

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**PPGTA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**  
**NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO**

**ANA PAULA DE OLIVEIRA PIZZOLI**

**Produção e caracterização de laminados biodegradáveis e  
antimicrobianos para embalagens de alimentos**

**CAMPO MOURÃO**

**2014**

**ANA PAULA DE OLIVEIRA PIZZOLI**

**Produção e caracterização de laminados biodegradáveis e antimicrobianos para embalagens de alimentos**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Nível Mestrado Acadêmico, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vitória Leimann

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianne Ayumi Shirai

**CAMPO MOURÃO**

**2014**

## Dados internacionais de Catalogação na Publicação

P625 Pizzoli, Ana Paula de Oliveira

Produção e caracterização de laminados biodegradáveis e antimicrobianos para embalagens de alimentos/ Ana Paula de Oliveira Pizzoli – Campo Mourão : UTFPR, 2014. 72 p. ; 23 cm.

Orientadora: Fernanda Vitória Leimann  
Co-orientadora: Marianne Ayumi Shirai

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2014.

1.Embalagens. 2.Filmes plásticos . 3.Alimentos - Dissertações. I.Leimann, Fernanda Vitória . II.Shirai, Marianne Ayumi. III.Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV.Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Campo Mourão  
Lígia Patrícia Torino CRB9/1278



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LAMINADOS BIODEGRADÁVEIS E  
ANTIMICROBIANOS PARA EMBALAGENS DE ALIMENTOS.**

Por

**ANA PAULA DE OLIVEIRA PIZZOLI**

Essa dissertação foi apresentada às 09 horas, do dia 23 de setembro de 2014, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann (Orientador)

---

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai (Co-orientadora)

---

Profa. Dra. Claudia Sayer (Membro Externo)

---

Prof. Dr. Fabio Yamashita (Membro Externo)

O Termo de Aprovação assinado encontra-se no Programa do Curso

Aos meus pais Anísio e Irani, que são as pessoas mais importantes da minha vida, e a quem eu serei eternamente grata. A minha irmã Cristina e ao meu irmão Luiz Antônio, por sempre estarem ao meu lado me apoiando. Ao meu namorado Oscar pelo apoio, compreensão e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann, pela compreensão, por me orientar sempre com atenção, e dedicação e por confiar no meu trabalho, pela oportunidade de aprendizado e por me acalmar sempre que me desesperava.

À Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai pela co-orientação, por sua atenção, tranquilidade e compreensão ao ensinar, por compartilhar seu conhecimento com o intuito de enriquecer o trabalho.

Ao técnico Nelson Heitor Fuzinato pela ajuda e apoio técnico.

A Profa. Dra. Livia Bracht pela atenção, auxílio durante o trabalho, pelas sugestões e dedicação.

Aos professores da banca, Profa. Dra. Claudia Sayer, Prof. Dr. Fabio Yamashita, pelas sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos da graduação da UTFPR Silvio José de Souza, Nicolli Grecco Marchiore, Priscila Freitas Santos pelo auxílio durante o trabalho no laboratório pela disposição e comprometimento.

Ao técnico Oswaldo do Laboratório de Microscopia da UEL pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus pais Aniso e Irani que sempre permaneceram ao meu lado me apoiando e sempre me auxiliando para que eu não desistisse e incentivando minhas realizações profissionais.

Aos meus irmãos Cristina e Luiz Antonio por me apoiar e incentivar sempre.

Ao meu namorado Oscar pela paciência e apoio.

Aos amigos que tive a felicidade de conhecer durante o curso Franciele Viel, Vanessa Rodrigues, Dayane Santos, Jorge L. Sanchez, pelos bons momentos que compartilhamos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

Quero agradecer a todos que auxiliaram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)



## RESUMO

Tendo em vista a crescente demanda por substituição de materiais de embalagens usuais por biodegradáveis bem como pela necessidade da manutenção de segurança dos alimentos durante seu armazenamento, o desenvolvimento de embalagens bioativas biodegradáveis torna-se importante. No presente trabalho foram produzidos laminados compostos por blendas de poli(L-ácido láctico) (PLLA), amido termoplástico (TPS) e gelatina por extrusão e calandragem. O processo apresentou-se como uma forma viável para produzir blendas de PLLA / TPS / gelatina com propriedades funcionais interessantes e aspecto homogêneo. A adição de gelatina em diferentes proporções (1, 3 e 5% em relação ao TPS) apresentou diferença significativa nos resultados das análises de solubilidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e isothermas de sorção de água devido à hidrofiliabilidade da mesma. Além disso, a incorporação de gelatina na blenda afetou significativamente as propriedades mecânicas através da redução da rigidez associada à incompatibilidade entre PLLA, amido e gelatina, como revelado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas para incorporação aos laminados pela técnica do polissacarídeo modificada, onde nitrato de prata foi reduzido a prata metálica por D-glicose. O diâmetro médio foi determinado através de três técnicas: Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, 63 nm), por Espectrofotometria UV-Vis (100 nm) e por análise das imagens de MEV (145 nm). Com a análise de FTIR foi possível detectar interações entre os grupamento C=O dos subprodutos de oxidação da D-glicose, produto da reação com o nitrato de prata. As AgNPs apresentaram ação antimicrobiana eficaz contra os microrganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a Concentração Inibitória Mínima igual a 1,17 µg/ml para *E. coli* (menor resistência) e 37,50 µg/ml para *S. aureus* (maior resistência). Os laminados foram tratados superficialmente com a solução resultante da síntese das AgNPs por reticulação enzimática (transglutaminase). Nas imagens de MEV foi possível verificar que os laminados tratados apresentaram maior porosidade em função da umidade promovida pelo tratamento. Através da porosidade criada foram detectadas diferenças significativas nas análises de PVA e propriedades mecânicas. Houve aumento da PVA e redução em todas as propriedades mecânicas, principalmente no módulo de Young em função da criação de pontos de concentração de força. As isothermas apresentaram ajuste adequado ao modelo de GAB ( $R^2 > 0,99$ ). A atividade antimicrobiana dos laminados contendo AgNPs foi comprovada pela formação de halos de inibição contra os microrganismos descritos anteriormente. Finalmente, os laminados produzidos possuem potencial de aplicação como embalagens ativas com propriedades antimicrobianas e de biodegradação para alimentos.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata; síntese verde; poli(L-ácido láctico), amido termoplástico, gelatina, extrusão, transglutaminase.

## ABSTRACT

Due to the growing demand for replacement of the usual packaging materials for biodegradable as well as the need to maintain food safety during storage, the development of bioactive biodegradable packaging becomes important. In this work sheets were produced by extrusion and calendaring process using blends of poly(L-lactic acid) (PLLA), thermoplastic starch (TPS) and gelatin. The process is presented as a viable way to produce blends of PLLA/TPS/gelatin with interesting functional properties and homogeneous appearance. The addition of gelatin in different proportions (1, 3 and 5% related to TPS) showed a significant difference in the solubility test results, the water vapor permeability (WVP) and water sorption isotherms due to gelatin hydrophilicity. Furthermore the incorporation of gelatin in the blend significantly affected the mechanical properties by reducing stiffness associated with incompatibility between PLLA, starch and gelatin, as shown by Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs. Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized for incorporation into the extruded sheets by the modified polysaccharide technique, where silver nitrate is reduced to metallic silver by D-glucose. The average diameter was determined by three techniques: Dynamic light scattering (DLS, 63 nm) by UV-Vis spectrophotometry (100 nm) and by analysis of SEM images (145 nm). With the analysis of FTIR was possible to detect interactions between the C = O groups of D-glucose oxidation byproducts, products of the reaction with silver nitrate. AgNPs presented effective antimicrobial action against the microorganisms: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*, and the Minimum Inhibitory Concentration equal to 1.17 µg/ml for *E. coli* (lower resistance) and 37.50 µg/ml for *S. aureus* (greater resistance). The extruded sheets were surface treated with the resulting solution from AgNPs synthesis and enzymatically crosslinked with transglutaminase. At the SEM images it was possible to verify that the treated laminates exhibited higher porosity due to moisture promoted by the treatment. The created porosity influenced significantly the results of the WVP and mechanical properties. There was an increase in vapor permeation and a reduction in all mechanical characteristics, particularly in Young's modulus due to the creation of tension concentration points. The isotherms showed adequate adjustment to GAB model ( $R^2 > 0.99$ ). The antimicrobial activity of the laminates containing AgNPs was confirmed by the formation of inhibition zones against the microorganisms described above. Finally, the sheets produced have potential application as active packaging with antimicrobial and biodegradable properties for food.

**Keywords:** Silver nanoparticles; Green synthesis; poly(L-lactic acid), thermoplastic starch, gelatin, extrusion, transglutaminase.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Embalagens Biodegradáveis.....	9
2.1.2 Técnicas de produção de filmes .....	10
2.2 Polímeros Biodegradáveis .....	122
2.2.1 Poli(ácido lático) (PLA) .....	13
2.2.2 Amido Termoplástico .....	14
2.2.3 Gelatina .....	155
2.3 Blendas de TPS, Gelatina e PLA.....	16
2.4 Embalagens Ativas com Propriedades Antimicrobianas .....	18
2.4.1 Embalagens Contendo Nanopartículas de Prata.....	19
2.4.2 Síntese Verde de AgNPs .....	20
2.4.3 Mecanismo de Ação das AgNPs .....	222
2.4.4 Tratamento Superficial de Filmes Poliméricos.....	23
3 OBJETIVOS .....	25
3.1 Objetivo Geral .....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1 Materiais .....	26
4.2 Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs) .....	26
4.3 Caracterização das nanopartículas de prata .....	27
4.3.1 Morfologia das AgNPs .....	27
4.3.2 Diâmetro médio e índice de polidispersão .....	27
4.3.3 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	28
4.3.4 Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) .....	28
4.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana das AgNPs .....	28
4.4.1 Preparo dos inóculos bacterianos.....	28

4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
4.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	29
4.5 Produção dos Laminados De PLLA/TPS/Gelatina .....	30
4.6 Aplicação das AgNPs aos Laminados de PLLA/TPS/gelatina .....	30
4.7 Caracterização dos laminados.....	31
4.7.1 Espessura e Densidade.....	31
4.7.2 Propriedades Mecânicas .....	31
4.7.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	32
4.7.4 Umidade dos laminados.....	33
4.7.5 Solubilidade em água .....	33
4.7.6 Isotherma de sorção de água .....	34
4.7.7 Morfologia dos laminados.....	35
4.7.8 Atividade antimicrobiana dos laminados.....	35
4.8 Análises estatísticas .....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 Caracterização dos laminados de PLLA / TPS / gelatina.....	36
5.2 Caracterização das AgNPs sintetizadas .....	44
5.3 Caracterização dos laminados tratados com AgNPs .....	49
6 CONCLUSÃO .....	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulações utilizadas para a produção dos laminados. ....	30
Tabela 2 – Soluções salinas e suas umidades relativas de equilíbrio a 25°C. ....	34
Tabela 3- Resultados obtidos de espessura e densidade dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	38
Tabela 4- Resultados obtidos para permeabilidade ao vapor de água dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina). ....	39
Tabela 5- Resultados obtidos para umidade e solubilidade dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	40
Tabela 6 – Propriedades mecânicas dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	40
Tabela 7- Parâmetros do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) para as isotermas de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	42
Tabela 8- Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) da solução de AgNPs. ....	48
Tabela 9- Resultados obtidos para espessura e densidade dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina). ....	53
Tabela 10- Resultados obtidos para a análise de PVA dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).....	54
Tabela 11- Resultados obtidos para umidade e solubilidade dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina). ....	55
Tabela 12 – Propriedades mecânicas dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina). ....	56
Tabela 13. Parâmetros do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) para as isotermas de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	57
Tabela 14. Atividade antimicrobiana do laminado FG5 tratado superficialmente por reticulação enzimática contendo AgNPs.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Capacidade global de produção de bioplásticos em 2012 (por segmento de mercado). (FONTE: European Bioplastics, 2014).....	10
Figura 2- Estruturas químicas: (a) poli(L- ácido láctico) (PLLA) e (b) poli (D- ácido láctico).( FONTE: XU et al, 2006).....	14
Figura 3- Esquema representando o mecanismo de formação de nanopartículas de prata utilizando a síntese verde. ....	22
Figura 4- Laminados de PLLA / TPS / gelatina produzidos por extrusão: (a) FC (controle, 0% gelatina); (b) FG1 (1% gelatina); (c) FG3 (3% gelatina); (d) FG5 (5% gelatina).....	36
Figura 5 – Micrografias dos laminados onde (A) fratura (magnificação: 800 x) e (B) superfície (magnificação: 1.600 x). FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	37
Figura 6- Isoterma de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina). ....	42
Figura 7- Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata.....	44
Figura 8 - Distribuição de tamanhos em intensidade das AgNPs obtida por DLS.....	45
Figura 9 - Micrografias das nanopartículas de prata obtidas por MEV (magnificação de 8.000 x). ....	46
Figura 10 – Distribuição de tamanhos das AgNPs determinada a partir da análise das micrografias de MEV. ....	46
Figura 11 – Espectroscopia de infravermelho de nanopartículas de prata. ....	47
Figura 12. Laminados de PLLA / TPS / gelatina produzidos por extrusão e tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs: (a) FCR (controle, 0% gelatina), (b) FG1R (1% gelatina), (c) FG3R (3% gelatina), (d) FG5R (5% gelatina).....	50
Figura 13 – Micrografias dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs, onde (A) fratura (magnificação: 800 x) e (B) superfície (magnificação: 1.600 x). FCR (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).....	51
Figura 14 – Micrografias da fratura dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs, onde FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina) (magnificação: 400 x). ....	52
Figura 15- Isoterma de sorção dos laminados tratados superficialmente contendo AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs – Nanopartículas de prata;

CBM- Concentração Bactericida Mínima;

CIM – Concentração Inibitória Mínima;

DLS – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de Luz dinâmico);

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier);

FWHM – *Full width at half maximum* (Largura à média altura.);

ICP – MSD – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado).

