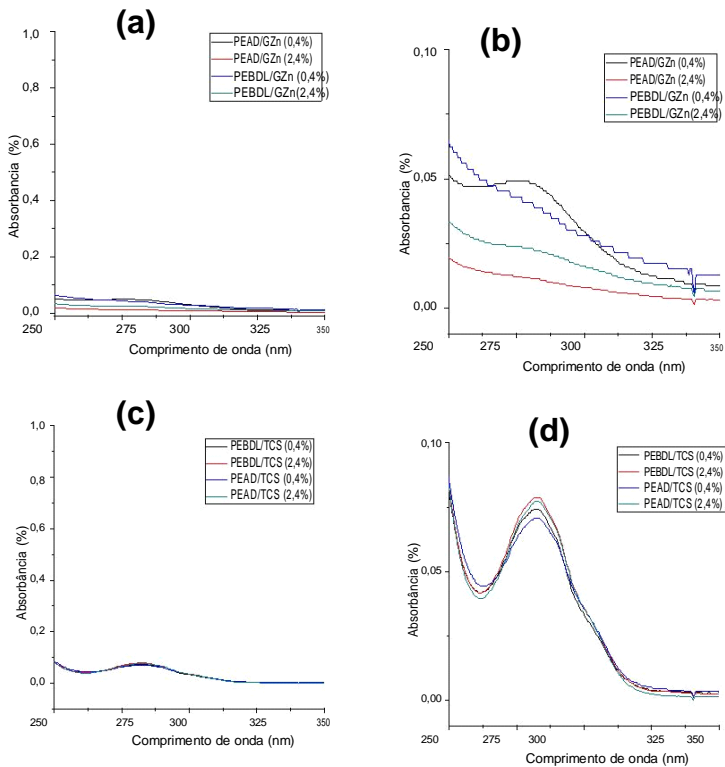
Fonte: O AUTOR.

A Figura 19 apresenta os espectros de absorção UV-Visível para a solução aquosa após 19 dias de imersão dos *masterbatches* contendo 0,4 % e 2,4 % em massa dos compostos GZn e TCS.

As Figuras 19a e 19b mostram a ausência dos picos de absorção próximos de 280 nanômetros no espectro, característicos das espécies de zinco para ambas as soluções aquosas contendo os *masterbatches* de

matriz polimérica PEAD e PEBDL. Em relação à capacidade de migração do TCS, verifica-se que este composto apresenta maior capacidade de liberação da matriz polimérica em todas as concentrações. Após 19 dias de imersão o sinal para o TCS é maior para as concentrações de 2,4 % em massa. Esta diferença apresentada entre GZn e TC S era esperada, tendo em vista os coeficientes de difusão já medidos entre ambos e descritos na literatura, sendo na ordem de 100 vezes maior para TCS em relação a GZn. Assim, os resultados indicam que quantidades pequenas de espécies de zinco são liberadas para o meio externo dos *masterbatches* contendo GZn e a quantidade é dependente do tempo, do percentual de GZn e do tipo da matriz polimérica. Estas informações sugerem que o efeito antimicrobiano dos *masterbatches* contendo GZn dependem de mecanismos de difusão ao longo da matriz polimérica. As análises mostram que o tempo e o percentual não afetam os mecanismos de liberação das moléculas de triclosan para o meio externo, o que sugere que o efeito antimicrobiano dos *masterbatches* é dependente das moléculas que estão na superfície da matriz polimérica, sendo a sua eficácia excelente devido a rápida liberação destas moléculas para o meio externo.

Figura 19 - Espectros de absorção UV-Visível para a solução aquosa após 19 dias de imersão dos *masterbatches* contendo 0,4 % e 2,4 % em massa do composto GZn e TCS. (a) PEBDL/GZn e PEAD/GZn, (b) detalhe na região de absorção do zinco, (c) PEBDL/TCS e PEAD/TCS e (d) detalhe na região de absorção do triclosan.



Fonte: O AUTOR.

Os *masterbatches* produzidos com TCS liberam rapidamente as moléculas de triclosan e com o passar do tempo o percentual de moléculas liberadas não é afetado. Ainda, o aumento do percentual de TCS no *masterbatche* pouco influi na quantidade de espécies liberada para o meio externo da matriz polimérica. Da mesma forma, a diferença da matriz polimérica não influi significativamente. Assim, o mecanismo de liberação das espécies de triclosan para o meio externo dos *masterbatche* não é dominado por mecanismos de difusão das moléculas através da matriz polimérica até a superfície. Seu efeito bactericida

essencialmente poderá depender apenas da quantidade de moléculas disponíveis na superfície dos *masterbatches* de TCS definida durante a etapa do processamento na superfície.

Por sua vez, os princípios ativos do composto GZn são liberados gradualmente pela matriz vítrea e se difundem através da matriz polimérica até a superfície dos polímeros para então serem liberados para o meio externo. O mecanismo de liberação depende do tempo, do percentual do princípio ativo e do tipo da matriz polimérica, o que sugere ser um mecanismo dominado por difusão através do PEAD e do PEBDL. Assim, as espécies iônicas de zinco são liberadas gradualmente para o meio externo dos *masterbatches*.

O fato de o TCS ser tóxico e ser liberado em grandes quantidades e rapidamente para o meio externo em curtos períodos de tempo pode ser uma característica limitadora para a sua aplicação em filmes poliméricos destinados, especialmente na fabricação de embalagens para alimentos. Os resultados de UV-Visível indicam magnitudes do pico de absorção característico aos do triclosan puro em elevadas concentrações, entre 0,1 g/L e 10 g/L. Em todas estas concentrações a solução aquosa apresentou elevada toxicidade. Assim, uma vez empregado o TCS para a produção de embalagens alimentícias, concentrações equivalentes poderão migrar para os alimentos tornando-os tóxicos e impróprios para o consumo.

6.2.3 Análise de absorção atômica

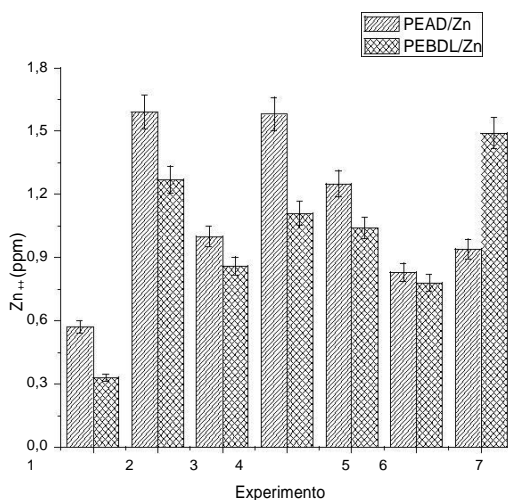
Na Tabela 5 são apresentados os resultados da quantificação das espécies iônicas de zinco, determinadas por absorção atômica, liberadas para meios aquosos por *masterbatches* de PEAD/GZn e PEBDL/GZn. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental 2^K , adotando como fatores de interesse o tempo de imersão e os percentuais de GZn na matriz polimérica. A Figura 20 apresenta os resultados na forma gráfica.

Tabela 5 - Resultados obtidos referente ao teste de migração para os *masterbatches* PEBDL/GZn e PEAD/GZn.

