



**Ana Filipa Cardoso  
Barra**

**Desenvolvimento de um bionanocompósito para  
embalagem alimentar**





**Ana Filipa Cardoso  
Barra**

**Desenvolvimento de bionanocompósito para  
embalagem alimentar**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Paula Celeste da Silva Ferreira, Investigadora Principal do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, Pós-Doutoranda do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto CICECO - Aveiro Institute of Materials (Refª. FCT UID/CTM/50011/2013), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC e quando aplicável cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria PT2020.



Dedico este trabalho aos meus pais.



**o júri**

presidente

**Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

**Doutor Miguel Ângelo Parente Ribeiro Cerqueira**  
bolseiro de pós - doutoramento do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho

orientador

**Doutora Paula Celeste da Silva Ferreira**  
investigadora principal do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Paula Ferreira, por me ter motivado a escolher este tema de dissertação. Por toda a orientação e por ter contribuído para que eu tenha descoberto o gosto pela investigação de materiais.

Agradeço à Doutora Cláudia Nunes, por todo o apoio prestado ao longo do desenvolvimento deste projeto e da elaboração desta dissertação, sem o qual a sua realização não teria sido possível.

Ao Manuel, pela paciência! Por tudo aquilo que me ensinou e pela forma extraordinária como transmite conhecimento e partilha o gosto pela ciência.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente à Mirtha e à Idalina, por me mostrarem a dinâmica do trabalho no laboratório e pela disponibilidade constante.

Aos meus pais, avós e irmã, pelo apoio incondicional. Por acreditarem sempre em mim e nunca me deixarem desistir.

Ao Hugo...

A todos os meus amigos, por estarem sempre lá.



## palavras-chave

Campo elétrico pulsado, embalagem alimentar, bionanocompósito, condutibilidade elétrica, quitosana, óxido de grafeno reduzido

## resumo

O campo elétrico pulsado (PEF) é uma das mais promissoras tecnologias de processamento de alimentos entre as novas tecnologias de processamento não térmicas. O PEF permite a pasteurização dos alimentos através da aplicação de potências elevadas, em intervalos de tempo muito curtos, o que permite inativar enzimas e microrganismos, mantendo as propriedades organolépticas e nutritivas dos alimentos minimamente alteradas. O tratamento dos alimentos líquidos ou pastosos ocorre em câmaras de fluxo contínuo previamente ao embalamento. Isto é uma limitação da técnica dado que obriga à transferência do alimento da câmara para a embalagem, havendo necessidade de utilizar linhas limpas altamente dispendiosas, sempre com o risco de ocorrer recontaminação dos alimentos.

Uma mais-valia para esta tecnologia é o desenvolvimento de um material para embalagem alimentar com boa condutibilidade elétrica que permita o tratamento por PEF de alimentos já embalados (*in-pack*). Neste contexto e atendendo também a critérios de sustentabilidade ambiental, neste trabalho investigou-se o potencial de bionanocompósitos de quitosana funcionalizada com óxido de grafeno reduzido ou nanofibras de carbono, para serem usados em embalagem alimentar para PEF.

O óxido de grafeno foi sintetizado pelo método de Hummers modificado e posteriormente foi quimicamente reduzido com ácido L-ascórbico ou ácido cafeico. Foram preparados filmes de quitosana reticulados com genipina e foram incorporadas diversas concentrações de óxido de grafeno reduzido com ácido L-ascórbico ou ácido cafeico. Para comparação, prepararam-se também filmes com nanofibras de carbono. Todos os filmes obtidos foram caracterizados no que diz respeito às suas propriedades estruturais, elétricas, colorimétricas, bioquímicas e mecânicas. Os filmes produzidos apresentam os materiais grafíticos dispersos de forma heterogênea na matriz de quitosana-genipina, o que se reflete nas propriedades dos filmes, tais como na baixa condutibilidade elétrica e a diminuição da resistência mecânica. Estes filmes apresentam um aumento da percentagem de deformação e do módulo de Young bem como a diminuição da solubilidade em água face ao filme controlo, o que induz uma melhoria das propriedades mecânicas em relação ao filme quitosana-genipina. A incorporação do material grafítico na quitosana provocou a diminuição da atividade antioxidante, à exceção dos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico. Estes filmes apresentam uma atividade antioxidante bastante superior aos restantes, indiciando que o ácido cafeico poderá estar ligado à quitosana, influenciando assim as propriedades dos filmes.

Apesar de ser necessária a otimização da preparação dos filmes, de modo a garantir uma boa dispersão dos materiais grafíticos com reflexo na melhoria das suas propriedades mecânicas e elétricas para o processamento dos alimentos por PEF *in-pack*, os filmes de quitosana e óxido de grafeno são promissores para aplicação em embalagens alimentares.



**keywords**

Pulsed electric field, food packaging, bionanocomposite, electrical conductivity, chitosan, reduced graphene oxide

**abstract**

Food processing by pulsed electric field (PEF) is one of the most promising non-thermal processing technologies currently available. The application of high voltage electric pulses to food products ensures their pasteurization while keeps their organoleptic properties under minimal changes. The main limitation of this technology is the need for continuous flow chambers where food processing occurs prior to packaging, which is preventing its transition from a laboratory scale to an industrial scale.

The present work aimed to provide a solution to this need by developing a novel food packaging capable of PEF in-pack processing. In order to achieve this goal while ensuring the fulfillment of environmental sustainability criteria, combined with the need for a packaging with electrical conductivity, various films consisting of chitosan with reduced graphene oxide or carbon nanofibers were synthesized and characterized.

Graphene oxide was synthesized by a modified Hummers method and chemically reduced by L-ascorbic acid or by caffeic acid. Chitosan films were prepared with several concentrations of graphene oxide reduced by L-ascorbic acid, graphene oxide reduced by caffeic acid or carbon nanofibers. All films were characterized in terms of their structure and electrical conductivity, as well as their colourimetric, biochemical and mechanical properties.

It was verified that the graphitic material were heterogeneously dispersed in chitosan, resulting in significant changes in various properties of the films, such as low electrical conductivity and mechanical resistance. Furthermore, an increase in the elongation percentage and Young's modulus and a decrease in solubility in water was observed in the as-prepared films in comparison with the control film. The incorporation of the graphitic material in chitosan showed a reduction of the antioxidant activity of the prepared films, with the exception of the films with reduced graphene oxide by caffeic acid. In the latter case, it was shown that these films exhibit a significantly increased antioxidant activity in comparison with the other films, thus providing an indication that the caffeic acid may be linked to chitosan influencing the properties of the films.

Although there is a need for optimization of the film preparation in order to ensure a good dispersion of the graphitic materials, thus improving its mechanical and electrical conductive properties, these novel chitosan and reduced graphene oxide films may be promising in the development of food packages suitable for PEF in-pack processing.



# ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de símbolos e abreviaturas.....	vii
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	1
1. Contextualização .....	3
2. Campo elétrico pulsado .....	4
2.1 Pasteurização de alimentos por campo elétrico pulsado .....	6
2.2 Limitações .....	9
3. Embalagens tradicionais.....	10
3.1 Materiais utilizados nas embalagens .....	10
3.2 Limitações .....	11
4. Embalagens ativas.....	13
4.1 Embalagens ativas de quitosana .....	13
4.2 Bionanocompósitos de quitosana e material grafítico .....	17
<b>Capítulo II - Enquadramento do trabalho</b> .....	23
<b>Capítulo III - Materiais e métodos</b> .....	27
1. Preparação do óxido de grafeno .....	29
1.1 Síntese do óxido de grafeno.....	29
1.2 Neutralização do pH do óxido de grafeno .....	29
2. Redução do óxido de grafeno em solução .....	30
2.1 Redução com ácido L-ascórbico .....	30
2.2 Redução com ácido cafeico.....	30
2.3 Caracterização do óxido de grafeno reduzido .....	30
3. Preparação dos filmes .....	30
3.1 Filmes de quitosana reticulados com genipina .....	30
3.2 Filmes de quitosana reticulados com genipina e material grafítico .....	31
3.2.1 Procedimento I.....	31
3.2.2 Procedimento II.....	31
4. Redução do óxido de grafeno <i>in situ</i> .....	32
6. Pirólise .....	33
6. Prensagem dos filmes .....	33

7. Técnicas de caracterização dos filmes .....	33
7.1 Imagens óticas.....	33
7.2 Morfologia.....	33
7.3 Topografia .....	33
7.4 Estrutura química .....	34
7.5 Condutibilidade elétrica .....	34
7.6 Contribuição capacitiva e potencial de contato da superfície .....	34
7.7 Cor .....	35
7.8 Atividade antioxidante .....	36
7.9 Humidade e solubilidade.....	36
7.10 Propriedades mecânicas .....	37
7.11 Ângulo de contacto .....	38
7.12 Análise estatística.....	38
<b>Capítulo IV - Resultados e discussão.....</b>	<b>39</b>
1. Redução do óxido de grafeno .....	41
1.1 Redução do óxido de grafeno <i>in situ</i> .....	41
1.2 Redução do óxido de grafeno em solução.....	45
2. Otimização da preparação dos filmes .....	49
3. Caracterização dos filmes selecionados .....	51
3.1 Caracterização estrutural.....	51
3.2 Caracterização elétrica.....	59
3.3 Caracterização colorimétrica .....	63
3.4 Caracterização bioquímica.....	67
3.5 Caracterização das propriedades mecânicas.....	71
<b>Capítulo V - Conclusões .....</b>	<b>77</b>
<b>Capítulo VI - Trabalho futuro .....</b>	<b>81</b>
<b>Capítulo VII - Referências.....</b>	<b>85</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação do sistema de tratamento de produtos alimentares por PEF.....	4
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de permeabilização da membrana celular induzido por um campo elétrico externo .....	6
<b>Figura 3.</b> a) Processamento dos alimentos por PEF antes de serem embalados. b) Processamento dos alimentos por PEF após serem embalados ( <i>in-pack</i> ).....	10
<b>Figura 4.</b> Tipos de plásticos utilizados em embalagens alimentares .....	11
<b>Figura 5.</b> a) Estrutura da quitina. b) Estrutura da quitosana .....	14
<b>Figura 6.</b> Representação da ligação da genipina às cadeias de quitosana .....	16
<b>Figura 7.</b> Estrutura do óxido de grafeno .....	18
<b>Figura 8.</b> Fatores influenciados pelo método de redução do óxido de grafeno.....	18
<b>Figura 9.</b> a) Estrutura do AA. b) Estrutura do CA .....	19
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de substituição nucleofílica SN2 subjacente à conversão do óxido de grafeno em óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico .....	19
<b>Figura 11.</b> Esquema das interações entre a quitosana e o óxido de grafeno.....	21
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo da técnica <i>Lift mode scan</i> .....	35
<b>Figura 13.</b> Imagens dos filmes após a reação de redução realizadas nas condições resumidas nas Tabelas 2 – 5.....	43
<b>Figura 14.</b> Imagens dos filmes GO 1 – 2% após as reações de redução realizadas nas condições apresentadas na Tabelas 6.....	44
<b>Figura 15. a)</b> Filmes após serem submetidos à reação de pirólise nas condições da Tabela 7. <b>b)</b> Filme GO 2% integrado no circuito de uma lâmpada LED .....	45
<b>Figura 16.</b> Espectros de absorção UV-Vis. a) Solução GO 0,1 mg/mL. b) Soluções RGO_AA 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. c) Solução RGO_CA 0,1 mg/mL .....	47
<b>Figura 17.</b> a) Solução GO 0,1 mg/mL antes da redução. b) Solução RGO_AA após a redução. c) Solução RGO_CA após a redução.....	48
<b>Figura 18.</b> Espectro de Raman do GO e do RGO_AA .....	49
<b>Figura 19.</b> CNF integradas no circuito de uma lâmpada LED. <b>1.</b> CNF; <b>2.</b> Baterias; <b>3.</b> Lâmpada LED acesa .....	50
<b>Figura 20.</b> Fotografias de microscopia ótica. Imagens nas colunas à esquerda - ampliação total de 35 vezes; imagens nas colunas à direita – ampliação total de 500 vezes. a) Filmes RGO_AA. b) Filmes RGO_CA. c) Filmes CNF.....	52

<b>Figura 21. a)</b> Secção transversal do filme Q/G. <b>b)</b> Secção transversal do filme RGO_CA 2%. <b>c) e e)</b> Superfície do filme Q/G. <b>d) e f)</b> Superfície do filme RGO_CA 2%.....	55
<b>Figura 22.</b> Imagens de topografia do filme RGO_CA 2%. a) Imagem 3D. b) Imagem 2D. c) Imagem de fase .....	56
<b>Figura 23.</b> Imagens de topografia do filme RGO_CA 2% após a prensagem. a) Imagem 3D. b) Imagem 2D. c) Imagem de fase.....	56
<b>Figura 24.</b> Espectros de absorção UV-Vis. a) Filme Q/G. b) Filmes RGO_AA 0,5%. c) Filmes RGO_CA 0,5% d) Filmes CNF 0,5% .....	57
<b>Figura 25.</b> Espectros de FTIR dos filmes de quitosana.....	59
<b>Figura 26.</b> Curvas de corrente em função da tensão aplicada aos filmes. a) Filmes RGO_AA. b) Filmes RGO_CA. c) Filmes CNF.....	59
<b>Figura 27.</b> Variação da condutibilidade elétrica dos filmes em função da concentração de óxido de grafeno reduzido. ....	61
<b>Figura 28.</b> EFM do filme RGO_CA 2%. a) Imagem de topografia. b) Imagem de capacitância (C). c) Imagem do potencial de contacto (V).....	63
<b>Figura 29.</b> Valores das coordenadas L* dos filmes .....	64
<b>Figura 30.</b> Valores de a* dos filmes .....	65
<b>Figura 31.</b> Valores das coordenadas b* dos filmes.....	65
<b>Figura 32.</b> Cores representadas pelas coordenadas L*, a* e b* dos filmes .....	66
<b>Figura 33.</b> Atividade antioxidante do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%) .....	67
<b>Figura 34.</b> Imagens do contacto entre a gota de água ultra pura e os filmes .....	69
<b>Figura 35.</b> Percentagem de humidade do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%) .....	70
<b>Figura 36.</b> Solubilidade (% de perda de massa) do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%) .....	70
<b>Figura 37.</b> Espessura média dos filmes .....	71
<b>Figura 38.</b> Módulo de Young dos filmes.....	72
<b>Figura 39.</b> Tensão de rutura dos filmes.....	73
<b>Figura 40.</b> Percentagem de deformação dos filmes .....	74

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resumo da composição e método de preparação dos filmes .....	32
<b>Tabela 2.</b> Condições testadas para verificar a influência da genipina na resistência dos filmes à reação de redução.....	41
<b>Tabela 3.</b> Condições testadas para verificar a influência da temperatura no filme GO 1% .....	42
<b>Tabela 4.</b> Condições testadas para verificar a influência do tempo da reação de redução no filme GO 1%.....	42
<b>Tabela 5.</b> Condições testadas para verificar a influência do aumento da concentração de GO na resistência dos filmes à reação de redução .....	42
<b>Tabela 6.</b> Condições de redução testadas nas reações de redução dos filmes GO 1 – 2% com ácido cafeico .....	43
<b>Tabela 7.</b> Condições de pirólise às quais foram submetidos os filmes Q/G e GO 2%, após terem sido submetidos às condições de redução da Tabela 6 .....	44
<b>Tabela 8.</b> Ângulos de contacto dos filmes com a água.....	69
<b>Tabela 9.</b> Propriedades mecânicas dos filmes .....	75



# LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>AFM</b>	Microscopia de força atómica
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATR</b>	Reflexão total atenuada
<b>CA</b>	Ácido cafeico
<b>CIELab</b>	CIE L*, a*, b* <i>uniform colour space</i>
<b>CNF</b>	Nanofibras de carbono
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E</b>	campo elétrico
<b>EFM</b>	Microscopia de força eletrostática
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<b>GO</b>	Óxido de grafeno
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized As Safe</i>
<b>L-AA</b>	Ácido L-ascórbico
<b>MS</b>	Espectroscopia de massa
<b>PEF</b>	Campo elétrico pulsado
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>Q/G</b>	Quitosana-genipina
<b>R</b>	Resistência
<b>RGO</b>	Óxido de grafeno reduzido
<b>RGO_AA</b>	Óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico
<b>RGO_CA</b>	Óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SEM</b>	Microscopia eletrónica de varrimento
<b>S<sub>N</sub>2</b>	Substituição nucleofílica bimolecular
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível
<b>V</b>	Tensão
<b>XPS</b>	Espectroscopia fotoeletrónica de raios-X
<b>ρ</b>	Resistividade
<b>σ</b>	Condutibilidade elétrica



## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

---





## 1. Contextualização

Na sociedade atual verifica-se um aumento da consciencialização do consumidor do papel da alimentação e nutrição na saúde. Consequentemente, a atual tendência de consumo de produtos alimentares centra-se na procura de alimentos minimamente processados que após o processamento preservem as suas características sensoriais e nutricionais. Perante estas exigências, os métodos de processamento tradicionais que recorrem à utilização de elevadas temperaturas são inadequados, uma vez que promovem a degradação de importantes compostos presentes nos alimentos e a diminuição do seu valor nutricional (1). Há cada vez mais a procura de métodos de processamento de alimentos a baixa temperatura. O campo elétrico pulsado (PEF) é uma nova tecnologia de processamento não térmica, que por aplicar elevadas potências elétricas em pequenos pulsos com a duração de segundos, não causa elevação significativa da temperatura, minimizando a deterioração das propriedades dos alimentos. Esta tecnologia é eficaz na inativação de microrganismos e enzimas, sendo uma das limitações à sua aplicação industrial a falta de uma embalagem compatível com a pasteurização do alimento embalado (*in-pack*) (1).

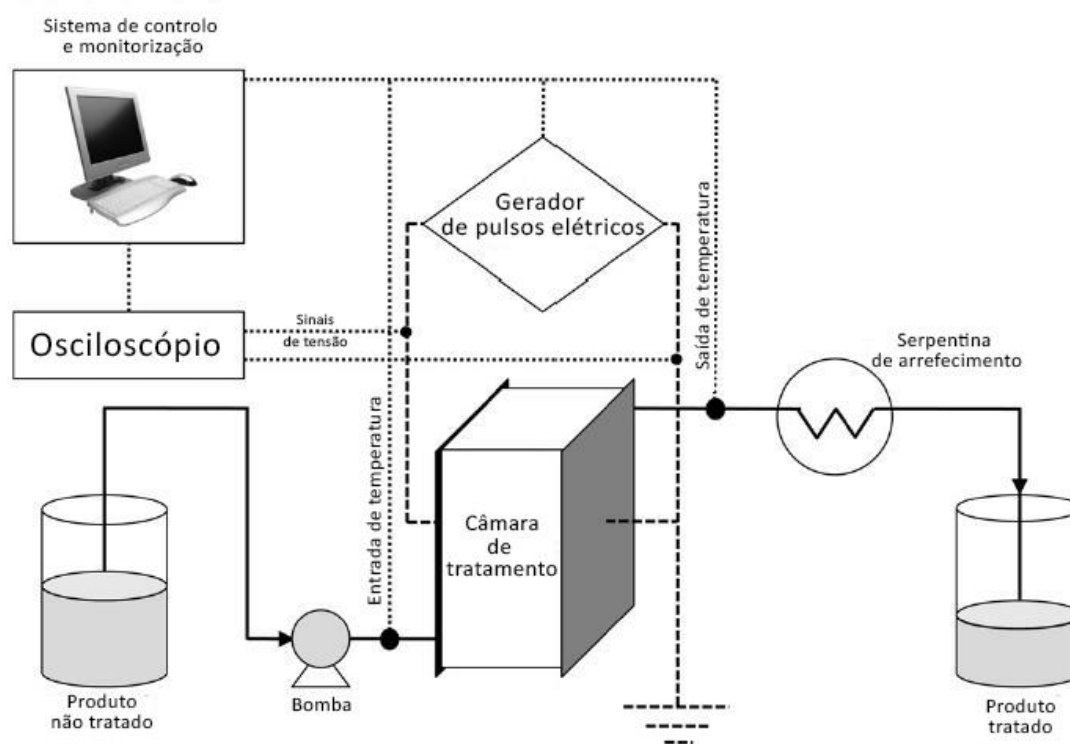
Estima-se que na Europa sejam perdidas aproximadamente 89 milhões de toneladas de alimentos por ano, principalmente devido a contaminações. Por este motivo é urgente implementar estratégias de esterilização dos alimentos e embalagens que permitam aumentar o tempo de vida dos alimentos em boas condições. Neste contexto têm surgido novos conceitos de embalagem, como os sistemas de embalagens ativas que permitem aumentar o tempo de prateleira dos alimentos através de interações dinâmicas entre estes e a embalagem (2).

Tendo também em conta o aumento da quantidade de embalagens alimentares utilizadas em todo mundo, há necessidade de reduzir o seu impacto no ambiente. Assim, é importante desenvolver materiais biodegradáveis que substituam os materiais derivados do petróleo não biodegradáveis. O recurso a biopolímeros como a quitosana, no desenvolvimento de bionanocompósitos para embalagens alimentares ativas que

permitam a adaptação das embalagens às novas tecnologias de processamento, compreende a satisfação de todos estes critérios de sustentabilidade, pelo que a sua utilização se encontra em expansão (3).

## 2. Campo elétrico pulsado (PEF)

O campo elétrico pulsado consiste na aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem, tipicamente entre 10 – 80 kV/cm com a duração 1 – 100  $\mu$ s, a produtos alimentares colocados dentro de uma câmara de tratamento limitada por dois eléttodos. Os sistemas genéricos de PEF consistem num sistema gerador de pulsos de alta voltagem, uma câmara de tratamento localizada entre a zona de entrada e saída de alimentos e um sistema de monitorização (**Figura 1**) (4).



**Figura 1.** Representação do sistema de tratamento de produtos alimentares por PEF (4).

O processamento por PEF utiliza voltagens pulsadas em intervalos de tempo muito curtos resultando em aquecimento dos alimentos a temperaturas ligeiramente acima da temperatura ambiente e por este motivo não ocorrem reações inerentes à utilização de elevadas temperaturas, dando origem a alimentos com as suas características originais minimamente alteradas após o processamento. Em comparação com outras técnicas não

térmicas, o PEF tem a vantagem de permitir o processamento dos alimentos de um modo contínuo em poucos segundos e ainda recorrer a um baixo consumo energético. Devido a estas características, esta técnica de processamento é altamente apelativa para a indústria alimentar onde encontra diversas aplicações (5).

Os métodos térmicos tradicionalmente utilizados na conservação dos alimentos tais como a pasteurização, ultrapasteurização e esterilização, potenciam reações de degradação nos alimentos decorrentes da utilização de altas temperaturas tais como a reação de *Maillard* e degradação de vitaminas, pigmentos e proteínas. Deste modo as propriedades organoléticas dos alimentos são alteradas, dando origem a produtos alimentares pouco apelativos aos consumidores. Neste contexto, as novas tecnologias de conservação não térmicas tal como o PEF têm sido alvo de grande interesse (6).

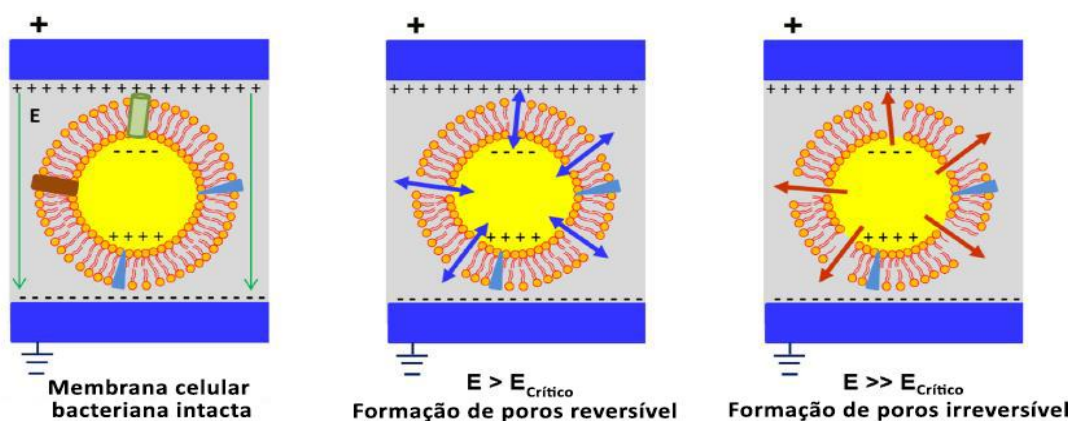
O PEF é utilizado para a extração de compostos bioativos tais como compostos fenólicos, isoprenóides, vitaminas, pigmentos e polissacarídeos de diversas matrizes alimentares ou para induzir ou modificar a expressão destes compostos bioativos quando é aplicado a tecidos metabolicamente ativos (4). A aplicação do PEF como pré-tratamento na desidratação de produtos alimentares tem sido uma estratégia adotada na desidratação de frutos e vegetais. O tratamento por PEF facilita a saída de água durante a desidratação osmótica e limita a entrada de solutos nas células, alterando minimamente as propriedades dos alimentos desidratados. Este pré-tratamento aumenta ainda a taxa de desidratação, aumentando a produtividade. Alguns produtos podem voltar a ser reidratados, tendo-se verificado que o pré-tratamento por PEF também melhora as condições deste processo (7).

O PEF é uma tecnologia que está a progredir da escala laboratorial para a escala industrial, sendo a sua principal aplicação a conservação de alimentos através da inativação de microrganismos e enzimas. O PEF é tradicionalmente aplicado a alimentos líquidos ou semilíquidos tais como sumos de fruta, leite, sopas ou purés. Esta tecnologia está em crescente desenvolvimento e recentemente as suas aplicações têm sido extrapoladas a alimentos sólidos e com baixa humidade tais como a carne ou o arroz, entre outros. Esta tecnologia tem potencial para complementar ou substituir a

pasteurização térmica tradicionalmente utilizada como método de conservação dos alimentos (8,9).

### 2.1 Pasteurização de alimentos por campo elétrico pulsado

A aplicação de um campo elétrico uniforme às matrizes alimentares provoca distorções no campo elétrico à volta das células, sendo esta a premissa subjacente à inativação dos microrganismos no tratamento por PEF. O potencial elétrico das membranas celulares é mais baixo do que o potencial elétrico do citoplasma e do meio extracelular, pelo que o campo elétrico é distribuído ao longo da membrana celular. Subsequentemente, o potencial transmembranar é alterado, induzindo a formação de poros na membrana. Este fenómeno designa-se por eletroporação. Este processo pode ser reversível ou irreversível. Quando o tamanho dos poros formados é inferior à área da membrana a eletroporação é reversível, podendo ainda assim desencadear diversos processos que levam à ocorrência de alterações bioquímicas e fisiológicas na célula. Quando os poros são suficientemente grandes para causar a destruição mecânica da membrana, a eletroporação é irreversível e conduz à morte celular (**Figura 2**) (7).