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura;

PDLA – Poli(D- ácido láctico);

PHB - Poli(hidroxibutirato);

PLLA – Poli(L-ácido láctico);

PVA – Permeabilidade ao vapor de água;

SPR - *Surface Plasmon Resonance* (pico de ressonância de plasma de superfície).

TPVA – Taxa de permeabilidade ao vapor d'água;

TPS – *Termoplastic Starch* (Amido termoplástico);

UR - Umidade Relativa.

## 1 INTRODUÇÃO

A função principal da embalagem de alimentos é manter a qualidade e segurança dos produtos durante seu armazenamento e transporte, além de prolongar sua vida de prateleira. Este processo se dá pelo impedimento do contato com fatores ou condições desfavoráveis, tais como microorganismos, contaminantes químicos, oxigênio, umidade, luz, força externa, etc. Dessa forma, os materiais de embalagem fornecem proteção física e criam condições físico-químicas adequadas para os produtos que são essenciais para a obtenção de uma vida útil satisfatória, além de manter a qualidade e segurança alimentar (RHIM; PARK; HA, 2013).

A maior parte dos materiais utilizados nas indústrias de embalagem são produzidos a partir de combustíveis fósseis não-degradáveis. Assim os materiais de embalagem para produtos alimentares, tal como qualquer outro tipo de embalagem de armazenamento de curto prazo, representam um grave problema ambiental (KIRWAN; STRAWBRIDGE, 2003). Diante disso houve um aumento na investigação acadêmica e industrial para desenvolver novos materiais etiquetados como "amigos do ambiente", cujos materiais são produzidos a partir de fontes alternativas, com menor consumo de energia, biodegradáveis e não tóxicos para o meio ambiente. Os biopolímeros que são biodegradáveis e obtidos a partir de recursos renováveis, representam uma alternativa interessante para essa substituição (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009). Um dos biopolímero de maior destaque na substituição dos materiais tradicionais é o poli(ácido láctico), que pode ser encontrado em suas duas formas isoméricas poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(D-ácido láctico) (PDLA). Também destacam-se o amido termoplástico (*Termoplastic Starch*, TPS), gelatina, a quitosana e a policaprolactona (PCL) (YU; DEAN; LI, 2006).

Outro ponto a ser destacado é que os materiais de embalagem produzidos com biopolímeros são excelentes veículos para a incorporação de uma grande variedade de aditivos, tais como antioxidantes, agentes antifúngicos, agentes antimicrobianos, cores e outros nutrientes (IMRAN et al., 2010).



Por conta dos surtos microbianos de origem alimentar e pela demanda por minimizar os aditivos químicos na composição dos alimentos, a busca de novas alternativas na área de embalagens vem se tornando importante (SUPPAKUL et al., 2003). Nesse contexto embalagens com propriedades antimicrobianas são uma nova opção para inibir o crescimento microbiano nos alimentos, mantendo a qualidade, frescor e segurança. Normalmente, os aditivos antimicrobianos são adicionados às formulações alimentícias, no entanto, essa via nem sempre se mostra eficaz, uma vez que a capacidade de proteção do agente antimicrobiano é neutralizado em reações e / ou interações do complexo sistema alimentar. Além disso, o composto antimicrobiano adicionado diretamente nos alimentos não atua somente na superfície do alimento, onde ocorrem as reações de deterioração mais intensivamente. Dessa forma a embalagem contendo o agente antimicrobiano é uma forma alternativa de ultrapassar estas limitações, permitindo a liberação controlada de agente antimicrobiano a uma taxa adequada, durante o armazenamento (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

As propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata (AgNPs), têm sido cada vez mais exploradas em produtos de consumo, tais como desodorantes, roupas, bem como em soluções e sprays de limpeza (CHEN; SCHLUESENER, 2008; SUPPAKUL et al., 2003; RAI; YADAV; GADE, 2009). Sua aplicação em embalagens alimentícias (FORTUNATI et al., 2011; LLORET; PICOUET; FERNÁNDEZ, 2012) e em filmes comestíveis (AN et al., 2008) tem sido alvo de diversos estudos já que a prata tem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo ativa contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, protozoários e certos vírus (KUMAR; MUNSTEDT, 2005).

Nesse contexto o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ativas, com propriedades antimicrobianas, torna-se interessante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Embalagens Biodegradáveis

Os plásticos biodegradáveis foram introduzidos na década de 1980 para encontrar maneiras de produzir plásticos oriundos de fontes renováveis, bem como para reduzir os efeitos ambientais devido ao aumento no volume de material destinado aos aterros (GIRONI; PIEMONTE, 2010). Materiais plásticos provenientes de embalagem na maioria das vezes estão contaminados por alimentos e substâncias biológicas, tornando impraticável economicamente sua reciclagem para aplicação em alimentos. Como consequência a cada ano ocorre o aumento da quantidade de materiais plásticos que são aterrados, aumentando o problema da eliminação de resíduos sólidos urbanos (SIRACUSA et al., 2012).

Os produtos obtidos a partir de fontes renováveis apresentam aceitabilidade comercial e ambiental que derivam do envolvimento de recursos renováveis, capacidade de reciclagem, além de biodegradabilidade (SOROUDI e JAKUBOWICZ, 2013). De acordo com *European Bioplastics* (2014), a crescente demanda por soluções mais sustentáveis se reflete na crescente capacidade de produção de bioplásticos: em 2012 a capacidade de produção chegou a cerca de 1,4 milhões de toneladas. As previsões de acordo com os dados de mercado indicam que a capacidade de produção irá se multiplicar até 2017 para mais de 6 milhões de toneladas. Além disso, de acordo com a Figura 1, o mercado atual é caracterizado por um elevado crescimento e forte diversificação.

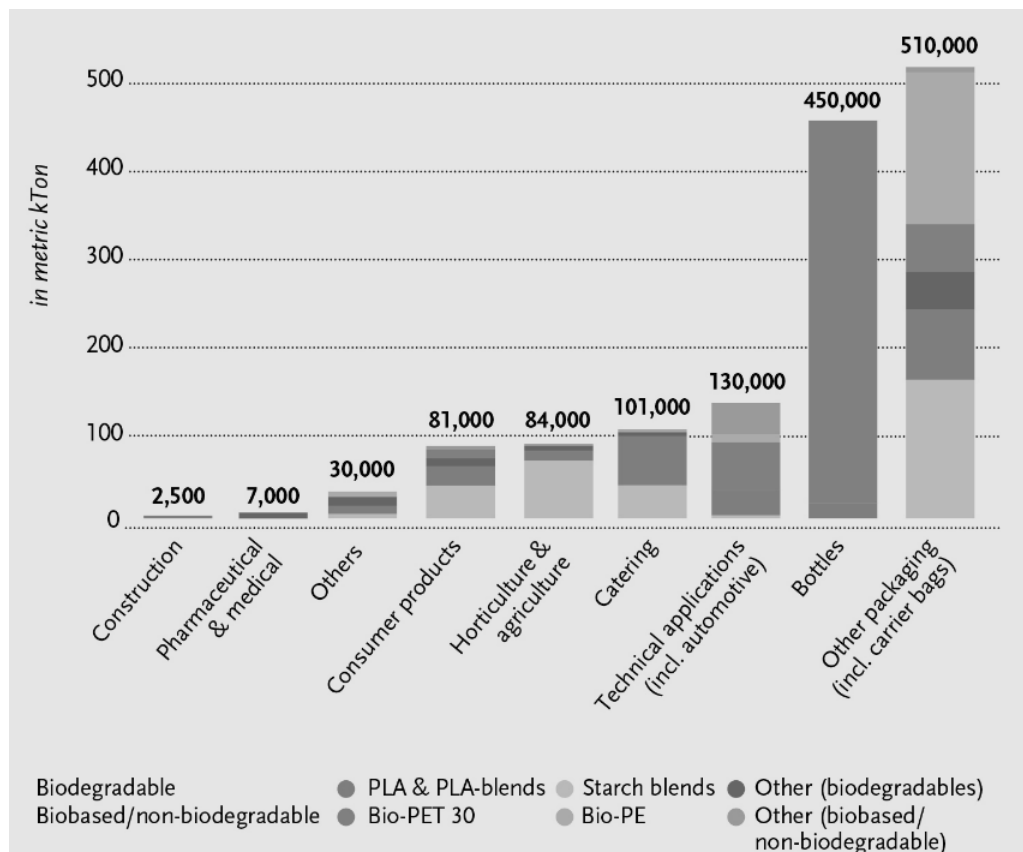


Figura 1- Capacidade global de produção de bioplásticos em 2012 (por segmento de mercado). (FONTE: European Bioplastics, 2014).

Pode-se observar na Figura 1, que os bioplásticos que apresentam destaque são o poli(ácido láctico) (PLA) e o amido. Os mesmos vêm sendo aplicados a sacolas, produtos destinados a consumidores, etc. De acordo com Luckachan e Pillai (2011) os nichos de mercado de polímeros biodegradáveis na área de embalagens incluem sacos de compostagem para resíduos ou alimentos, sacolas e aplicações de serviços de alimentação, como copos de uso único compostáveis, canudos, pratos, talheres, e recipientes.

### 2.1.2 Técnicas de produção de filmes

Existe uma grande variedade de técnicas para a produção de filmes, sendo assim serão abordadas as mais utilizadas como a extrusão e o *casting*.

O processamento de blendas poliméricas por extrusão consiste basicamente em duas etapas principais: a de mistura ou preparação e a de moldagem. Estas etapas influenciam nas propriedades finais da blenda

polimérica. Na etapa de mistura ou de preparação da blenda polimérica ocorre a incorporação dos componentes poliméricos, na qual se procura atingir o estado de mistura desejado (ITO et al., 2004). Este método de produção é considerado altamente eficiente, com potencial comercial para a produção em larga escala de filmes comestíveis, devido aos baixos níveis de umidade, altas temperaturas e curtos períodos de tempo necessários (Hernandez-Izquierdo e Krochta, 2008).

Diversos polímeros biodegradáveis têm sido processados por extrusão e a técnica tem se mostrado eficiente para estes sistemas, como por exemplo, amido de mandioca (MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2011), blendas de amido termoplástico com poli(L-ácido láctico) (SHIRAI et al., 2014), zeína (WANG; RAKOTONIRAINY; PADUA, 2003).

Outra forma conhecida de produção comercial de filmes e chapas é o processo de extrusão plana. Esse processo consiste na passagem do material fundido entre dois ou mais cilindros refrigerados com água, que giram a velocidades ligeiramente diferentes para solidificar e formar os materiais. O processo possibilita a obtenção de materiais planos com espessura constante. A espessura do filme é controlada pela abertura dos rolos finais da calandra, e seu acabamento superficial é determinado pelo acabamento da superfície do último cilindro de passagem (RODOLFO-JR et al., 2002).