ENSAIO Nº	FATORES		PEBDL		PEAD	
	Princípio ativo (%)	Tempo (dias)	Média (ppm)	σ (ppm)	Média (ppm)	σ (ppm)
1	0,4	1	0,33	0,10	0,57	0,20
2	2,4	1	1,07	0,20	1,59	0,25
3	1,4	10	0,86	0,20	1	0,20
4	1,4	10	1,04	0,25	1,58	0,14
5	1,4	10	1,11	0,25	1,25	0,18
6	0,4	19	0,78	0,22	0,83	0,16
7	2,4	19	1,49	0,22	0,94	0,20

Fonte: O AUTOR.

Figura 20 - Concentração de espécies iônicas libera das (ppm) para meio aquoso por *masterbatches* PEAD/GZn e PEBD/GZn contendo diferentes percentuais de GZn: 0,4; 1,4 e 2,4 wt% ; em após diferentes tempos de imersão: 1, 10 e 19 dias.



Fonte: O AUTOR.

A partir de análises de variância (ANOVA), Tabelas 6 e 7, é

possível verificar que nenhum fator foi estatisticamente significativo para a quantidade de espécies liberadas pelo *masterbatche* PEAD/GZn. Porém, para o PEBDL/GZn o percentual de GZn incorporado na matriz de PEBDL demonstrou ser um fator estatisticamente significativo para os mecanismos de liberação das espécies iônicas de zinco.

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores de migração de PEAD.

Fator	Desvio Padrão	df	MS	Teste F	Teste P
1) Concentração (%)	0,319225	1	0,319225	3,771859	0,191612
2) Tempo (dias)	0,038025	1	0,038025	0,449291	0,571704
1 by 2	0,207025	1	0,207025	2,446140	0,258264
Falta de ajuste	0,148344	1	0,148344	1,752785	0,316580
Erro Puro	0,169267	2	0,084633		
Desvio Padrão Total	0,881886	6			

Fonte: O AUTOR.

Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos valores de migração de PEBDL.

Fator	Desvio Padrão	df	MS	Teste F	Teste P
1) Concentração (%)	0,680625	1	0,680625	57,56973	0,004750
2) Tempo (dias)	0,112225	1	0,112225	9,49240	0,054095
1 by 2	0,013225	1	0,013225	1,11862	0,367845
Falta de ajuste	0,002201	1	0,002201	0,13234	0,750878
Erro Puro	0,033267	2	0,016633		
Desvio Padrão Total	0,841543	6			

***Em destaque os fatores estatisticamente significativos.**

Fonte: O AUTOR.

A partir da análise por efeitos estimados é possível verificar que o efeito do percentual de GZn na quantidade de espécies iônicas liberadas para o meio aquoso é positivo. O que implica na afirmação que percentuais maiores de GZn nos *masterbatches* de PEBDL/GZn promovem o aumento da quantidade de espécies iônicas no meios

externo, conseqüentemente o aumento da capacidade antimicrobiana. No entanto, devido à maior dificuldade de migração das espécies de zinco através da matriz de PEAD os valores de quantidades de espécies iônicas de zinco apresentaram grande dispersão, o que inviabiliza as conclusões estatísticas.

Os resultados por absorção atômica confirmam a liberação de espécies iônicas de zinco pelos *masterbatches* PEAD/GZn e PEBDL/GZn. Ainda, as concentrações de espécies iônicas de zinco liberadas por ambos os *masterbatches* não ultrapassa os valores permitidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) pela norma RDC n° 105/99, ANVISA. Para ambos os *masterbatches* os resultados não apresentam valores maiores da ordem de 2 ppm, atendendo aos níveis exigidos pela ANVISA, de no máximo 25 ppm para o zinco.

6.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE MIGRAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO ATÓXICO NOS FILMES DE PEBDL E PEAD

Nesta seção são apresentados resultados e discussões da caracterização de filmes de PEBDL e de PEAD contendo apenas os *masterbatches* antimicrobianos e atóxicos. Apenas os *masterbatches* PEAD/GZn e PEBDL/GZn apresentaram tais características. Desta forma, nesta etapa não foram aplicados os *masterbatches* contendo TCS nos respectivos estudos.

6.3.1 Ensaios microbiológicos

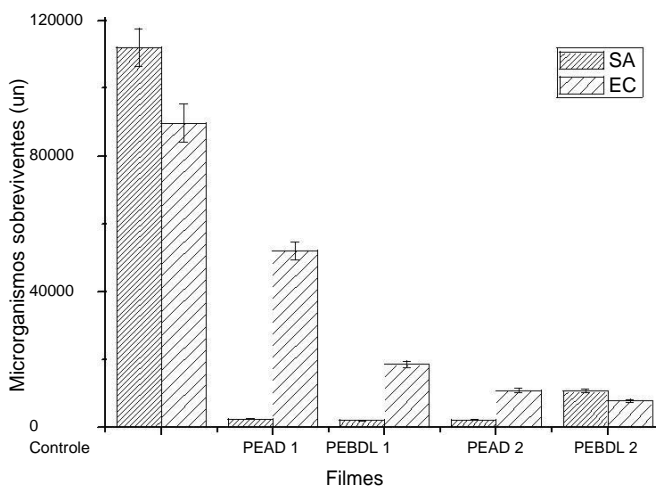
A Figura 21 mostra os resultados referentes ao ensaio de curva de morte aplicado aos filmes produzidos de PEAD e PEBDL, aditivados com os *masterbatches* PEAD/GZn e PEBDL/GZn, com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC), durante o período de 4h. A Tabela 8 apresenta os valores de espessura e percentual de GZn definidos nas amostras de filmes de PEBDL e de PEAD submetidos aos testes.

Tabela 8 - Valores de espessura e percentual de GZn definidos nas amostras de filmes de PEBDL e de PEAD.

Níveis		Espessura (mm)	Princípio ativo (%wt)	Amostra
-1,00	-1,00	0,5	2	1
1,00	1,00	1,2	8	2

Fonte: O AUTOR.

Figura21 - Número de microrganismos sobreviventes do tipo *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC) durante exposição por 4 horas em filmes antimicrobianos atóxicos de P EAD e PEBDL, aditivados com GZn.



Fonte: O AUTOR.

As amostras descritas na Tabela 8 foram selecionadas de acordo com o planejamento 2^k apresentado nas etapas anteriores. Os pontos selecionados para cada polímero, PEAD e PEBDL, correspondem aos níveis mínimos (-1/-1) e máximos (1/1) das variáveis espessura (mm) do filme produzido e percentual (%) de *masterbatche* incorporado.

É possível verificar que todos os filmes de PEBDL/ GZn e de PEAD/ GZn apresentam efeito antimicrobiano após os períodos de 4 h de exposição. Com ambos os percentuais de GZn o efeito antimicrobiano é muito expressivo para as bactérias do tipo SA. Para as

bactérias EC, por serem mais resistentes, o efeito antimicrobiano é maior com percentuais de GZn mais elevados.

Embora o efeito antimicrobiano possa ser considerado muito bom os resultados evidenciam a grande dispersão nos valores de quantidade de microrganismos sobreviventes em função do percentual e do tempo. Esta característica dificulta a análises da diferença entre os filmes de PEBDL/GZn e PEAD/GZn. Porém, os resultado mostram que com há espécies iônicas de zinco na superfície dos filmes poliméricos e suficientes para agregar um bom desempenho antimicrobianos aos filmes de PEBDL/GZn e de PEAD/GZn.