**Figura 2.** Mecanismo de permeabilização da membrana celular induzido por um campo elétrico externo.  $E$  – intensidade do campo elétrico;  $E > E_{\text{crítico}}$  – formação de poros reversível quando os poros induzidos pelo campo elétrico são considerados pequenos em comparação com a área da membrana;  $E \gg E_{\text{crítico}}$  – formação de poros irreversível quando os poros são grandes e provocam a destruição mecânica da membrana levando à morte celular (10).

A eficácia na inativação dos microrganismos depende dos parâmetros do PEF bem como de características das células tais como tamanho e tipo de célula (Gram positiva ou Gram negativa). A taxa de inativação dos microrganismos aumenta com a intensidade dos

pulsos elétricos aplicados e com o aumento do tempo de tratamento. Em relação ao tipo de células, verifica-se que células com membranas celulares mais finas são mais sensíveis ao campo elétrico, pois o potencial transmembranar e a intensidade do campo elétrico diminuem com o aumento da espessura da parede celular. Em relação ao tamanho, as células com maiores dimensões apresentam maior potencial transmembranar do que as células com menores dimensões pelo que sofrem uma maior intensidade do campo elétrico externo. Subsequentemente, as células com maiores dimensões são as mais sensíveis ao tratamento por PEF (7).

A fluidez da membrana celular e a sua composição lipídica podem sofrer alterações como resposta ao *stress* celular induzido pelo PEF. Após o tratamento das células por PEF ocorre uma diminuição da fluidez da membrana e um aumento da sua viscosidade. Este aumento da rigidez da membrana é devido a alterações no conteúdo de ácidos gordos, uma vez que após o PEF ocorre uma diminuição da concentração de ácidos gordos insaturados e um aumento da concentração de ácidos gordos saturados (11).

Embora o efeito mais evidente do PEF nos microrganismos seja a eletroporação das membranas, recentemente têm sido identificados diversos alvos celulares que paralelamente a este processo desempenham um papel fundamental na inativação dos microrganismos. Apesar de o PEF não provocar alterações nas cadeias de DNA dos microrganismos, as cadeias de RNA acumulam danos extensos. Atendendo ao facto de que o RNA é bem representativo do estado metabólico da célula, estes dados indicam que o RNA possa ser uma molécula chave no processo de inativação dos microrganismos por PEF (11). O tratamento por PEF também provoca danos nas mitocôndrias e diminui o seu potencial membranar, refletindo-se numa diminuição da performance metabólica e dos níveis de energia da célula. Uma vez que a recuperação da célula aos danos causados pelo PEF é dependente dos seus níveis energéticos, a diminuição da funcionalidade da mitocôndria desempenha um papel fundamental na inativação dos microrganismos (12).

O tratamento por PEF induz alterações na atividade enzimática das enzimas intracelulares dos microrganismos. A enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é responsável por manter os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , transportando um ião  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol para o meio extracelular, acoplado à hidrólise de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP). A

atividade desta enzima aumenta após o tratamento por PEF, indicando que este tratamento induz distúrbios na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ . A atividade das esterasas citoplasmáticas é utilizada como indicador da atividade das restantes enzimas citoplasmáticas e do metabolismo da célula. A drástica diminuição da atividade destas enzimas após o tratamento é representativa da inativação das enzimas citoplasmáticas. De acordo com a literatura, exceto a fosfatase ácida e a fosfatase alcalina, todas as restantes enzimas intracelulares de *S. cerevisiae* são parcialmente ou totalmente inativadas o que pode ser consequência direta do PEF ou ser uma consequência da agregação de proteínas intracelulares decorrente do tratamento (12).

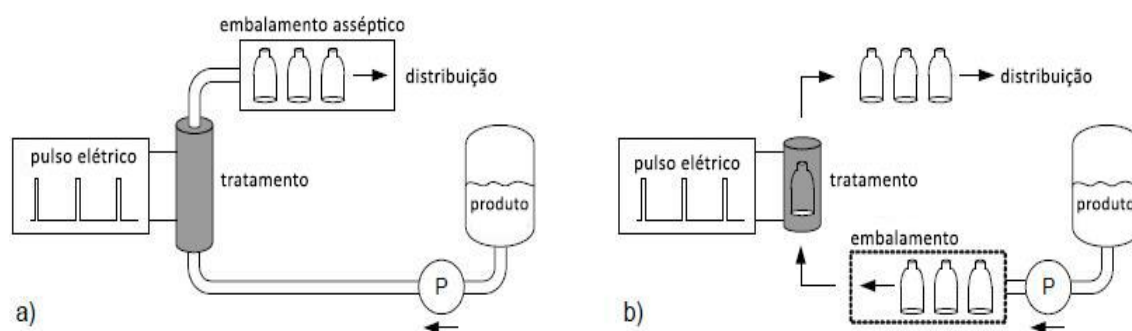
O pH da matriz alimentar é um parâmetro químico que influencia a inativação dos microrganismos, verificando-se uma maior taxa de inativação em produtos alimentares com pH ácido como os frutos. A influência do pH na inativação dos microrganismos é explicada pelo facto de este parâmetro influenciar a dissociação ou não dissociação dos ácidos orgânicos fracos presentes. O pH baixo favorece a formação de ácidos orgânicos dissociados, que nesta forma conseguem atravessar a membrana celular e entrar no citoplasma. No citoplasma, os ácidos orgânicos podem-se dissociar e reduzir o pH intracelular afetando diversos processos bioquímicos que contribuem para inativação dos microrganismos tais como o transporte passivo e ativo através da membrana, o estado de oxidação-redução e a atividade enzimática (13).

O PEF pode ser utilizado como complemento a outras tecnologias e estratégias de conservação dos alimentos. Vários estudos demonstram interações sinérgicas entre um pré-tratamento térmico com temperaturas geralmente abaixo dos 50 – 55 °C, seguido pelo tratamento por PEF para inativação de microrganismos (12-14). Num estudo recente, o leite foi pré-aquecido a diferentes temperaturas seguindo-se o tratamento por PEF. Os resultados demonstram que quanto mais elevada é a temperatura de pré-aquecimento, mais eficaz é a inativação dos microrganismos. Este efeito sinérgico deve-se ao facto de as membranas celulares dos microrganismos ficarem mais fluidas por ação da temperatura, implicando uma diminuição da resistência mecânica e consequentemente um aumento da suscetibilidade à eletroporação. O pré-aquecimento do leite a 55 °C durante 24 s, seguido pelo tratamento por PEF é equivalente à inativação

de microrganismos por pasteurização térmica (14). A inativação de ascósporos de *S. cerevisiae* em cerveja com álcool é mais eficaz quando o PEF é assistido pelo pré-tratamento térmico. O sinergismo dos dois tratamentos permite uma redução de microrganismos idêntica à alcançada pela pasteurização térmica tradicional, mas em menor período de tempo. Esta estratégia de conservação representa ganhos em termos de produtividade e esta vantagem aumenta o interesse da indústria em relação a esta nova tecnologia (15).

## 2.2 Limitações

O PEF oferece vantagens únicas face a outras técnicas de conservação, no entanto também apresenta algumas limitações. Atualmente o processo de conservação por PEF utiliza câmaras de fluxo contínuo onde o tratamento ocorre previamente ao embalamento (**Figura 3 a**). Subsequentemente é necessário que o embalamento seja totalmente asséptico para evitar recontaminações. Se o PEF fosse aplicado aos produtos alimentares previamente embalados – *in-pack* (**Figura 3 b**), seria dispensável o embalamento asséptico e seriam evitadas recontaminações, o que permitiria agilizar todo o processo e baixar os custos. A esta limitação do PEF acresce o facto de a câmara de tratamento do sistema de PEF ter um tempo de vida reduzido devido à corrosão dos eléctrodos, o que aumenta os custos de manutenção do equipamento. O facto de os eléctrodos estarem em contacto direto com os produtos alimentares levanta ainda questões de segurança alimentar, pois ocorrem reações eletroquímicas entre os eléctrodos e os alimentos, sendo que o aumento da concentração de alguns metais nos alimentos após o tratamento por PEF se encontra descrito na literatura (16). O tratamento *in-pack* mediante a utilização de uma embalagem condutora da eletricidade solucionaria todas estas limitações do PEF. A embalagem adequada a este tipo de processamento ainda não se encontra disponível, pelo que é necessário o seu desenvolvimento permitindo a difusão da conservação por PEF a nível industrial (17).



**Figura 3. a)** Processamento dos alimentos por PEF antes de serem embalados. **b)** Processamento dos alimentos por PEF após serem embalados (*in-pack*) (18).

### 3. Embalagens tradicionais

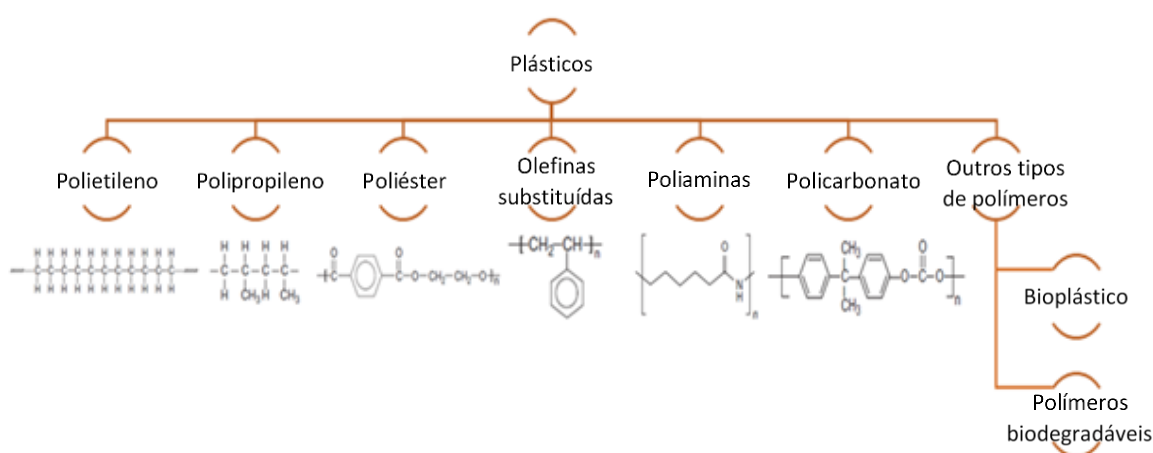
As principais funções das embalagens alimentares são constituir uma barreira protetora aos danos e contaminações por agentes externos, armazenar os alimentos e fornecer informações sobre os mesmos aos consumidores. As embalagens alimentares protegem os alimentos de agentes químicos, físicos e biológicos o que permite adiar a sua deterioração, prolongar a qualidade e segurança alimentar e aumentar o tempo de prateleira. O *design* da embalagem e o tipo de material utilizado são parâmetros que devem ser adequados a cada tipo de alimento para permitirem maximizar a eficiência das embalagens (19).

#### 3.1 Materiais utilizados nas embalagens

Os materiais tradicionalmente utilizados em embalagens alimentares são o papel, cartão, plástico, vidro e metal (20). O plástico é um dos materiais mais utilizados devido às suas excelentes propriedades de barreira aos gases e ao vapor de água, resistência e estabilidade térmica. Os plásticos mais utilizados em embalagens alimentares são o polietileno, polipropileno, poliéster e olefinas substituídas (**Figura 4**), sendo o polietileno o mais utilizado. A sua utilização começou a ser generalizada nos anos 50 e a partir daí encontra-se em expansão como material de embalagem de diversos tipos de alimentos, devido à sua versatilidade e devido à evolução das metodologias de processamento (20,21). Existem diversos tipos de polietileno que diferem no grau de linearidade da molécula, densidade e tipo de substituição, sendo facilmente processáveis e com boas propriedades de barreira ao vapor de água. No entanto, têm fracas propriedades de



barreira aos gases como o oxigénio, motivo pelo qual é comumente funcionalizado com outros materiais como o alumínio ou o cartão (20,21). Os plásticos à base de polipropileno apresentam baixa densidade sendo resistentes a bruscas variações de temperatura, pelo que são adequados a diversos métodos de processamento e conservação que envolvem altas ou baixas temperaturas. Apresentam boa resistência química mas têm fracas propriedades de barreira aos gases como o oxigénio. Os plásticos do grupo do poliéster têm boas propriedades de barreira ao oxigénio e ao vapor de água e são plásticos resistentes utilizados para produtos sólidos. As olefinas substituídas com diversos grupos vinílicos são muito versáteis para o embalamento de produtos alimentares. As poliaminas, conhecidas como *nylon*, resultam da condensação de moléculas que contêm grupos amina. São polímeros rígidos, pelo que normalmente são incorporadas em sistemas de multicamadas. O policarbonato é um polímero amorfo conhecido pelas suas propriedades óticas, rigidez e dureza. No entanto a sua utilização é limitada devido a conter monómeros bisfenol A nefastos para a saúde. Existem ainda outros tipos de polímeros como os bioplásticos e polímeros biodegradáveis, desenvolvidos para aumentar a sustentabilidade ambiental dos plásticos. Porém têm custos de produção elevados e apresentam limites de funcionalidade e compatibilidade com outros polímeros.



**Figura 4.** Tipos de plásticos utilizados em embalagens alimentares (20).

### 3.2 Limitações

Apesar das vantagens que os materiais tradicionais como o plástico oferecem, existem muitas limitações tais como produção não sustentável, falta de sustentabilidade

ambiental e falta de adaptabilidade às novas tecnologias de processamento e conservação que precisam de ser resolvidas.

O uso de plásticos tem que ser restringido porque estes não são totalmente recicláveis e/ou biodegradáveis e representam graves problemas ambientais. As embalagens alimentares de plástico ficam sujas pelo que a sua reciclabilidade por vezes é impraticável e economicamente inconveniente. Como consequência, grande parte das embalagens de plástico é depositada em aterros sanitários, sendo uma ameaça ao ambiente principalmente devido ao longo período de decomposição do plástico (22). Durante os anos 90 apenas uma percentagem inferior a 10% de embalagens alimentares de plástico foi reciclada, sendo maioritariamente depositadas em aterros, pelo que a acumulação de plástico no solo ao longo do tempo agrava ainda mais esta ameaça ao ambiente (23). A par das questões ambientais, outro grande problema das embalagens de plástico é a sua dependência do uso de combustíveis fósseis. O aumento do preço do petróleo tende a tornar o custo de produção das embalagens pouco sustentável (22).

Outro grave problema associado às embalagens de plástico é migração de componentes dos plásticos para os alimentos. A migração dos componentes da embalagem ocorre principalmente por processos de difusão que podem ser acelerados através da interação dos componentes dos alimentos como as gorduras que ao migrarem para o plástico aumentam a mobilidade dos seus componentes para os alimentos. A migração destes componentes é um grave problema de saúde. A maioria dos compostos que migram do plástico das embalagens para os alimentos são solventes, pigmentos ou aditivos (plastificantes, antioxidantes, lubrificantes, agentes antiestáticos, entre outros) utilizados durante a fabricação do material (24). Estudos epidemiológicos mostram que estes compostos, dos quais são exemplo dos quais são exemplos o bisfenol A, ftalatos, estireno, metilbenzeno ou xileno, entre muitos outros, podem provocar um aumento da incidência de cancro bem como alterações das funções imunológicas e reprodutoras pelo que muitos destes compostos são designados compostos disruptores endócrinos. Apesar de existir legislação sobre os compostos permitidos na fabricação das embalagens e existir monitorização dos seus níveis nos alimentos, o limite de consumo diário é

facilmente ultrapassado ao considerar a quantidade de compostos presentes em todos os alimentos ingeridos (25).

Atualmente existe uma maior consciencialização ambiental e para a saúde que está a ditar a necessidade de substituir as embalagens tradicionais por embalagens recicláveis e com origem em materiais naturais. O encontro de alternativas é urgente.

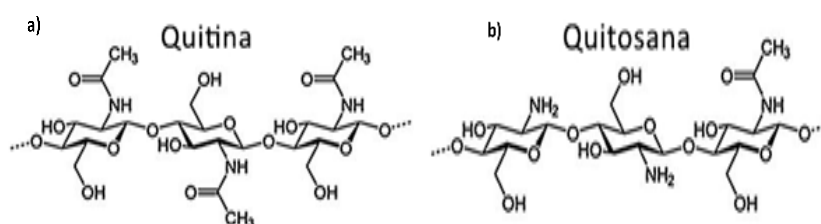
#### 4. Embalagens ativas

Em resultado de uma política de mercado global a que se junta o aumento da exigência dos consumidores pela disponibilidade de todas as variedades de alimento em qualquer sítio ou estação do ano, há nos dias de hoje a necessidade de desenvolver embalagens alimentares funcionais. As novas funções decorrem de processos químicos, físicos e biológicos que despoletam mecanismos interativos entre o alimento e a embalagem. A interação dinâmica entre a embalagem e os produtos alimentares ou a atmosfera que os envolve promove o aumento do tempo de prateleira e da qualidade dos produtos (26). Os materiais tradicionais desempenham um papel passivo na proteção dos alimentos pelo que são desadequados a este conceito de embalagem. Deste modo, os materiais tradicionais podem ser funcionalizados ou substituídos por materiais alternativos como os biopolímeros. Os biopolímeros apresentam propriedades químicas e biológicas intrínsecas que tornam a embalagem ativa. Paralelamente, a utilização dos biopolímeros promove a sustentabilidade ambiental, uma vez que estes são biodegradáveis e são uma alternativa sustentável à utilização dos plásticos derivados do petróleo não biodegradáveis. Os biopolímeros utilizados para este efeito são proteínas, polissacarídeos e lípidos de origem animal ou vegetal, sendo os polissacarídeos como a quitosana os mais utilizados, devido às suas boas capacidades de formar filmes.

##### 4.1 Embalagens ativas de quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, o segundo biopolímero mais abundante na natureza depois da celulose (26). A quitina é um polissacarídeo de cadeia linear constituído por monómeros de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (**Figura 5 a**). Este polissacarídeo presente nos exosqueletos de artrópodes constitui um desperdício industrial do processamento dos produtos marinhos.

As aplicações práticas da quitina são muito limitadas, devido ao elevado grau de acetilação que a torna insolúvel na maioria dos solventes. A desacetilação da quitina através de hidrólise alcalina dá origem à quitosana. A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear constituído por monómeros de 2-amino-2-desoxi-D-glucose e N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose unidos através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (**Figura 5 b**). A utilização da quitosana é ambientalmente sustentável, uma vez que este biopolímero é proveniente de uma fonte abundante e de ocorrência natural (27). A quitosana tem um grupo amina e dois grupos hidroxilo em cada resíduo glicosídico, pelo que é um polímero policatiónico. Devido à presença destes grupos funcionais na sua estrutura, a quitosana apresenta propriedades químicas e biológicas únicas, sendo as mais relevantes para as embalagens alimentares as propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (28).



**Figura 5. a)** Estrutura da quitina. **b)** Estrutura da quitosana (28).

A atividade antimicrobiana da quitosana é explicada através de três possíveis mecanismos. O primeiro mecanismo consiste na interação das cargas positivas dos grupos amina com as cargas negativas de resíduos de macromoléculas presentes à superfície das células dos microrganismos. Estas interações interferem com a troca de nutrientes entre o meio intracelular e o meio extracelular da célula. Os grupos amina podem ainda competir com o cálcio pelos locais eletronegativos na membrana e comprometer a sua integridade provocando a libertação do conteúdo intracelular. O segundo mecanismo propõe que a quitosana atue como agente quelante de metais essenciais ao funcionamento da célula. O último mecanismo pressupõe que a quitosana de baixo peso molecular pode entrar no núcleo da célula e interagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), interferindo com a síntese de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro, afetando a síntese proteica e inibindo a atividade enzimática (29).

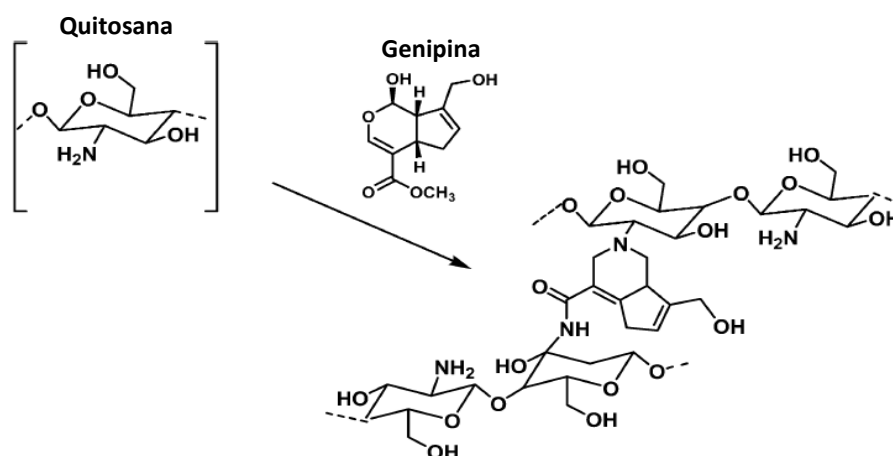
A atividade antifúngica da quitosana é devida à interação da sua cadeia catiónica com macromoléculas negativamente carregadas expostas à superfície do fungo e afeta a morfogénese da parede celular, interferindo diretamente com a atividade de enzimas responsáveis pelo crescimento do fungo (30).

A atividade antioxidante da quitosana surge da sua capacidade de se ligar a iões metálicos envolvidos na catálise de reações de oxidação e impedir a formação de espécies radicalares como radicais hidroxilo ou superóxido (31). O mecanismo subjacente à atividade antioxidante da quitosana compreende o facto de os azotos ligados ao carbono - 2 terem um par de eletrões que se liga aos protões libertados pelas soluções ácidas para formar  $\text{NH}_3^+$  e posteriormente os radicais livres reagem com o  $\text{H}^+$  do grupo  $\text{NH}_3^+$ , formando moléculas estáveis (32).

A quitosana é biocompatível pois é passível de ser degradada pelas enzimas do trato intestinal quando é ingerida, não sendo absorvida. A sua citocompatibilidade foi comprovada em diversos tipos de células. Algumas proteínas residuais podem provocar reações de insensibilidade, no entanto a sua presença depende da origem e do método de extração da quitosana. Deste modo, a quitosana está reconhecida pela *Food and Drug Administration* (FDA) com o estatuto de *Generally Recognized As Safe* (GRAS) desde 2011. Devido às suas propriedades únicas, a quitosana tem sido utilizada como biopolímero de eleição no desenvolvimento de nanocompósitos para embalagens alimentares (31,33).

Apesar das diversas vantagens na utilização da quitosana em bionanocompósitos, esta também apresenta algumas limitações. Apesar de a quitosana ser insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, é facilmente dissolvida em soluções ácidas, uma vez que nestas condições ocorre protonação dos grupos amina primários. Deste modo, a solubilidade da quitosana é uma limitação na sua aplicação como material de embalagem para alimentos ácidos. Devido à presença dos grupos hidroxilo na sua estrutura, a quitosana tem elevada permeabilidade ao vapor de água e exhibe fraca resistência mecânica em ambientes com elevada humidade. A par da elevada solubilidade, a quitosana tem ainda como principais limitações as suas fracas propriedades mecânicas e fracas propriedades de barreira a diversos gases e líquidos (34).

Para reforçar as propriedades da quitosana, as ligações entre as suas cadeias podem ser fortalecidas através da formação de ligações covalentes entre os grupos amina primários da quitosana e diversos agentes reticulantes como o glutaraldeído, tripolifosfatos, etileno glicol, diglicidil éter ou diisocianato. No entanto, a maioria destes compostos tradicionalmente utilizados são citotóxicos e comprometem a biocompatibilidade da quitosana, não sendo adequados para a utilização em embalagens alimentares (35). Recentemente, estes compostos têm sido substituídos por um agente reticulante alternativo, a genipina. A genipina é um composto isolado dos frutos *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides Ellis*, com baixa toxicidade, biocompatibilidade e com propriedades anti-inflamatórias, anti-colesterolémicas, hemostáticas e diuréticas, sendo frequentemente utilizado na medicina tradicional chinesa e também como corante alimentar. A genipina reage com as amins primárias da quitosana na presença de oxigénio, formando um pigmento azul (**Figura 6**) (36).



**Figura 6.** Representação da ligação da genipina às cadeias de quitosana (37).

O mecanismo de reação entre a quitosana e a genipina consiste no ataque nucleofílico do grupo amina ao carbono 3 da genipina originando a formação de um aldeído intermediário. A abertura do anel é seguida por um ataque da amina secundária formando um composto heterocíclico (38).

A reticulação da quitosana e funcionalização com diversos compostos permite reduzir o impacto das suas limitações bem como potenciar as suas propriedades intrínsecas. Filmes de quitosana reticulados com genipina e ácido cafeico foram desenvolvidos com o objetivo de diminuir a sua solubilidade e potenciar as suas

propriedades antioxidantes. A reticulação da quitosana permitiu diminuir a solubilidade dos filmes e aumentar a atividade antioxidante dos filmes em 80% (38). Também foram desenvolvidos filmes de quitosana com compostos funcionais provenientes de extrato de bagaço de uva, o que também resultou na diminuição da solubilidade dos filmes em 75% e no aumento da sua atividade antioxidante (39).

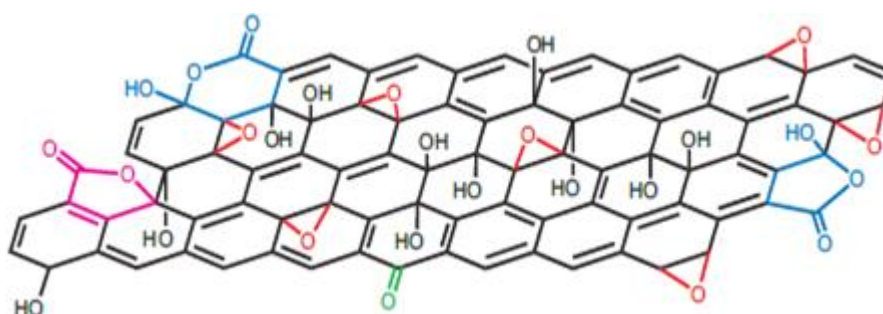
Recentemente, a nisina que é um péptido catiónico anfifílico com atividade antimicrobiana foi incorporada em filmes de quitosana no âmbito do desenvolvimento de uma embalagem ativa. O filme de quitosana retém a nisina e permite a sua libertação controlada ao longo do tempo, uma vez que a nisina e a quitosana têm elevada afinidade e interagem entre si. Esta estratégia permite a libertação contínua dos agentes antimicrobianos pela embalagem ativa, em oposição à adição de agentes antimicrobianos aos produtos alimentares em que ocorre uma rápida diminuição da sua concentração, devido a interações com os compostos presentes nos alimentos (40).