Uma outra técnica que vem sendo utilizada para a produção laboratorial de películas à base de amido é a de casting (VICENTINI; SOBRAL; CEREDA, 2002). A produção de filmes por meio da técnica consiste em verter uma solução filmogênica em placas pequenas. Este processo não é adequado para a formação de películas muito maiores do que 25-30 cm, o que leva a dificuldades de aumento de escala. A secagem da solução deve acontecer à temperatura ambiente ou em fornos com circulação forçada de ar a temperaturas moderadas (30-40 °C), o que requer tempos de secagem de 10-24 h (GODBILLOT et al, 2006).

Embora o método de casting seja utilizado na maioria das pesquisas de desenvolvimento de filmes à base de amidos e proteínas, essa técnica apresenta algumas desvantagens como: dificuldade em dimensionar a

produção de películas de maior tamanho e os longos tempos de secagem. Estas desvantagens fazem esta técnica ser impraticável em escala industrial.

## 2.2 Polímeros Biodegradáveis

O termo "material biodegradável" é utilizado para descrever os materiais que podem ser degradados pela ação enzimática de organismos vivos, tais como bactérias, leveduras, fungos e os produtos finais do processo de degradação, sendo estes de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e biomassa (sob condições aeróbicas) e de hidrocarbonetos, metano e de biomassa (sob condições anaeróbicas) (DOI; FUKUDA, 1994). Sendo assim, a biodegradação é a única via de degradação capaz de remover completamente um polímero ou seus produtos de degradação do ambiente.

Polímeros provenientes de fontes renováveis têm atraído a atenção nas últimas décadas, predominantemente devido a duas maiores razões: preocupações com o meio ambiente e a percepção de que as fontes de petróleo são finitas. Geralmente os polímeros de fontes renováveis podem ser classificados em três grupos: (1) polímeros naturais, como o amido, proteínas e celulose; (2) sintéticos de monômeros naturais, tais como o PLA; e (3) polímeros de fermentação microbiana, tais como o poli(hidroxibutirato) (PHB) (YU; DEAN; LI, 2006). (4) Polímeros sintéticos de monômeros sintéticos obtidos de fontes naturais (ex: Polietileno) (BRASKEM, 2010).

Polissacarídeos como celulose, amido, quitosana e proteínas (gelatina, caseína, etc.) têm encontrado inúmeras aplicações em produtos biodegradáveis (LUCKACHAN; PILLAI, 2011). Além destes, dentre os materiais biodegradáveis estudados até o momento na literatura, o PLA tem recebido crescente atenção devido à sua biodegradabilidade natural que tornou interessante sua aplicação nos ramos biomédico, farmacêutico e alimentício (SIRACUSA et al., 2012).

### 2.2.1 Poli(ácido láctico) (PLA)

Dentre os componentes da família dos poliésteres biodegradáveis, os polilactídeos (como o PLA) têm sido o foco de muita atenção, pois são produzidos a partir de recursos renováveis, tais como o amido, são biodegradáveis e compostáveis, além de apresentarem muito pouca ou nenhuma toxicidade e elevado desempenho mecânico, comparável aos polímeros comerciais (YU; DEAN; LI, 2006).

A primeira síntese do PLA foi realizada em 1932, por Carothers, Dorough e Natta (1932), que produziram o material com baixa massa molecular. Este apresentava propriedades mecânicas mais fracas, dessa forma, não se apresentando adequado para determinadas aplicações. No ano de 1954 a “Du Pont” produziu esse polímero com uma massa molar maior e o patenteou. Porém, o PLA apresentava alguns inconvenientes como a suscetibilidade à reação com a água, dessa forma houve uma diminuição na utilização desse material. Apenas no ano de 1966, quando Kulkarni et al. (1966) demonstrou que a degradação do material poderia ocorrer *in vivo*, o polímero despertou interesse da área médica.

O PLA pode ser sintetizado utilizando-se de dois processos: reação de policondensação direta do ácido láctico levando a formação de produto de baixa massa molar (LUNT et al., 1998) e a reação de polimerização por abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico, na presença de um catalisador metálico gerando polímero de alta massa molecular (BENDIX, 1998).

A presença de um átomo de carbono quiral assimétrico na estrutura do polilactídeo leva à existência de estereoisômeros. Poliactídeos estéreo regulares resultam da polimerização de lactídeos opticamente puros: poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(D-ácido láctico) (PDLA) (SARASUA; ARRAIZA, 2005). O homopolímero PLLA, poli(L-ácido láctico), é um polímero semicristalino com ponto de fusão em torno de 180 °C e cristalinidade por volta de 70% e dentre os poli(lactídeos), é o que possui a menor taxa de degradação (MOTTA, 2002).

O PLA apresenta algumas vantagens sobre o TPS como maior resistência mecânica, resistência a umidade e ainda é um material

biodegradável. Na Figura 2, pode-se observar a estrutura química dos polímeros (PLLA) e (PDLA).

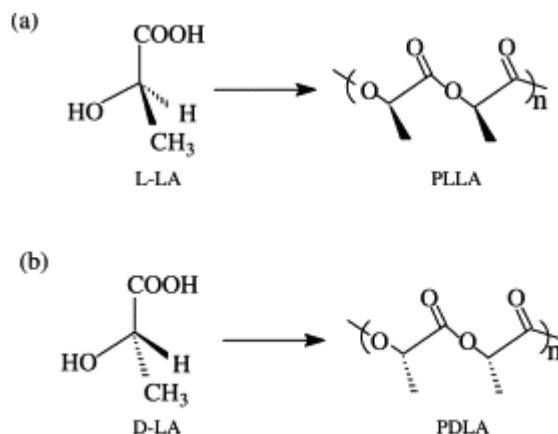


Figura 2- Estruturas químicas: (a) poli(L- ácido láctico) (PLLA) e (b) poli (D- ácido láctico) ( FONTE: XU; TENG; YU, 2006).

### 2.2.2 Amido Termoplástico

O amido é a principal fonte de armazenamento de energia para as plantas e uma das principais fontes de calorias na nutrição humana. O amido nativo ocorre como grânulos insolúveis em água cujos tamanhos e formas são dependentes de sua origem botânica. Grânulos de amido têm natureza semi-cristalina com grau típico de cristalinidade de cerca de 25-30 %. O amido é uma substância composta por dois polissacarídeos: amilose (molécula linear) e amilopectina (molécula ramificada). A proporção entre amilose e amilopectina, a distribuição de moléculas de amilose no interior dos grânulos de amido, bem como a estrutura molecular dos polissacarídeos de amido individuais determinam a estrutura e funcionalidade do amido (GENKINA et al., 2014).

Existe uma grande diversidade de produtos obtidos a partir do TPS onde foram utilizados diferentes amidos nativos, como sacos descartáveis, recipientes, vasos, garfos, facas e sacos de lixo (MA et al., 2009).

Vários autores têm apontado que apesar da facilidade de preparação, os filmes à base de amido apresentam algumas desvantagens, tais como as suas propriedades mecânicas pobres que fazem a adição de compostos plastificantes ser necessária (PERESSINI et al., 2003; BRAVIN; PERESSINI; SENSIDONI, 2006). Os grânulos de amido podem ser gelatinizados por

aquecimento na presença de um plastificante, sendo chamado então de amido termoplástico (*Termoplastic Starch*, TPS). Durante a gelatinização a estrutura cristalina é desfeita, permitindo que o amido flua a temperaturas elevadas, podendo ser processado por um método convencional como a extrusão (TAGHIZADEH; SARAZIN; FAVIS, 2013).

### 2.2.3 Gelatina

A gelatina é derivada da proteína insolúvel fibrosa colágeno por desnaturação química e é obtida a partir de ossos, pele e tecido conjuntivo gerado como resíduo durante o abate e processamento de animais. Alguns fatores como fonte, o tipo de colágeno e as condições de processamento podem afetar as propriedades da gelatina produzida. Os variados tipos de gelatinas podem apresentar diferentes propriedades térmicas e reológicas, como a resistência, fusão e temperatura de gelificação. Estas propriedades são reguladas por fatores tais como o tamanho da cadeia ou de distribuição de peso molecular, composição de aminoácidos e de hidrofobicidade (HANANI; ROOS; KERRY, 2014).

O uso da gelatina como filme comestível ou revestimento foi estudado consideravelmente até os anos sessenta, o que resultou em muitas patentes, principalmente na área farmacêutica. Dessa forma, atualmente vários pesquisadores têm concentrado sua atenção no estudo de filmes de gelatina (PARK; WHITESIDE; CHO, 2008). Sabe-se que a gelatina forma películas transparentes, flexíveis, fortes e impermeáveis ao oxigênio, quando preparadas a partir de soluções aquosas contendo um plastificante, tal como glicerina ou sorbitol (ZHAO; TORLEY; HALLEY, 2008). Park, Whiteside e Cho (2008) produziram filmes de gelatina por extrusão e termo prensagem, o que torna a sua utilização comercialmente viável quando comparado com o *casting*. Os autores concluíram que os filmes de gelatina apresentavam propriedades mecânicas e de barreira aceitáveis sendo controladas pelo uso combinado de plastificantes.



### 2.3 Blendas de TPS, Gelatina e PLA

A mistura física de dois ou mais polímeros sem que haja reação química entre os componentes é denominada blenda polimérica (CANEVAROLO JR, 2002). Muitas propriedades dos polímeros de fontes renováveis, como as de numerosos outros polímeros à base de petróleo, também podem ser melhoradas através da formação de blendas e compósitos. Muitos polímeros naturais são hidrofílicos e alguns deles são solúveis em água. A solubilidade em água aumenta a degradabilidade além da velocidade de degradação, no entanto, esta sensibilidade à umidade limita a sua aplicação. Blendas e multicamadas de polímeros naturais com outros tipos de polímeros de fontes naturais podem ser usadas para melhorar as suas propriedades. As blendas também podem auxiliar no desenvolvimento de novos produtos de baixo custo, com melhor desempenho (YU; DEAN; LI, 2006).

As blendas poliméricas podem ser produzidas por *casting* ou por extrusão. A produção por *casting* é um método prático de laboratório, apesar de existirem processos comerciais que empregam o método. Porém a extrusão é uma alternativa óbvia já que a processabilidade é maior além da menor quantidade de energia necessária para a remoção de água quando comparado ao *casting*. Ainda no caso de blendas com amido, no caso do *casting* existe a necessidade de pré-gelatinização enquanto que na extrusão os grânulos de amido são gelatinizados *in situ* durante o processamento (FISHMAN et al., 2000).

Apesar de se restringir basicamente à escala laboratorial blendas de TPS e gelatina têm sido desenvolvidas pela técnica de *casting* por diversos autores, sendo os efeitos do uso de amidos de diferentes fontes bem como diferentes plastificantes estudados. Fakhouri et al. (2009) produziram filmes de amido de milho lipofílico e gelatina utilizando ácidos graxos como plastificantes. A adição de ácidos graxos aos filmes de amido lipofílico e gelatina causou um aumento em algumas das suas propriedades, tais como a espessura, alongamento e a opacidade. Por outro lado, a incorporação destes ácidos graxos levou a uma diminuição da sua resistência à tração, além da diminuição na sua permeabilidade ao vapor de água. Em trabalho mais recente, Fakhoury et al. (2012) utilizaram amido de mandioca e gelatina para produção de filmes

plastificados com sorbitol e glicerol. Os valores para a permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, espessura e resistência mecânica dos bioplásticos aumentou com o aumento da concentração de gelatina. A adição de gelatina resultou também numa redução de opacidade dos bioplásticos (plastificada com ambos, sorbitol e glicerol), provavelmente devido a uma diminuição da cristalinidade do sistema. Liu et al. (2014) produziram filmes gelatina e amido de milho hidroxipropilado com alto teor de amilose (80%) plastificados com polietilenoglicol 400 (400 g/mol). Os resultados de MEV mostraram que a mistura de gelatina e amido forma duas fases separadas. As superfícies dos filmes com PEG tornaram-se muito mais suaves, o que indica a que a compatibilidade na interface entre a gelatina e o amido foi melhorada. Veiga-Santos et al. (2007) observaram que a o alongamento na ruptura foi negativamente afetado pelo aumento de concentração de gelatina em filmes de amido e gelatina plastificados com sacarose e açúcar invertido.