Considerando a condição de melhor capacidade de eliminação bacteriana é possível verificar a dependência do efeito antimicrobiano com o percentual de GZn. A melhor condições pode se r considerada a condição de máximo percentual de GZn, algo esperado considerando que maior quantidade de espécies de zinco estarão disponibilizadas na superfície dos filmes poliméricos.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível atender os principais objetivos propostos inicialmente tornando a sua realização satisfatória perante as metas estipuladas. O trabalho baseou-se na seleção, caracterização e produção de embalagens flexíveis com perspectivas inovadoras no mercado de atuação.

Os princípios ativos utilizados neste trabalho apresentam propriedades antimicrobianas e toxicológicas diferentes. O triclosan apresenta maior eficiência antimicrobiana em relação ao composto vítreo dopado com o zinco, porém exibe níveis de toxicidade maiores o que restringe o seu uso como aditivo atóxico para as embalagens alimentícias.

Os compostos também apresentam capacidades de migração das espécies diferentes. O triclosan demonstra maior migração em relação ao composto vítreo independente do período de exposição entre 1 e 19 dias, o que o torna ainda mais inadequado para o uso como aditivo atóxico. No entanto, o composto vítreo apresenta atividade antimicrobiana tanto no estado puro quanto disperso em estruturas poliméricas diferentes o que favorece ao uso do composto em *masterbatches* e embalagens de PEBDL e PEAD.

O processo de extrusão a balão monocamada mostra-se viável tecnicamente para a produção em escala laboratorial e industrial de embalagens flexíveis para a indústria alimentícia. Os principais parâmetros do processo foram padronizados a fim de obter condição ideal do processamento dos filmes poliméricos.

Este trabalho ainda contou com a participação direta de empresas parceiras como o grupo Marfrig e Plaszom além da participação direta da UNESC, em especial do LMPP, nas decisões e ações vinculadas aos propósitos do tema. Salienta-se que tal parceria foi extremamente importante para finalização das etapas desenvolvidas visando à obtenção do produto esperado. Ainda assim, este trabalho por sua vez justifica o sucesso alcançado devido ao pedido de patente já protocolado junto ao INPI.

8 REFERÊNCIAS

AL-HOLY, M. A.; CASTRO, L. F.; AL-QUADIRI, H. M. Inactivation of *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) in infant formula using lactic acid, copper sulfate and monolaurin. **Letters in Applied Microbiology**. Vol. 50, nº 3, p. 246-251, 2010 [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02782.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02782.x)

ALI DADFAR, S.M.; ALEMZADEH, I.; REZA DADFAR, S.M.; VOSOUGHI, M. Studies on the oxygen barrier and mechanical properties of low density polyethylene/organoclay nanocomposite films in the presence of ethylene vinyl acetate copolymer as a new type of compatibilizer. **Material and Design**. 32, p. 1806-1813, 2012. [DOI:10.1016/j.matdes.2010.12.028](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2010.12.028)

ARYOU, Emamifar; KADIVAR, Mahdi; SHAHEDI, Mohammad; SOLEIMANIAN-ZAD, Sabihe. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**. 22, p. 408-413, 2011. [DOI:10.1016/j.foodcont.2010.09.011](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.011)

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. Vol. 3 nº 2, pp. 113-26, 2002. [DOI: 10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)

BARBIROLI, Alberto; BONOMI, Francesco; CAPRETTI, Giorgio; LAMETTI, Stefânia; MANZONI, Matilde; PIERDIOVANI, Luciano; ROLLINI, Manuela. Antimicrobial activity lizozime and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. **Food Control**, p. 1-22, 2012. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.01.046](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.046)

BARRETO, Wagner J.; ANDO, Rômulo A. ; SANTOS, Paulo S.; SILVA, Waleria P. Preparation, UV-vis, IR, EPR and resonance Raman study of Fe, Ni, Co and Zn dioxolene complexes. **Espectrichimica Acta Part A**. Vol. 68, p.612-618, 2007. [DOI:10.1016/j.saa.2006.12.037](https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.12.037)

BECKER, M. R.; FORTE, M. M. C.; BAUMHARDT N°, R. Pr eparação e avaliação térmica e reológica de misturas de PEBD /PELBD. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 12, nº 2, p. 85-95, 2002.

BLASS, Arno. **Processamento de Polímeros**. 2ª edição, Florianópolis: UFSC, 1988.

BORTOLOTTO, T.; BERTOLDO, J.B.; SILVEIRA, F.Z.; DEFAVERI, T.M.; SILVANO J.; PICH, C.T.. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. **Environmental Toxicology. Pharmacology**. 28, p. 288–292, 2009. DOI:10.1016/j.etap.2009.05.007

BOTTERO, Jean-Yves; AUFFA, Melanie; ROSE, Jerome; MOUNEYRAC, Catherine; BOTTA, Celine; LABILLE, Jerome; MASION, Armand; THILL, Antoine; CHANEAC, Corinne. Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. **Comptes Rendus Geoscience**. 343, p. 168-176, 2011. DOI:10.1016/j.crte.2011.01.001

BRAUSCH, John M.; RAND, Gary M. A review of personal care products in aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**, 82, p. 1518-1532, 2011. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018.

BRUNA, J.E.; PENALOZA, A.; GUARDA, A.; RODRÍGUEZ, F.; GALOTTO, M.J. Development of MtCu⁺²/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potencial use in food packaging. **Applied Clay Science**. ISSN 0169-1317, 2012. doi:10.1016/j.clay.2012.01.016.

BRAKEN. **Ficha Técnica do Produto**: Polietileno de Baixa Densidade Linear (PEBDL). Grade GM 9450 F.

BURNETT, Mark E; WANG, Steven Q. Current sunscreen controversies: a critical review. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. Vol 27, p.58-67, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0781.2011.00557.x

BUTH, J.M.; ROSS, M.R.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W.A.; Removal and formation of chlorinated triclosan derivatives in wastewater treatment plants using chlorine and UV disinfection. **Chemosphere**. 84 (9), 1238-1243. 2011.

CABRALES, Luis; ABIDI, Nouredine; HAMMOND, Adrienne; HAMOOD, Abdul. Cotton Fabric Functionalization with Cyclodextrins. **Journal Materials Environmental Science**. Vol. 3, n° 3, p. 561-574, 2012. ISSN : 2028-2508

CASTRO, A. Gomes de; POUZADA, A. Sérgio. **Embalagens para a Indústria Alimentar**. Instituto Piaget, p. 247 Lisboa, 2002.

CEFET-RS UNED. **Processos de Transformação** . Sapucaia do Sul. Unidade D, 2000.

CORTEZ, Fernando Sanzi; PEREIRA, Camilo Dias Seabra; SANTOS, Aldo Ramos; CESAR, Augusto; CHOUERI, Rodrigo Brasil; MARTINI, Gisela de Assis; BOHRER-MOREL, Maria Beatriz. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Environmental Pollution**. 168, p. 145-150, 2012. DOI:10.1016/j.envpol.2012.04.024

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

CHATTOPADHYAY, D. P.; PATEL, B. H. Effect of nanosized colloidal copper on cotton fabric. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, 5, p. 1-6, 2010.

CHEN, Xijuan; RICHARD, Jessica; LIU, Yaling; DOPP, Elke; TUERK, Jochen; BESTER, Kai. Ozonation products of triclosan in advanced wastewater treatment. **Water Research**. 46, p. 2247-2256, 2012.