#### 4.2 Bionanocompósitos de quitosana e material gráfico

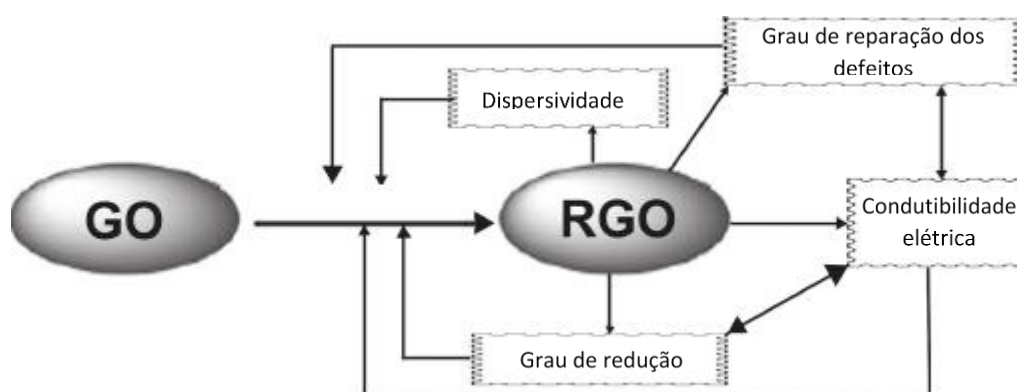
Os compósitos são materiais constituídos por duas ou mais fases (fase contínua ou matriz e fase dispersa) e que reúnem as propriedades de ambas. Quando as estruturas que constituem a fase dispersa são estruturas da ordem dos nanómetros (nanopartículas, nanoplaquetas, nanotubos, nanofibras, entre outros), os compósitos são designados nanocompósitos. Quando a fase contínua é constituída por biopolímeros e a fase dispersa é constituída por nanoestruturas designam-se bionanocompósitos. A fase dispersa modifica as propriedades intrínsecas da fase contínua, tendo por objetivo conferir-lhe novas propriedades (41).

Os nanomateriais têm elevada área superficial pelo que permitem melhorar as propriedades físicas e mecânicas da quitosana tal como reduzir o contacto com os alimentos ácidos, quando aplicados como material de embalagem (27). A título de exemplo, diversos materiais gráficos como as nanofibras de carbono (42), nanotubos de carbono (43) ou óxido de grafeno reduzido (44) têm sido adicionados à quitosana como estratégia de melhoramento das suas propriedades mecânicas e de barreira, podendo também conferir condutibilidade elétrica.

O óxido de grafeno é sintetizado a partir da oxidação da grafite e é uma estrutura bidimensional constituída por folhas planas de átomos de carbono ligados a grupos epóxidos e hidroxilos no plano basal e diversos grupos funcionais com oxigénio fora do plano (**Figura 7**) (45). A redução do óxido de grafeno permite eliminar parcialmente os grupos com oxigénio e restabelecer a rede de carbonos  $sp^2$  de forma a adquirir condutibilidade elétrica. Existem diversos métodos de redução do óxido de grafeno tais como a redução química (hidrazina, monóxido de carbono, ácido ascórbico, ácido cafeico), condições ácidas ou alcalinas, tratamento térmico, tratamento por micro-ondas, fotocatalise, laser, plasma, bactérias, eletroquímica, corrente elétrica, entre outros. Os diferentes métodos de redução têm influência nas propriedades do óxido de grafeno reduzido, nomeadamente no grau de redução, dispersividade, grau de reparação dos defeitos (isto é, grau de remoção dos grupos funcionais com oxigénio) e por consequência na condutibilidade elétrica (**Figura 8**) (46).



**Figura 7.** Estrutura do óxido de grafeno (47).

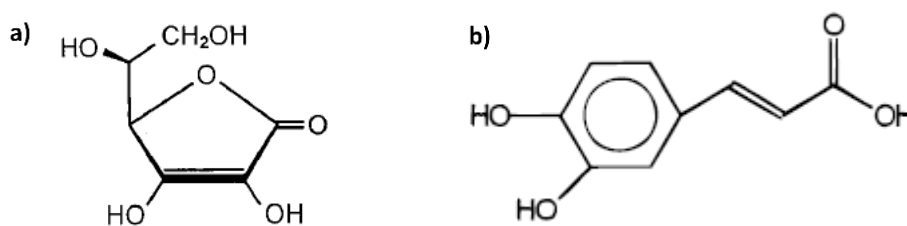


**Figura 8.** Fatores influenciados pelo método de redução do óxido de grafeno (46).

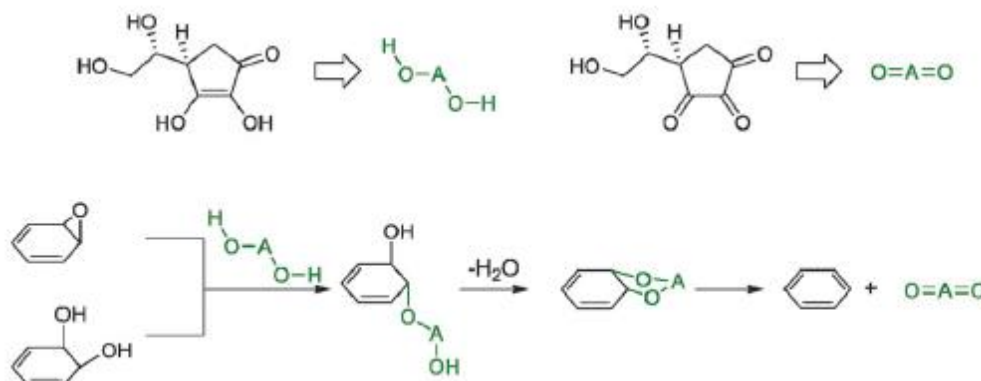
A redução química do óxido de grafeno com recurso a agentes redutores naturais como o ácido L-ascórbico (**Figura 9 a**) ou o ácido cafeico (**Figura 9 b**) tende a ser cada vez mais utilizada, pois devido às suas baixas toxicidades permitem praticar uma química



verde proporcionando uma eficácia de redução comparável aos agentes redutores mais eficazes como o hidrato de hidrazina (47,48). O ácido L-ascórbico ou vitamina C é um antioxidante natural presente em inúmeros sistemas biológicos. O mecanismo de redução do óxido de grafeno pelo ácido L-ascórbico ainda não se encontra bem clarificado, mas um dos mecanismos propostos consiste numa reação de substituição nucleofílica  $S_N2$  seguida por um passo de eliminação térmica, sendo o ácido L-ascórbico convertido em ácido desidroascórbico (**Figura 10**).



**Figura 9.** a) Estrutura do AA (49). b) Estrutura do CA (50).



**Figura 10.** Mecanismo de substituição nucleofílica  $S_N2$  subjacente à conversão do óxido de grafeno em óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico (51).

Os eletrões presentes no anel aromático do ácido L-ascórbico tornam os seus grupos hidroxilos ácidos, o que faz com que o ácido L-ascórbico liberte dois prótons funcionando como um nucleófilo. Os grupos com oxigénio maioritariamente presentes no óxido de grafeno são grupos hidroxilos e grupos epóxidos. Os grupos epóxidos podem ser abertos por um ataque nucleofílico  $S_N2$  pelo anião oxigénio do ácido L-ascórbico. Segue-se o segundo ataque nucleofílico com formação de um intermediário e libertação de uma molécula de água. Por fim, o intermediário sofre uma eliminação térmica sendo formado o óxido de grafeno reduzido. O mecanismo de remoção dos grupos hidroxilos é semelhante

ao dos grupos epóxidos (51). Apesar de este mecanismo contemplar um passo de eliminação térmica, diversos autores descrevem a redução do óxido de grafeno por ácido L-ascórbico à temperatura ambiente, pelo que poderão existir outros mecanismos subjacentes a este processo de redução (52).

O ácido cafeico é um dos ácidos hidroxicinâmicos mais abundantes, podendo ser encontrado em diversas plantas e nos seus derivados. A atividade antioxidante do ácido cafeico é devida aos seus grupos hidroxilos. Este composto apresenta uma atividade superior a outros compostos fenólicos devido à presença de um segundo grupo hidroxilo nas posições *orto* ou *para* do anel. Este segundo grupo hidroxilo acrescenta uma estabilização de ressonância adicional que contribui para a atividade antioxidante (53,54).

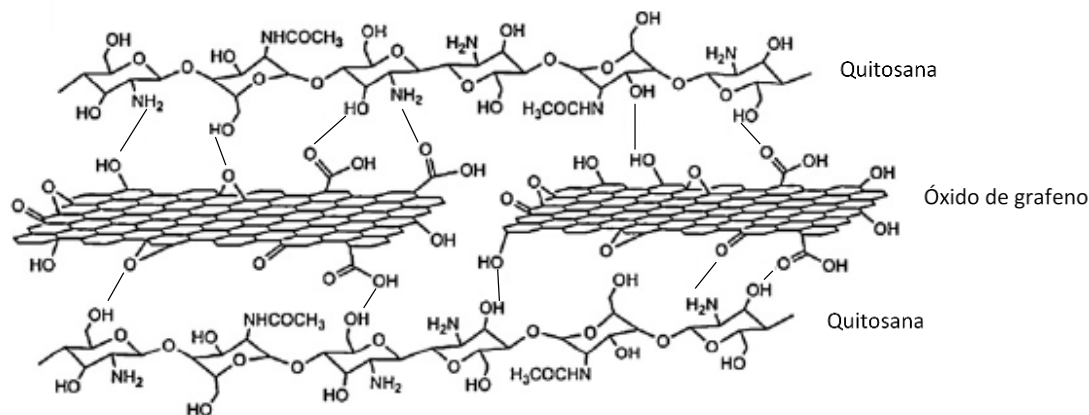
O mecanismo de redução do óxido de grafeno pelo ácido cafeico é um mecanismo de redução direta. Ocorre a libertação de quatro eletrões presentes no ácido cafeico que leva à formação de semiquinonas que são facilmente oxidadas a quinonas e podem sofrer novamente oxidação formando-se grupos carboxílicos (48).

O óxido de grafeno reduzido, à semelhança de outros materiais gráfiticos, apresenta atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana é atribuída ao facto de os cantos das folhas do óxido de grafeno reduzido serem capazes de perfurar as membranas celulares das bactérias, levando à perda da sua integridade, extravasamento do conteúdo extracelular e por fim morte celular (55).

A incorporação de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido na quitosana reforça drasticamente as suas propriedades mecânicas e térmicas. O sinergismo entre a atividade antimicrobiana de ambos origina bionanocompósitos com excelentes propriedades antibacterianas (56). O óxido de grafeno reduzido aumenta a condutibilidade elétrica da quitosana alargando o seu espectro de aplicações (44).

A quitosana liga-se ao óxido de grafeno através de ligações covalentes entre os seus grupos amina e os grupos epóxidos e hidroxilos do óxido de grafeno. Além destas ligações, a quitosana e o óxido de grafeno também poderão interagir através de ligações de hidrogénio e ligações electroestáticas entre os grupos policatiónicos da quitosana e grupos negativamente carregados do óxido de grafeno (**Figura 11**). Existem menos ligações entre a quitosana e o óxido de grafeno reduzido devido ao facto de o óxido de

grafeno reduzido ter menos grupos funcionais do que o óxido de grafeno. Todas estas interações fortes entre a quitosana e o óxido de grafeno são responsáveis pelo reforço das propriedades mecânicas e de barreira dos bionanocompósitos (56,57,58).



**Figura 11.** Esquema das interações entre a quitosana e o óxido de grafeno (58)

A síntese de bionanocompósitos de quitosana e nanofibras de carbono também se encontra descrita na literatura. As nanofibras de carbono têm um tamanho superior aos nanotubos de carbono e mais locais de ligação na sua parede externa, pelo que são mais facilmente incorporáveis na quitosana. À semelhança de outros materiais gráfiticos, também as nanofibras de carbono podem conferir condutibilidade elétrica e reforçar toda a estrutura polimérica dando origem a bionanocompósitos com excelentes propriedades mecânicas (41).



## CAPÍTULO II – ENQUADRAMENTO DO TRABALHO



O processamento por PEF é uma tecnologia altamente promissora, uma vez que altera minimamente as características e propriedades dos alimentos e em simultâneo inativa os microrganismos com eficácia, satisfazendo a tendência crescente de consumo de produtos de minimamente processados e de elevada qualidade. No entanto, a sua transição da escala laboratorial para a escala industrial está comprometida devido à falta de uma embalagem alimentar com condutibilidade elétrica que permita o tratamento por PEF *in-pack*, evitando uma potencial recontaminação entre o tratamento e o embalamento.

A quitosana é um biopolímero de excelência no desenvolvimento de embalagens ativas, devido às suas propriedades químicas e biológicas intrínsecas. As suas limitações podem ser contornadas através da reticulação com moléculas compatíveis como a genipina e através da incorporação de nanoestruturas, que podem ainda potenciar as suas propriedades intrínsecas bem como conferir novas propriedades.

Neste contexto, o presente trabalho centrou-se no desenvolvimento e caracterização de um bionanocompósito para embalagem alimentar que permita o processamento por PEF *in-pack*. Foram desenvolvidos bionanocompósitos de quitosana e óxido de grafeno reduzido ou nanofibras de carbono, optando-se por procedimentos com menor impacto ambiental. O óxido de grafeno foi sintetizado pelo método de Hummers modificado e posteriormente foi quimicamente reduzido com ácido L-ascórbico ou ácido cafeico de forma a restaurar a sua rede de carbonos  $sp^2$  e permitir a condutibilidade elétrica. Alternativamente foram sintetizados bionanocompósitos de quitosana reticulada com genipina e nanofibras de carbono comerciais como termo de comparação aos bionanocompósitos de quitosana reticulada com genipina e óxido de grafeno reduzido. Após a otimização da síntese dos bionanocompósitos, foram selecionados os mais promissores e as suas propriedades estruturais, elétricas, colorimétricas, mecânicas e bioquímicas foram caracterizadas.





## CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

---



## 1. Preparação do óxido de grafeno

### 1.1 Síntese do óxido de grafeno

O óxido de grafeno foi sintetizado a partir da oxidação da grafite, de acordo com o método de *Hummers* modificado (59). De acordo com este método, foram misturados 0,75 g de flocos de grafite (Sigma-Aldrich) com 10 mL de ácido fosfórico concentrado (Sigma-Aldrich, 99%) e 90 mL de ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich, 95-98%), sob agitação à temperatura ambiente. Posteriormente foram lentamente adicionadas 4,5 g de permanganato de potássio (Sigma-Aldrich, 99%) à mistura anterior em banho de água a 50 °C durante 12 h. Após a mistura atingir a temperatura ambiente foram adicionados 50 mL de gelo e 2,5 mL de peróxido de hidrogénio (Sigma-Aldrich, 30%) 10% (m/v). De seguida a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a lavagens sucessivas com 100 mL de água, 100 mL de ácido clorídrico 30% (Sigma-Aldrich, 36.5-38.0%) e 400 mL de etanol (2 vezes) sendo o sobrenadante descartado a cada lavagem. O precipitado resultante após as lavagens foi coagulado com 200 mL de éter dietílico (Sigma-Aldrich, 99%).

### 1.2 Neutralização do pH do óxido de grafeno

Após a síntese do óxido de grafeno, procederam-se a múltiplas lavagens com água destilada tendo por objetivo a neutralização do pH. A mistura foi centrifugada a 6000 rpm durante 60 min, sendo o sobrenadante descartado após cada lavagem.

Após as lavagens com água destilada a neutralização do pH prosseguiu através da diálise do óxido de grafeno. O óxido de grafeno foi colocado no interior de uma membrana de diálise (Spectra/Por 6, 1 kDa, 38 mm), tendo esta sido submersa num copo com água ultrapura. A água ultrapura foi substituída múltiplas vezes até o pH do óxido de grafeno atingir a neutralidade. Por fim, o óxido de grafeno foi armazenado na forma de solução aquosa com a concentração de 5,2 mg/mL determinada através da aferição do peso seco do óxido de grafeno.

## 2. Redução do óxido de grafeno em solução

### 2.1 Redução com ácido L-ascórbico

O óxido de grafeno em solução (0,1 mg/mL) foi reduzido com 1 mg/mL de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich,  $\geq 99,0\%$ ) durante 24 h sob agitação à temperatura ambiente (51). Foram ainda testadas as concentrações de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL de ácido L-ascórbico, nas condições acima referidas. Após a reação, parte das soluções foram filtradas sob vácuo com filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22  $\mu\text{m}$  (Merk Millipore).

### 2.2 Redução com ácido cafeico

O óxido de grafeno em solução (0,1 mg/mL) foi reduzido com 0,3 mg/mL de ácido cafeico (Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ) durante 24 h, em refluxo a 95 °C sob agitação (48).

### 2.3 Caracterização do óxido de grafeno reduzido

Após as reações de redução descritas nos pontos anteriores, as soluções de óxido de grafeno reduzido foram lavadas com água destilada e centrifugadas (3 vezes), para remover os agentes redutores. Posteriormente foi feito o espectro de absorvância das soluções de óxido de grafeno reduzido, tal como da solução de óxido de grafeno (0,1 mg/mL) num espectrofotómetro de UV-Vis (Jasco V-560) (52).

O óxido de grafeno reduzido pelo ácido L-ascórbico, presente nos filtros PVDF após a filtração, foi analisado por espectroscopia de Raman num espectrómetro de Raman (Jobin Yvon 64000), à temperatura ambiente, utilizando o comprimento de onda de excitação de 532 nm (60).

## 3. Preparação dos filmes

### 3.1 Filmes de quitosana reticulados com genipina

Os filmes de quitosana reticulados com genipina, a partir daqui designados por filmes quitosana-genipina, foram preparados por evaporação do solvente. Foi preparada uma solução de quitosana (médio peso molecular, 85% de desacetilação, Sigma-Aldrich) 1,5% (m/v) numa solução de ácido acético 0,1 M (Sigma-Aldrich,  $\geq 99,7\%$ ), tendo

permanecido sob agitação durante 16 h à temperatura ambiente. Após a completa dissolução da quitosana, a solução foi filtrada num funil de placa porosa (G1). A esta solução foi adicionado glicerol 0,75% (m/v) (Fisher Chemicals, 98%) como plastificante. Para promover uma melhor homogeneização do glicerol, a solução foi aquecida a 50 °C em banho de água, durante 10 min sob agitação. Quando a solução atingiu a temperatura ambiente, foi adicionada uma solução de genipina (Challenge Bioproducts Co., Lda., 98%) dissolvida em etanol 10% (m/v) (Sigma-Aldrich, ≥99,8%) de modo a obter uma concentração final de 0,025% (m/v) na solução de quitosana, mantida constante em todos os filmes preparados. A reação ocorreu sob agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Após a reação procedeu-se à desgaseificação sob vácuo, até não existirem bolhas de ar visíveis na mistura. A mistura foi distribuída por placas de acrílico com 144 cm<sup>2</sup> de área útil, tendo sido transferidas 31 g de solução para cada placa. As placas foram devidamente colocadas num suporte e niveladas, tendo permanecido durante 24 h no escuro. Após este período o suporte com as placas foi colocado na estufa a 35 °C durante 16 h para evaporar o solvente (39).

### 3.2 Filmes de quitosana reticulados com genipina e material grafitico

Foram preparados filmes quitosana reticulados com genipina e óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido ou nanofibras de carbono (Sigma-Aldrich). A preparação destes filmes foi adaptada do procedimento anterior, tendo sido testados dois procedimentos distintos.

#### 3.2.1 Procedimento I

Após a filtração da solução de quitosana, foi adicionado o material grafitico em solução aquosa, tendo estas soluções sido submetidas a tratamento por ultrassons durante 6 – 8 h até atingir uma boa homogeneização da solução de óxido de grafeno ou óxido de grafeno reduzido na solução de quitosana. O tratamento por ultrassons foi alternado com agitação constante à temperatura ambiente.

#### 3.2.2 Procedimento II

As soluções aquosas de óxido de grafeno ou óxido de grafeno reduzido e as nanofibras de carbono foram adicionadas à solução de ácido acético 0,1 M. A quitosana

foi adicionada a estas soluções e após a sua completa dissolução, as soluções não foram filtradas. A composição dos filmes de quitosana reticulados com genipina e material grafítico está descrita na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Resumo da composição e método de preparação dos filmes. Os filmes assinalados a negrito foram selecionados para posterior caracterização.

Designação do filme	Material grafítico	Material grafítico (%)	Genipina (mg/mL)	Método de preparação	
<b>Q/G</b>	-	-	0,025	-	
GO 0,5%	GO	0,5	0,5	I;II	
GO 0,5%		0,5	0,025		
GO 0,75%		0,75			
GO 1%		1	-		
GO 1%		1			
GO 1,25%		1,25			
GO 1,5%		1,5			
GO 2%		2			
<b>RGO_AA 0,5%</b>	RGO_AA	0,5			0,025
<b>RGO_AA 1%</b>		1			
<b>RGO_AA 1,5%</b>		1,5			
<b>RGO_AA 2%</b>		2			
<b>RGO_CA 0,5%</b>	RGO_CA	0,5			
<b>RGO_CA 1%</b>		1			
<b>RGO_CA 1,5%</b>		1,5			
<b>RGO_CA 2%</b>		2			
<b>CNF 0,5%</b>	CNF	0,5	-	II	
<b>CNF 1%</b>		1			
<b>CNF 1,5%</b>		1,5			
<b>CNF 2%</b>		2			

Q/G: Filme quitosana-genipina; GO: Filmes com óxido de grafeno; RGO: Filmes com óxido de grafeno reduzido; CNF: Filmes com nanofibras de carbono.

#### 4. Redução do óxido de grafeno *in situ*

O óxido de grafeno presente nos filmes de quitosana reticulados com genipina foi reduzido *in situ* com ácido L-ascórbico e ácido cafeico. As condições de redução são apresentadas no ponto 1.1 do capítulo IV, de modo a facilitar a compreensão de todo o processo de otimização da redução do óxido de grafeno *in situ*.

## 5. Pirólise

O filme quitosana-genipina e o filme com 2% de óxido de grafeno foram pirolisados num forno (Carbolite) com atmosfera de azoto durante 2 h a 900 °C.

## 6. Prensagem dos filmes

Os filmes de quitosana reticulados com genipina e óxido de grafeno reduzido ou nanofibras de carbono foram prensados numa prensa hidráulica (Carver, Model 3851-0) tendo sido submetidos à temperatura de 110 °C, pressão de 20 MPa durante 10 min com o objetivo de alinhar o material grafitico (61,62).

## 7. Técnicas de Caraterização dos filmes

### 7.1 Imagens óticas

Os filmes selecionados foram observados ao microscópio ótico de transmissão com câmara integrada para captação das imagens. Foi utilizado um microscópio ótico (Leika) com uma objetiva com ampliação de 3,5 vezes e ocular com ampliação de 10 vezes perfazendo a ampliação total de 35 vezes e num microscópio ótico (Olympus BX51) com uma objetiva com ampliação de 50 vezes e ocular com ampliação de 10 vezes perfazendo a ampliação total de 500 vezes.

### 7.2 Morfologia

A morfologia dos filmes selecionados foi avaliada num microscópio eletrónico de varrimento (SEM, Hitachi, SU-70). Foi feita deposição de carbono previamente à observação.

### 7.3 Topografia

A topografia dos filmes com 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico foi caracterizada antes e após a prensagem por AFM em *tapping mode* com recurso a um microscópio (Nanoscope IIIa Multimode, Digital Instruments). Foram utilizadas *tips* de silicone (Nanosensors) com uma resistividade de 0,01-0,02  $\Omega$ .cm e raio de 2 nm. Para obter as imagens bidimensionais e calcular a altura dos perfis dos filmes foi utilizado o programa WSxM 4.0 Develop 12.0 (Nanotec Electronica S.L., 2008) e para obter as

imagens tridimensionais foi utilizado o programa Surfer Version 8.00 (Golden Software Inc. 2002).

#### 7.4 Estrutura química

A estrutura química dos filmes foi avaliada através de UV-Vis e FTIR.

Os espectros de FTIR dos filmes selecionados foram adquiridos num espectrómetro com sistema de reflexão ATR (Perkin Elmer Spectrum BX). Os espectros foram adquiridos no modo de absorvância entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 16  $\text{cm}^{-1}$  e 64 scans por amostra. Foram analisadas 5 réplicas de cada tipo de filme (39).

Os espectros de absorvância de UV-Vis dos filmes selecionados foram adquiridos entre 200 e 900 nm, num espectrofotómetro de UV-Vis (Jasco V-560).

#### 7.5 Condutibilidade elétrica

A resistência ( $R$ ) dos filmes foi determinada através da obtenção de curvas de corrente elétrica em função da tensão aplicada (0 – 100 V), com recurso a um eletrómetro (Keithley 617). A resistência foi determinada a partir da aplicação direta da Lei de Ohm, de acordo com a **Equação 1**, em que  $V$  representa a tensão aplicada e  $I$  a corrente elétrica medida. Após a determinação da resistência foi determinada a resistividade ( $\rho$ ) de acordo com a **Equação 2**, em que  $A$  representa área da seção transversal (espessura do filme x comprimento) e  $l$  representa o comprimento da seção. A condutibilidade elétrica ( $\sigma$ ) foi determinada de acordo com a **Equação 3**.

$$R = \frac{V}{I} \quad \text{Equação 1}$$

$$\rho = \frac{R \cdot A}{l} \quad \text{Equação 2}$$

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad \text{Equação 3}$$

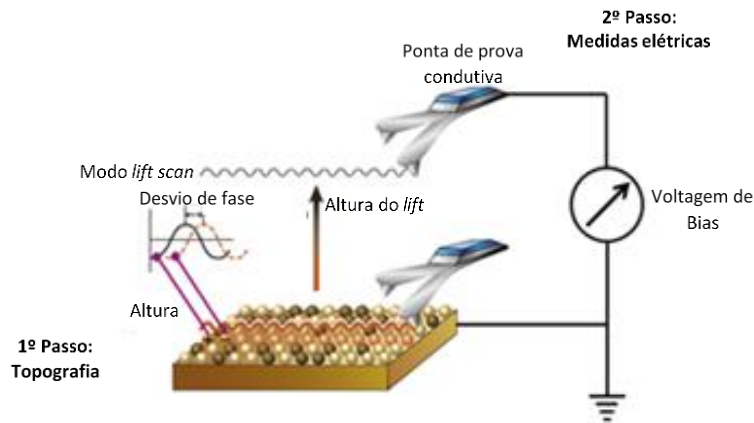
#### 7.6 Contribuição capacitiva e potencial de contacto da superfície

As medidas de microscopia de força eletrostática (EFM) foram realizadas num microscópio de força atómica (Nanoscope IIIa Multimode) equipado com um módulo de extensão eletrónico (Digital Instruments). Adicionalmente à imagem de topografia foram



adquiridas imagens de desfasamento de EFM, que foram utilizadas para calcular a contribuição capacitiva e potencial eletrostático da superfície. Estas imagens foram obtidas por varrimento da superfície a uma distância fixa entre a ponta de medida e a superfície de 20 nm, no modo *lift scan* (Figura 12).