O número de trabalhos de desenvolvimento de blendas de TPS e gelatina bem como de TPS e PLA por extrusão vem aumentando rescentemente. Fakhoury et al. (2013) avaliaram a processabilidade de blendas de TPS e gelatina pelas seguintes técnicas: prensagem, prensagem seguida por sopro e extrusão seguida por sopro. Os bioplásticos obtidos por termo prensagem apresentaram menores valores de resistência à tração em relação aos outros e além de morfologia da superfície irregular, com rachaduras. A análise de microestrutura mostrou que não houve separação entre a fase de amido, de gelatina e de plastificante, que ilustra alguma afinidade entre estes componentes. Park et al. (1999) estudaram o efeito da adição de amido de milho com alto teor de amilose (80%) em blendas com PLA produzidas por termoprensagem. Houve uma redução na resistência à tração e alongação das blendas. Apesar de terem observado que o amido agiu como agente de nucleação com aparecimento de espaços vazios na estrutura polimérica, a análise de ATR-IR (*Attenuated Total Reflectance-Infrared*) mostrou um deslocamento na banda C=O do PLA no espectro indicando interação tipo ligação de hidrogênio entre o grupo éster do PLA e o grupo hidroxila do amido. Park et al. (2004) produziram filmes por extrusão de PLA/amido e observaram na sua microestrutura espaços vazios, formados pela separação de grânulos

de amido da matriz polimérica. Os vazios desapareceram em filmes onde o amido foi pré-gelatinizado indicando que uma melhora na adesão interfacial entre os componentes da blenda. Shirai et al. (2013) produziram filmes de TPS por extrusão e sopro para avaliar o efeito da adição de PLA plastificado com adipato ou ésteres de citrato. Os ésteres de adipato com estrutura linear e menor peso molecular em concentração mais baixa foram os melhores plastificantes para o PLA. Foi possível produzir filmes com propriedades mecânicas adequadas para vários tipos de aplicações.

Blendas compostas pelos três componentes TPS, PLA e gelatina ainda não foram estudadas com a mesma amplitude que as blendas discutidas anteriormente. Guzman-Sielicka, Janik e Sielicki (2013) produziram blendas de amido, gelatina e PLA plastificadas com glicerol por termo prensagem. Os autores adicionaram ainda  $\text{CaCO}_3$  como carga a fim de reduzir o preço da blenda. Porém o estudo apresenta somente resultados de microscopia ótica de polarização e de biodegradação em ambiente marinho e nenhuma propriedade mecânica é avaliada. Sendo assim existe a ampla oportunidade de investigação da produção e propriedades de blendas de TPS, PLA e gelatina.

#### 2.4 Embalagens Ativas com Propriedades Antimicrobianas

A função principal das embalagens de alimentos é a de manter a qualidade e segurança dos produtos alimentares durante o armazenamento e transporte, e prolongar a vida de prateleira de produtos alimentares, impedindo o contato com fatores ou condições desfavoráveis, tais como microorganismos, contaminantes químicos, oxigênio, umidade, luz, etc. Dessa forma, os materiais de embalagem fornecem proteção física e criam condições físico-químicas adequadas para os produtos, sendo essenciais para a obtenção de uma vida útil satisfatória e manter a qualidade e segurança alimentar (RHIM; PARK; HA, 2013).

Normalmente, os aditivos antimicrobianos são adicionados diretamente nas formulações dos alimentos para controlar o crescimento microbiano e prolongar a vida de prateleira, no entanto, esta maneira não é sempre eficaz uma vez que a capacidade de proteção do agente antimicrobiano é

neutralizado em reações e/ou interações com os demais componentes dos alimentos. Além disso, o composto antimicrobiano adicionado diretamente nos alimentos não permanecem somente na superfície dos mesmos, onde ocorrem as reações de deterioração mais intensivamente (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Embalagens ativas apresentam um conceito inovador que pode ser definido como uma forma em que a embalagem, o produto e o meio ambiente interagem para prolongar a vida de prateleira ou a melhorar a segurança e as propriedades sensoriais, mantendo a qualidade do produto (SUPPAKUL et al., 2003). Para tanto, têm sido desenvolvidas embalagens alimentícias com sistemas de atmosfera modificada, controle e absorção de umidade, incorporação de aditivos antimicrobianos e antioxidantes (SUPPAKUL et al., 2003; HEMPEL et al., 2013; GOMEZ- ESTACA et al., 2014).

Uma vasta gama de substâncias antimicrobianas foram testadas em laboratórios para as suas potenciais aplicações em embalagens antimicrobianas de alimentos. Estas substâncias incluem ácidos orgânicos (ácido benzoico e sorbatos), enzimas (lisozima e glicose oxidase), bacteriocinas (nisina e pediocina), fungicidas (benomyl e imazalil), polímeros (principalmente a quitosana), extratos naturais, antibióticos (triclosan e compostos de prata), etc. (BASTARRACHEA, DHAWAN e SABLANI, 2011).

#### 2.4.1 Embalagens Contendo Nanopartículas de Prata

A prata tem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo ativa contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, protozoários, e certos vírus (KUMAR; MUNSTEDT, 2005).

Diversos estudos têm sido feitos quanto à incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) em diferentes materiais para embalagens ativas de alimentos. Sánchez-Valdes et al. (2008) produziram um compósito de polietileno e nanopartículas de prata depositado em uma estrutura de filme com cinco camadas. Tankhiwale e Bajpai (2009) desenvolveram em filtros de papel comuns um material antibacteriano para aplicação em embalagens, pela grafitação de monômeros vinílicos, como a acrilamida, seguida pela

incorporação de nanopartículas de prata. Os autores concluíram que o material apresentou ação biocida contra *E. coli* podendo ser aplicado como embalagem antimicrobiana para alimentos. Emamifar et al. (2010) avaliaram a capacidade de filmes nanocompósito de polietileno de baixa densidade contendo nanopartículas de óxido de zinco e prata como uma nova proposta de preservação e aumento da vida de prateleira de suco de laranja. Os autores observaram uma prolongação da vida útil do suco de laranja fresco de até 28 dias sem efeitos negativos nos aspectos sensoriais. De Moura, Mattoso e Zucolotto (2012) investigaram as propriedades de filmes de hidroxipropil metil celulose contendo nanopartículas de prata e concluíram que o nanocompósito pode ser utilizado como revestimento interno antimicrobiano em embalagens alimentícias.

#### 2.4.2 Síntese Verde de AgNPs

As AgNPs mostram propriedades antimicrobianas mais eficientes quando comparadas com sais de prata devido a sua área superficial extremamente grande que proporciona melhor contato com os microorganismos (RAI; YADAV; GADE, 2009).

Existe uma diversidade de técnicas desenvolvidas para sintetizar nanopartículas de prata, como: redução química (ZHANG; QIAO CHEN, 2006), irradiação de raios  $\gamma$  (CHEN; SONG; LIUY, 2007), ablação por laser (ABID et al., 2002), método eletroquímico (REICHA et al., 2012), autoclavagem (YANG; PAN, 2012), aplicação de micro-ondas (KHAN et al., 2011) e a redução fotoquímica (ALARCON et al., 2012). Dentre todos esses métodos a síntese por redução química foi bastante utilizada, por apresentar diversas vantagens como produzir nanopartículas sem agregação, alto rendimento e de baixo custo de preparação. O método de redução química se caracteriza pela redução de íons de prata com a utilização de um agente redutor, tal como borohidreto de sódio (EOM, 2013), hidrazina (RYU et al., 2005), formamida (SARKAR; KAPOOR; MUKHERJEE, 2005), formaldeído (WU; HSU, 2008), ácido ascórbico (QIN et al., 2010), anilina (KHAN, 2011), tirosina (KHAN, 2012), etileno-glicol (ZHAO et al., 2010) e glicose (SHERVANI et al., 2011), etc. A io apropriado e na presença de um estabilizador adequado, tal como brometo de

cetiltrimetilamônio (KHAN, 2012), citrato de sódio (PINTO et al., 2010), polivinilpirrolidona (PVP) (WANG, 2005), poli(álcool vinílico) (KHANNA et al., 2005), etc. Porém, muitos desses reagentes podem estar associados a potencial toxicidade ambiental, bem como a riscos biológicos (ZAHEER; RAFIUDDI, 2011).

O desenvolvimento de AgNPs utilizando técnica de síntese verde revolucionou todo o campo da síntese de nanopartículas. Existem três itens principais na preparação de nanopartículas que devem ser considerados: i- a escolha do solvente, ii- o agente de redução compatível com o ambiente, e iii- um material não tóxico para a estabilização das nanopartículas. Para tanto, polímeros naturais têm sido utilizados como agentes redutores e ao mesmo tempo estabilizantes, como por exemplo a quitosana (WEI et al., 2009), o amido solúvel (KASSAEE, 2008), a heparina (HUANG; YANG, 2008) e o ácido hialurônico (XIA et al., 2011).

Uma das técnicas de síntese verde que se destaca é a técnica do polissacarídeo modificada (GHASEMINEZHAD; HAMED; SHOJAOSADATI, 2012). Nela glicose é utilizada com agente redutor de íons prata e amido é utilizado como agente estabilizante. O processo de redução dos íons prata em prata metálica ocorre por autoclavagem (121 °C e 15 psi). Além da glicose adicionada, nessas condições o amido é hidrolisado hidrotérmicamente, produzindo glicose que contribui para a redução da prata. Stevanović et al. (2011) descrevem que no primeiro passo os íons de prata são reduzidos levando à formação de *clusters* de prata, em seguida ocorre a redução de íons adjacentes e a sua acumulação nos *clusters* de prata. Finalmente o crescimento das nanopartículas de prata é controlado por estabilização coloidal.

O mecanismo de formação das AgNPs pela técnica do polissacarídeo modificada é apresentado na Figura 3.

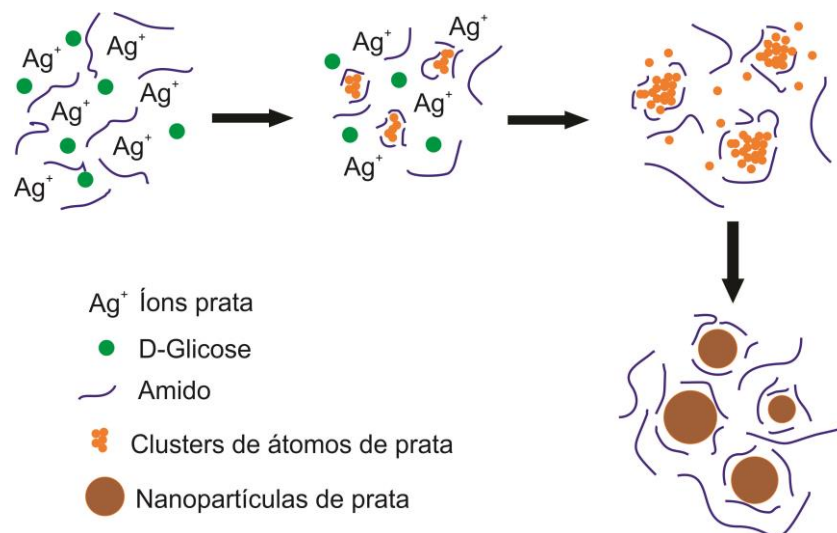


Figura 3- Esquema representando o mecanismo de formação de nanopartículas de prata utilizando a síntese verde.

#### 2.4.3 Mecanismo de Ação das AgNPs

Embora não se conheça corretamente como ocorre a ação antimicrobiana das AgNPs, existem alguns mecanismos que podem ser levados em consideração para explicar esse processo.

Um deles é o rompimento da membrana celular devido à interação das AgNPs com compostos contendo enxofre e fósforo, incluindo proteínas e o DNA, impedindo a replicação do DNA e levando à morte celular (MORONES et al., 2005). Um segundo mecanismo possível é a ligação das AgNPs carregadas positivamente com a membrana celular bacteriana carregada negativamente, o que causa rompimento das paredes celulares e de proteínas superficiais, levando à morte celular (SUI et al., 2006). O terceiro seria pela penetração das AgNPs na célula bacteriana, causando a inativação de enzimas e produzindo  $\text{H}_2\text{O}_2$  levando à morte celular (RAFFI et al., 2008).

Independente do mecanismo, as AgNPs mostram-se alternativas viáveis de serem sintetizadas e possuidoras de elevada atividade antimicrobiana, tornando-se interessantes para serem aplicadas a embalagens biodegradáveis ativas.

#### 2.4.4 Tratamento Superficial de Filmes Poliméricos

Algumas estratégias têm sido empregadas para incorporação de agentes antimicrobianos a filmes poliméricos. Na maioria das vezes os filmes são produzidos por *casting* e o agente antimicrobiano é incorporado diretamente à solução filmogênica (LARA-LLEDÓ; OLAIMAT; HOLLEY, 2012; EHIVET et al., 2011). No caso da extrusão o agente antimicrobiano pode ser incorporado diretamente durante o processamento (PIRES; PETZHOLD; SANTOS, 2014).