CHEN, J. H.; REN, Y.; SEOW, J.; LIU, T.; BANG, W. S.; YUK, H. G. Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat: current and future trends. **Food Science and Food Safety**. 11, p. 119-132, 2012. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00177.x

CHORIANOPOULOS, N. G.; TSOUKLERIS, D. S.; PANAGOU, E. Z.; FALARAS, P.; NYCHAS, G.-J. E. Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm

disinfection in food processing. **Food Microbiology**, 28, p.164-170, 2011.

CLAYTON, E.M.R.; TODD, M.; DOWD, J.B.; AIELLO, A.E., The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the US population, NHANES 2003– 2006. **Environ. Health Perspect.** 119, p. 390–396, 2011.

COSTA, C.; CONTE, A.; BUONOCORE, G.G.; LAVORGNA, M.; DEL NOBILE, M.A. Calcium-alginate coating loaded with silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf-life of fresh-cut carrots. **Food Research International.** 48, p. 164-169, 2012. DOI:10.1016/j.foodres.2012.03.001

CRAN, Marlene J.; RUPIKA, L.A.S.; SONNEVELD, Kees; MILTZ, Joseph.; BIGGER, Stephen W. Release naturally-derived antimicrobials agents from LDPE films. **Journal Food Science**, vol. 75, pg. 126-133, (2010) DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01506.x

CUTTER, CATHERINE N. The Effectiveness of Triclosan-Incorporated Plastic against Bacteria on Beef Surfaces. **Journal of Food Protection**, 625, 474-479 (1999);

DANN, A.B.; HONTELA, A.; Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **Journal of Applied Toxicology.** 31 (4), 285-311, 2011.

DEMAI, Yves; CLAMOND, Didier. A new model for the blown film process. **Comptes Rendus Mecanique.** 339, p. 692-699, 2011. DOI:10.1016/j.crme.2011.07.005

DENYER, S. P. AND MAILLARD, J.-Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 92, 35S–45S (2002).

DIAZ-VISURRAGA, J.; MELENDREZ, M. F.; GARCIA, A.; PAULRAJ, M.; CARDENAS, G. Semitransparent chitosan-TiO₂ nanotubes composite film for food package applications. **Journal of Applied Polymer Science.** 116, p. 3503-3515, 2010.

DINESH, R.; ANANDARAJ, M.; SRINIVASAN, V.; HAMZA, S.

Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. **Geoderma**. 173-174, p. 19-27, 2012. [DOI:10.1016/j.geoderma.2011.12.018](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.12.018)

DOW CHEMICAL COMPANY. **Ficha técnica do produto:** Polietileno de Alta de Densidade (PEAD). *Grade NG 1045-11B*.

DUNCAN, Timothy V.; Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barriers materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 363, p. 1-24, 2011.

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

FERNANDES, Maria H. Costa; GARCIA, Eloísa E. Corrêa; PADULA, Marisa. **Migração de Componentes de Embalagens Plásticas para Alimentos**. CETEA, p. 116, Campinas, 1987.

FERNANDEZ, A.; PICOUET, P.; LLORET, E. Reduction of the spoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology Turing MAP packaging of beef meat. **Journal of Food Protection**. 73, p. 2263-2269, 2010.

FIORI, M. A.; Desenvolvimento e avaliação do compósito polímero-madeira com propriedades biocidas. **Dissertação de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, 2008.

FORTE, M. C.; MIRANDA, M. S. L.; DUPONT, J. Novas resinas produzidas com catalisadores metalocênicos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 6, n° 3, p. 49-60, 1996.

FRESHNEY, R. I. *Freshney's Culture of animal cell - a multimedia guide*. New York , 1999. CD-ROOM.

GALIC, Kata; SCETAR, Mario; KUREK, Mia. The benefits of processing and packaging. **Trends in Food Science and Technology**, 22, p. 127-137, 2011. [DOI:10.1016/j.tifs.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.001)

GALOTTO, M.J.; TORRES, A.; GUARDA, A. MORAGA, N.; ROMERO, J. Experimental and theoretical study of LDPE versus different concentrations of irganox 1076 and different thickness. **Food Research International**, 44, 566-574, 2011. DOI:10.1016/j.foodres.2010.12.009

GUECHEVA, T; HENRIQUES, J.A.P; ERDTMANN, Bernardo. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research**, v.497, p. 19-27, 2001. DOI:10.1016/S1383-5718(01)00244-3

GUERRINI, L. M.; PAULIN F°, P. I.; BRETAS, R. E. S. ; BERNARDI, A. Correlação entre as propriedades reológicas, ópticas e a morfologia de filmes soprados de LLDPE/LDPE. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 14, nº 1, p. 38-45, 2004.

GUECHEVA, T; HENRIQUES, J.A.P; ERDTMANN, Bernardo. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research**, v.497, p. 19-27, 2001.

GUO, Li-Wu; WU, Qiangen; GREEN, Bridgett; NOLEN, Greg; SHI, Leming; LOSURDO, Jessica; DENG, Helen; BAUER, Steven; FANG, Jia-Long; NING, Baitang. Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 262, p. 117-123, 2012. DOI:10.1016/j.taap.2012.04.024

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single test (comet assay). **Toxicol. Letters**, v.90, p.183-188, 1997. DOI: 10.1016/S0378-4274(96)03847-7

HAUSER, Carolin; WUNDERLICH, Joachim. Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating. **Procedia Food Science**. 1, p. 197-202, 2011. DOI:10.1016/j.profoo.2011.09.031

HEDGESPEETH, Melanie Lea; SAPOZHNIKOVA, Yelena; PENNINGTON, Paul; CLUM, Allan; FAIREY, Andy; WIRTH,

Edward. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. **Science**

of the **Total Environmental**. 437, p. 1-9, 2012.
DOI:10.1016/j.scitotenv.2012.07.076

HERNANDEZ, R.J. Effect of Water Vapor on the transport properties of oxygen through polyamide packaging materials. **Journal Food Engineering**. Vol. 22, p. 495-507, 1994.

HERNANDEZ, R. J.; SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D. **Plastics packaging: properties, processing, applications, and regulations**. Munich: Hanser Gardner, 2000.

HONG, Seok-In; RHIM, Jong-Whan. Preparation and properties of melt-intercalated linear low density polyethylene/clay nanocomposite films prepared by blow extrusion. **LVT-Food Science and Technology**. 48, p. 43-51, 2012. DOI:10.1016/j.lwt.2012.03.009

HOTCHKISS, JH, Food-packaging interactions influencing quality and safety. **Food Additives Contaminants**. Vol. 14, p. 601-607, 1997.

IBRAHIM, S. A.; SREEKANTAN, S. Effect of pH on TiO₂ nanoparticles via sol-gel method. **Advanced Materials Research**. 173, p.184-189, 2011.

ISO 20645:2004 (International Organization for Standardization). Textile Fabrics: Determination of Antibacterial Activity – Ágar Diffusion Plate Test.

JAISWAL, Swarna; MCHALE, Patrick; Brendan DUFFY. Preparation and rapid analysis of antibacterial silver, copper and zinc doped sol-gel surfaces. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**. 94, p.170-176,2012.
DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.01.035

JIS Z 2801:2000 (Japanese Industrial Standard). Antimicrobial Products – Test for Antimicrobial Activity and efficacy.