A voltagem de Bias foi aplicada à superfície da amostra através da entrada *Analog 2*, incorporada apenas durante o modo *lift scan*. As pontas de prova utilizadas foram de silício altamente dopado tipo n<sup>+</sup> (Super-Sharp tips, Nanosensors), com um raio de curvatura da ponta de 2 nm e uma resistividade de 0,01-0,02  $\Omega/\text{cm}$ . Foram considerados varrimentos de 128X128 linhas para as diferentes voltagens de Bias na gama de -5 a 5 V (63).



**Figura 12.** Esquema representativo da técnica lift mode scan (63).

### 7.7 Cor

A cor dos filmes foi estudada através do método CIELab. O espectro de transmitância dos filmes selecionados foi adquirido entre 400 e 700 nm no espectrofotómetro de UV-Vis (Perkin Elmer Lambda 35) com uma esfera de integração. A determinação das coordenadas L\*, a\* e b\* foi efetuada com a fonte de luz D65 e posição de observação 10° (1964), tendo posteriormente sido convertidas na cor correspondente através do *software EasyRGB*. As medições para cada filme foram efetuadas em triplicado.

### 7.8 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%) e do filme quitosana-genipina, foi avaliada através de uma adaptação do método do ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS (64). Foi preparada uma solução de ABTS 7 mM em persulfato de potássio 2,45 mM, a qual ficou a reagir no escuro à temperatura ambiente durante 16 h para formação do catião radicalar ABTS<sup>•+</sup>. Diluiu-se 1 mL desta solução em 80 mL de etanol e mediu-se a absorvância a 745 nm num espectrofotómetro (Jenway 6405) tendo-se ajustado a absorvância entre 0,8 – 0,9. As amostras de filmes com 1 cm<sup>2</sup> foram colocadas em 3 mL desta solução, tendo permanecido a reagir no escuro à temperatura ambiente. A absorvância a 745 nm das soluções ABTS<sup>•+</sup> e da solução ABTS<sup>•+</sup> sem amostra foi medida ao longo do tempo. A atividade antioxidante foi avaliada através da percentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> pelos filmes através da **Equação 4**, onde *abs branco* representa a absorvância da solução ABTS<sup>•+</sup> sem amostra e *abs filme* representa a absorvância das soluções ABTS<sup>•+</sup> com amostra de filme.

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{\text{abs branco} - \text{abs filme}}{\text{abs branco}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

### 7.9 Humidade e solubilidade

A percentagem de humidade dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%) e do filme controlo foi calculada através da determinação do peso seco das amostras. Foram utilizadas cápsulas de vidro previamente colocadas na estufa a 105 °C durante 5 h e arrefecidas num exsiccador durante 1 h, nas quais foram colocadas amostras de filmes com 4 cm<sup>2</sup>. As cápsulas com as amostras foram pesadas e colocadas na estufa durante 16 h a 105 °C. Após atingirem a temperatura ambiente, as cápsulas com as amostras foram novamente pesadas e a percentagem de humidade foi determinada de acordo com a **Equação 5**, onde *m filme i* representa a massa do filme antes da secagem e *m filme f* representa a massa do filme após a secagem.

$$\% \text{ Humidade} = \left( \frac{m \text{ filme } i - m \text{ filme } f}{m \text{ filme } i} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Os testes de solubilidade dos filmes com concentrações extremas de material gráfitico (0,5% e 2%) e do filme quitosana-genipina, foram iniciados no mesmo dia em que foi determinada a percentagem de humidade de modo a garantir que não existiam variações de humidade atmosférica. As amostras de filme com 4 cm<sup>2</sup> foram pesadas e submersas em 30 mL de água durante 7 dias à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram colocadas na estufa a 105 °C durante 16 h ao fim das quais e após atingirem a temperatura ambiente foram novamente pesadas. Para determinar a solubilidade foram determinadas as massas inicial e final do filme seco através das **Equações 6 e 7**, onde *m inicial* representa a massa inicial do filme, *m final* representa a massa final do filme e a *% de humidade* representa a percentagem de humidade descrita no ponto anterior. Com estes dados foi calculada a solubilidade através da **Equação 8**.

$$m_{\text{filme } i \text{ seco}} = m_{\text{inicial}} \times \left( 100 - \left( \frac{\% \text{ humidade}}{100} \right) \right) \quad \text{Equação 6}$$

$$m_{\text{filme } f \text{ seco}} = m_{\text{final}} \times \left( 100 - \left( \frac{\% \text{ humidade}}{100} \right) \right) \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Solubilidade} = \left( \frac{m_{\text{filme } i \text{ seco}} - m_{\text{filme } f \text{ seco}}}{m_{\text{filme } i \text{ seco}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

### 7.10 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes selecionados foram avaliadas através de ensaios de tensão até à rutura de acordo com o método padrão ASTM D 882-83, num texturómetro (TA-HDi, Stable Micro Systems), através dos quais foram calculados a percentagem de deformação, tensão no ponto de rutura e módulo de Young. A percentagem de deformação corresponde à distância que o filme pode ser esticado até sofrer rutura (expresso em percentagem). A tensão no ponto de rutura indica a força que é necessária para puxar uma seção transversal do filme até sofrer rutura, expresso em megapascals (MPa). O módulo de Young é uma medida da elasticidade do filme e corresponde ao declive da zona linear da curva de força de tensão versus taxa de deformação sendo expresso em MPa. Os filmes foram colocados numa câmara com uma

solução saturada de nitrato de magnésio durante 48 h, sob condições controladas de humidade e temperatura,  $35 \pm 1,6$  e  $26$  °C, respetivamente. Posteriormente foi medida a espessura dos filmes com um micrómetro digital. Os filmes foram colocados no sistema de garras vertical do texturómetro, tendo-se deixado uma área de filme exposta de aproximadamente 5 cm. Os filmes foram submetidos a deformação extensional através da aplicação de uma taxa de deslocamento de 0,5 mm/s até à rutura da amostra. Os ensaios foram realizados à temperatura de  $26$  °C e humidade relativa de 36%, tendo sido testadas 6 amostras de cada tipo de filme.

### 7.11 Ângulo de contacto

Os ângulos de contacto entre a água ultrapura e os filmes foram determinados através do sistema de ângulos de contacto (OCA 20, Dataphysics). Os filmes foram previamente acondicionados numa câmara com uma solução saturada de nitrato de magnésio com condições controladas de humidade e temperatura durante 48 h. As gotas de água ultrapura com 3  $\mu$ L foram automaticamente doseadas com uma seringa, sendo a sua evolução após o contacto com o filme gravada com uma câmara associada ao sistema. O cálculo dos ângulos de contacto foi efetuado com recurso a *software* apropriado (SCA20\_M4, Dataphysics) através do método de elipse. Foram realizadas 9 determinações em cada filme.

### 7.12 Análise estatística

Os resultados dos testes de humidade, solubilidade, cor, propriedades mecânicas e ângulo de contacto foram avaliados estatisticamente através dos testes F e *t-student* (Microsoft Excel 2010), de modo a averiguar quais as amostras significativamente diferentes. As amostras foram consideradas significativamente diferentes quando o nível de significância  $p \leq 0,05$ .

## CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



## 1. Redução do óxido de grafeno

A redução do óxido de grafeno remove parcialmente os grupos funcionais com oxigénio presentes na sua estrutura restaurando a rede de carbonos  $sp^2$ , o que lhe confere novas propriedades como a condutibilidade elétrica (65). No presente trabalho, o óxido de grafeno sintetizado foi quimicamente reduzido com ácido L-ascórbico e ácido cafeico. Durante o processo de otimização foi testada a redução *in situ* do óxido de grafeno presente nos filmes e a redução do óxido de grafeno em solução.

### 1.1 Redução do óxido de grafeno *in situ*

Após a síntese dos filmes com 0,5 - 2% de óxido de grafeno, procedeu-se à otimização das condições de redução do óxido de grafeno *in situ*. Inicialmente foi avaliado o efeito da concentração de genipina na resistência dos filmes à reação de redução do óxido de grafeno *in situ* com ácido L-ascórbico (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Condições testadas para verificar a influência da concentração de genipina na resistência dos filmes à reação de redução.

Teste	GO (%)	Genipina (mg/mL)	L-AA (mg/mL)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
a)	1	-	0,25	24	ambiente
b)	0,5	0,025			
c)	0,75	0,025			
d)	0,5	0,5			

Mediante estas condições de redução verificou-se a solubilização total do filme sem genipina e a solubilização parcial dos restantes filmes. Deste modo, todos os filmes cujos resultados se apresentam a partir daqui foram preparados com 0,025% de genipina. Foi selecionada esta concentração intermédia por permitir o reforço da estrutura dos filmes através da reticulação da genipina, permitindo ainda que existam grupos amina livres para interagir com o óxido de grafeno. Verificou-se que entre os filmes com 0,025% de genipina, a solubilização foi mais acentuada no filme com menor concentração de óxido de grafeno (0,5%) (**Figura 13 a - b**). Dada a falta de resistência mecânica dos filmes à reação de redução com ácido L-ascórbico, foi necessário otimizar as condições de redução de modo a tentar ultrapassar esta limitação. Neste sentido, diminuiu-se o tempo da reação potenciando o efeito da redução através do aumento da temperatura. Assim

procedeu-se ao estudo da influência da temperatura nos filmes (**Tabela 3**), tendo-se verificado que este fator não afeta a integridade dos filmes (**Figura 13 e**).

**Tabela 3.** Condições testadas para verificar a influência da temperatura no filme GO 1%.

Teste	GO (%)	L-AA (mg/mL)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
e)	1	0	1	90

De acordo com estes resultados e sabendo através dos testes iniciais que o aumento da concentração de óxido de grafeno nos filmes poderá aumentar a sua resistência mecânica à reação, testou-se a influência do tempo de reação na redução do filme com 1% de óxido de grafeno (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Condições testadas para verificar a influência do tempo da reação de redução no filme GO 1%.

Teste	GO (%)	L-AA (mg/mL)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
f)	1	1	1	90
g)			0,5	

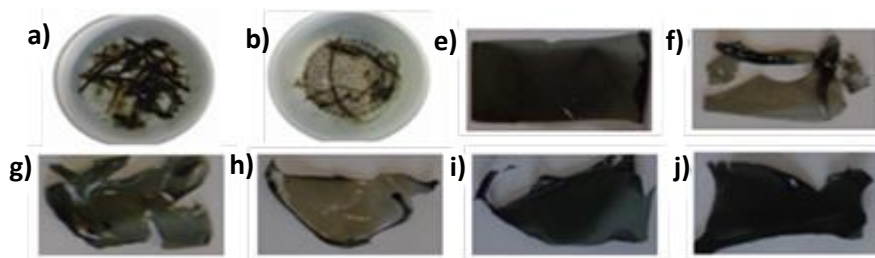
Após este teste verificou-se que os filmes se apresentavam muito quebradiços independentemente do tempo de reação (**Figura 13 f – g**). Deste modo, testou-se uma menor concentração de ácido L-ascórbico e o aumento da concentração de óxido de grafeno presente nos filmes (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Condições testadas para verificar a influência do aumento da concentração de GO na resistência dos filmes à reação de redução.

Teste	GO (%)	L-AA (mg/mL)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
h)	1	0,25	0,5	90
i)	1,25			
j)	1,50			

Verificou-se que os filmes não solubilizaram quando submetidos às condições acima referidas (**Figura 13 h – j**). No entanto, todos os filmes se apresentavam muito quebradiços e sem um aumento de condutibilidade elétrica significativo após a redução (resultados não apresentados).





**Figura 13.** Imagens dos filmes correspondentes aos testes descritos nas **Tabelas 2 – 5**. A numeração das imagens nesta figura corresponde à numeração dos testes (a negrito) presente nas tabelas.

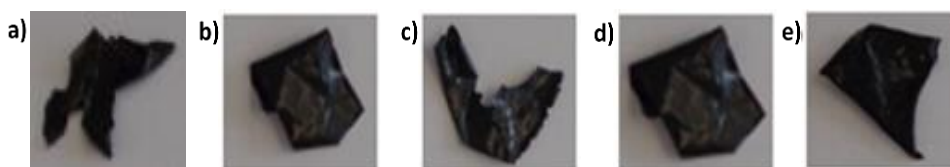
De acordo com a literatura, a presença de ácido L-ascórbico pode induzir a degradação dos filmes, uma vez que este ácido promove a clivagem das ligações glicosídicas da quitosana por mecanismos oxidativos. A oxidação do anião ascorbato em solução é acompanhada pela formação de aniões superóxido como intermediário, que coexistem em equilíbrio com radicais hidroperóxidos, que reagem com a quitosana através da abstração de um próton ou pela formação de hidroperóxidos, promovendo a sua solubilização (66).

A redução do óxido de grafeno *in situ* com ácido L-ascórbico não foi bem sucedida devido a comprometer a integridade dos filmes e a não promover o aumento da condutibilidade elétrica. De acordo com os resultados, pode-se concluir que os filmes com maiores concentrações de óxido de grafeno são mais resistentes às condições de redução. Face a estes dados, optou-se por tentar reduzir o óxido de grafeno *in situ* presente nos filmes com maiores concentrações de óxido de grafeno (1 – 2%), utilizando o ácido cafeico como agente redutor (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Condições de redução testadas nas reações de redução dos filmes GO 1 – 2% com ácido cafeico.

Teste	GO (%)	CA (mg/mL)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
<b>a)</b>	-	0,3	24	95
<b>b)</b>	1			
<b>c)</b>	1,25			
<b>d)</b>	1,50			
<b>e)</b>	2			

Após a reação de redução, os filmes não solubilizaram, mas ficaram bastante quebradiços após a secagem. Independentemente da sua cor inicial, todos os filmes ficaram pretos após a reação, inclusive o filme quitosana-genipina sem óxido de grafeno (**Figura 14 a – e**).



**Figura 14.** Imagens dos filmes GO 1 – 2% após as reações de redução realizadas nas condições apresentadas na **Tabelas 6**. A numeração das imagens nesta figura corresponde à numeração dos testes presente na tabela.

À semelhança da redução do óxido de grafeno *in situ* com ácido L-ascórbico, estes filmes também não apresentaram um aumento significativo da condutibilidade elétrica (resultados não apresentados). Estes dados permitem inferir que as alterações colorimétricas poderão surgir devido à ocorrência de ligações entre o ácido cafeico e a quitosana-genipina. De acordo com a literatura, são utilizadas enzimas como a peroxidase, tirosinase ou lacase para promover a ligação entre o ácido cafeico e a quitosana. Estas enzimas oxidam o ácido cafeico formando espécies reativas como *orto*-quinonas que posteriormente reagem com os grupos amina da quitosana. Neste caso, estas espécies reativas podem estar em solução devido à oxidação do ácido cafeico após a redução do óxido de grafeno e terem reagido com a quitosana, alterando a cor dos filmes para preto (67,68). Outra hipótese pode ser a ocorrência da reação de desidratação do polímero quitosana-genipina catalisada pelo ácido cafeico e que originaria a carbonização do filme à semelhança do que ocorre à sacarose na presença de ácido sulfúrico concentrado. Para confirmar e verificar se seria fácil formar óxido de grafeno reduzido, procedeu-se à pirólise do filme quitosana-genipina e do filme com 2% de óxido de grafeno, ambos tratados com ácido cafeico (**Tabela 7**).

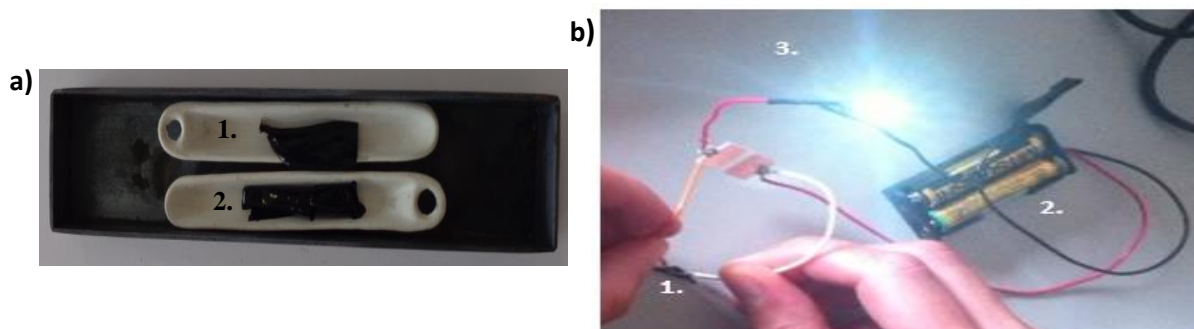
**Tabela 7.** Condições de pirólise às quais foram submetidos os filmes Q/G e GO 2%, após terem sido submetidos às condições de redução da **Tabela 6**.

Teste de redução	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Atmosfera
a)	900	2	N <sub>2</sub>
e)			

Após a pirólise, os filmes mantiveram a integridade da sua estrutura mas apresentavam-se muito quebradiços, fragmentando-se durante o manuseamento (**Figura 15 a**). No entanto, tanto o filme quitosana-genipina como o filme com 2% de óxido de

grafeno apresentaram condutibilidade elétrica (resultados não apresentados), sendo possível integrá-los no circuito de uma lâmpada LED permitindo que esta acendesse (**Figura 15 b**). Os filmes apresentaram condutibilidade elétrica após a pirólise, provavelmente devido à degradação térmica da estrutura da quitosana e sua conversão em carbono (69). Seria necessário avaliar as amostras por FTIR e Raman para avaliar a estrutura dos filmes após a pirólise, bem como a influência do pré-tratamento com ácido cafeico na estrutura final.

Durante todo o processo de otimização da redução *in situ*, surgiram dificuldades em manter a integridade da estrutura dos filmes e em conseguir um aumento da condutibilidade elétrica. Apesar de a pirólise ser uma estratégia eficaz para conferir condutibilidade elétrica aos filmes, estes ficaram demasiado rígidos e quebradiços para poderem ser utilizados em embalagem alimentar. No entanto, a pirólise poderá ser uma boa estratégia para produzir fibras de carbono. Face às dificuldades que surgiram durante todo este processo, concluiu-se que a redução do óxido de grafeno *in situ* não é uma estratégia viável. Assim, foi definida uma nova estratégia. Procedeu-se à redução do óxido de grafeno em solução, sendo o óxido de grafeno reduzido posteriormente adicionado à solução de quitosana durante a preparação dos filmes.



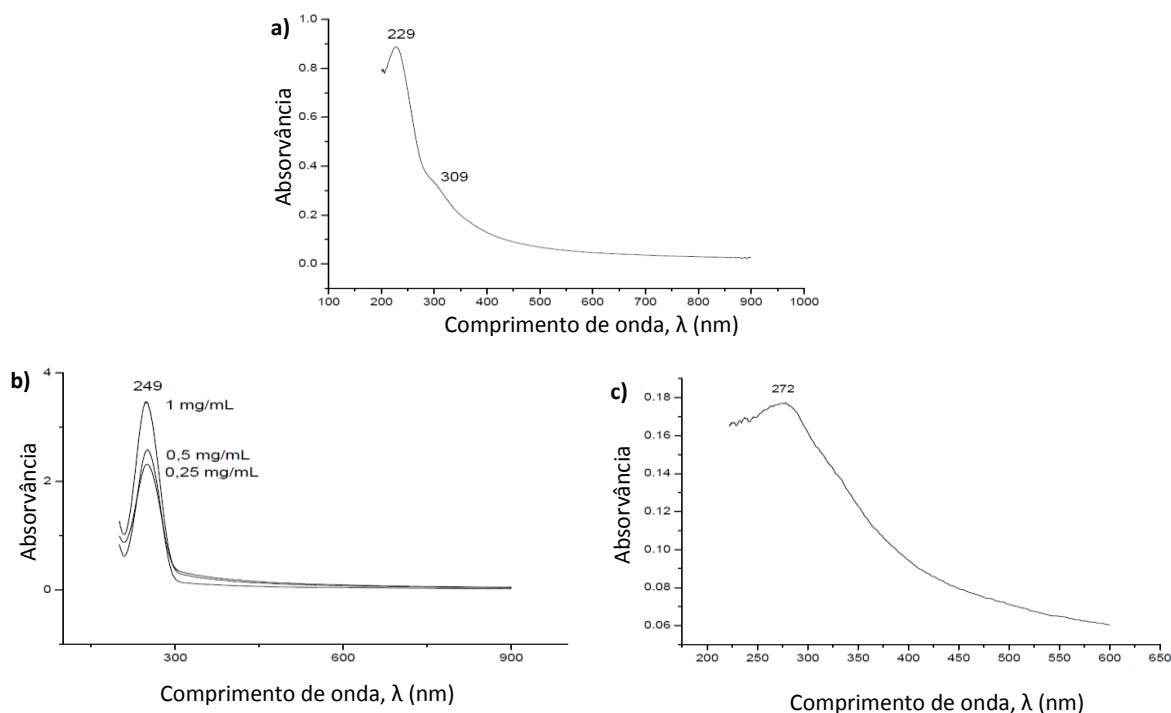
**Figura 15. a)** Filmes após serem submetidos à reação de pirólise nas condições da **Tabela 7**: **1.** Filme Q/G. **2.** Filme GO 2%. **b)** Filme GO 2% integrado no circuito de uma lâmpada LED: **1.** Filme GO 2% após ter sido submetido às condições de reação apresentadas na **Tabela 7** e pirolisado; **2.** Baterias; **3.** Lâmpada LED acesa.

### 1.2 Redução do óxido de grafeno em solução

A redução do óxido de grafeno com ácido L-ascórbico e ácido cafeico foi acompanhada por espectrofotometria de UV-Vis (**Figura 16**). O espectro da solução de óxido de grafeno apresenta um pico de absorção a 229 nm e um “ombro” a 309 nm (**Figura 16 a**). Este espectro está de acordo com a literatura, pois o espectro de absorção

característico do óxido de grafeno apresenta um pico intenso a aproximadamente 230 nm e um “ombro” a aproximadamente 310 nm (70). O pico de maior intensidade corresponde a transições  $\pi$ - $\pi^*$  e o “ombro” corresponde a transições  $n$ - $\pi^*$  (71).

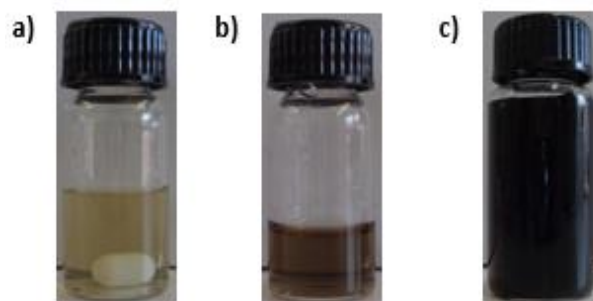
Após a reação de redução com ácido L-ascórbico ocorreu um deslocamento do pico de absorvância característico do óxido de grafeno a 229 nm para 249 nm. Verifica-se que a utilização de diferentes concentrações de ácido L-ascórbico (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL ou 1 mg/mL) não provocou o deslocamento do pico para diferentes comprimentos de onda, observando-se apenas diferentes intensidades de absorvância devido às diferentes concentrações das soluções (**Figura 16 b**). Após a reação de redução com ácido cafeico ocorreu um deslocamento do pico característico do óxido de grafeno para 272 nm (**Figura 16 c**). O comprimento de onda ao qual surge o pico de absorvância do óxido de grafeno reduzido pelo ácido cafeico está de acordo com o que se encontra descrito na literatura (54). No entanto, a redução com ácido L-ascórbico poderá não ter sido completa, pois de acordo com um estudo realizado em condições semelhantes às deste trabalho, a redução provoca o deslocamento do pico de absorção característico do óxido de grafeno para 264 nm (52). A reação de redução ocorreu à temperatura ambiente, uma vez que na literatura se encontra descrita a sua eficácia nestas condições (52). No entanto, a utilização de temperaturas entre os 80 – 95 °C poderia aumentar o grau de redução (48,72). Apesar de se saber que a redução com ácido L-ascórbico poderá não ter sido completa, não se tentou aumentar o grau de redução do óxido de grafeno através do aumento da temperatura, para posteriormente se verificar se a presença de mais grupos com oxigénio permitiam um aumento da eficácia da interação entre a quitosana e o óxido de grafeno. O pico de absorção característico do óxido de grafeno a 230 nm sofre um deslocamento para comprimentos de onda mais elevados, como resultado do restabelecimento da rede  $sp^2$ . Deste modo, quanto maior a extensão do restabelecimento da rede  $sp^2$ , mais evidente é o deslocamento deste pico para maiores comprimentos de onda, pelo que este é um parâmetro a partir do qual é possível comparar a eficácia de diversos agentes redutores (50). Deste modo, conclui-se que o ácido cafeico é um agente redutor mais eficaz do que o ácido L-ascórbico.



**Figura 16.** Espectros de absorção UV-Vis. **a)** Solução GO 0,1 mg/mL. **b)** Soluções RGO\_AA 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. **c)** Solução RGO\_CA 0,1 mg/mL.