Porém da mesma forma que os agentes antimicrobianos adicionados às formulações alimentícias, nos filmes eles também atuam de forma mais efetiva na superfície pelo contato com o alimento, sendo a parte interna do filme desprezível no processo. Dessa forma uma estratégia que vise aplicar o agente antimicrobiano na superfície dos filmes para reduzir a quantidade do mesmo utilizado na formulação deve ser levada em consideração.

Modificações superficiais podem ser aplicada a filmes poliméricos como por exemplo com a técnica de *layer-by-layer* (camada-por-camada) que emergiu como uma ferramenta promissora para a funcionalização de vários substratos devido à sua facilidade de formação e flexibilidade de adaptar as propriedades físico-químicas (YAMANLAR et al., 2011). Soares et al. (2013) produziram laminados de PLA e amido de mandioca plastificado com glicerol produzidos por extrusão. Os laminados foram submetidos a um tratamento de recobrimento com quitosana reticulada com glutaraldeído para estudar o efeito do revestimento nas suas propriedades mecânicas, na solubilidade em água e na permeabilidade ao vapor de água. O revestimento melhorou as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água e reduziu a solubilidade em água, além de alterar as características morfológicas da superfície dos laminados.

A gelatina, como a maioria das proteínas, produz filmes com propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água não ideais, o que limita a sua aplicação. A modificação da rede polimérica por meio de ligações cruzadas (reticulação) é uma alternativa para melhorar a funcionalidade dos filmes proteína (CAO; FU; HE, 2007). A reticulação de proteínas é alcançada usando reagentes como o glutaraldeído, formaldeído, a transglutaminase e a



genipina (SHEWAN; STROKES, 2013). Para contornar a utilização de reagentes de reticulação tóxicos como o glutaraldeído e o formaldeído, a enzima transglutaminase tem sido proposta, já que não apresenta limitações quanto a toxicidade (PRATA et al., 2008).

Transglutaminases (TGases) são uma família amplamente larga de enzimas presentes em animais, plantas e organismos unicelular, que são responsáveis pela modificação de proteínas, agindo como cálcio-dependente (IORIO et al., 2012). Ela é capaz de catalisar reações de acil-transferência entre grupos  $\gamma$ -carboxiamídico e resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica (aciloadadores) e uma variedade de aminas primárias (acil-receptores), incluindo os grupos  $\epsilon$ - amino de resíduos de lisina em certas proteínas. É usado como um agente de reticulação comestível e tem sido amplamente utilizado na fabricação de queijo, processamento de carne, e produção de filmes comestíveis (DONG et al., 2008). Dessa forma, o aumento do grau de ligações intra e intermoleculares, causadas por reações enzimáticas, pode aumentar a aproximação da matriz polimérica, provocando a alteração de funcionalidade, incluindo a diminuição da solubilidade e da permeabilidade ao vapor de água (CAO, FU e HE, 2007).

A incorporação de AgNPs a superfície de filmes compostos por TPS, PLA e gelatina por tratamento superficial de reticulação enzimática com gelatina é proposta no presente trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é a obtenção de laminados de poli(L-ácido láctico)/amido termoplástico/gelatina incorporados superficialmente com nanopartículas de prata bem como sua caracterização.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar as AgNPs utilizando a técnica do polissacarídeo modificada e quantificar a concentração real de prata metálica por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS);
- Caracterizar AgNPs quanto a morfologia (Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV), diâmetro médio e índice de polidispersão (Espalhamento Dinâmico de Luz e por Espectrofotometria UV-Vis) e grupos funcionais presentes na superfície das mesmas (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, FTIR);
- Determinar as concentrações inibitória mínima e bactericida mínima das AgNPs contra as seguintes bactérias: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Produzir laminados de poli(L-ácido láctico)/amido termoplástico/gelatina, com diferentes concentrações de gelatina, por extrusão;
- Recobrir os laminados por tratamento superficial com reticulação de gelatina via enzimática para incorporação das AgNPs;
- Caracterizar os laminados produzidos (com e sem incorporação de AgNPs) quanto as suas propriedades mecânicas (ensaio de tração) e de barreira (solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água);
- Caracterizar a morfologia dos laminados produzidos com e sem incorporação de AgNPs por MEV.
- Avaliar as propriedades antimicrobianas dos laminados com e sem incorporação de nanopartículas de prata.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Amido solúvel (Merk), D-glicose (Isofar) e nitrato de prata (Proquímios) foram utilizados na síntese das nanopartículas de prata. As bactérias Gram positivas, *Bacillus cereus* (IAL55) e *Staphylococcus aureus* (IAL1875) e bactérias Gram negativas, *Escherichia coli* (IAL339) e *Pseudomonas aeruginosa* (IAL2081), caldo Muller-Hinton (Biomark), e solução salina foram utilizados nas análises microbiológicas. Para preparação da solução padrão McFarland de 0,5 foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de bário (Vetec) e ácido sulfúrico (Proquímios). Brometo de potássio (KBr, Sigma Aldrich) foi utilizado para a análise de FTIR. Os laminados foram produzidos com amido de mandioca (Indemil, Brazil), glicerol, gelatina (Dinâmica, P.A.) e PLLA Ingeo 4043D (Natureworks LLC, Cargill, USA). Nitrato de magnésio e cloreto de sódio anidro (Vetec) foram utilizados para controlar a umidade durante o condicionamento dos laminados. Transglutaminase Activa WM (AJINOMOTO) obtida do *Streptomyces mobaraense* foi utilizada para reticulação superficial dos laminados.

### 4.2 Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)

A técnica do polissacarídeo modificada (GHASEMINEZHAD; HAMED; SHOJAOSADATI, 2012) foi adotada para síntese das AgNPs. Para tanto, soluções aquosas de nitrato de prata (2 mL, 25 mM), de amido (gelatinizado a 90 °C, 50 mL, 1%g/g) e de D-glicose (4 mL, 25 mM) foram preparadas. Em seguida as soluções foram homogeneizadas com agitação magnética por 5 min. Finalmente a solução resultante foi autoclavada a 121°C e 15 psi (Prismatec) por 15 min. Ao final do procedimento a solução apresentou coloração amarelo marrom, indicando a formação das AgNPs. A solução foi armazenada a temperatura ambiente.

### 4.3 Caracterização das nanopartículas de prata

#### 4.3.1 Morfologia das AgNPs

A morfologia das nanopartículas de prata foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (Shimadzu SSX 550 Superscan) localizado no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A solução contendo as nanopartículas foi seca em lamínula de vidro que em seguida foi recoberta com ouro (*sputter*).

#### 4.3.2 Diâmetro médio e índice de polidispersão

Foram determinados o tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão utilizando a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, MALVERN – Zetasizer Nano S). O equipamento utilizado está localizado no Laboratório de Controle de Processos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O diâmetro médio também foi estimado utilizando o cálculo da largura à meia altura (*Full-Width at Half Maximum*, FWHM) do espectro da solução das nanopartículas obtido por Espectrofotometria UV-Vis (OCEAN OPTICS, USB650UV) (BECHTOLD, 2011). Para tanto, uma solução branco foi preparada com o mesmo procedimento da síntese de nanopartículas de prata, sem a adição do nitrato de prata. Após a obtenção do espectro de varredura da solução contendo as AgNPs foi determinada graficamente a altura no ponto de máxima absorção do espectro. Em seguida foi localizada a largura no ponto referente à meia altura (diâmetro estimado).

As imagens obtidas por MEV das AgNPs também foram submetidas a análise através do software *SizeMeter* para determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanhos das nanopartículas. Para tanto 305 medidas de diâmetro foram tomadas e a distribuição de tamanhos foi obtida por meio de construção de um histograma (LEIMANN et al., 2008).

#### 4.3.3 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas foi obtida por Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu) (GHASEMINEZHAD; HAMED; SHOJAOSADATI, 2012). A solução resultante da síntese das nanopartículas foi seca em estufa. As pastilhas de brometo de potássio (100 mg, KBr) foram preparadas com 10 mg da amostra seca. As pastilhas de KBr foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  utilizando 32 acumulações e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  (LEIMANN, 2011). Para comparação foi analisada a amostra branco (mesmo procedimento adotado para a caracterização do diâmetro por UV-Vis).

#### 4.3.4 Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

A concentração total de prata metálica sintetizada foi determinada por espectroscopia de massa foram feitas no Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da UFSC em um espectroscópio de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Perkin Elmer, modelo Nexlon 300 D, Shelton, USA. A solução de AgNPs resultante da síntese foi diluída em 200 vezes para a determinação.

### 4.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana das AgNPs

#### 4.4.1 Preparo dos inóculos bacterianos

Para a determinação da atividade antimicrobiana in vitro foram utilizadas bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Para padronização dos inóculos microbianos, foram selecionadas, pelo menos, de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico, em placa de ágar. Os inóculos de cada cultura foram transferidos com o auxílio de uma alça de semeadura para tubos contendo caldo Müller-Hinton. As culturas foram incubadas a 35 °C, por 24 horas. A turbidez da cultura em crescimento ativo de

24 horas foi ajustada com solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. Após, foram realizadas diluições 1:10 em tubo Eppendorf da suspensão padronizada ( $10^8$  UFC/mL), obtendo-se uma suspensão de  $10^7$  UFC/mL.

#### 4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana das AgNPs foi avaliada utilizando o método de microdiluição em caldo, o qual determina a concentração mínima inibitória (CIM). Placas de microtitulação (96 poços) foram utilizadas para os testes. Foram pipetados 100 $\mu$ L de caldo Müller-Hinton (CMH) nos poços da microplaca. A seguir, 100 $\mu$ L de uma solução contendo AgNPs foram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneizados, foram transferidos 100  $\mu$ L do conteúdo deste poço para o segundo, e assim sucessivamente, obtendo-se diferentes concentrações de AgNPs. Para a preparação do inóculo bacteriano, suspensões bacterianas com turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) foram diluídas 10x em salina estéril, obtendo-se inóculos bacterianos com concentração  $10^7$  UFC/mL. Desta suspensão, 5  $\mu$ L foram inoculados em cada poço da microplaca (NCCLS, 2003). A CIM foi determinada após 24 h de incubação a 37 °C, sendo a menor concentração das AgNPs capaz de causar inibição total do crescimento microbiano.

#### 4.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada pela transferência de uma alíquota de 10  $\mu$ L do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível no teste de CIM, para a superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton. Após 48 h de incubação a 37 °C em estufa para cultura bacteriológica se definiu a concentração bactericida mínima, que foi a menor concentração capaz de causar a morte do inóculo.

#### 4.5 Produção dos Laminados De PLLA/TPS/Gelatina

Foram produzidas blendas de amido termoplástico (TPS), gelatina e PLLA em extrusora mono rosca (marca BGM, modelo EL-25, Brasil), empregando-se as seguintes condições: diâmetro das roscas de 20 mm, comprimento do parafuso de 28D, velocidade do parafuso de 30 rpm e perfil de temperatura 90 / 180 / 180 / 180°C nas quatro zonas. As formulações utilizadas estão apresentadas da Tabela 1, sendo o controle selecionado a partir de resultados apresentados por Shirai (2013).

Tabela 1- Formulações utilizadas para a produção dos laminados.

<b>Formulação</b>	<b>PLA (g)</b>	<b>Amido (g)</b>	<b>Glicerol (g)</b>	<b>Gelatina (g)</b>
FC	250	187,50	62,50	0,00
FG1	250	185,62	61,88	2,50
FG3	250	181,88	60,63	7,50
FG5	250	178,13	59,37	12,50

Os extrusados obtidos na forma de perfis cilíndricos foram peletizados e processados em extrusora dupla rosca co-rotacional (marca BGM, modelo D-20) para produção dos laminados. O perfil de temperatura empregado foi de 100 / 170 / 170 / 170 / 175 °C, a velocidade do alimentador foi de 30 rpm e a velocidade dos parafusos foi de 100 rpm. Próximo à matriz da extrusora foi acoplada uma calandra laminadora, (AX- plásticos, Brasil) em 45°, composta de sistema de resfriamento dos cilindros por água, puxador, bobinador e painel de controle de rotação dos cilindros. A distância entre os cilindros utilizada foi de 0,5 mm a 0,8 mm e a rotação foi ajustada conforme a formulação para manter a continuidade do processo.