JIPA, Iuliana M.; DOBRE, Loredna; STROESCU, Marta; STOICA-GUZUN, Aniuta; JINGA, Sorin; DOBRE, Tanase. Preparation and Characterization of bacterial cellulose-poly(vinyl alcohol) films with antimicrobials properties. **Materials Letter**. 66, p. 125-127, 2012.
DOI:10.1016/j.matlet.2011.08.047

JO, Hun Je; CHOI, Jae Woo; LEE, Sang Hyup; HONG, Seok Won. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of Hazardous Materials**. 227-228, p. 301-308, 2012. [DOI:10.1016/j.jhazmat.2012.05.066](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.066)

JORNAL DE PLASTICOS. **CBPI**: Curso Básico intensivo de plásticos, São Paulo, 1998.

JIN, T.; GURTLER, J. B. Inactivation of Salmonella in liquid egg albumen by antimicrobial bottle coatings infused with allyl isothiocyanate, nisin and zinc oxide nanoparticles. **Journal of Applied Microbiology**, 110, 704-712, 2011.

KAARIAINEN, Tommi O.; MAYDANNIK, Phillip; CAMERON, David C.; LAHTINEN, Kimmo; JOHANSSON, Petri; KUUSIPALO, Jurkka. Atomic layer deposition on polymer based flexible packaging materials: growth characteristics and diffusion barrier properties. **Thin solid films**, 519, p. 3146-3154, 2011.

KAO, Yi-Yun; CHEN, Yi-Chun; CHENG, Tsun-Jen; CHIUNG, Yin-Mei; LIU, Pei-Shan. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. **Toxicological Sciences**. 125(2), p. 462-472, 2011. [DOI:10.1093/toxsci/kfr319](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr319)

KIM, Dowan; JEON, Kwonyoung; LEE, Yunho; SEO, Jongchul; SEO, Kwangwon; HAN, Haksoo; KHAN, Sher Bahadar. Preparation and characterization of UV-cured polyurethane acrylate/ZnO nanocomposite films based on surface modified ZnO. **Progress in Organic Coatings**. 74, p. 435-442, 2012. [DOI:10.1016/j.porgcoat.2012.01.007](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2012.01.007)

KOLARIK, Roman; ZATLOUKAL, Martin; TZOGANAKIS, Costas. Stability analysis of non-isothermal film blowing process for non-Newtonian fluids using variational principles. **Chemical Engineering Science**. 73, p. 439-453, 2012. [DOI:10.1016/j.ces.2012.01.029](https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.01.029)

KUGEL, Alex J.; EBERT, Scott M.; STAFSLIEN, Shane J.; HEVUS, Ivan; KOHUT, Ananiy; VORONOV, Andriy; CHISHOLM, Bret J. Synthesis and characterization of novel antimicrobial polymer

containing pendent triclosan moieties. **Reactive and Functional Polymers**, 72, p. 69-76, 2012.
[DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2011.10.009](https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2011.10.009)

KUORWEL, Kuorwel; CRAN, Marlene J.; SONNEVELD, Kess; MILTZ, Joseph; BIGGER, Stephen W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. **Journal of Food Science**, vol. 76, n° 9, p. R164-R177, 2011. [DOI:10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x)

LEE, Do Gyun; ZHAO, Fuman; REZENOM, Yohannes H.; RUSSELL, David H.; CHU, Kung-Hui. Biodegradation of triclosan by a wastewater microorganism. **Water Research**. 46, p. 4226-4234, 2012.
[DOI:10.1016/j.watres.2012.05.025](https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.025)

LI, X.; XING, Y.; JIANG, Y.; DING, Y.; LI, W. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. **International Journal of Food Science and Technology**, 44, p. 2161-2168, 2009.

LI, Yan; CHEN, David H.; YAN, Jian; CHEN, Ying; MITTELSTAEDTA, Roberta A.; ZHANG, Yongbin; BIRIS, Alexandru S.; Robert H. HEFLICH; Tao Chen. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 745, p. 4-10, 2012.
[DOI:10.1016/j.mrgentox.2011.11.010](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010)

LIU, F; YING G.G.; YANG L.H.; ZHOU Q.X. Terrestrial ecotoxicological effects of the antimicrobial agent triclosan. **Ecotoxicology Environmental Safety**. 72(1): 86–92, 2009.

LI, Yan; Chen, David H.; Yan, Jian; Chen, Ying; Mittelstaedt, Roberta A.; ZHANG, Yongbin; BIRIS, Alexandru S.; HEFLICH, Robert H.; CHEN, Tao. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 745, p. 4-10, 2012.
[DOI:10.1016/j.mrgentox.2011.11.010](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010)

LLORENS, Amparo; LLORET, Elza; PICOUET, Pierre A.; TRBORJEVICH, Raul.; FERNANDEZ, Anjelina. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food

packaging. **Trends in Food Science & Technology**, p.1-11, 2011. DOI:10.1016/j.tifs.2011.10.001

LOPEZ-DEL-DICASTILLO, Carol; CATALÀ, Ramon; GAVARA, Rafael; HERNADEZ-MUNHOZ, Pilar. Food applications of active packaging containing ciclodextrinsfor the preferential scavenging of undesirable compounds. **Journal of Food Engineering**, 104, p. 380-386, 2011.

MAIER, R. D. Metaloceno: por que ele torna as resinas especiais? **Plástico Industrial**, São Paulo, Aranda Editora, Ano II - N° 18, p. 28-49, 2000.

MAHAPRAMA, Supak; POOMPRADUB, Sirilux. Preparation of natural rubber (NR) latex/low density polyethylene (LDPE) blown film and its properties. **Polymer Testing**. 30, p. 716-725, 2011. DOI:10.1016/j.polymertesting.2011.06.006

MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in limphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluted by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel eletrophoresis assay. **Mutation Research**. 41(1-2), p. 21-27, 2000. DOI: 10.1016/S1383-5718(00)00107-8

MARIANO, Maria José; FROEMIMING, Lurdes Marlene S. **Considerações sobre a história da embalagem de alimentos: A evolução de uma poderosa ferramenta de marketing**. UNIJUÍ. IJUÍ, 2008. Disponível em <http://mariamariano.files.wordpress.com/2008/02/consideracoes-sobre-a-historia-da-embalagem-mariano-maria.pdf>. Acesso em 19 maio de 2011.

MASTROMATTEO, Marianna; CONTE, Amalia; DEL NOBILE, Matteo Alessandro. Packaging strategies to prolong the shelf life of fresh carrots (*Daucus carota L.*) **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 13, p. 215–220, 2012. DOI:10.1016/j.ifset.2011.10.010

MENDES, E. Desenvolvimento de pó de vidro bactericida e fungicida através de reações de troca iônica para uso como aditivo biocida na indústria. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química** ,

Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

MERGEN, I. Z. Estudo da perda de vácuo em embalagens multicamada para produtos cárneos curados. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

MOEZZI, Amir; MACCDONAGH, Andrew M.; CORTIE, Michael B. Zinc oxide particles: synthesis, properties and applications. **Chemical Engineering Journal**, p. 1-84, 2012. [DOI:10.1016/j.cej.2012.01.076](https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.076)

MOREIRA, Maria D.; PEREDA, Mariana; MARCOVICH, Norma; ROURA, Sara I. Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein in polymers: assessment, on carrot, cheese and salami. **Journal Of Food Science**, vol. 76, nº 1, p. M54-M63, 2011. [DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x)

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 16(1-2), p. 55-63, 1983. [DOI:10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MUNOZ-BONILLA, Alexandra; FERNANDEZ-GRACIA, Marta. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**. 72, p. 281-339, 2012. [DOI:10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005)

MUNOZ, Macarena; PEDRO, Zahara M. de; CASAS, Jose A.; RODRIGUEZ, Juan J. Triclosan breakdown by Fenton-like oxidation. **Chemical Engineering Journal**. 198-199, p. 275-281, 2012. [DOI: 10.1016/j.cej.2012.05.097](https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.097)

NFODZO, Prince; CHOI, Hyeok. Triclosan decomposition by sulfate radicals: effects of oxidant and metal doses. **Chemical Engineering Journal**, 174, p. 629-634, 2011. [DOI:10.1016/j.cej.2011.09.076](https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.076)

NAGY, Amber; HARRISON, Alistair; SABBANI, Supriya; MANSON JR, Robert S.; DUTTA, Prabir K.; WALDMAN, W. James. Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. **International Journal of Nanomedicine**, 6, p. 1833-1852, 2011.