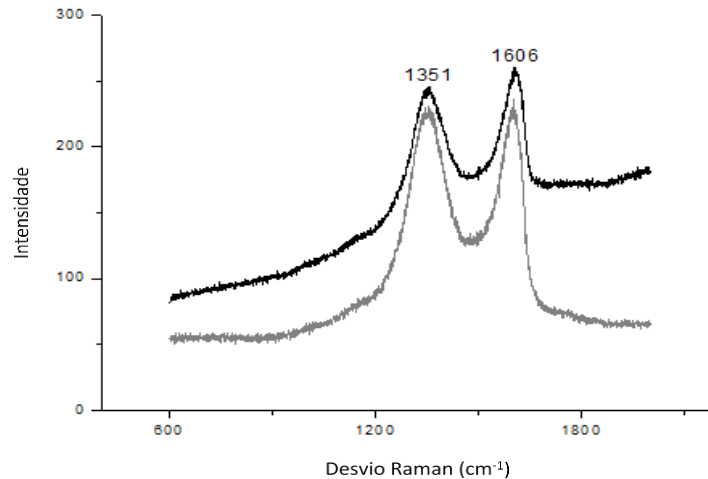
As soluções aquosas de óxido de grafeno reduzido não apresentaram a formação de aglomerados visíveis a olho nu após a sua preparação, mantendo-se estáveis durante várias semanas, sem a adição de agentes estabilizantes (**Figura 17**). Verificou-se que tanto as soluções de óxido de grafeno reduzido com ácido ascórbico como com ácido cafeico se mantêm estáveis. No entanto, enquanto as soluções de óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico se mantiveram estáveis durante mais de um mês, as soluções de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico apenas se mantiveram estáveis durante duas semanas. De acordo com a literatura, o mecanismo de estabilização do óxido de grafeno reduzido com ácido L-ascórbico tem origem nos produtos resultantes da sua oxidação. Após a desprotonação do ácido L-ascórbico é formado ácido desidroascórbico, que posteriormente pode ser convertido em ácido oxálico ou gulurónico. Estes ácidos formam ligações de hidrogénio com os grupos funcionais com oxigénio que permanecem à superfície do óxido de grafeno após a redução, quebrando as interações  $\pi - \pi$  entre as folhas de óxido de grafeno reduzido e evitando assim a sua aglomeração (52). Assim, a utilização do ácido L-ascórbico como agente redutor dispensa a utilização de agentes

estabilizantes, que devido à sua toxicidade poderiam comprometer a aplicação do óxido de grafeno reduzido nos bionanocompósitos para embalagem alimentar.



**Figura 17.** a) Solução GO 0,1 mg/mL antes da redução. b) Solução RGO\_AA após a redução. c) Solução RGO\_CA após a redução.

A redução do óxido de grafeno com ácido L-ascórbico foi acompanhada por espectroscopia de Raman (**Figura 18**). Devido a limitações na disponibilidade do equipamento não foi possível confirmar a redução do óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico através desta técnica. Os espectros de Raman do óxido de grafeno e do óxido de grafeno reduzido com ácido L-ascórbico apresentam duas bandas a  $1351\text{ cm}^{-1}$  e a  $1606\text{ cm}^{-1}$ . Os materiais gráfiticos apresentam duas bandas características em Raman, a banda D a aproximadamente  $1330 - 1340\text{ cm}^{-1}$  e a banda G a aproximadamente  $1580 - 1600\text{ cm}^{-1}$  (60). A banda D resulta das imperfeições estruturais presentes no óxido de grafeno tais como os grupos hidroxilos ou epóxidos. A banda G resulta dos domínios  $sp^2$  dos carbonos presentes na estrutura do óxido de grafeno (48). Após a redução do óxido de grafeno ocorre um aumento da razão das intensidades das bandas D e G ( $I_D/I_G$ ) de 1,7 para 1,94. O aumento de  $I_D/I_G$  após a redução encontra-se bem descrito na literatura, estando relacionada com a criação de novos domínios com tamanho médio inferior ao tamanho dos domínios pré-existentes (47,60,65,73). Apesar de os domínios  $sp^2$  apresentarem menos defeitos após a redução, devido à diminuição do seu tamanho médio e à permanência de alguns defeitos estruturais, verifica-se o aumento da razão de  $I_D/I_G$  (45). Estes resultados de espectroscopia de Raman não são suficientes para concluir que o óxido de grafeno foi eficazmente reduzido pelo ácido L-ascórbico. Seria necessário comprovar a redução do óxido de grafeno com outras técnicas como espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS).



**Figura 18.** Espectro de Raman do GO (preto) e do RGO\_AA (cinzento).

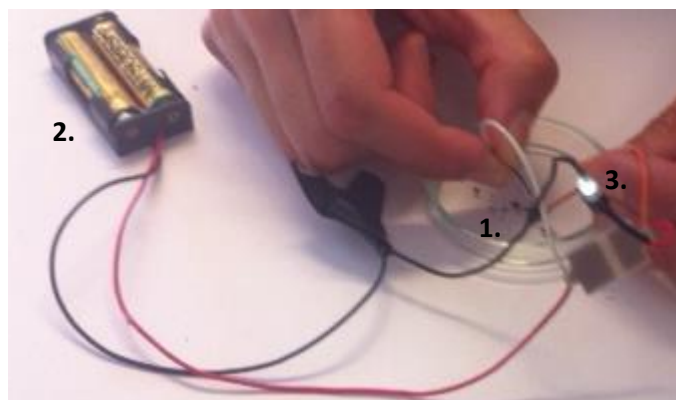
## 2. Otimização da preparação dos filmes

Após se ter concluído que a redução *in situ* do óxido de grafeno não era uma estratégia adequada para o tipo de filmes desenvolvidos neste trabalho, optou-se por reduzir o óxido de grafeno com ácido cafeico ou ácido L-ascórbico previamente à sua adição à solução de quitosana durante a preparação dos filmes. Paralelamente foi produzido outro tipo de filmes, tendo sido adicionadas nanofibras de carbono à solução de quitosana. Visto que após a redução do óxido de grafeno *in situ* as amostras não apresentaram condutibilidade elétrica, a preparação dos filmes com nanofibras grafitizadas teve por objetivo descartar que a fraca condutibilidade elétrica dos filmes com óxido de grafeno reduzido tivesse origem na redução do óxido de grafeno, uma vez que as nanofibras não necessitam de ser reduzidas para apresentarem condutibilidade elétrica. Assim, este filme serviu como controlo positivo em relação à adição de óxido de grafeno reduzido.

Inicialmente a preparação dos filmes consistiu na adição das soluções de óxido de grafeno reduzido à solução de quitosana. Porém, surgiram dificuldades em dispersar as soluções somente através de agitação magnética, uma vez que o óxido de grafeno reduzido aglomerava, pelo que as soluções foram tratadas com ultrassons. Apesar de os tratamentos com ultrassons melhorarem consideravelmente a homogeneização das soluções, de acordo com a literatura, os tratamentos prolongados quebram as cadeias de quitosana (74). Assim, o procedimento selecionado para a preparação dos filmes consistiu

na adição de óxido de grafeno reduzido ou nanofibras de carbono à solução de ácido acético, previamente à dissolução da quitosana, o que aparentemente promovia a homogeneização da solução com maior eficácia. Ao adotar esta estratégia, surgiu a necessidade de suprimir o passo de filtração da solução de quitosana, para que não ocorressem perdas de material gráfitico, pelo que os filmes apresentam algumas impurezas provenientes da quitosana.

A condutibilidade elétrica dos filmes aumenta proporcionalmente à concentração de material gráfitico (75). Consequentemente, o filme torna-se opaco, ficando completamente preto a partir de determinadas concentrações. Como os filmes preparados neste trabalho se destinam a embalagens alimentares, pretendeu-se que estes fossem o mais translúcidos possível. Assim, tentou-se encontrar um compromisso entre as concentrações de óxido de grafeno reduzido para a atribuição de condutibilidade elétrica aos filmes e a sua transparência. Deste modo, os filmes caracterizados tinham concentrações de 0,5%, 1%, 1,5% ou 2% de óxido de grafeno reduzido com ácido L-ascórbico ou ácido cafeico. Paralelamente prepararam-se filmes com as mesmas concentrações de nanofibras de carbono comerciais, para comparação, tendo sido verificada a sua condutibilidade elétrica antes da utilização. À semelhança dos filmes quitosana-genipina e do filme com 2% de óxido de grafeno após a pirólise, também foi possível integrar as nanofibras de carbono no circuito da lâmpada LED, permitindo que esta acendesse (**Figura 19**).



**Figura 19.** CNF integradas no circuito de uma lâmpada LED. 1. CNF; 2. Baterias; 3. Lâmpada LED acesa.



### 3. Caraterização dos filmes selecionados

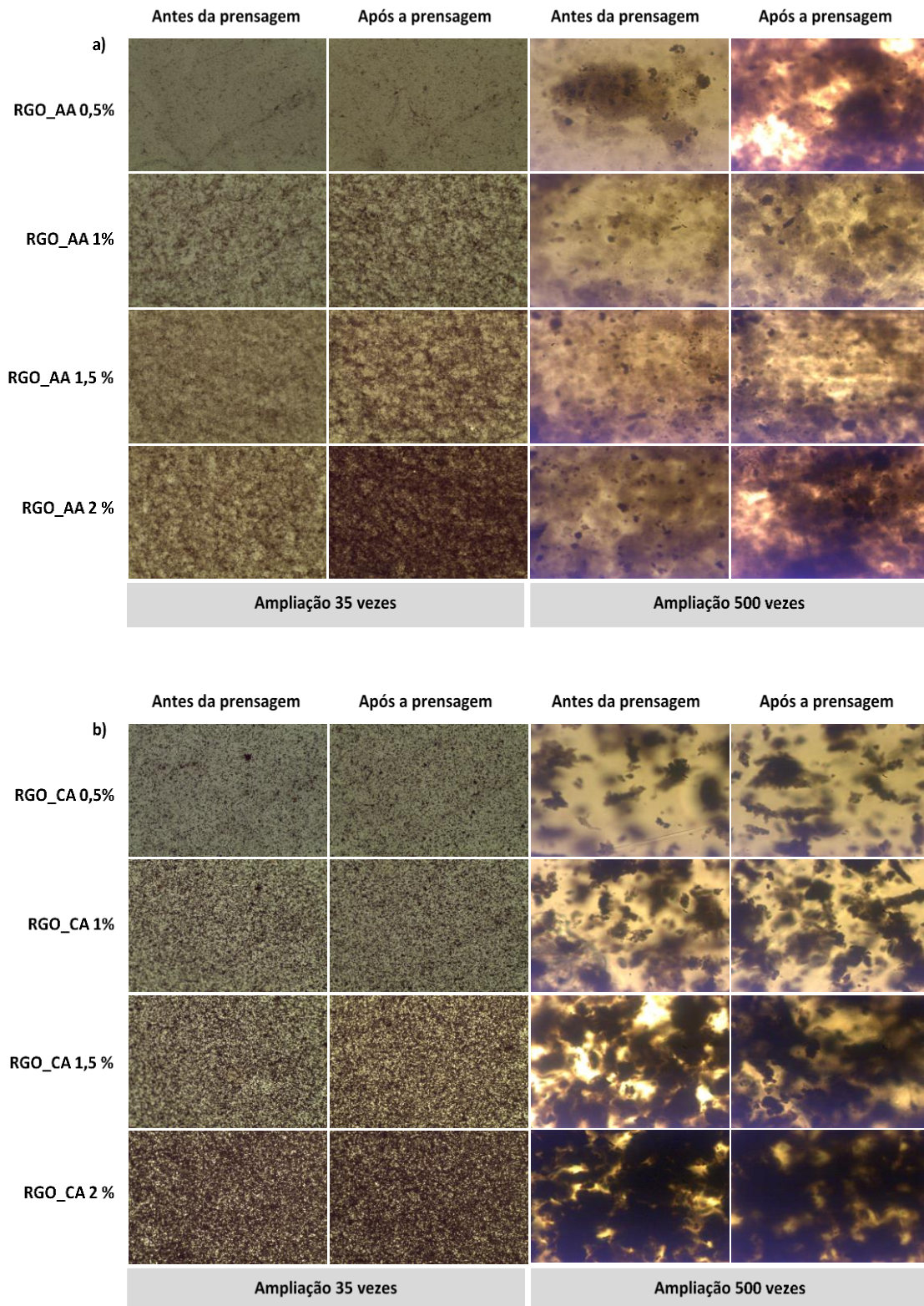
#### 3.1 Caraterização estrutural

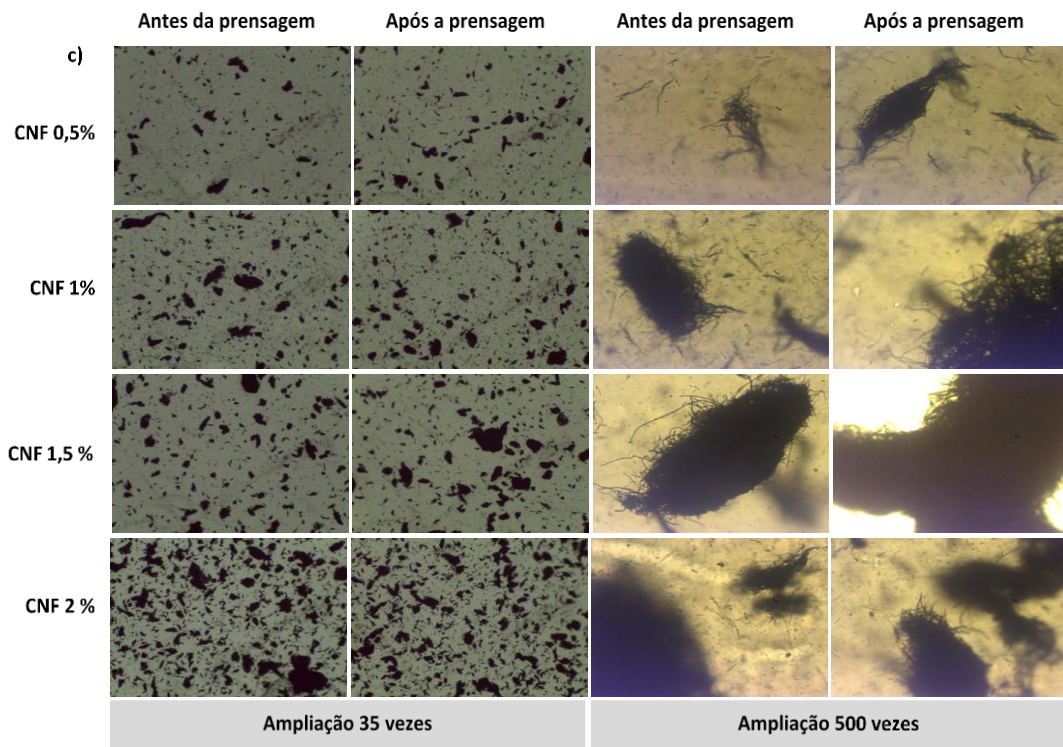
A dispersão do material grafítico na matriz de quitosana-genipina é um fator que pode influenciar todas as propriedades físicas e químicas dos filmes. Assim, os filmes foram observados ao microscópio ótico antes e após a prensagem, o que permitiu obter uma avaliação global sobre este parâmetro (**Figura 20**). Através destas imagens é possível observar que o material grafítico se encontra disperso de forma heterogénea. Porém, existem diferenças notórias entre a dispersão do material grafítico nos diferentes tipos de filmes. Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico (**Figura 20 a**) são caracterizados por variações graduais da densidade de óxido de grafeno reduzido disperso na matriz quitosana-genipina. É possível identificar zonas escuras correspondentes aos aglomerados de óxido de grafeno reduzido, zonas de cor intermédia nas quais o óxido de grafeno reduzido se encontra disperso e zonas claras correspondentes à quitosana-genipina com baixa densidade de óxido de grafeno reduzido. O aumento da concentração de óxido de grafeno reduzido traduz-se na intensificação da sua densidade nas diversas zonas.

Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico (**Figura 20 b**) apresentam zonas escuras correspondentes aos aglomerados de óxido de grafeno reduzido e zonas claras correspondentes à quitosana-genipina. Ao contrário dos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico, estes filmes não apresentam zonas de densidade intermédia, o que poderá estar relacionado com o facto de a suspensão do óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico se manter mais estável do que a suspensão de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico. Através destas imagens verifica-se que os filmes apresentam mais aglomerados de óxido de grafeno reduzido e por consequência são filmes mais heterogéneos do que os filmes com óxido de grafeno reduzido com ácido L-ascórbico. Verifica-se ainda que o aumento da concentração de óxido de grafeno reduzido se traduz no aumento do tamanho e da frequência dos aglomerados.

Os filmes com nanofibras de carbono (**Figura 20 c**) apresentam grandes aglomerados de nanofibras e zonas com muito baixa densidade de nanofibras, não

apresentando zonas com densidade intermédia, sendo o tipo de filme mais heterogéneo entre os filmes selecionados. O aumento da concentração de nanofibras traduz-se no aumento do tamanho os aglomerados.



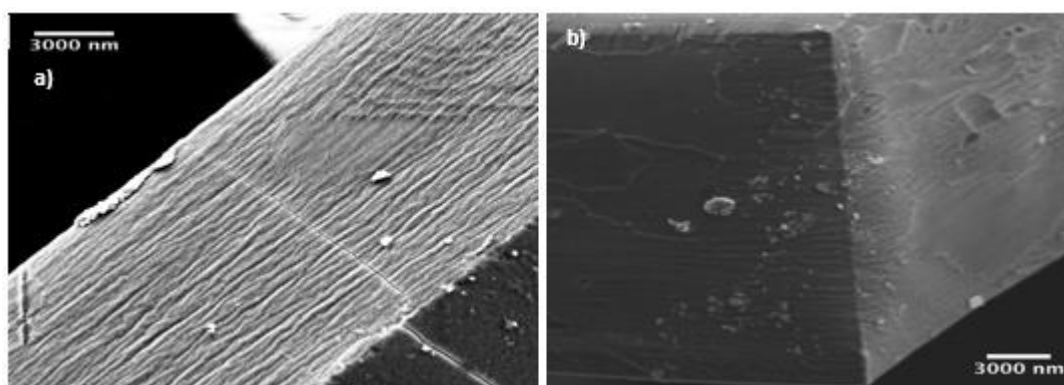


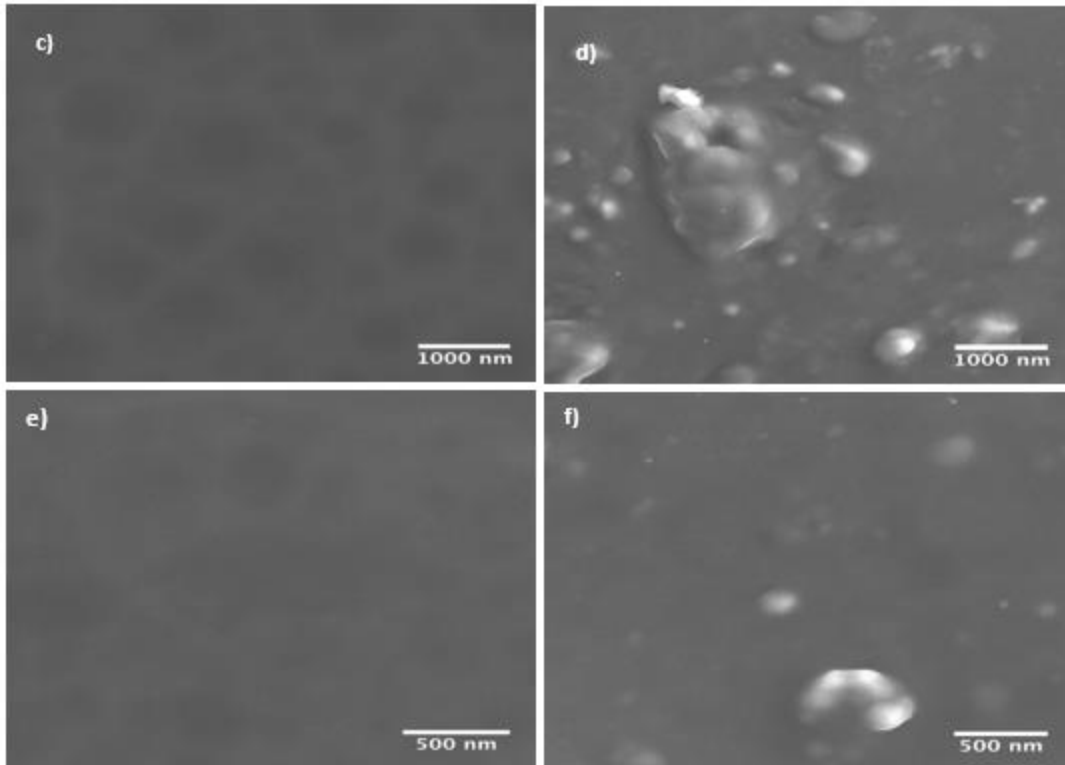
**Figura 20.** Fotografias de microscopia ótica. Imagens nas colunas à esquerda - ampliação total de 35 vezes; imagens nas colunas à direita - ampliação total de 500 vezes. **a)** Filmes RGO\_AA. **b)** Filmes RGO\_CA. **c)** Filmes CNF.

Os filmes foram prensados com o objetivo de alinhar o material gráfico, no entanto através destas imagens óticas não são visíveis diferenças nos filmes antes e após a prensagem. A dispersão homogénea do óxido de grafeno em filmes de quitosana em condições semelhantes às deste trabalho encontra-se descrita na literatura (76,77). No entanto, o óxido de grafeno apresenta mais grupos funcionais do que o óxido de grafeno reduzido, o que permite uma melhor interação com a quitosana e consequentemente uma melhor dispersão. A formação de aglomerados pelo material gráfico na quitosana poderá dever-se à fraca interação entre estes. Deste modo, seria necessário adequar o procedimento de preparação dos filmes. Na literatura encontra-se reportado o aumento da temperatura de reação ou a adição de copolímeros estabilizantes como estratégias para melhorar a dispersão (44,75). Num estudo recente, o procedimento de preparação de nanocompósitos de quitosana e óxido de grafeno reduzido consistiu em misturar uma solução de quitosana com uma solução de óxido de grafeno, aumentar a temperatura de reação para promover a interação e reduzir quimicamente o óxido de grafeno já na

solução. Neste caso, a própria quitosana funciona como agente estabilizante do óxido de grafeno reduzido pois atua como agente surfactante catiónico, separando as folhas de óxido de grafeno reduzido, pelo que a solução se mantém estabilizada sem a formação de aglomerados (72).

Após se ter verificado que os materiais gráfiticos se encontram heterogeneamente dispersos na matriz quitosana-genipina, recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (SEM) para avaliar com maior detalhe a morfologia dos filmes. O filme quitosana-genipina e o filme com 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico foram os filmes selecionados para esta avaliação (**Figura 21**). A secção transversal do filme quitosana-genipina (**Figura 21 a**) tem uma aparência estriada o que de acordo com a literatura poderá ser devido a um processo de agregação das próprias cadeias da quitosana (78). No entanto, a sua superfície é completamente lisa (**Figura 21 b - c**). As imagens da superfície do filme com óxido de grafeno reduzido, mostram que este se encontra em aglomerados que sobressaem de forma proeminente à superfície do filme (**Figura 21 d - f**). Estes resultados confirmam a dispersão heterogénea do material gráfitico na matriz quitosana-genipina. Na literatura encontra-se bem descrita a dispersão homogénea dos materiais gráfiticos na quitosana, sendo possível observar o alinhamento unidirecional dos materiais gráfiticos paralelamente ao filme o que consequentemente origina filmes com superfícies relativamente lisas (79,80).

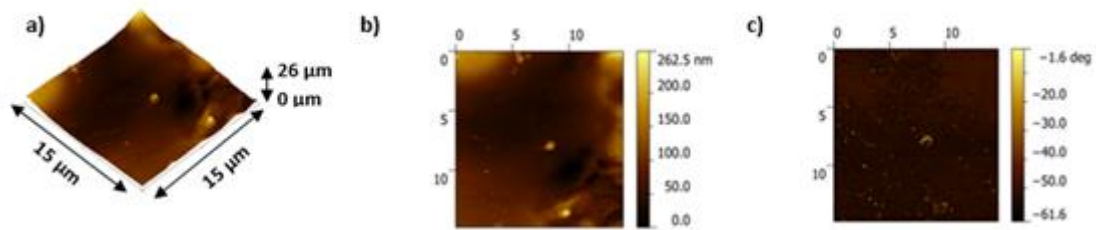




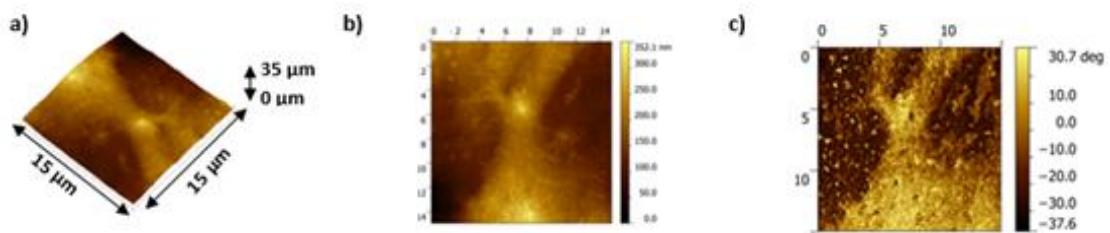
**Figura 21.** **a)** Secção transversal do filme Q/G. **b)** Secção transversal do filme RGO\_CA 2%. **c) - e)** Superfície do filme Q/G. **d) - f)** Superfície do filme RGO\_CA 2%.

Os dados anteriores foram complementados com informações sobre a rugosidade e espessura das amostras, tendo-se estudado a topografia dos filmes através de microscopia de força atómica (AFM). O filme com 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico foi selecionado para o efeito, tendo sido avaliada a sua topografia antes da prensagem (**Figura 22**) e após a prensagem (**Figura 23**). As imagens 3D (**Figura 22 a**, **Figura 23 a**) e 2D (**Figura 22 b**, **Figura 23 b**) fornecem informações sobre a altura das diferentes zonas da amostra enquanto as imagens de variação de fase (**Figura 22 c**, **Figura 23 c**) fornecem informações qualitativas sobre a dureza das diferentes regiões. A rugosidade quadrática média do filme é de 180.9 nm antes da prensagem e de 137.5 nm após a prensagem do filme. Tal como está representado nas imagens, a amostra tem 26  $\mu\text{m}$  de altura antes da prensagem e 35  $\mu\text{m}$  após a prensagem, pelo que apresenta uma altura consideravelmente maior após a prensagem. À primeira vista estes dados parecem ser contraditórios. No entanto é de salientar que estas imagens correspondem a apenas uma área de 15 x 15  $\mu\text{m}$  e sabendo que os filmes são heterogéneos, estas áreas não representam todo o filme. Provavelmente a área avaliada no filme antes da prensagem é

uma região maioritariamente constituída por quitosana-genipina enquanto a região do filme avaliada após a prensagem poderá ser constituída pela mistura de quitosana-genipina e óxido de grafeno reduzido. Estes resultados constituem mais uma evidência da elevada heterogeneidade dos filmes, verificando-se que o óxido de grafeno reduzido se encontra em aglomerados, não sendo possível distinguir com clareza as folhas de óxido de grafeno reduzido ao contrário do que se encontra descrito na literatura (81,82).