#### 4.6 Aplicação das AgNPs aos Laminados de PLLA/TPS/gelatina

Para incorporação das AgNPs aos laminados 32 mL de uma solução aquosa contendo gelatina (0,8 %g/g) e transglutaminase (1 %g/g) foi adicionada à solução final obtida na síntese das AgNPs (volume). A concentração final de AgNPs nesta solução foi escolhida em função da caracterização da CIM das AgNPS contra o microorganismo que apresentou maior resistência. A solução resultante foi então colocada em uma bandeja e os laminados previamente cortados (10 cm x 20 cm) foram mergulhados na

solução por 30 s. Em seguida os laminados tratados foram mantidos suspensos em um varal para secagem da solução e reticulação com a transglutaminase a temperatura ambiente durante 24 h. Após a secagem os filmes foram armazenados em sacos plásticos fechados. Os filmes reticulados com tratamento superficial para incorporação das AgNPs foram denominados: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).

#### 4.7 Caracterização dos laminados

##### 4.7.1 Espessura e Densidade

A espessura foi determinada com um micrômetro digital (Starrett) com resolução de 0,001 mm. Foram utilizados 10 pontos aleatórios sobre a superfície de cada filme e a média dessas medidas foi então calculada.

Para determinar a densidade, amostras de filmes na dimensão de 20 mm x 20 mm foram mantidos em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro (0% RH) por 2 semanas em incubadora de BOD e pesados. A densidade foi calculada com a Equação (1), onde  $m_f$  é a massa do filme (g), e  $E$  a espessura do filme (mm). Os resultados foram expressos em  $g/cm^3$ .

$$D = \frac{1000.m_f}{400.E} \quad \text{Equação (1)}$$

##### 4.7.2 Propriedades Mecânicas

Foram avaliadas as amostras dos laminados com e sem tratamento superficial de incorporação das AgNPs. Os corpos de prova foram cortados em tamanhos igual a 100 x 10 mm. As análises foram realizadas no laboratório de Tecnologia do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os testes de tração nas amostras foram feitos em texturômetro (Stable Micro Systems, TA XTplus), conforme os métodos e normas da American Society for Testing and Material (ASTM D-882-00, 2001). As propriedades determinadas foram resistência máxima a tração



(MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade ou de Young (MPa).

#### 4.7.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor foi determinada por método gravimétrico, conforme a ASTM E-96-00 (2000) com algumas modificações. Os filmes cortados em formato circular com 60 mm de diâmetro foram previamente condicionado sob UR de 53% durante 48 horas em incubadora de BOD (ACB LABOR). Em seguida, os mesmos foram fixados em uma cápsula de alumínio, vedada nas extremidades com graxa de silicone e presos hermeticamente com os anéis de vedação para garantir que a migração de umidade ocorresse através do filme. O interior da cápsula foi previamente preenchido com cloreto de cálcio anidro (0% UR) e o sistema foi condicionado em dessecador contendo solução de cloreto de sódio (75% UR) a 25 °C em incubadora de BOD.

Sucessivas pesagens foram realizadas a cada 12 horas, por um intervalo de tempo de 5 dias. O ganho de massa ( $m$ ) foi plotado em função do tempo ( $t$ ) sendo determinado o coeficiente angular através da equação da reta obtida por regressão linear e a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) calculada através da Equação 2. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada com a Equação 3.

$$TPVA = \frac{m}{t} \cdot \frac{1}{A} \quad \text{Equação (2)}$$

$$PVA = \frac{TPVA \cdot e}{p_s \cdot (UR_1 - UR_2)} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

- PVA - Permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ )
- E - Espessura média do corpo-de-prova (m)
- Os - Pressão de saturação e vapor a temperatura do ensaio (Pa)
- UR1 - Umidade relativa dentro do dessecador (%)

- UR2 - Umidade relativa dentro da Cápsula (%)  
 TPVA - Taxa de permeabilidade ao vapor de água (g.dia<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>)  
 M - Ganho de massa de água (g)  
 t - Tempo (dia)  
 A - Área de permeação do corpo de prova (m<sup>2</sup>)

#### 4.7.4 Umidade dos laminados

A umidade dos laminados com e sem incorporação das AgNPs foi determinada por secagem em estufa de circulação de ar (Cienlab) 70 °C por 24 h e pelo uso da Equação 4, onde  $U$  é a umidade do laminado (%),  $mi_1$  é a massa inicial da amostra (g) e  $ms_1$  a massa seca final da amostra (g).

$$U = \frac{(mi_1 - ms_1)}{mi_1} \cdot 100 \quad \text{Equação (4)}$$

#### 4.7.5 Solubilidade em água

Os corpos de prova dos laminados (2 x 2 cm) foram submetidos a imersão (triplicata) em erlenmeyer contendo 200 mL de água destilada e mantido em banho a 25 +/- 2 °C por 24 h (IRISSIN- MANGARA et al., 2001). Após esse período, o laminado restante foi removido e seco à 70 °C em estufa de convecção de ar por 24 h para determinar a massa seca final ( $ms_2$ ). A solubilidade do laminado (SOL) foi calculada em função da massa seca inicial do laminado através da Equação 4, onde  $mi_2$  denota a massa inicial da amostra (g),  $m_a$  a massa de água calculada a partir da umidade, sendo  $(mi_2 - m_a)$  a massa inicial do laminado em base seca e  $ms_2$  a massa seca final da amostra (g).

$$SOL = \frac{((mi_2 - m_a) - ms_2)}{(mi_2 - m_a)} \cdot 100 \quad \text{Equação (4)}$$

#### 4.7.6 Isoterma de sorção de água

As amostras dos laminados com e sem tratamento foram cortadas em pequenos quadrados com dimensões aproximadas de 5 x 5 mm e mantidas por 14 dias em dessecador contendo sílica gel para remoção da umidade. Após este período as amostras foram acondicionadas a 25°C em potes herméticos contendo diferentes soluções saturadas de sais que proporcionou uma URE diferente (Tabela 2). As amostras foram pesadas até atingir o equilíbrio e em seguida tiveram sua umidade absoluta determinada pelo método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C por 24h.

As isotermas foram obtidas a partir da plotagem dos dados de umidade atingida pelas amostras no equilíbrio versus a URE e ajuste por regressão ao modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Equação 5.

$$X_w = \frac{C \times K \times m_o \times a_w}{[(1 - K \times a_w)(1 - K \times a_w + C \times K \times a_w)]} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

$X_w$  = Umidade de equilíbrio (g de água/g de matéria seca)

$C$  = Constante de Guggenheim, que representa o calor de sorção na primeira camada

$K$  = Calor de sorção das múltiplas camadas

$m_o$  = Teor de água na monocamada

$a_w$  = Atividade de água

Tabela 2 – Soluções salinas e suas umidades relativas de equilíbrio a 25°C.

Sal	Nome	URE a 25°C
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio Anidro P.A.	0%
LiCl	Cloreto de Lítio Anidro P.A.	11,3%
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de Magnésio Hexaidratado P.A.	32,4%
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Nitrato de Magnésio Hexaidratado P.A.	52,9%
NaCl	Cloreto de Sódio Anidro P.A.	75,3%
KCl	Cloreto Potássio P.A.	85%

#### 4.7.7 Morfologia dos laminados

As análises foram realizadas no laboratório de Tecnologia do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em microscópio eletrônico de varredura Phillips, modelo FEI Quanta 200. As amostras dos laminados foram inicialmente condicionadas com em dessecador contendo sílica gel para remoção da umidade. Em seguida foram mergulhadas em nitrogênio líquido e então fraturadas. Finalmente as mesmas foram aderidas em suportes metálicos e por fim metalizadas em *sputter coater* marca Bal-Tec, modelo SCD-050.

#### 4.7.8 Atividade antimicrobiana dos laminados

Amostras de laminados com e sem tratamento superficial de incorporação das AgNPs foram submetidos à avaliação de atividade antimicrobiana. Os filmes foram cortados em círculos de 2 mm de diâmetro e autoclavados por 15 minutos. Em seguida foram colocadas na estufa com sílica, por 24 horas. Os inóculos bacterianos previamente padronizados (escala 0,5 McFarland) foram semeados homoganeamente com swab em toda superfície de placas de petri contendo ágar Müller-Hinton. Os discos dos filmes com tratamento com as AgNPs foram aplicados sobre as placas de petri, que foram então incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período, as placas foram analisadas observando-se a formação de halos de inibição ao redor dos filmes.

#### 4.8 Análises estatísticas

Os resultados de umidade, espessura, densidade, solubilidade, PVA e propriedades mecânicas foram submetidos à análise de variância ANOVA a um nível de significância de 5% e ao teste de Tukey utilizando o software Statistica 7.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos laminados de PLLA / TPS / gelatina

Imagens dos laminados produzidos estão apresentadas na Figura 4.

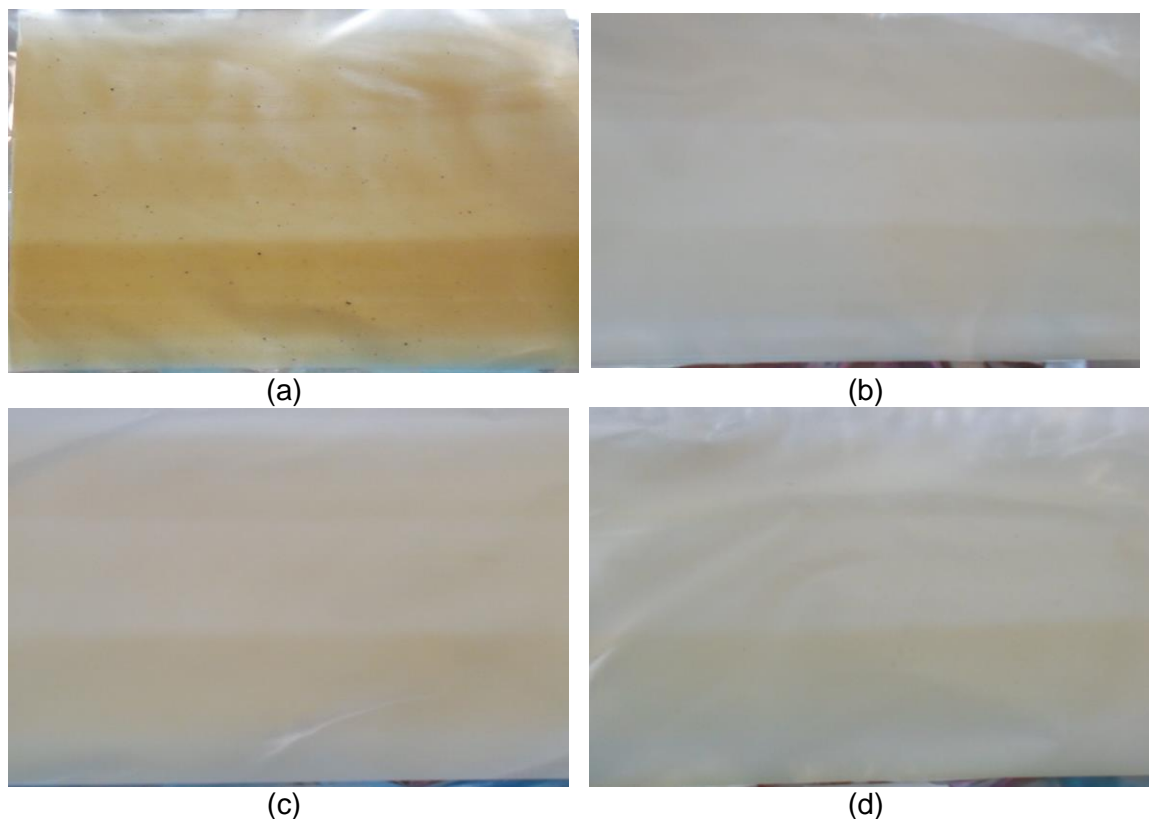


Figura 4- Laminados de PLLA / TPS / gelatina produzidos por extrusão: (a) FC (controle, 0% gelatina); (b) FG1 (1% gelatina); (c) FG3 (3% gelatina); (d) FG5 (5% gelatina).

Analisando visualmente os laminados produzidos (Figura 4) pode ser observado que o aumento da quantidade de gelatina (FG3 e FG5) resultou em aspecto mais áspero, coloração mais amarelada e a consistência mais rígida com aumento da espessura. Os laminados produzidos com maior concentração relativa de amido (FG1), apresentaram coloração mais branca, aspecto liso e consistência delicada. Resultados semelhantes também foram observados por Fakhoury et al. (2012).

A morfologia dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina) e FG5 (5% gelatina) foi caracterizada por MEV sendo que as micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 5.