NOBREGA, Marcelo M.; BONA, Evandro; MULLER, Carmen M. O.; YAMASHITA, Fabio. Extruded cylindrical strands: mechanical properties correlated with the formation of biodegradable films through blown extrusion. **Polymer Engineering and Science**. Vol. 52, p. 35-41, 2011. [DOI:10.1002/pen.22041](https://doi.org/10.1002/pen.22041)

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. V. L. Revisão: Princi pais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**. Vol. 7, n.172, p. 161-165, 2004. ISSN 1517-7645.

OLIVEIRA, Mauricio César. Nucleases Sintéticas: Caracterização Bioquímica e Mecanismo de Ação Sobre DNA. **Tese de Doutorado em Química**, Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2006.

PANNU, Manmeet W.; TOOR, Gurpal S.; O'CONNOR, George A.; WILSON, Patrick C. Toxicity and bioaccumulation of biosolids-borne triclosan in food crops. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 31, n° 9, p. 2130-2137, 2012. [DOI: 10.1002/etc.1930](https://doi.org/10.1002/etc.1930)

PALENSKE, N.M.; DZIALOWSKI, E.M. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. **Comp. Biochem. Physiol.** Pt C 152: 232–240, 2010.

PARK, Margriet V.D.Z.; NEIGH, Arianne M.; VERMEULEN, Jolanda P.; DE LA FONTEYNE, Liset J.J.; VERHAREN, Henny W.; BRIEDÉ, Jacob J.; VAN LOVEREN, Henk; JONG, Wim H. de. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**. 32, p. 9810-9817, 2011. [DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.08.085](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085)

PERRON, Monique M.; HO, Kay t.; CANTWELL, Mark G.; BURGESS, Robert M.; PELLETIER, Marguerite C. Effects of triclosan on marine benthic and epibenthic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 31, n° 8, p. 1861-1866, 2012. [DOI: 10.1002/etc.1884](https://doi.org/10.1002/etc.1884)

POLEY, R. H.; SIQUEIRA, A. P. L.; SILVA, M. G.; VARGAS, H.;

SANCHEZ, R. Photothermal characterization of low density polyethylene food packages. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 14, n° 1, p. 8-12, 2004.

POLITENO IND. COM. S.A. **Filme**, São Paulo, 1991.

PIRARD, Catherine; SAGOT, Clémence; DEVILLE, Marine; DUBOIS, Nathalie; CHARLIER, Corinne. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. **Environmet International**. 48, p. 78-83, 2012. [DOI:10.1016/j.envint.2012.07.003](https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.07.003)

PETTERSEN, M. K.; GÄLLSTEDT, M.; EIE, T. Oxygen Bar rier Properties of Thermoformed Trays Manufactured with Different Drawing Methods and Drawing Depths. **Packaging Technology and Science**. John Wiley & Sons Ltda. Vol. 17:43-52, 2004. [DOI: 10.1002/pts.642](https://doi.org/10.1002/pts.642)

PRASANNA, K.; SAILAJA, R.R.N. Blends of LDPE/Chitosan using epoxy-functionalized LDPE as compatibilizer. **Journal Applied of Polymer Science**. Vol. 124, p.3264-3275, 2012. DOI: 10.1002/app.35262

RAGHAVAN, S. L.; SCHUESSEL, K.; DAVISB, A. and HADGRAFT, J. **Formation and stabilisation of triclosan colloidal suspensions using supersaturated systems**. International Journal of Pharmaceutics, 261, 153–158 (2003);

RAMOS, Marina; JIMÉNEZ, Alfonso; PELTZER, Mercedes; GARRIGÓZ, María C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**. 109, p. 513-519, 2012. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.031

RATHNAYAKE, W.G.I.U.; ISMAIL, H.; BAHARIN, A.; DARSANASIRI, A.G.N.D.; RAJAPAKSE, Sanath. Synthesis and characterization of nano silver based natural rubber latex foam for imparting antibacterial and anti-fungal properties. **Polymer Testing**. 31, p. 586-592, 2012. [DOI:10.1016/j.polymertesting.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.01.010).

Resolução n° 105. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Regulamento técnico sobre disposições gerais para**

embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

Ministério da Saúde, 1999.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, p.173-200, 2003.

RIVA, Consuelo; CRISTONI, Simone; BINELLI, Andrea. Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: A proteomic investigation. **Aquatic Toxicology**. 118-119, p. 62-71, 2012.

RODRICKS, J.V.; SWENBERG, J.A.; BORZELLECA J.F.; MARONPOT, R.R.; Shipp AM. 2010. Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. **Journal of Applied Toxicology**. 40(5), p. 422–484, 2010.

RÖSCH, J.; WÜNSCH, J. R. Tendências em materiais com propriedades de barreira. **Plástico Industrial**, São Paulo, Aranda Editora, Ano II - Nº 25, p. 70- 81, set. 2000.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 49, 597–9 (2002);

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infectious Diseases*, 3, 794–803 (2003).

RUSSEL, A.D. Whiter Triclosan? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53,693-695 (2004).

SÁNCHEZ, M. J.; P. GAMERO, D. CORTÉS. Bioactivity a ssesment of ZSM-5 type zeolite functionalized with silver or zinc. **Materials Letters**. 74, p. 250-253, 2012. [DOI:10.1016/j.matlet.2012.01.135](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.01.135)

SANTAMARÍA, P.; EGUIAZABAL, J.I. Structure and mechanical properties of blown films of ionomer compatibilized LDPE nanocomposites. **Polymer Testing**. 31, p. 367-374, 2012. [DOI:10.1016/j.polymertesting.2011.12.015](https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.12.015)

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA , M.;

COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SCHENCK, H.; ANDRÉ, J. Propriedades de barreira def inem as melhores aplicações para os filmes plásticos. **Plástico Industrial**, São Paulo, Aranda Editora, Ano II - Nº 20, p. 40-49, ab r. 2000.

SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D.; HERNANDEZ, R. J. **Plastics packaging: properties, processing, applications, and regulations**. Munich: Hanser Gardner, 2004.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O. et al. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research**. 470(1), p.39-51, 2000. [DOI:10.1016/S1383-5718\(00\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00094-2)

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. John Wiley & Sons, 7ª ed., p. 72-126, 2005.