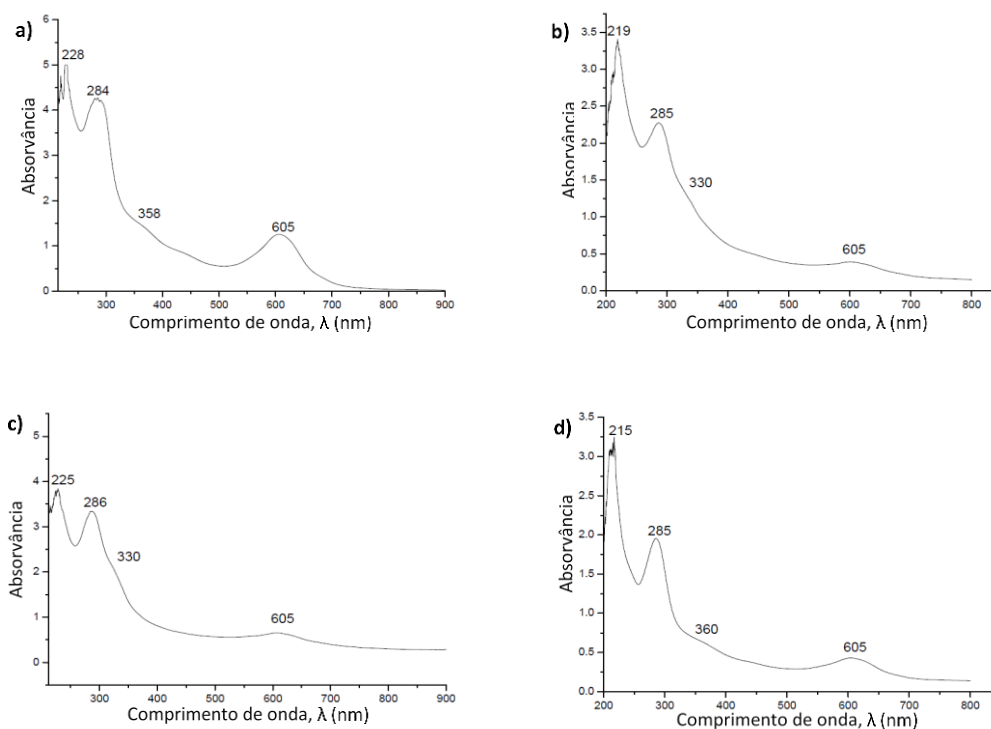
**Figura 22.** Imagens de topografia do filme RGO\_CA 2%. **a)** Imagem 3D. **b)** Imagem 2D. **c)** Imagem de fase.



**Figura 23.** Imagens de topografia do filme RGO\_CA 2% após a prensagem. **a)** Imagem 3D. **b)** Imagem 2D. **c)** Imagem de fase.

Após a avaliação da morfologia dos filmes, procedeu-se à caracterização da sua estrutura química. Recorreu-se à espectrofotometria de UV-Vis para detetar evidências da ligação dos materiais gráfiticos à quitosana (**Figura 24**). Os espectros dos filmes com concentração de material gráfitico superior a 0,5% não são aqui apresentados porque têm intensidades de absorção muito elevadas, provocadas pelo aumento da concentração de material gráfitico e consequente escurecimento dos filmes. Todos os filmes apresentam espectros de absorção semelhantes, com picos de absorção entre 215 – 219 nm e entre 284 – 286 nm, um “ombro” entre 330 – 360 nm e um pico bem definido a 605 nm. O pico que surge entre 284 – 286 nm é causado pelo composto de amina heterocíclico que resulta da ligação da genipina à quitosana (83). O “ombro” que é visível

entre 330 – 360 nm ocorre devido às ligações amida entre a quitosana e a genipina e o pico de absorção a 605 nm presente em todos os filmes corresponde ao pigmento azul formado pela ligação da genipina à quitosana (84). Aparentemente, todos os picos de absorção são causados pelas interações entre a genipina e a quitosana.



**Figura 24.** Espectros de absorção UV-Vis. **a)** Filme Q/G. **b)** Filmes RGO\_AA 0,5%. **c)** Filmes RGO\_CA 0,5% **d)** Filmes CNF 0,5%.

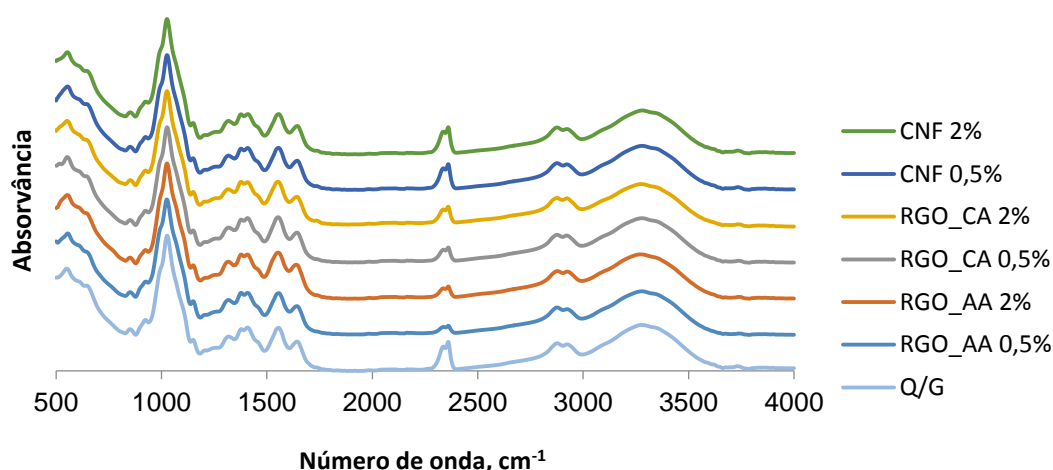
O óxido de grafeno apresenta um pico de absorvância a aproximadamente 230 nm, devido às transições  $\pi - \pi^*$  e a quitosana apresenta um pico de absorvância a aproximadamente 250 nm, devido às transições  $n - \sigma^*$  dos grupos amina. Ao incorporar o óxido de grafeno na quitosana, ocorre um pico único entre 270 - 320 nm devido às interações entre ambos. Após a introdução da genipina verifica-se o deslocamento deste pico para aproximadamente 370 nm devido à conversão dos grupos amina primários da quitosana em ligações amida secundárias entre a quitosana e a genipina (84,85). Neste trabalho está presente o óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico que apresenta um pico a 249 nm e o óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico com um pico de absorção a 272 nm, pelo que continuam a ter um espectro de absorção semelhante ao da quitosana (86). O pico correspondente à interação entre os materiais gráfiticos e a

quitosana poderá ser o “ombro” a 330 nm, atribuído às ligações amida entre a quitosana e a genipina. No entanto, este ocorre ao mesmo comprimento de onda nos espectros dos diferentes filmes e sabe-se que o óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico e por ácido cafeico ocorrem a comprimentos de onda distintos. Deste modo, a partir de espectrometria de UV-Vis não é possível retirar conclusões sobre as interações entre a quitosana e o óxido de grafeno. Para que tal fosse possível, seria necessário fazer o espectro de absorvância da quitosana após a adição dos materiais gráfiticos e após a adição da genipina, separadamente.

Os espectros de FTIR do filme quitosana-genipina e dos filmes com concentrações extremas de material gráfitico (RGO e CNF 0,5 e 2%) foram feitos para tentar compreender o tipo de interações entre a quitosana e os materiais gráfiticos (**Figura 25**). Os espectros do filme quitosana-genipina e dos filmes com material gráfitico apresentam bandas semelhantes. As bandas entre  $882 - 1175 \text{ cm}^{-1}$  são causadas pelo estiramento C-O e C-O-C e pelas ligações glicosídicas. As bandas a  $1327 \text{ cm}^{-1}$  e  $1398 \text{ cm}^{-1}$  resultam da deformação angular de N-H e do acoplamento do estiramento axial de C-N. A banda a  $1550 \text{ cm}^{-1}$  é causada pelas vibrações da amida II e a banda a  $1632 \text{ cm}^{-1}$  é causada pelas vibrações da amida I. A banda a  $2898 \text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento axial das ligações C-H e a banda ampla entre  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  é devida ao estiramento axial das ligações O-H e N-H (87,88).

De acordo com a literatura, tanto a ligação do óxido de grafeno reduzido como da genipina à quitosana podem ser comprovadas através das bandas referentes às vibrações das ligações amida I e amida II e através das bandas referentes ao estiramento das ligações H-C-H e C-H (84,86,89). A introdução dos materiais gráfiticos não provocou alterações ao espectro do filme quitosana-genipina, o que pode ser devido ao facto de bandas coincidirem ou ao facto de os espectros da quitosana e do bionanocompósito de quitosana e óxido de grafeno reduzido serem muito semelhantes (90). A falta de resultados inequívocos que evidenciem as interações entre os materiais gráfiticos e quitosana também pode sugerir que estas sejam pouco acentuadas.

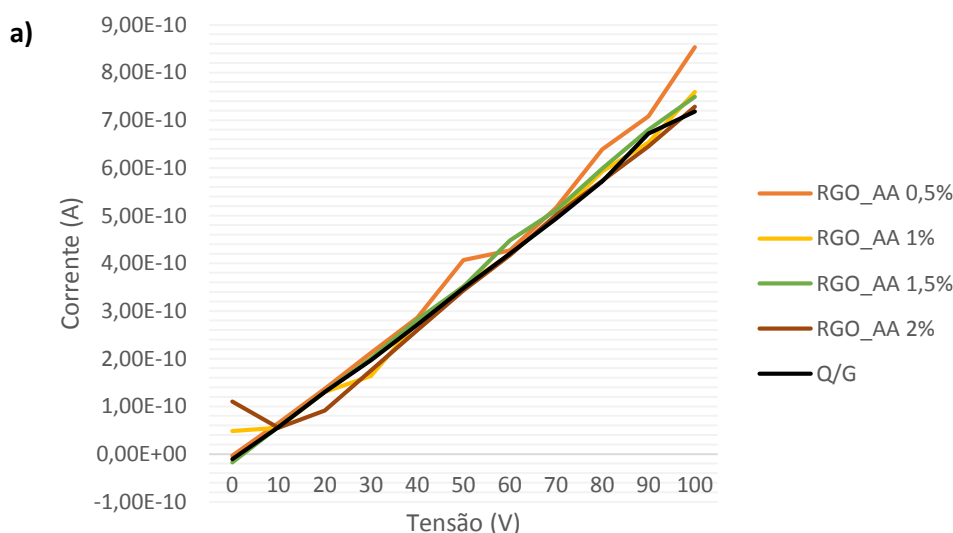


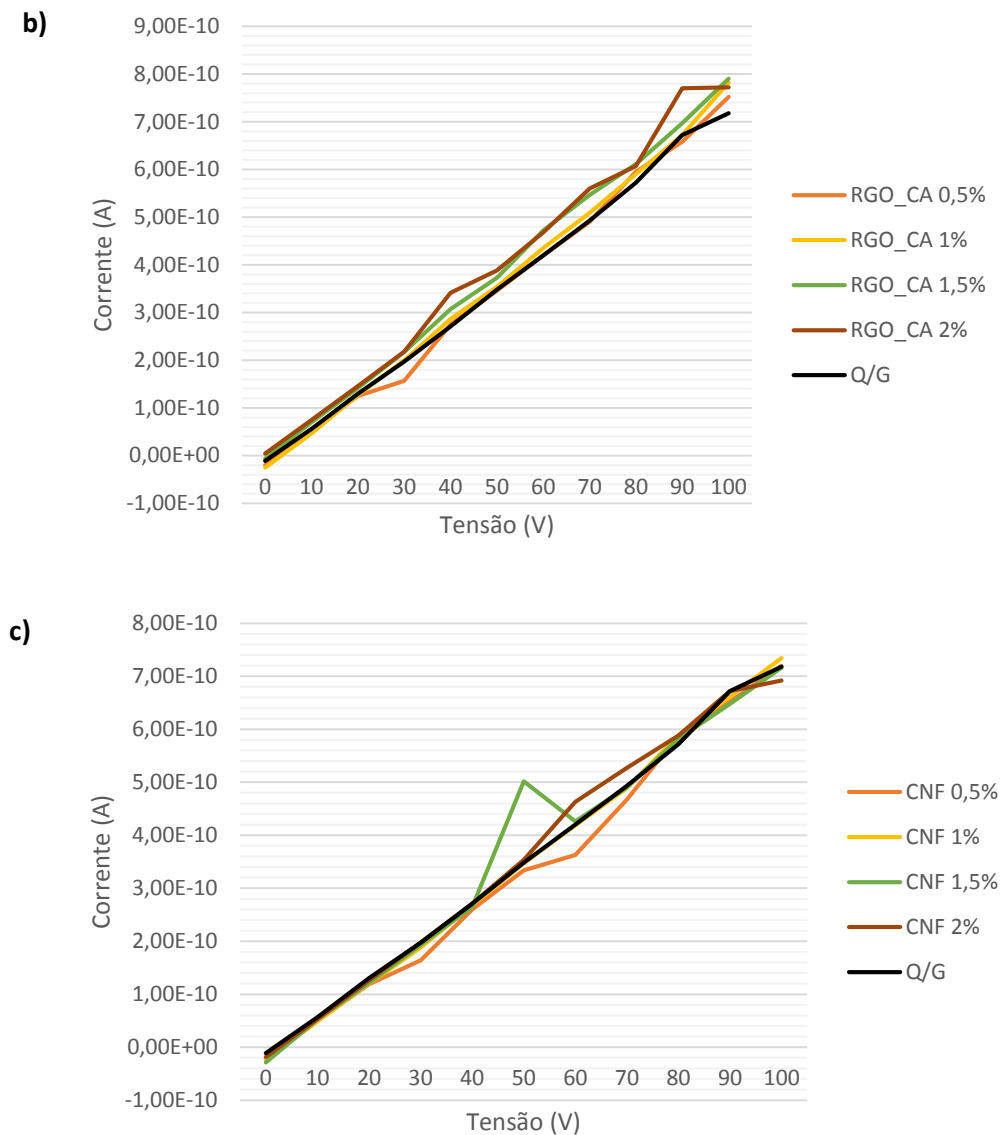


**Figura 25.** Espectros de FTIR do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%). Foram analisadas cinco réplicas de cada amostra.

### 3.2 Caracterização elétrica

O principal objetivo da incorporação dos materiais gráficos na matriz de quitosana-genipina é a preparação de bionanocompósitos com condutibilidade elétrica. Deste modo, a condutibilidade dos filmes foi medida através da medição da corrente em função do potencial aplicado (**Figura 26 a – c**). A incorporação do material gráfico na matriz quitosana-genipina apenas diminuiu ligeiramente a resistividade dos filmes, sendo esperado que ocorresse uma diminuição drástica da resistividade. Todos os filmes se comportam de forma semelhante mediante a aplicação do potencial.





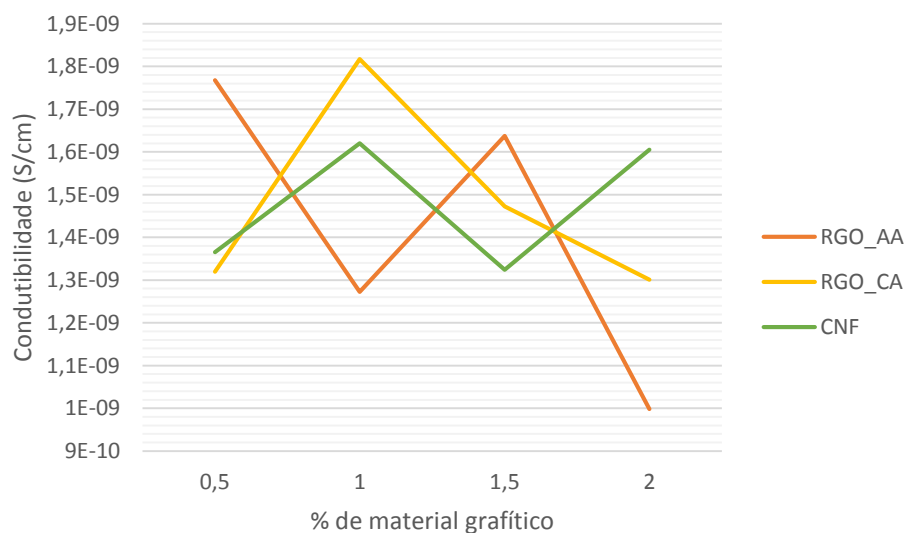
**Figura 26.** Curvas de corrente em função da tensão aplicada aos filmes. **a)** Filmes RGO\_AA. **b)** Filmes RGO\_CA. **c)** Filmes CNF. Foi analisada uma réplica de cada amostra.

A resistência dos filmes foi calculada através da aplicação direta da lei de Ohm, permitindo posteriormente calcular a condutibilidade elétrica (**Figura 27**). A condutibilidade elétrica não varia de acordo com os diferentes tipos de filmes nem varia de forma linear com o aumento da concentração de material gráfico. Os valores de condutibilidade aqui apresentados são muito menores do que aqueles que se encontram descritos na literatura para as mesmas concentrações de material gráfico (75,91,92).

Os filmes com nanofibras de carbono apresentam valores de condutibilidade elétrica idênticos aos filmes com óxido de grafeno reduzido. Uma vez que as nanofibras

de carbono são grafitizadas, a falta de condutibilidade elétrica provavelmente terá origem na dispersão heterogénea dos materiais gráfiticos.

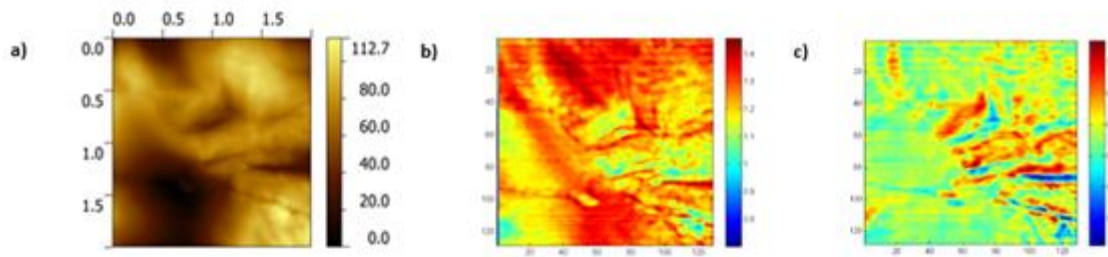
A condutibilidade elétrica é dependente da rede de percolação, que neste caso corresponde à concentração de material gráfitico necessária para formar uma rede contínua de material gráfitico que permita o fluxo de eletrões por todo o filme. Como de acordo com os dados da caracterização estrutural, os materiais gráfiticos se encontram heterogeneamente dispersos na matriz de quitosana-genipina, as concentrações utilizadas não são suficientes para formar uma rede de percolação que permita aumentar drasticamente a condutibilidade elétrica dos filmes. Outro fator que poderá influenciar a condutibilidade dos filmes é o facto de as cadeias de quitosana serem muito densas e cobrirem todo o plano basal do óxido de grafeno reduzido, o que impossibilita a transferência de eletrões. Caso as cadeias da quitosana estivessem covalentemente ligadas apenas aos grupos funcionais remanescentes nas extremidades (e não aos grupos do plano basal) das folhas de óxido de grafeno reduzido, através de reações de amidação ou esterificação, a rede  $sp^2$  estaria protegida permitindo que a transferência de eletrões ocorresse eficazmente (92).



**Figura 27.** Variação da condutibilidade elétrica dos filmes em função da concentração de RGO. Foi analisada uma réplica de cada amostra.

As propriedades elétricas dos filmes foram caracterizadas em maior detalhe através do estudo do potencial e da distribuição de cargas à sua superfície, através de microscopia de força electrostática (EFM). O filme com 2% de óxido de grafeno reduzido

por ácido cafeico foi o selecionado para a avaliação (**Figura 28**). Os mapas de capacitância (**Figura 28 b**) e de potencial electrostático (**Figura 28 c**) foram construídos assumindo um modelo de condensador de placas paralelas. Estes mapas permitem-nos distinguir regiões com comportamento dielétrico distinto, que poderão estar relacionadas com a heterogeneidade do filme, uma vez que é possível observar regiões compostas por quitosana-genipina e regiões compostas por aglomerados de óxido de grafeno reduzido. Estando a componente capacitiva relacionada com a constante dielétrica do meio entre a ponta de prova e o substrato, são observadas regiões com uma componente capacitiva bastante significativa (vermelho) e regiões cuja contribuição capacitiva é menos significativa (verde). É possível localizar aproximadamente as regiões onde se encontra o óxido de grafeno reduzido, excluindo os efeitos de rugosidade por comparação com a imagem de topografia (**Figura 28 a**). O óxido de grafeno reduzido localiza-se nas regiões com menor componente capacitiva (verde) sendo facilmente distinguido das regiões quase exclusivamente compostas por quitosana-genipina (vermelho) (**Figura 28 b**). O mapeamento das regiões de componente capacitiva distinta é complementado pela análise do potencial eletrostático de superfície (**Figura 28 c**). Este potencial é devido à aproximação de dois materiais com natureza distinta - o silício que constitui a ponta de prova e a amostra a ser analisada. A análise do mapeamento desta componente permite uma atribuição mais detalhada das regiões correspondentes ao óxido de grafeno reduzido, zonas de elevado potencial de contacto (vermelho) das regiões correspondentes à quitosana-genipina com menor potencial de contacto (amarelo). Podemos ainda distinguir regiões cujo potencial de contacto é tipicamente inferior a 0.6 V (azul escuro), que podem surgir apenas como consequência da rugosidade local da amostra (**Figura 28 c**).

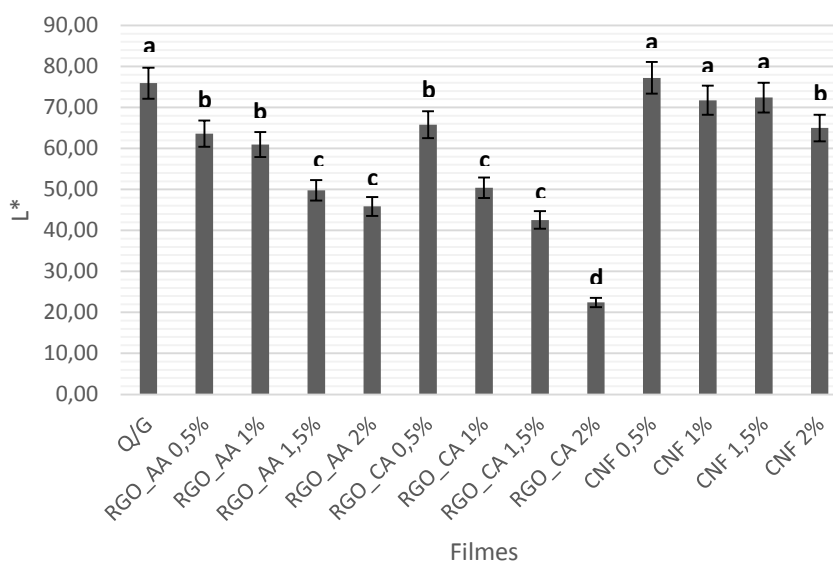


**Figura 28.** EFM do filme RGO\_CA 2%. **a)** Imagem de topografia. **b)** Imagem de capacitância (C). **c)** Imagem do potencial de contacto (V).

### 3.3 Caracterização colorimétrica

A cor dos bionanocompósitos é fundamental devido à sua aplicação para embalagem alimentar, pois de acordo com o tipo de alimento a conservar é necessário adequar a cor da embalagem bem como a sua transparência, sendo por vezes necessário recorrer a materiais opacos que protejam os alimentos da luz (93). Deste modo, a cor dos filmes foi caracterizada pelo método CIELab, através do qual foram determinadas as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . A coordenada  $L^*$  representa a luminosidade das amostras e varia entre 0 (opaca) e 100 (transparente). A coordenada  $a^*$  expressa a tonalidade verde ( $-a^*$ )/vermelho ( $+a^*$ ) e a coordenada  $b^*$  expressa a tonalidade azul ( $-b^*$ )/amarelo ( $+b^*$ ).

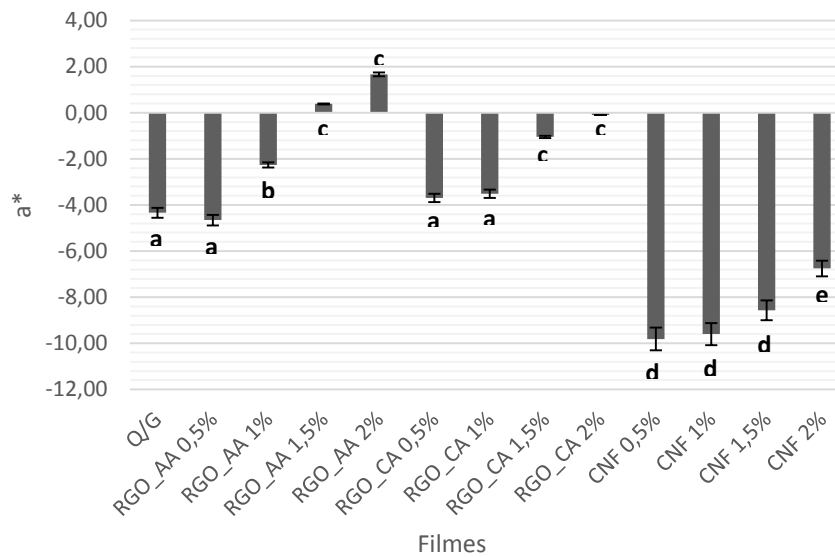
Os filmes com nanofibras de carbono têm valores de  $L^*$  semelhantes ao filme quitosana-genipina ( $p \geq 0,05$ ) enquanto os filmes com óxido de grafeno reduzido são significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mais opacos do que o filme quitosana-genipina. Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico apresentam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de opacidade entre si, sendo os filmes mais opacos (**Figura 29**). A opacidade dos filmes depende principalmente da presença e da dispersão do material gráfico. Apesar de os valores de  $L^*$  diminuírem tendencialmente com o aumento da concentração de material gráfico, esta diminuição não é linear devido à sua dispersão heterogénea na matriz de quitosana-genipina. A presença de produtos da oxidação do ácido cafeico, como *orto* – quinonas, que se ligam à quitosana, provocando o escurecimento da solução poderá contribuir para o facto de os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico serem os mais opacos (68).