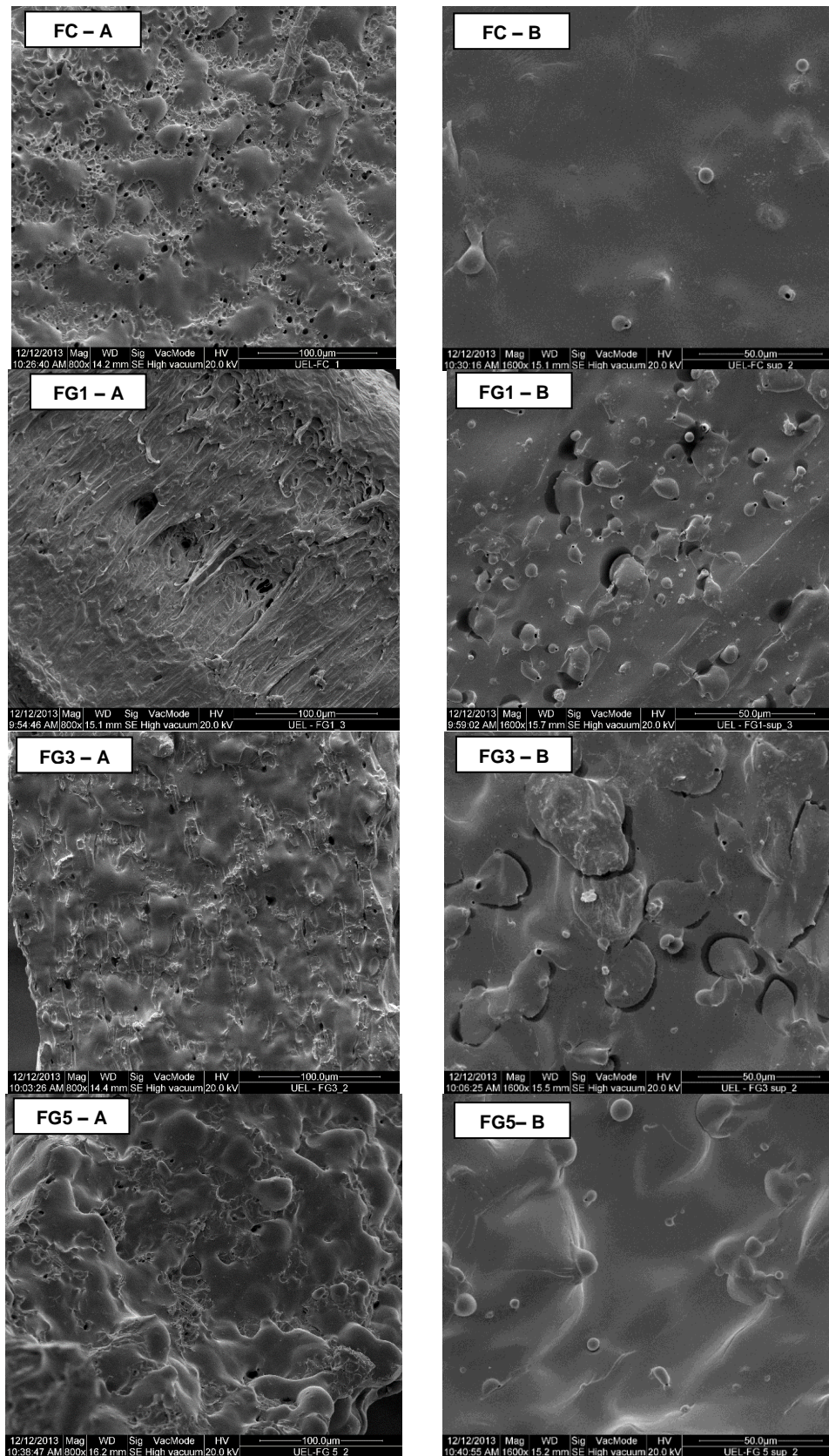


Figura 5 – Micrografias dos laminados onde (A) fratura (magnificação: 800 x) e (B) superfície (magnificação: 1.600 x). FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

As fraturas dos laminados apresentaram características bem diferentes como pode-se observar na Figura 5. É possível observar na micrografia do laminado controle (FC - A) maior porosidade enquanto que para a formulação FG1 (FG1 - A) são observadas estruturas com aspecto fibroso que proporcionaram cavidades em forma de vales. Os laminados FG3 (FG3 - A) e FG5 (FG5 - A) apresentaram estrutura mais compacta, com menor porosidade que a formulação controle.

É possível observar a presença de grânulos de amido não gelatinizado na superfície de todos os laminados e que as superfícies mais lisas foram as das formulações controle (FC - B) e com 5% de gelatina (FG5 - B). As formulações intermediárias apresentaram aspecto irregular e poroso. Resultados semelhantes foram observados por Zhang et al. (2013) que produziram filmes de gelatina e amido. Os autores observaram protuberâncias nas superfícies dos filmes e que a densidade das mesmas aumentava diretamente com a proporção de amido. Como os filmes foram produzidos por *casting* os autores sugerem que isso se deve ao fato das duas fases apresentarem taxas de encolhimento diferentes durante a secagem. No caso do presente trabalho é possível que a taxa de encolhimento dos materiais tenha sido diferente na etapa de resfriamento após a laminação.

Guzman-Sielicka, Janik e Sielicki (2013) produziram blendas de PLLA, gelatina e TPS por termoprensagem e observaram um aumento na porosidade da superfície com o aumento da concentração de gelatina. Provavelmente esse efeito não pôde ser observado no presente trabalho devido as quantidades diferentes de gelatina que foram utilizadas, muito menores (de até 5 % relativa a formulação total) comparado com os filmes de Guzman-Sielicka, Janik e Sielicki (2013) (de 10 a 40%).

Os valores determinados para a densidade e espessura dos laminados produzidos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados obtidos de espessura e densidade dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>
FC	0,357 ± 0,047	1,25 ± 0,09
FG1	0,316 ± 0,025	1,31 ± 0,09
FG3	0,391 ± 0,040	1,22 ± 0,07
FG5	0,320 ± 0,079	1,04 ± 0,10

Quanto aos resultados de espessura e densidade (Tabela 3) a análise de variância não indicou diferença significativa a 5% de significância. Este fato pode ser explicado pela uniformidade do material produzido por extrusão. Choi et al. (1998) produziram peles artificiais compostas por alginato de sódio e gelatina e constataram o que com o aumento da concentração de gelatina houve uma diminuição da densidade do material. Este efeito não foi observado nos resultados da Tabela 3 possivelmente devido à variação da concentração de gelatina não ter sido tão elevada.

Tabela 4- Resultados obtidos para permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

Formulação	PVA ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) ( $\times 10^{-6}$ )
FC	$2,83^a \pm 0,068$
FG1	$3,25^a \pm 0,003$
FG3	$3,45^a \pm 0,075$
FG5	$10,1^b \pm 1,148$

<sup>a,b</sup> As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

De acordo com a análise estatística de variância a 5% de significância, houve diferença significativa entre os valores de PVA da amostra com 5% de gelatina (FG5R) e as demais formulações. Isso pode ser explicado pela maior quantidade de gelatina que apresenta maior caráter hidrofílico que o amido.

Al-Hassan e Norsiah (2012) obtiveram resultados na faixa de  $4$  a  $5 \times 10^{-6}$   $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  para a PVA de filmes de amido de sorgo e gelatina (glicerol como plastificante). Fakhouri et al. (2009) obtiveram PVA igual a  $3,38 \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  para filmes de amido de milho lipofílico e gelatina plastificados com ácido caprílico. No presente trabalho a incorporação de TPS e gelatina ao PLLA permitiu que a PVA se aproximasse de valores obtidos para blendas de gelatina e TPS.

Os resultados obtidos para as análises de umidade e solubilidade estão dispostos na Tabela 5. A análise de umidade não apresentou resultados com diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), como pode ser observado na Tabela 5. Já para os resultados referentes à solubilidade houve diferença significativa entre a formulação controle (sem gelatina) e a formulação com 5% de gelatina (FG5).



Tabela 5- Resultados obtidos para umidade e solubilidade dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>U (%)</b>	<b>SOL (%)</b>
FC	6,1 ± 0,59	19,1 <sup>a</sup> ± 0,89
FG1	6,4 ± 0,12	20,6 <sup>a,b</sup> ± 1,83
FG3	7,6 ± 0,02	22,7 <sup>a,b</sup> ± 1,65
FG5	5,4 ± 1,27	26,4 <sup>b</sup> ± 1,5

<sup>a,b,c,d</sup> As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Esse resultado se deve provavelmente a maior solubilidade da gelatina na água, pois os filmes de gelatina plastificados são completamente solúveis na mesma (PEREDA et al., 2011). Fakhouri et al. (2009) avaliando a solubilidade de filmes de gelatina e amido de milho com ácido caprílico como plastificante obtiveram valores de até 44,82%. Soares et al. (2013) determinaram a solubilidade de blendas de laminados de PLLA/TPS igual a 35,2%. A maior solubilidade encontrada pelos autores, maior até que para os laminados produzidos no presente trabalho, se deve ao fato dos mesmos utilizarem uma proporção entre PLLA/TPS de 30/70. No presente trabalho a proporção entre PLLA/(TPS+gelatina) foi de 50/50. Já que o PLLA não apresenta solubilidade em água sua maior proporção afetou este resultado.

Os resultados das propriedades mecânicas em termos de resistência à tração, modulo de Young e alongação na ruptura dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina) e FG5 (5% gelatina) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Propriedades mecânicas dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>	<b>Elongação na ruptura (%)</b>	<b>Modulo de Young (MPa)</b>
FC	28,8 <sup>a</sup> ± 2,1	31,7 <sup>a</sup> ± 6,1	614 <sup>a</sup> ± 51
FG1	22,6 <sup>b</sup> ± 2,1	37,2 <sup>a</sup> ± 8,8	469 <sup>b</sup> ± 27
FG3	22,7 <sup>c</sup> ± 0,9	18,4 <sup>a</sup> ± 3,1	520 <sup>c</sup> ± 39
FG5	19,8 <sup>b</sup> ± 0,8	35,9 <sup>b</sup> ± 9,7	483 <sup>b,c</sup> ± 25

<sup>a,b</sup> As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

A adição gradual de gelatina aos laminados de PLLA/TPS afetou significativamente as propriedades mecânicas. Uma redução em torno de 30%

foi observada na resistência à tração, no módulo de Young e na elongação na ruptura. Este fato pode ser explicado pela incompatibilidade entre os componentes da blenda. As propriedades mecânicas dos laminados estão diretamente ligados à adesão interfacial entre os polímeros da blenda. Quando os polímeros são misturados é interessante que haja boa distribuição e dispersão dos componentes formando uma única fase. Dispersões pobres podem resultar em formação de *clusters* resultado do emaranhamento das cadeias poliméricas que por sua vez reduz a transmissão de tensão (BRANDELERO GROSSMANN; YAMASHITA, 2011). Nas imagens de MEV apresentadas anteriormente (Figura 5) a presença de porosidade e grânulos de amido não gelatinizados dificultam a transferência de carga sob estresse o que explica os resultados obtidos. Filmes compostos de amido de mandioca e gelatina preparados por *casting* apresentaram aumento na resistência à tração conforme gelatina foi adicionada devido ao reforço nas propriedades da matriz polimérica (FAKHOURY et al., 2012; FAKHOURY et al., 2013). No presente estudo não foram observados tais resultados devido à presença do PLLA que possui caráter hidrofóbico e possui incompatibilidade com o amido e a gelatina conforme já relatado em outros estudos (SHIRAI, et al., 2013; ZHAO; LIU; KANDGE, 2006). Apesar do amido e da gelatina serem hidrofílicos e compatíveis, eles são imiscíveis e se apresentam em duas fases (LIU et al., 2014).

Os resultados relacionados as isotermas de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina) e FG5 (5% gelatina) estão apresentados na Figura 6 e os parâmetros do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) na Tabela 7.