SILVESTRE, Clara; DURACCIO, Donatella; CIMMINO, Sossio. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress Polymer Science**, 36, p. 1766-1782, 2011. [DOI:10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003)

SINHA, Rajeshwari; KARAN, Ram; SINHA, Arvind; KHARE, S.K. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. **Bioresource Technology**. 102, p. 1516-1520, 2011. [DOI:10.1016/j.biortech.2010.07.117](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.117)

SINGH NP et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. 175(1), p.184–191, 1988. [DOI: 10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

SINGH, Preeti; WANI, Ali Abas; SAENGERLAUB, Sven. Active packaging of food products: recent trends. **Packaging of Food Products**. Vol. 41, n°4, p. 249-260, 2011. [DOI:10.1108/00346651111151384](https://doi.org/10.1108/00346651111151384).

SONTAKKE, T.K.; JAGTAP, R.N.; SINGH, Arvind; KOTHARI, D.C.

Nano ZnO grafted on MAA/BA/MMA copolymer: An additive for hygienic coating. **Progress in Organic Coatings**, 74, p. 582-588, 2012. DOI:10.1016/j.porgcoat.2012.02.005

SMITH, W. F. **Princípios de ciência e engenharia dos materiais**. 3^a edição. Portugal: McGraw-Hill, 1998.

STUART, Barbara. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications**. John Wiley and Sons. 1^a ed, p. 71-88, 2004.

SUPPAKUL, Panuwat; SONNEVELD, Kess; BIGGER, Stephen W.; MILTZ, Joseph. Diffusion of linalool and methylchavicol from polyethylene-based antimicrobial packaging films. **Food Science and Technology**, 44, p. 1888-1893, 2011. DOI:10.1016/j.lwt.2011.03.024

SULLER, M. T. E. and RUSSELL, A. D. (1999). Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. **Journal of Hospital Infection**, 43, 281-91 (1999).

SVENNINGSEN, Hanne; HENRIKSEN, Trine; PRIEMÉ, Ander s; JOHNSEN, Anders R. Triclosan affects the microbial community in simulated sewage-drain-field soil and slows down xenobiotic degradation. **Environmental Pollution**, 159, p. 1599-1605, 2011. DOI:10.1016/j.envpol.2011.02.052

TAMURA, Ikumi; KANBARA, Yasuhiro; SAITO, Minoru; HORIMOTO, Kanna; SATOH, Masaya; YAMAMOTO, Hiroshi. Triclosan, an antibacterial agent, increases intracellular Zn⁺² concentration in rats thymocytes: its relation to oxidative stress. **Chemosphere**, 86, p. 70-75, 2012. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.09.009

TANKHIWALE, Rasika. BAJPAI, S.K. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 2011. DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.09.031

THOMÉ, I.P.S.; DAGOSTIN, V.S.; PILETTI, R.; PICH, C .T.; RIELLA, H.G.; ANGIOLETTO, E.; FIORI, M.A.; Bactericidal low density polyethylene (LDPE) urinary catheters: microbiological

characterization and effectiveness. **Material Science Engineering C**. 32, p. 263-268. DOI: 10.1016/j.msec.2011.10.027

TOMS, Leisa-Maree L.; ALLMYR, Mats; MUELLER, Jochen F.; ADOLFSSON-ERICI, Margaretha; MCLACHLAN, Michael; MURBY, John; HARDEN, Fiona A. Triclosan in individual human milk samples from Australia. **Chemosphere**. 85, p. 1682-1686, 2011. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.08.009

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 2005.

UZ, Metin; ALTINKAYA, Sacide A.; Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate. **Food Science and Technology**, 44, p. 2302-2309, 2011. DOI:10.1016/j.lwt.2011.05.003

WALLER, N.J.; KOOKANA, R.S.; YING, G.G. Triclosan: its occurrence, fate and effects in the Australian environment. **Water Sci. Technol**. 63, 598–604, 2011

VAN WILLIGE, R.W.G. **Effects of flavour absorption on foods and their packaging materials**. Tese de doutorado, Wageningen University, The Netherlands, p.140, (2002). ISBN: 90-5808-640-2.

VERMIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; DEVEBERE, J.; Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**. Vol. 19, p. 163-171. 2002. DOI:10.1080/02652030110104852

VERNAUD, Jean Maurice; ROSCA, Iosif Daniel; **Assessing Food Safety of Polymer Packaging**. Smithers Rapra Limited, 1ª edição, 2006. Shrewsbury, Ucrânia.

VERRAN, J.; PACKER, A.; KELLY, P.; WHITEHEAD, K. A. Titanium coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. **International Journal of Food Microbiology**, 141(Suppl. 1), p. 134-139, 2010.

VILLALAIN, J., MATEO, C. R., ARANDA, F. J. et al. **Membranotropic effects of the antibacterial agent triclosan**.

Archives of Biochemistry and Biophysics, 390, 128–36 (2001).

WAHAB, Rizwan; MISHRA, Amrita; YUN, Soon-il; HWANG, I.H.; MUSSARAT, Javed; AL-KHEDHAIRY, Abdulaziz A.; KIM, Young-soom; SHIN, Hyung-shik. Fabrication, growth mechanism and antibacterial activity of micro-spheres prepared via solution process.

Biomass and Bioenergy. 39, p. 227-236, 2012.
DOI:10.1016/j.biombioe.2012.01.005

WANG, Li; YING, Guang-Guo; CHEN, Feng; ZHANG, Li-Juan; ZHAO, Jian-Liang; LAI, Hua-Jie; CHEN, Zhi-Feng; TAO, Ran, Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. **Environmental Pollution.** 165, p. 241-248, 2012. DOI:10.1016/j.envpol.2011.10.005

YEH, J. T.; CHEN, H. Y.; TSAI, F. C.; CHANG, C. J. Blending and oxygen permeation properties of the blown films of blends of modified polyamide and ethylene vinyl alcohol copolymer with varying vinyl alcohol contents. **World Polymer Congress.** Macro 2006, 41st International Symposium on Macromolecules Proceedings, Rio de Janeiro, 2006.

YAM, K.L.; TAKHISTOV, P.T.; MILTZ, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. **Journal of Food Science.** Vol.70, p.1-10, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09052.x

XIE, Yanping; HE, Yiping; IRWIN, Peter L.; JIN, Tony; SHI, Xianming. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology.** Vol. 77, n°7, p. 2325-2331, 2011. DOI:10.1128/AEM.02149-10

ZHANG, Z.; BRITT, I.J.; TUNG, M.A., Water absorption in EVOH films and its influence on glass transition temperature. **Journal Polymer Science. Part B: Polymer Physics.** Vol. 3, p. 691-699, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0488(19990401)37:7<691::AID-POLB20>3.0.CO;2-V

ZATLOUKAL, M.; KOPYTKO, W.; SÁHA, P.; VLCEK, J. Ten são viscoelástica influencia as instabilidades interfaciais em filmes planos

multicamadas. **Plástico Industrial**, São Paulo, Aranda Editora, Ano VIII - Nº 93, p. 54-61, mai. 2006.