**Figura 29.** Valores das coordenadas L\* dos filmes. Foram analisadas três réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

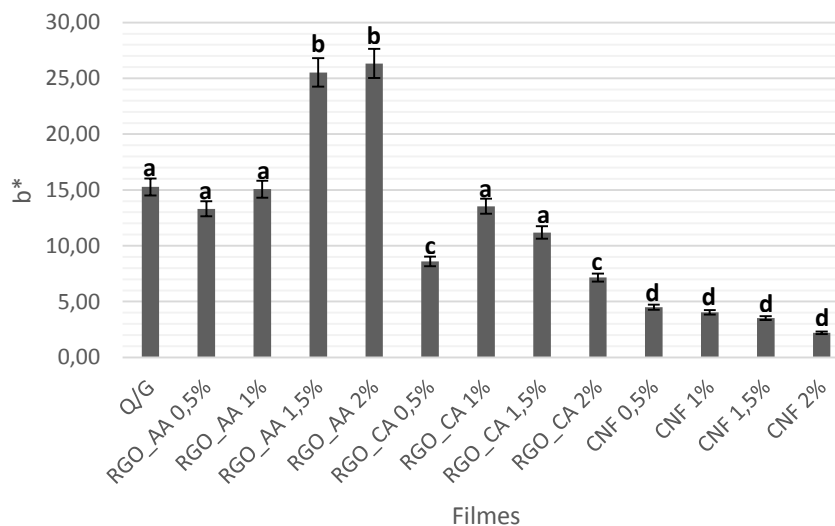
A maioria dos filmes apresenta valores de  $a^*$  negativos, devido à sua tonalidade esverdeada conferida pela genipina e significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) do filme quitosana-genipina (**Figura 30**). As diferenças entre os valores de  $a^*$  dos filmes são devidas à dispersão heterogênea do material gráfico bem como à interação dos agentes redutores do óxido de grafeno e a quitosana. Os filmes com nanofibras de carbono têm os valores de  $a^*$  significativamente mais baixos ( $p \leq 0,05$ ), devido à dispersão heterogênea das nanofibras, uma vez que existem grandes áreas de filme sem nanofibras com coloração esverdeada característica da quitosana reticulada com genipina. Em relação aos filmes com óxido de grafeno reduzido, além da dispersão heterogênea existe ainda a influência dos agentes redutores. Nos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico, ocorre o escurecimento da quitosana devido à sua interação com o ácido cafeico, pelo que quanto maior é a concentração de óxido de grafeno reduzido, maior é a concentração de ácido cafeico e por consequência menor é a sua tonalidade esverdeada, o que se traduz em valores de  $a^*$  próximos de zero. A interação entre o ácido L-ascórbico oxidado e a quitosana promove a formação de pigmentos avermelhados, o que se traduz em valores de  $a^*$  positivos para concentrações de óxido de grafeno reduzido mais elevadas. Os filmes com as concentrações de 0,5% e 1% de óxido de grafeno reduzido não

sofrem da mesma forma a influência dos agentes redutores, devido a estes não estarem presentes em concentrações suficientes, mantendo a cor original dos filmes (94).



**Figura 30.** Valores das coordenadas a\* dos filmes. Foram analisadas três réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

A maioria dos filmes apresenta valores de b\* significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) do filme quitosana-genipina. Os valores de b\* dos filmes com 1,5% e 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico são significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) aos restantes (**Figura 31**), devido a interações entre o ácido L-ascórbico oxidado e a quitosana com consequente formação de pigmentos amarelos (94).

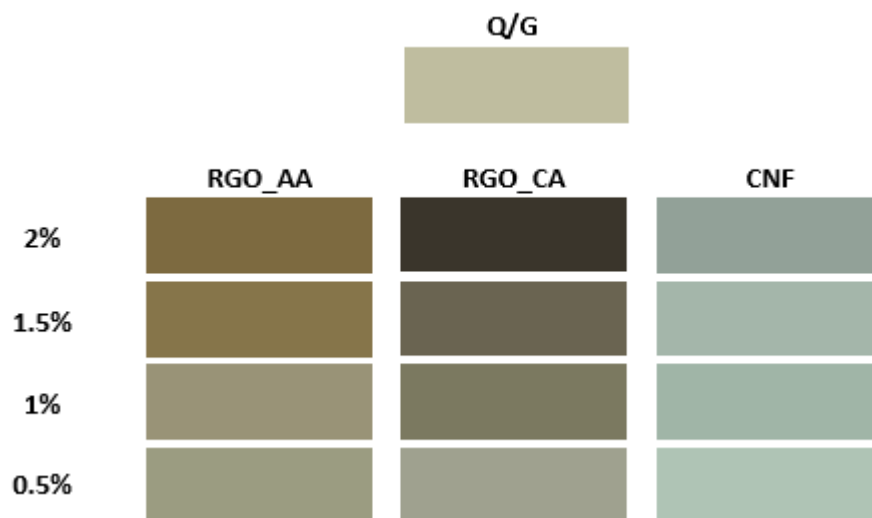


**Figura 31.** Valores das coordenadas b\* dos filmes. Foram analisadas três réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

Os filmes com valores de  $b^*$  mais elevados são os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico seguidos pelos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico, sendo os filmes com nanofibras de carbono os que apresentam valores de  $b^*$  mais baixos. Todos os filmes apresentam valores de  $b^*$  positivos devido à sua tonalidade amarela.

Com recurso a *software* apropriado, foi possível fazer a conversão das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  nas suas cores correspondentes (**Figura 32**). As cores geradas pelo *software* são representativas das diferentes tonalidades dos diferentes tipos de filmes. Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico apresentam tonalidades castanhas, os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico apresentam cor escura variando entre o preto e o cinzento e os filmes com nanofibras de carbono apresentam tonalidades azuis e verdes.

Uma vez que os filmes selecionados neste trabalho são caracterizados por diferentes transparências e diferentes tonalidades cromáticas poderão ser adequados a diversos tipos de alimentos.

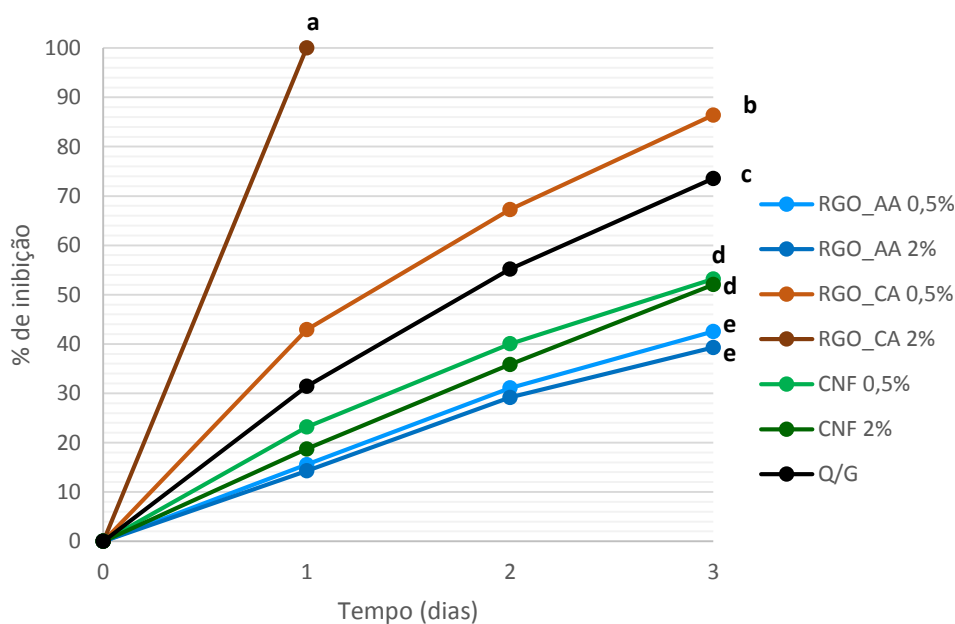


**Figura 32.** Cores representadas pelas coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dos filmes. Foram analisadas três réplicas de cada amostra.



### 3.4 Caracterização bioquímica

A atividade antioxidante dos bionanocompósitos é extremamente importante, pois ao exibirem esta propriedade permitem que a embalagem reforçe o seu papel ativo na conservação dos alimentos. Deste modo, a atividade antioxidante do filme quitosana-genipina e dos filmes com concentrações de material grafítico extremas (0,5% e 2%) foi avaliada pelo método ABTS, pela percentagem de inibição do catião ABTS<sup>•+</sup> pelos filmes (Figura 33). Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico apresentam atividade antioxidante significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) ao filme quitosana-genipina, enquanto os restantes filmes apresentam atividade antioxidante significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ). O filme com 2% de óxido de grafeno reduzido com ácido cafeico tem atividade antioxidante significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) ao filme com 0,5% de óxido de grafeno reduzido.



**Figura 33.** Atividade antioxidante do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material grafítico (0,5 - 2%). Foram analisadas três réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

O óxido de grafeno reduzido não foi lavado após a redução. Deste modo na solução de óxido de grafeno reduzido poderia estar presente ácido cafeico e produtos resultantes da sua oxidação capazes de interagir com a quitosana, o que justifica o aumento da atividade antioxidante dos filmes com óxido de grafeno reduzido com ácido cafeico. A atividade antioxidante do ácido cafeico encontra-se bem descrita na literatura,

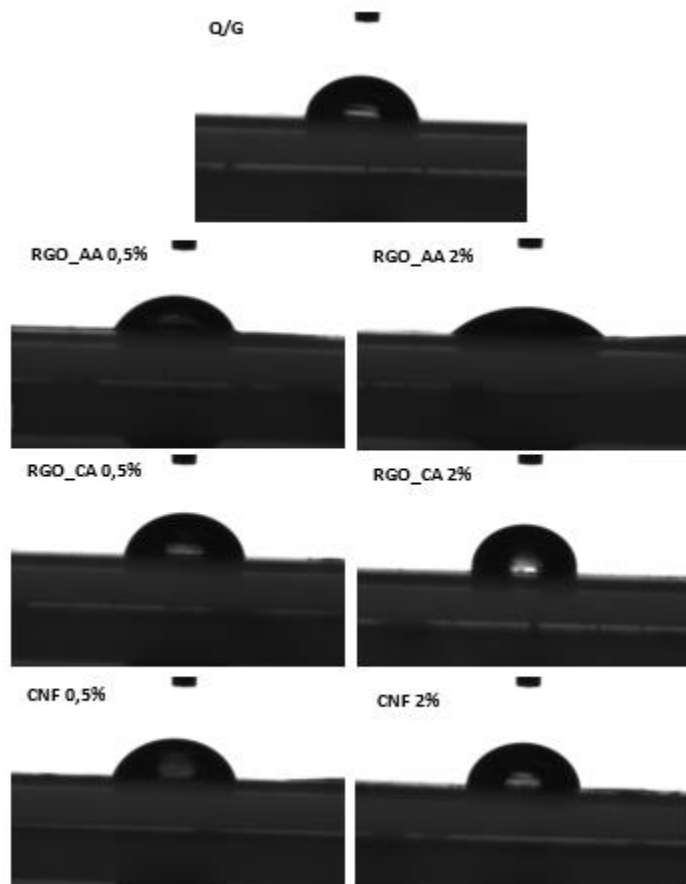
à semelhança do aumento da atividade antioxidante da quitosana ligada ao ácido cafeico (54,39,67).

Os materiais gráfiticos podem ter atividade antioxidante através da destruição ou inibição da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) ou pelo contrário, podem ser produtores de espécies ROS. O comportamento dos diferentes materiais gráfiticos, bem como as condições em que se verifica um ou o outro efeito ainda não se encontram clarificados (95). Sabendo que a quitosana exibe atividade antioxidante e que a adição do material gráfitico origina um decréscimo da atividade antioxidante dos filmes, deduz-se que as nanofibras de carbono e o óxido de grafeno reduzido poderão estar a produzir espécies ROS, diminuindo assim a atividade antioxidante da quitosana (32). Este efeito também está de acordo com o facto de os filmes com menor percentagem de material gráfitico apresentam atividade antioxidante ligeiramente superior aos filmes correspondentes com maior percentagem de material gráfitico.

As interações entre os filmes e a água podem fornecer indicações sobre a permeabilidade dos filmes. Deste modo a hidrofobicidade dos filmes foi caracterizada através da avaliação do ângulo de contacto (**Figura 34**). O aumento do ângulo de contacto traduz um aumento da hidrofobicidade da superfície enquanto a diminuição do ângulo de contacto traduz a diminuição da sua hidrofobicidade (96). Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico e os filmes com nanofibras de carbono são significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mais hidrofílicos que o filme quitosana-genipina. O aumento da hidroflicidade dos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico pode estar relacionada com a presença de moléculas hidrofílicas no filme, nomeadamente ácido L-ascórbico que não reagiu durante a reação de redução e ácido desidroascórbico, o que se traduz na diminuição do ângulo de contacto face ao filme quitosana-genipina (97). O aumento da hidroflicidade dos filmes após a introdução de nanofibras de carbono também se encontra descrita na literatura (98).

O filme com 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico é significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mais hidrofóbico que o filme quitosana-genipina enquanto o filme com 0,5% de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico não difere significativamente ( $p \geq 0,05$ ) do filme quitosana-genipina (**Tabela 8**). O aumento da

hidrofobicidade dos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico também se pode dever à presença do ácido cafeico uma vez que a sua cadeia alquílica e aromaticidade contribuem para o seu carácter hidrofóbico (99).

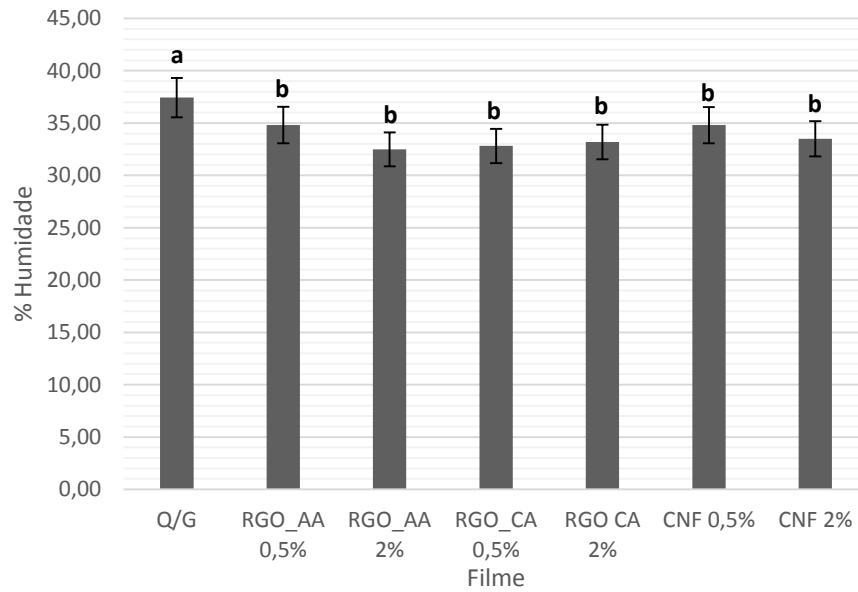


**Figura 34.** Imagens do contacto entre a gota de água e os filmes.

**Tabela 8.** Ângulos de contacto com a água do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico. Foram analisadas nove réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

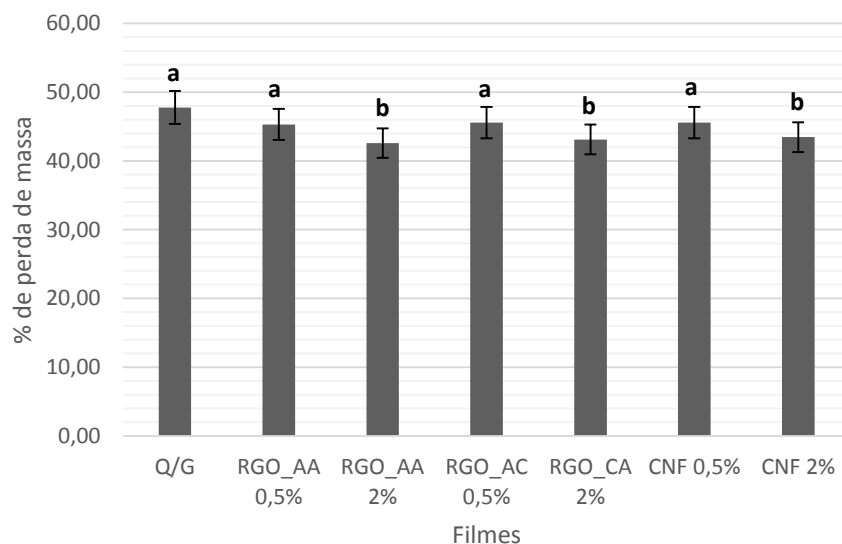
Filme	Ângulo de Contacto (°)
Q/G	$88,80 \pm 2,54^a$
RGO_AA 0,5%	$75,47 \pm 9,32^b$
RGO_AA 2%	$50,55 \pm 5,29^c$
RGO_CA 0,5%	$86,33 \pm 4,08^a$
RGO_CA 2%	$95,59 \pm 2,66^d$
CNF 0,5%	$72,51 \pm 3,59^b$
CNF 2%	$79,46 \pm 11,89^e$

Para complementar o estudo da interação entre a água e os filmes, foi determinada a percentagem de humidade do filme quitosana-genipina e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (**Figura 35**). Os filmes com material gráfico apresentam uma percentagem de humidade média de 33,6%. O filme quitosana-genipina apresenta uma percentagem de humidade média de 37,4% sendo esta significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) aos filmes com material gráfico. Deste modo, confirma-se que a introdução do material gráfico nos filmes de quitosana melhora as suas propriedades de barreira à água.



**Figura 35.** Percentagem de humidade do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico. Foram analisadas três réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

Os filmes de quitosana-genipina apresentam elevada solubilidade em água, sendo esta uma das limitações na sua aplicação para embalagem alimentar. A introdução do material gráfico também tem por objetivo ultrapassar esta limitação diminuindo a solubilidade dos filmes. Deste modo foi determinada a solubilidade do filme quitosana-genipina e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (**Figura 36**).

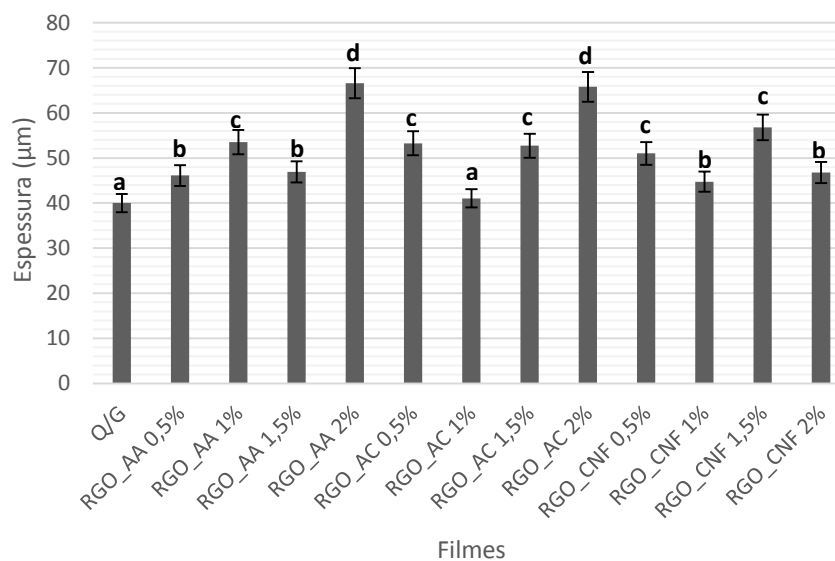


**Figura 36.** Solubilidade (% de perda de massa) do filme Q/G e dos filmes com concentrações extremas de material gráfico (0,5% e 2%). Foram analisadas três réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

Os filmes com a concentração máxima de material gráfitico apresentam uma percentagem de perda de massa média de aproximadamente 43%, sendo significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) à perda de massa média do filme quitosana-genipina, de aproximadamente 47% enquanto os filmes com a concentração mínima de material gráfitico apresentam uma percentagem de perda de massa média de aproximadamente 45%.

### 3.5 Caracterização das propriedades mecânicas

A principal função das embalagens é conferir proteção física aos alimentos, pelo que as suas propriedades mecânicas são um parâmetro fundamental. Deste modo, as propriedades mecânicas dos filmes foram caracterizadas através de ensaios de tensão uniaxial até à rutura (**Tabela 9**). Para calcular a área de contacto, foi medida a espessura dos filmes (**Figura 37**).

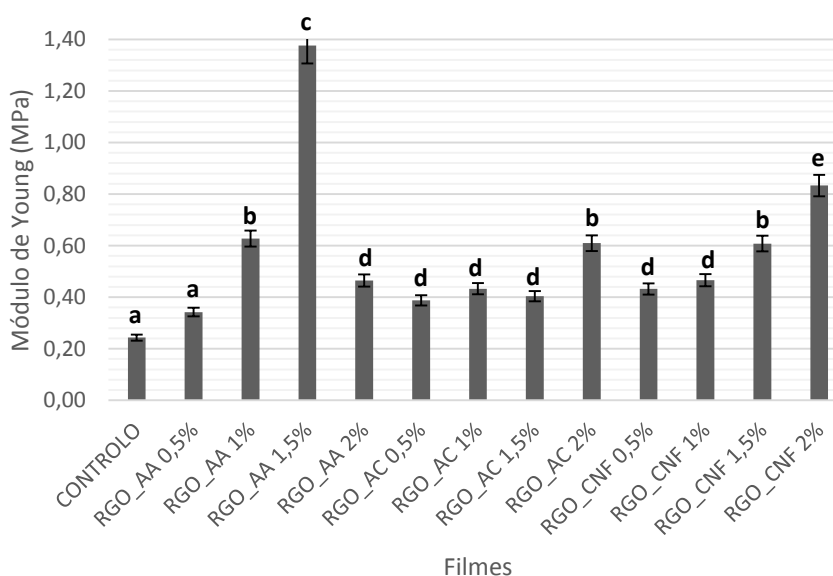


**Figura 37.** Espessura média dos filmes. Foram analisadas seis réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

A espessura média dos filmes com material gráfitico varia significativamente em relação à espessura média do filme quitosana-genipina ( $p \leq 0,05$ ). O filme quitosana-genipina tem a espessura de 40 µm, sendo o filme com menor espessura e o filme com 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico mede 66 µm sendo o filme mais espesso. A espessura dos filmes aumenta com a introdução do material gráfitico, no

entanto não varia linearmente com o aumento da concentração devido à heterogeneidade das dispersões.

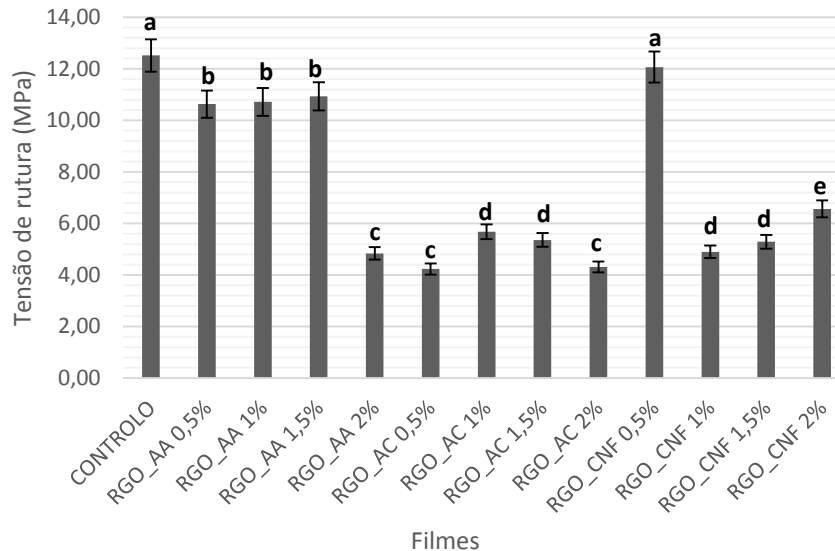
O módulo de Young corresponde ao quociente entre a força de tensão e a percentagem de deformação na zona em que este apresenta um comportamento elástico (**Figura 38**). Todos os filmes com material gráfitico têm um módulo de Young significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior ao filme quitosana-genipina, à exceção do filme com 0,5% de óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico.



**Figura 38.** Módulo de Young dos filmes. Foram analisadas seis réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes.

O aumento da elasticidade dos filmes de quitosana devido à incorporação de material gráfitico encontra-se bem descrito na literatura, verificando-se o aumento do módulo de Young de acordo com o aumento da concentração de material gráfitico (69,94). Neste trabalho, não se verifica um aumento linear do módulo de Young de acordo com o aumento da concentração de material gráfitico devido a este não se encontrar homogeneamente disperso. Apesar de o aumento não ser linear com o aumento da concentração de material gráfitico, é de referir a grande contribuição da incorporação do material gráfitico nos filmes para o aumento da elasticidade.

A tensão de rutura é representativa da resistência do filme e corresponde à força que é necessário exercer para que ocorra a rutura do filme (**Figura 39**). À exceção dos filmes com 0,5% e 1% de óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico e 0,5% de nanofibras de carbono, todos os filmes apresentam uma tensão de rutura significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) ao filme quitosana-genipina.

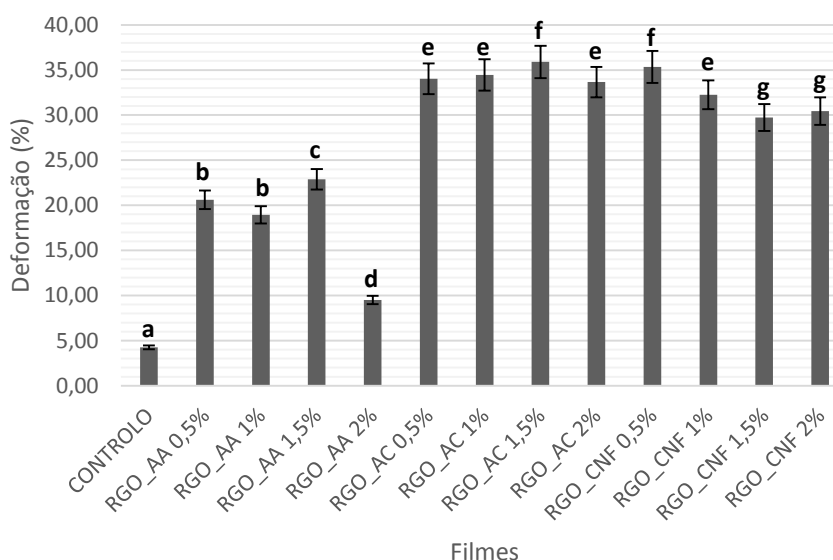


**Figura 39.** Tensão de rutura dos filmes. Foram analisadas seis réplicas por amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes.

De acordo com a literatura, a incorporação de materiais gráfiticos na quitosana reforça drasticamente a sua tensão de rutura (58,76,78). Os materiais gráfiticos aumentam a tensão de rutura da quitosana devido a interagirem com a quitosana e restringirem a mobilidade das suas cadeias (56). A dispersão do material gráfitico também é apontado como um dos principais fatores a contribuir para o aumento da tensão de rutura (77). A dispersão homogénea dos materiais gráfiticos e as suas fortes interações com a quitosana permitem uma distribuição homogénea da tensão dando origem a um aumento da tensão de rutura (80). Visto que nos filmes desenvolvidos neste trabalho o material gráfitico se encontra heterogeneamente disperso e não existem evidências da ligação entre este e a quitosana, existem zonas do filme com diferentes tensões, o que leva à diminuição da tensão de rutura face ao filme quitosana-genipina.

Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico são os que apresentam a menor tensão de rutura. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois a interação do ácido cafeico com a quitosana promove a formação de filmes mais quebradiços e menos resistentes tendo por consequência a diminuição da tensão de rutura (38). De acordo com a literatura, o aumento da tensão de rutura dos filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico pode ser devido à oxidação do ácido L-ascórbico. Após a oxidação do ácido L-ascórbico, este fica com três grupos carbonilo que podem reagir com os grupos hidroxilos da quitosana, reforçando toda a estrutura do filme (101).

A percentagem de deformação representa a flexibilidade do filme e corresponde à distância que o filme pode esticar antes de sofrer rutura (**Figura 40**).



**Figura 40.** Percentagem de deformação dos filmes. Foram analisadas seis réplicas por amostra. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes.

Todos os filmes têm uma percentagem de deformação significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) ao filme quitosana-genipina, à exceção do filme com 2% de óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico. Os filmes mais flexíveis são os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico e os filmes menos flexíveis são os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido L-ascórbico. A incorporação dos materiais grafiticos contribui



para o aumento da flexibilidade dos filmes, sendo esta uma característica claramente vantajosa na sua aplicação em embalagem alimentar.

**Tabela 9.** Tabela resumo das propriedades mecânicas dos filmes selecionados. Foram analisadas seis réplicas de cada amostra. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes  $p \leq 0,05$ .

Filme	Deformação (%)	Tensão de rutura (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Q/G	4,26 ± 7,97 <sup>a</sup>	12,52 ± 4,89 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>a</sup>
RGO_AA 0,5%	20,62 ± 4,48 <sup>b</sup>	10,63 ± 3,47 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,26 <sup>a</sup>
RGO_AA 1%	18,95 ± 4,80 <sup>b</sup>	10,72 ± 4,29 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,43 <sup>b</sup>
RGO_AA 1,5%	22,89 ± 2,48 <sup>c</sup>	10,93 ± 3,07 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,22 <sup>c</sup>
RGO_AA 2%	9,50 ± 2,59 <sup>d</sup>	4,84 ± 1,73 <sup>c</sup>	0,46 ± 0,15 <sup>d</sup>
RGO_CA 0,5%	34,01 ± 4,24 <sup>e</sup>	4,23 ± 1,10 <sup>c</sup>	0,39 ± 0,09 <sup>d</sup>
RGO_CA 1%	34,45 ± 6,77 <sup>e</sup>	5,68 ± 3,11 <sup>d</sup>	0,43 ± 0,04 <sup>d</sup>
RGO_CA 1,5%	35,90 ± 7,45 <sup>f</sup>	5,36 ± 1,19 <sup>d</sup>	0,40 ± 0,08 <sup>d</sup>
RGO_CA 2%	33,66 ± 4,27 <sup>e</sup>	4,31 ± 1,61 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,08 <sup>b</sup>
CNF 0,5%	35,35 ± 2,27 <sup>f</sup>	12,07 ± 6,92 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,05 <sup>d</sup>
CNF 1%	32,25 ± 3,20 <sup>e</sup>	4,90 ± 0,45 <sup>d</sup>	0,47 ± 0,07 <sup>d</sup>
CNF 1,5%	29,74 ± 4,17 <sup>g</sup>	5,29 ± 0,96 <sup>d</sup>	0,61 ± 0,04 <sup>b</sup>
CNF 2%	30,44 ± 2,46 <sup>g</sup>	6,57 ± 1,01 <sup>e</sup>	0,83 ± 0,15 <sup>e</sup>



## CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

---



Neste trabalho foram desenvolvidos bionanocompósitos de quitosana reticulados com genipina e material grafítico de modo a tentar solucionar a falta de uma embalagem alimentar com condutibilidade elétrica que permita o processamento por PEF *in-pack*.

O método de preparação dos bionanocompósitos refletiu-se em todos os parâmetros caracterizados. Os dados da caracterização dos bionanocompósitos permitem concluir que a sua preparação originou a dispersão heterogénea dos materiais grafíticos e a sua aglomeração tal como não promoveu eficazmente o estabelecimento de interações entre estes e a quitosana. Neste contexto, contrariamente ao que era esperado, a resistência mecânica e a condutibilidade elétrica dos filmes não aumentaram drasticamente após a incorporação dos materiais grafíticos. A heterogeneidade e as baixas concentrações do material grafítico presente na matriz de quitosana-genipina podem representar um problema de percolação, que impede a mobilidade dos eletrões, o que estará na origem da falta de condutibilidade elétrica dos bionanocompósitos (101,102). Ainda assim, a incorporação dos materiais grafíticos contribuiu para o aumento da elasticidade e da flexibilidade dos filmes, uma vez que ocorreu um grande aumento do módulo de Young e da percentagem de deformação, sendo estas características vantajosas na sua aplicação para embalagem alimentar.

A caracterização dos bionanocompósitos com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico indicia que os compostos resultantes da oxidação do ácido cafeico poderão estar efetivamente ligados às cadeias de quitosana. Deste modo, os bionanocompósitos com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico destacam-se pela sua atividade antioxidante superior aos restantes bionanocompósitos.

Os bionanocompósitos de quitosana e material grafítico necessitam de uma otimização da sua preparação de modo a promover as interações com a quitosana e a dispersão do material grafítico na matriz de quitosana-genipina de forma homogénea. Neste contexto, os bionanocompósitos poderão vir a ser materiais adequados à aplicação para embalagem alimentar que permita o processamento dos alimentos por PEF *in-pack*. Os bionanocompósitos com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico são os mais promissores devido às suas propriedades mecânicas e também à sua elevada atividade

antioxidante que permite reforçar o papel ativo da embalagem na conservação dos alimentos.

## CAPÍTULO VI – TRABALHO FUTURO

---





Neste trabalho iniciou-se o desenvolvimento dos bionanocompósitos de quitosana reticulados com genipina e material gráfico, pelo que o tempo designado à sua realização foi insuficiente para que pudesse ocorrer a sua total otimização. Neste sentido, existe muito trabalho que poderá ser desenvolvido futuramente.

Em primeiro lugar, o óxido de grafeno e o óxido de grafeno reduzido poderiam ser sujeitos a uma caracterização mais detalhada, sendo que os efeitos da redução poderiam ser avaliados através das alterações estruturais. Deste modo, poderiam ser estudadas as alterações na estrutura atómica através de difração de raios-X e as alterações da espessura das folhas por AFM. A eficácia da redução poderia ser caracterizada através da quantificação dos grupos funcionais com oxigénio através de XPS.

O método de preparação dos filmes teria que ser impreterivelmente alterado, recorrendo-se a diferentes estratégias tais como o aumento da temperatura da reação e a incorporação de compostos que impedissem a formação de aglomerados e promovessem as interações entre a quitosana e o material gráfico. Estas alterações teriam reflexo em todas as propriedades dos bionanocompósitos, com especial impacto no aumento da resistência mecânica e da condutibilidade elétrica. Por outro lado, a preparação dos filmes por evaporação do solvente poderia ser substituída por um método de deposição de camadas. Deste modo, o óxido de grafeno poderia ficar à superfície do filme, evitando que fosse coberto pelas densas cadeias de quitosana e permitindo a criação de uma rede de carbonos  $sp^2$  que possibilite o fluxo de eletrões. Seria interessante estudar também metodologias para garantir a percolação entre partículas condutoras. Poderia ser estudada a utilização de nanoestruturas gráficas unidimensionais preparadas a partir da própria quitosana. Outra aproximação poderia ser a dispersão dos resíduos da pirólise durante a preparação de novos filmes.

Os filmes com óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico mostraram ser os mais promissores devido à sua elevada capacidade antioxidante. Futuramente, o estudo da atividade antioxidante deveria ser realizado em intervalos de tempo mais curtos, sendo também averiguada a atividade antioxidante dos filmes com concentrações intermédias de óxido de grafeno reduzido por ácido cafeico. Tal não foi possível, devido às limitações de tempo.

Existiram muitas dificuldades na caracterização da condutibilidade elétrica dos filmes, visto que esta propriedade se encontra no limite da capacidade de deteção dos sistemas existentes. Futuramente, a condutibilidade elétrica deveria ser medida num sistema mais adequado como um sistema de quatro pontas.

A caracterização realizada no âmbito deste trabalho poderia ser complementada com a caracterização das propriedades microbiológicas dos bionanocompósitos tal como das propriedades de barreira aos gases como o oxigénio e o dióxido de carbono ou ao vapor de água.

Após o aperfeiçoamento dos filmes de quitosana e material gráfico, seria necessário estudar o seu comportamento mediante as condições do PEF, sendo posteriormente avaliados os efeitos da pasteurização de diversos tipos de alimentos embalados em filmes do bionanocompósito desenvolvido por PEF.

## CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS

---



1. Salvia-Trujillo L, Morales-De La Peña M, Rojas-Graü A, Martín-Belloso O. Changes in water-soluble vitamins and antioxidant capacity of fruit juice-milk beverages as affected by high-intensity pulsed electric fields (HIPEF) or heat during chilled storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011 59:10034–10043.
2. Realini CE, Marcos B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science* 2014 98:404–419.
3. Vanderroost M, Ragaert P, Devlieghere F, De Meulenaer B. Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology* 2014 39:47–62.
4. Soliva-Fortuny R, Balasa A, Knorr D, Martín-Belloso O. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science & Technology* 2009 20:544–556.
5. Toepfl S, Mathys a., Heinz V, Knorr D. Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Rev Int.* 2006;22(4):405–23.
6. Odriozola-Serrano I, Garde-Cerdán T, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Differences in free amino acid profile of non-thermally treated tomato and strawberry juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 2013 32:51–58.
7. Ade-Omowaye BIO, Angersbach a., Taiwo K a., Knorr D. Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science & Technology* 2001 12:285–295.
8. Huang K, Jiang T, Wang W, Gai L, Wang J. A Comparison of Pulsed Electric Field Resistance for Three Microorganisms with Different Biological Factors in Grape Juice via Numerical Simulation. *Food and Bioprocess Technology* 2014 7:1981–1995.
9. Qian J-Y, Gu Y-P, Jiang W, Chen W. Inactivating effect of pulsed electric field on lipase in brown rice. *Innovative food science & emerging technologies* 2014 22:89–94.
10. Sharma P, Oey I, Everett DW. Effect of pulsed electric field processing on the functional properties of bovine milk. *Trends Food Science and Technology* 2014 35:87–101.
11. Zhao W, Yang R, Gu Y, Li C. Effects of pulsed electric fields on cytomembrane lipids and intracellular nucleic acids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Control* 2014 39:204–213.

12. Zhao W, Yang R, Gu YJ, Tang Y, Li C. Assessment of pulsed electric fields induced cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*: Change in performance of mitochondria and cellular enzymes. *LWT - Food Science and Technology* 2014 58:55–62.
13. Timmermans R a H, Nierop Groot MN, Nederhoff a L, van Boekel M a JS, Matser a M, Mastwijk HC. Pulsed electric field processing of different fruit juices: impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms. *International journal of food microbiology* 2014 173:105–111.
14. Sharma P, Bremer P, Oey I, Everett DW. Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. *International Dairy Journal* 2014 35:49–56.
15. Taylor SL, Buckle K. *Innovations in food Packaging*. Jung H. Han. Second Edition 2014
16. Roodenburg B, de Haan SWH, van Boxtel LBJ, Hatt V, Wouters PC, Coronel P, et al. Conductive plastic film electrodes for Pulsed Electric Field (PEF) treatment-A proof of principle. *innovative food science and emerging technologies* 2010 11:274–282
17. Roodenburg B, De Haan SWH, Ferreira J a., Coronel P, Wouters PC, Hatt V. Toward 6 log 10 pulsed electric field inactivation with conductive plastic packaging material. *Journal of Food Process Engineering* 2013 36:77–86.
18. Roodenburg B., *Pulsed electric field treatment of packaged food*. Netherlands. Delft University of Technology 2008
19. Marsh K, Bugusu B. *Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary*. *Journal of Food Science* 2007 72
20. Taylor SL, Buckle K. *Innovations in Food Packaging*. Jung H. Han, Second Edition 2014
21. Tice P. *Packaging Materials: 4. Polyethylene for Food Packaging Applications*. ILSI Europe Report Series 2003
22. Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19:634–643.
23. Sorrentino, A., Gorrasi, G., & Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 18:84–95.
24. Guart a, Bono-Blay F, Borrell a, Lacorte S. Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food*

- Additives and Contaminants Part A Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 2011 28:676–685.
25. Arvanitoyannis IS, Bosnea L. Migration of substances from food packaging materials to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2004 44:63–76.
  26. Lim L. *Active and Intelligent Packaging Materials*. Second Edition. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier B.V. 2011.
  27. Van den Broek L a. M, Knoop RJI, Kappen FHJ, Boeriu CG. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrates Polymers* 2015 116:237–242
  28. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba O a., Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013 59:46–58.
  29. Martínez-Camacho a. P, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, Graciano-Verdugo a. Z, Rodríguez-Félix F, Castillo-Ortega MM, et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrates Polymers*. 2010 82:305–315.
  30. Gabriel JDS, Tiera MJ, Tiera VADO. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2015
  31. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Opinion in Chemical Biology* 2009:203–230.
  32. Trung TS, Nguyen H, Bao D. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chitin and Chitosan Prepared from Pacific White Shrimp Waste *international journal of carbohydrate chemistry* 2015.
  33. Luo Y, Wang Q. Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science Beverages. *Journal of Food Processing & Beverages*. 2013 1: 1-13.
  34. Oguzlu H, Tihminlioglu F. Preparation and barrier properties of chitosan-layered silicate nanocomposite films. *Macromolecular Symposia* 2010 298:91–98.
  35. Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *Journal of Biomedical Materials Research* 1995 29:829–834.

36. Butler MF, Ng YF, Pudney PD a. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2003 41:3941–3953.
37. Fernandes SC, de Oliveira Santos DMP, Vieira IC. Genipin-Cross-Linked Chitosan as a Support for Laccase Biosensor. *Electroanalysis*. 2013 25 :557–566.
38. Nunes C, Maricato É, Cunha Â, Nunes A, da Silva J a L, Coimbra M a. Chitosan-caffeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. *Carbohydrate Polymers* 2013 91:236–43.
39. Ferreira AS, Nunes C, Castro A, Ferreira P, Coimbra M a. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers* 2014 113:490–499.
40. Imran M, Klouj A, Revol-junelles A, Desobry S. Controlled release of nisin from HPMC , sodium caseinate , poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. *Journal of Food Engineering* 2014 143:178–185
41. Youssef AM. Polymer Nanocomposites as a New Trend for Packaging Applications. *Polymer Plastic Technology and Engineering* 2013 52:635–660.
42. Martins AM, Eng G, Caridade SG, Mano JF, Reis RL, Vunjak-Novakovic G. Electrically conductive chitosan/carbon scaffolds for cardiac tissue engineering. *Biomacromolecules* 2014 15:635–643.
43. Pok S, Vitale F, Eichmann SL, Benavides OM, Pasquali M, Jacot JG. Biocompatible carbon nanotube-chitosan scaffold matching the electrical conductivity of the heart. *ACS Nano* 2014
44. Justin R, Chen B. Strong and conductive chitosan-reduced graphene oxide nanocomposites for transdermal drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 2014 2:3759–3770.
45. Perrozzi F, Prezioso S, Ottaviano L. Graphene oxide: from fundamentals to applications. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2015 27
46. Luo D. Evaluation Criteria for Reduced Graphene Oxide. *The Journal of Physical Chemistry C* 2011 115:11327–11335.
47. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry* 2010:1015–1024
48. Bo Z, Shuai X, Mao S, Yang H, Qian J, Chen J, et al. Green preparation of reduced graphene oxide for sensing and energy storage applications. *Scientific Reports* 2014 4:4684.



49. Sanmartin M, Davey MW, Montagu M Van, Inze D, Kanellis A, Smirnoff N, et al. Review Plant L -ascorbic acid : chemistry , function , metabolism , bioavailability and effects of processing. *Journal of Science and Food Agriculture* 2000 860:825–860
50. Fernández-Merino MJ, Guardia L, Paredes JI, Villar-Rodil S, Solís-Fernández P, Martínez-Alonso a., et al. Vitamin C is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions. *Journal of Physical Chemistry C*. 2010 114:6426–6432.
51. Gao J, Liu F, Liu Y, Ma N, Wang Z, Zhang X. Environment-friendly method to produce graphene that employs vitamin C and amino acid. *Chemistry Materials*. 2010 22:2213–2218.
52. Zhang J, Yang H, Shen G, Cheng P, Zhang J, Guo S. Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid. *Chemical communications* 2010 46:1112–1114.
53. Chen JH, Ho CT. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1997 45:2374–2378.
54. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 2006 217:213–220.
55. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress. *ACS Nano*. 2011 5:6971–6980.
56. Lim HN, Huang NM, Loo CH. Facile preparation of graphene-based chitosan films: Enhanced thermal, mechanical and antibacterial properties. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2012 358:525–30.
57. He L, Wang H, Xia G, Sun J, Song R. Chitosan/graphene oxide nanocomposite films with enhanced interfacial interaction and their electrochemical applications. *Applied Surface Science* 2014 314:510–515.
58. Pan Y, Wu T, Bao H, Li L. Green fabrication of chitosan films reinforced with parallel aligned graphene oxide. *Carbohydrates Polymers* 2011 83:1908–1915.
59. Marcano DC, Kosynkin D V., Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, et al. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano* 2010 4:4806–4814.
60. Eigler S, Dotzer C, Hirsch A. Visualization of defect densities in reduced graphene oxide. *Carbon* 2012 50:3666–3673.

61. Hashizume M, Kobayashi H, Ohashi M. Preparation of free-standing films of natural polysaccharides using hot press technique and their surface functionalization with biomimetic apatite. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011 88:534–538.
62. Sakurai K, Maegawa T, Takahashi T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 2000 41:7051–7056.
63. Lilliu S, Maragliano C, Hampton M, Elliott M, Stefancich M, Chiesa M, et al. EFM data mapped into 2D images of tip-sample contact potential difference and capacitance second derivative. *Scientific Reports* 2013 3:3352.
64. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999 26:1231–1237.
65. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry* 2010:1015–1024
66. Zoldners J, Kiseleva T, Kaiminsh I. Influence of ascorbic acid on the stability of chitosan solutions. *Carbohydrate Polymers*. 2005 60:215–218.
67. Brzonova I, Steiner W, Zankel A, Nyanhongo GS, Guebitz GM. Enzymatic synthesis of catechol and hydroxyl-carboxylic acid functionalized chitosan microspheres for iron overload therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*
68. Liu Y, Zhang B, Javvaji V, Kim E, Lee ME, Raghavan SR, et al. Tyrosinase-mediated grafting and crosslinking of natural phenols confers functional properties to chitosan. *Biochemical Engineering Journal* 2014 89:21–27.
69. Bengisu M, Yilmaz E. Oxidation and pyrolysis of chitosan as a route for carbon fiber derivation. *Carbohydrate Polymers*. 2002 50:165–175.
70. Lai Q, Zhu S, Luo X, Zou M, Huang S. Ultraviolet-visible spectroscopy of graphene oxides. *AIP Advances* 2012 2:3–8.
71. Xu S, Yong L, Wu P. One-pot, green, rapid synthesis of flowerlike gold nanoparticles/reduced graphene oxide composite with regenerated silk fibroin as efficient oxygen reduction electrocatalysts. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2013 5:654–662
72. Dua V, Surwade SP, Ammu S, Agnihotra SR, Jain S, Roberts KE, et al. All-organic vapor sensor using inkjet-printed reduced graphene oxide. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2010 49:2154–2157.

73. He, Dafang; Shen, Liming; Zhang, Xiaoyan; Wang, Yifeng; Bao N. An efficient and eco-friendly solution-chemical route for preparation of ultrastable reduced graphene oxide suspensions. *Journal of Materials Synthesis and Processing* 2009 60.
74. Wu T, Zivanovic S, Hayes DG, Weiss J. Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2008 56:5112–5119.
75. Wang X, Bai H, Yao Z, Liu A, Shi G. Electrically conductive and mechanically strong biomimetic chitosan/reduced graphene oxide composite films. *Journal of Materials Chemistry*. 2010 20:9032.
76. Fan H, Wang L, Zhao K, Li N, Shi Z, Ge Z, et al. Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites. *Biomacromolecules*. 2010 11:2345–2351.
77. Yang X, Tu Y, Li L, Shang S, Tao XM. Well-dispersed chitosan/graphene oxide nanocomposites. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2010 2:1707–1713.
78. Han D, Yan L, Chen W, Li W. Preparation of chitosan/graphene oxide composite film with enhanced mechanical strength in the wet state. *Carbohydrates Polymers* 2011 83:653–658.
79. Wang W, Wang Z, Liu Y, Li N, Wang W, Gao J. Preparation of reduced graphene oxide/gelatin composite films with reinforced mechanical strength. *Materials Research Bulletin* 2012 47:2245–2251.
80. Zuo P-P, Feng H-F, Xu Z-Z, Zhang L-F, Zhang Y-L, Xia W, et al. Fabrication of biocompatible and mechanically reinforced graphene oxide-chitosan nanocomposite films. *Chemistry Central Journal* 2013 7:39
81. Pan Y, Bao H, Li L. Noncovalently functionalized multiwalled carbon nanotubes by chitosan-grafted reduced graphene oxide and their synergistic reinforcing effects in chitosan films. *ACS Applied Materials Interfaces* 2011 3:4819–4830.
82. Justin R, Chen B. Characterisation and drug release performance of biodegradable chitosan-graphene oxide nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* 2014 103:70–80.
83. Mi FL, Shyu SS, Peng CK. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part B* 2005 43:1985–2000.

84. Li J, Ren N, Qiu J, Mou X, Liu H. Graphene oxide-reinforced biodegradable genipin-cross-linked chitosan fluorescent biocomposite film and its cytocompatibility. *International Journal of Nanomedicine* 2013 8:3415–3426.
85. Kumar S, Koh J. Synthesis, physiochemical and optical properties of chitosan based dye containing naphthalimide group. *Carbohydrate Polymers* 2013 94:221–228.
86. Huang D, Wang A. Non-covalently functionalized multiwalled carbon nanotubes by chitosan and their synergistic reinforcing effects in PVA films. *RSC Advances* 2013 3:1210
87. Leceta I, Guerrero P, Ibarburu I, Dueñas MT, De La Caba K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering* 2013 116:889–99.
88. Rubilar JF, Cruz RMS, Silva HD, Vicente A a., Khmelinskii I, Vieira MC. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering* 2013 115:466–474.
89. Feng X, Wang X, Xing W, Yu B, Song L, Hu Y. Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide by chitosan and their synergistic reinforcing effects in PVA films. *Industrial Engineering Chemistry Research* 2013 52:12906–12914.
90. Han D, Han T, Shan C, Ivaska A, Niu L. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid with chitosan-graphene modified electrode. *Electroanalysis*. 2010 22:2001–2008.
91. Marroquin JB, Rhee KY, Park SJ. Chitosan nanocomposite films: Enhanced electrical conductivity, thermal stability, and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 2013 92:1783–1791.
92. Tang Z, Kang H, Shen Z, Guo B, Zhang L, Jia D. Grafting of polyester onto graphene for electrically and thermally conductive composites. *Macromolecules*. 2012 45:3444–3451.
93. Dias MV, Machado Azevedo V, Borges SV, Soares NDFF, de Barros Fernandes RV, Marques JJ, et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated  $\alpha$ -tocopherol. *Food Chemistry* 2014 165:323–329.
94. Song X, Cheng L. Chitosan / kudzu starch / ascorbic acid films : Rheological, wetting, release, and antibacterial properties. *African Journal of Agricultural Research* 2014 9:3816–3824.

95. Qiu Y, Wang Z, Owens ACE, Kulaots I, Chen Y, Kane AB, et al. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry 2014 6:11744–11755.
96. Jin J, Song M, Hourston DJ. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules*. 2004 5:162–168.
97. Falconi M, Salvatore V, Teti G, Focaroli S, Durante S, Nicolini B, et al. Gelatin crosslinked with dehydroascorbic acid as a novel scaffold for tissue regeneration with simultaneous antitumor activity. *Biomedical Materials* 2013 8:035011.
98. Hao C, Ding L, Zhang X, Ju H. Biocompatible conductive architecture of carbon nanofiber-doped chitosan prepared with controllable electrodeposition for cytosensing. *Analytical Chemistry* 2007 79:4442–4447.
99. Thirupathi Kumara Raja S, Thiruselvi T, Aravindhana R, Mandal AB, Gnanamani a. In vitro and in vivo assessments of a 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid bioconjugated gelatin-based injectable hydrogel for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*. Royal Society of Chemistry 2015 3:1230–1244.
100. Chen, P., Lai, Y., Kuo, T., Liu F. Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution *Journal of Medical and Biological Engineering* 2007 27:23–28.
101. Last, B. J., Thouless, D. J., Percolation theory and electrical conductivity *Physical Review Letters* 1971 27:1719-1712
102. Wessling, B., Electrical conductivity in heterogeneous polymer systems. V(1): Further experimental evidence for a phase transition at the critical volume concentration. *Polymer Engineering and Science* 1991 31