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE

Estamos realizando um projeto de pesquisa referente ao projeto intitulado **DESENVOLVIMENTO DE FILMES MONOCAMADA PEBDL E PEAD ANTIMICROBIANOS E ATÓXICOS PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS.**

O Sr. Marcel Ferrari dos Santos foi plenamente esclarecido de que participando deste projeto, estará participando de um estudo de cunho acadêmico, que tem como um dos objetivos **AVALIAR AS PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS DE EMBALAGENS ANTIMICROBIANAS PARA A INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA**

Embora o Sr. Marcel Ferrari dos Santos venha a aceitar a participar neste projeto, estará garantido que o Sr. Marcel Ferrari dos Santos poderá desistir a qualquer momento bastando para isso informar sua decisão. Foi esclarecido ainda que, por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro o Sr. Marcel Ferrari dos Santos não terá direito a nenhuma remuneração. Desconhecemos qualquer risco ou prejuízos por participar dela. Os dados referentes ao Sr. Marcel Ferrari dos Santos serão sigilosos e privados, preceitos estes assegurados pela Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sendo que o Sr. Marcel Ferrari dos Santos poderá solicitar informações durante todas as

fases do projeto, inclusive após a publicação dos dados obtidos a partir desta.

A coleta de dados será realizada pelo acadêmico da.. fase de Graduação da UNESCO e orientado pelo professor O telefone do Comitê de tica é 431.2723.

Criciúma (SC) 06 de dezembro de 2012.

Assinatura do Participante

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE FILMES MONOCAMANA PEBDL E PEAD ANTIMICROBIANOS E ATÓXICOS PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS

Pesquisador: Márcio Antônio Fiori

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12882713.0.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 236.970

Data da Relatoria: 29/05/2013

Apresentação do Projeto:

Neste trabalho foram desenvolvidas embalagens flexíveis para a indústria de alimentos com propriedades antimicrobianas e atóxicas desejadas.

Foram utilizados dois grades comerciais de diferentes polímeros, PEAD e PEBDL, aditivados com dois princípios ativos de natureza química distinta:

um composto inorgânico, de matriz vítrea dopado com íons de zinco - GZn; e um composto orgânico, conhecido como triclosan - TCS. Na

caracterização dos princípios ativos foram aplicadas técnicas microbiológicas, toxicológicas e de migração.

Ambos os princípios ativos

demonstraram atividade antimicrobiana em bactérias do tipo gram-positiva *Staphylococcus aureus* (SA) e gram-negativa *Escherichia coli* (EC) sendo

o TCS mais efetivo quando exposto aos microrganismos, em relação ao GZn. Os princípios também apresentaram capacidades de migração das

espécies químicas para o meio externo, sendo o TCS com potencial de migração relativamente maior do que GZn. Porém, quanto as análises do

tipo toxicológica, o GZn não apresentou efeitos tóxicos quando do exposto ao DNA devido a menores valores de índice de fragmentação e

frequência de danos. Em comparação, o TCS mostrou-se extremamente tóxico, com valores muito maiores de índice de fragmentação e frequência

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.808-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48)-3431-2723

Fax: (48)-3431-2750

E-mail: cetica@unesoc.net; cep-uneso@unesoc.br

sendo inviável o seu uso em embalagens alimentícias. Assim, o GZn foi definido e adotado como princípio ativo atóxico na produção de embalagens flexíveis de PEAD e PEBDL, via processo de extrusão a balão em monocamada. Foram empregadas análises microbiológicas e de absorção atômica na caracterização das embalagens atóxicas. As análises apresentaram resultados satisfatórios de acordo com a temática do trabalho proposta. Ambas as embalagens de PEAD e PEBDL apresentaram efeito antimicrobiano desejável em bactérias gram-positivas (SA) e gramnegativas (EC) além de apresentar valores de migração na ordem de 2ppm, atendendo assim as exigências propostas pela ANVISA de 25 ppm. Assim as embalagens mostram-se adequadas quanto ao seu emprego pela indústria alimentícia no mercado de produtos cárneos, com propriedades antimicrobianas e atóxicas esperadas, sem riscos de interferir na segurança alimentar do produto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver e caracterizar filmes poliméricos monocamadas antimicrobianos e atóxicos de PEBDL e PEAD via o processo de extrusão para aplicação na fabricação de embalagens flexíveis. Ainda, avaliar a capacidade de migração dos aditivos antimicrobianos para o meio externo em função do percentual e da espessura dos filmes poliméricos monocamadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

as embalagens podem não promover o shelf-life necessário ou o princípio ativo escolhido pode apresentar níveis indesejáveis de migração

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caracterização dos princípios ativos propostos: Análises microbiológicas e toxicológicas Análises Microbiológicas Para as análises microbiológicas

serão utilizadas as espécies de bactérias do tipo *Escherichia coli* (ATCC 25922 gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 gram positiva).

O ensaio de Difusão em Agar é empregado para avaliar a presença do efeito antimicrobiano dos materiais testados. Em uma placa de Petri contendo um meio de cultura sólido (ágar) com quantidade padronizada da bactéria teste, as amostras são preparadas no formato de disco (sólido) ou depositadas em um poço (na forma de pó). Durante a incubação a 37°C por 24h, as espécies químicas difundem-se para o ágar. O efeito antimicrobiano é medido em função da presença e dimensões dos halos inibitórios formados no

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48-)3431-2723

Fax: (48-)3431-2750

E-mail: otica@unesc.net; cep-uneso@unesc.br

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



ágar em torno da amostra, adotando a área do halo de difusão em ágar como proporcional ao efeito antimicrobiano das amostras testadas. Outras técnicas microbiológicas utilizadas também serão utilizadas neste trabalho como, por exemplo, Curva de Morte. Nos procedimentos da técnica de Curva de Morte as amostras de masterbatches são colocadas em contato direto com as bactérias durante 4 hs e o número de bactérias viáveis (sobreviventes) determinado por um contador de colônias manual, modelo CP 608, marca Phoenix. Nesta análise microbiológica, também serão utilizadas espécies de bactérias Escherichia coli (EC) e Staphylococcus aureus (SA). Análise Toxicológica O teste cometa foi aplicado para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos ao DNA humano. Serão coletadas amostras de sangue de 4 indivíduos, com idade entre 18 e 35 anos, não fumantes e dispostos a colaborar com este trabalho. Três concentrações (0,1 g/L; 1,0g/L e 10,0 g/L) para cada princípio ativo serão preparadas em meio aquoso. Após 72 hs, são coletadas alíquotas de cada concentração e colocadas em contato com o sangue (DNA) sobre lâminas de vidro por 24 h. Serão utilizados neste método dois controles: água oxigenada (positivo) e água destilada (negativo). Após este período, será realizadas as leituras por análise de imagem das lâminas com o auxílio de um microscópio ótico e também análises de acordo com a escala de danos (GUECHEVA et al., 2001). A realização desta análise tem por objetivo obter resultados referentes a genotoxicidade de cada princípio ativo, ou seja, a presença de danos ao DNA humano. Assim estes resultados irão definir a viabilidade técnica desejável quanto emprego do TCS e GZn como princípios ativos atóxicos no desenvolvimento de embalagens antimicrobianas. Análise microbiológica: Difusão em disco e diagramas de inibição de crescimento de bactérias; Análise toxicidade: teste cometa Análise de Migração: espectroscopia de absorção atômica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
 presentes

Recomendações:
 -

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
 -

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48-)3431-2723

Fax: (48-)3431-2750

E-mail: cetica@uneso.net, cep-uneso@uneso.br

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CRICIUMA, 04 de Abril de 2013

Assinador por:

Márgada Tessmann Schwalm
(Coordenador)

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48-)3431-2723

Fax: (48-)3431-2750

E-mail: cetica@unesc.net, cep-unesc@unesc.br