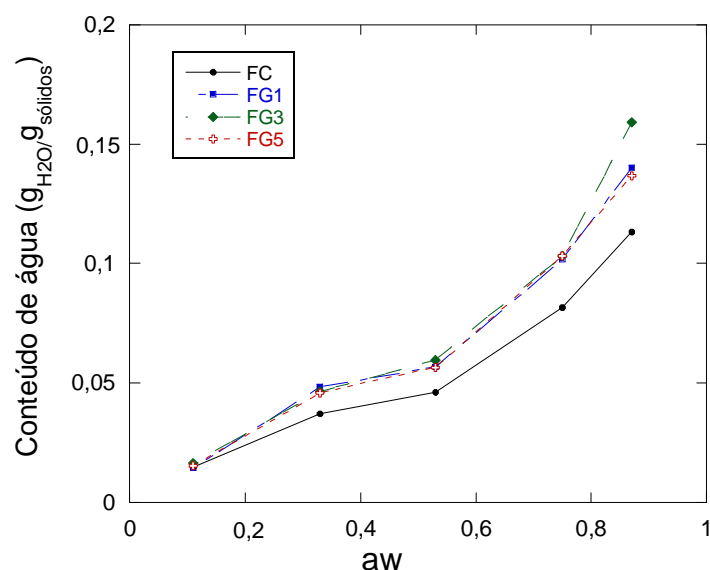


Figura 6- Isoterma de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

Tabela 7- Parâmetros do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) para as isotermas de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

Parâmetro	FC	FG1	FG3	FG5
C	8,65	6,59	8,86	5,73
K	0,84	0,83	0,89	0,81
m <sub>0</sub>	0,031	0,042	0,036	0,044
R <sup>2</sup>	0,997	0,995	0,998	0,996

Onde : C = Constante de Guggenheim, que representa o calor de sorção na primeira camada, K = Calor de sorção das múltiplas camadas, m<sub>0</sub> = Teor de água na monocamada, R<sup>2</sup>=corresponde ao coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>>0,99).

Pode se observar de acordo com a Figura 6 que não houve diferença quanto à absorção de umidade entre as formulações com variadas concentrações de gelatina, e ainda analisando o filme controle percebe-se que os filmes que tiveram adição de gelatina absorveram mais água, assim também como aconteceu com a análise de PVA, isso pode ser explicado pelo fato da gelatina ter proporcionado um caráter mais hidrofílico ao material. Todas as formulações são apresentadas como isotermas de sorção sigmoideal (Tipo II) (segundo a classificação de Brunauer 's) (Brunauer, Deming, Deming, e Troller, 1940) devido à presença de materiais hidrofílicos, tais como da T\PS e a gelatina, ainda essa característica também foi observada em outros trabalhos como Shirai (2014), que produziu filme de PLA e TPS, e Müller, Laurindo e Yamashita (2012) que produziram filme de amido termoplástico (TPS), reforçado com nanoargilas hidrofílicas e hidrofóbicas.

De acordo com Shirai (2013) que produziu filmes com 70% de PLA, quando o teor de PLA foi aumentada na mistura, o teor de umidade de equilíbrio diminuiu a atividade da água avaliada. Este resultado pode estar relacionado com o carácter hidrofóbico da PLA, porém nesse trabalho como foi utilizado uma menor concentração de PLA que foi de 50% e ainda utilizamos gelatina na formulação houve um aumento da absorção de umidade.

De acordo com o modelo de GAB representados os dados experimentais tiveram um ótimo ajuste ( $R^2 > 0,99$ ), sendo esse modelo também adequado para descrever as isotermas de sorção de água dos filmes de misturas de TPS / PBAT (BRANDELERO, 2011). Assim como em outros trabalhos como o de Soares (2013) que produziu filme de PLA e amido, Brandelero et al. (2013) com blendas de amido/PBAT adicionados de Tween 80 e óleo de soja, e Abdillahi et al. (2013) com filme de farinha de trigo / glicerol / poli (ácido láctico) (PLA) com adição de ácido cítrico.

O teor de umidade de monocamada ( $m_0$ ) indica a quantidade máxima de água que pode ser adsorvido em uma única camada de película por grama de matéria seca e é uma medida do número de sítios de adsorção (Mali et al., 2005). Todas as formulações apresentaram altos valores de água na monocamada, valores estes que estão dentro da faixa comum para os produtos amiláceos (Mali et al, 2005). E ainda nas formulações que continham gelatina esses valores foram maiores ainda.

Assim como observado por Mali et al. (2005) e Müller, Laurindo e Yamashita (2011) os parâmetros K e C não foram influenciados pela composição das misturas, não houve variações muito grandes entre os valores para cada formulação.

O parâmetro K está relacionado com a absorção de calor do vapor de água na multicamada e quando K é igual a um, considera-se que não há interação entre as moléculas de água sorvida nas multicamadas e isotérmica e o modelo é igual ao modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Fato este que não foi observado neste trabalho.

O parâmetro C é relativo à absorção de calor da monocamada. Na primeira parte da curva de sorção de 0 - 0,3 as amostras não tiveram

comportamento diferente entre si, de 0,3 – 0,5 a amostra controle teve uma absorção menor que as amostras com maior quantidade de gelatina, e na terceira parte da curva de 0,5 – 0,9, a atividade de água causou um aumento na umidade para todos os filmes, e este comportamento está associado com um fenômeno de "clustering" de água (MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2009).

## 5.2 Caracterização das AgNPs sintetizadas

As nanopartículas de prata foram sintetizadas com sucesso pela técnica do polissacarídeo modificada, ao final da síntese foi observada a coloração amarelo-marrom que indica a sua formação (GHASEMINEZHAD; HAMED; SHOJAOSADATI, 2012). Para determinar a concentração real de prata metálica (AgNPs) na solução de síntese a análise de Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) foi realizada. A concentração teórica de prata na solução de acordo com a formulação utilizada foi de 151,70 mg/L e a concentração obtida pela análise foi de  $135,62 \pm 1,28$  mg/L. O resultado mostra que a conversão dos íons prata em prata metálica foi de 89,4%.

O espectro obtido pela análise de Espectrofotometria UV-Vis das AgNPs sintetizadas é apresentado na Figura 7.

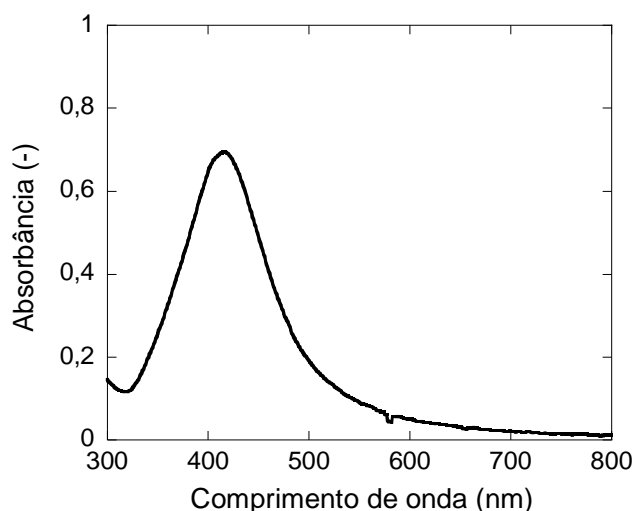


Figura 7- Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata.

O pico de ressonância de plasma de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR), obtido com a solução de prata foi de aproximadamente 410 nm. De acordo com Bankura et al. (2012) as nanopartículas de prata, absorvem a radiação na região visível do espectro eletromagnético (380-450 nm) devido à ressonância de plasma de superfície (SPR) de transição, o que confirma que os íons de prata foram reduzidos a prata metálica. Esta transição SPR é responsável pela coloração marrom amarelada marcante de nanopartículas de prata. Por apresentar um pico bem definido, em cerca de 410 nm, conclui-se que há um ótimo grau de dispersão das nanopartículas (SONG; KIM, 2009; GARCÍA, 2011), típico para nanopartículas com geometria esférica e estreita distribuição de tamanho (FWHM pequeno) (WILCOXON; ABRAMS, 2006).

Por meio do cálculo da largura à meia altura (FWHM) foi determinado o diâmetro médio das nanopartículas igual a 100 nm. Zielinska et al. (2009) obtiveram tamanho de nanopartículas de prata de diâmetros variando de 5 nm a 100 nm, utilizando técnicas de redução química. An et al. (2008) utilizaram a técnica do boro hidreto para a síntese e obtiveram nanopartículas com tamanho médio de 20 nm. Ghaseminezhada, Hamedib e Shojaosadati (2012) obtiveram nanopartículas com diâmetro médio de 20 nm utilizando a mesma técnica do polissacarídeo utilizada neste trabalho.

O diâmetro médio das nanopartículas e seu índice de polidispersão também foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e a curva de distribuição de tamanhos em intensidade é apresentada na Figura 8.

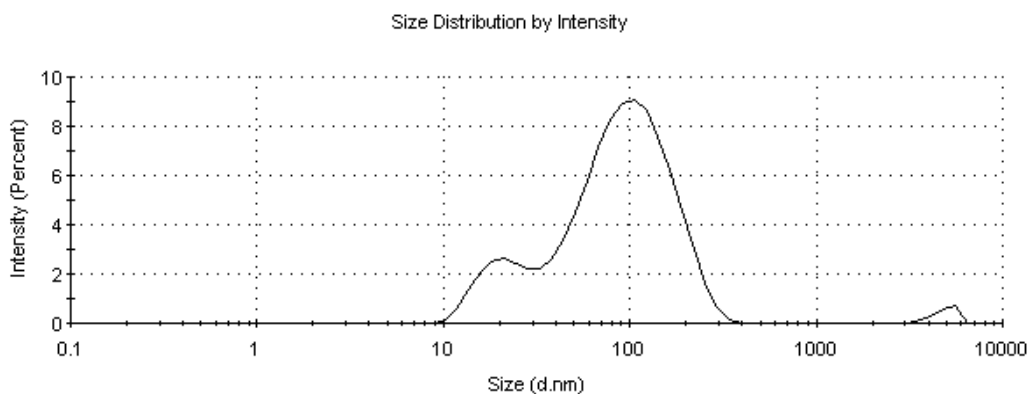


Figura 8 - Distribuição de tamanhos em intensidade das AgNPs obtida por DLS.

O resultado apresentado na Figura 8 confirma o diâmetro estimado pela largura à meia altura. O diâmetro médio em intensidade determinado foi de ( $D_z$ ) 63 nm. Na Figura 8 são observados dois grupos principais de nanopartículas como distribuição bimodal: um com nanopartículas menores na faixa de 10 a 30 nm, e outro composto de nanopartículas maiores, 30 a 400 nm. O maior percentual de nanopartículas encontra-se na faixa de 100 nm, tamanhos maiores que este possivelmente são resultado de agregação. O terceiro pico que surge na ordem de micrometros, de acordo com Panacek et al. (2006), é devido a impurezas existentes como, por exemplo, poeira.

A micrografia das AgNPs obtida por MEV está apresentada na Figura 9 e a distribuição de tamanhos para a análise de imagem está apresentada na Figura 10.

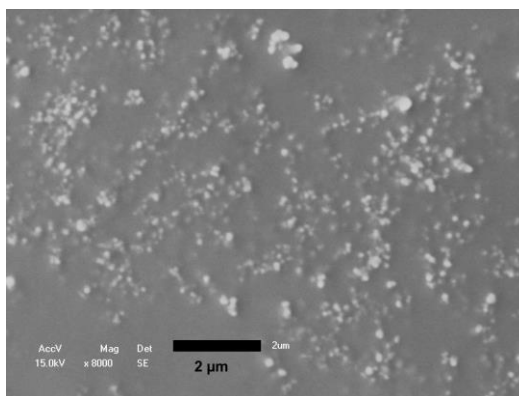


Figura 9 - Micrografias das nanopartículas de prata obtidas por MEV (magnificação de 8.000 x).

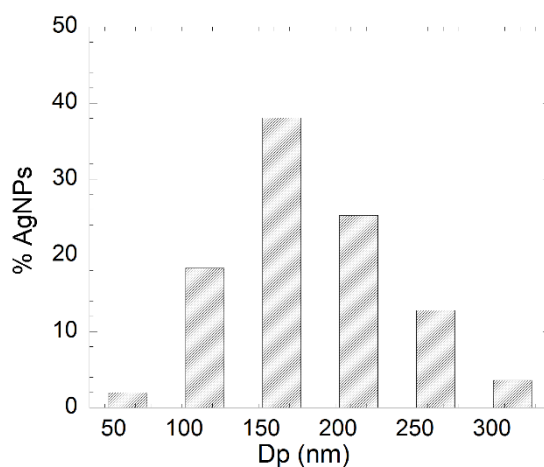


Figura 10 – Distribuição de tamanhos das AgNPs determinada a partir da análise das micrografias de MEV.

Pode ser observado na micrografia da Figura. 9 tamanhos uniformes das nanopartículas, além do formato esférico. Sankar et al. (2013) produziram nanopartículas de prata com forma relativamente uniforme em diâmetro e morfologia esférica, resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho.

A média de tamanho em número das AgNPs obtida com as 305 medidas de diâmetro foi de  $145 \pm 52$  nm. Este valor está um pouco acima do encontrado com a largura à meia altura pelo espectro de UV-Vis e com o DLS. Esta diferença pode ser explicada pela detecção nas imagens de MEV das nanopartículas de maior tamanho em função da magnificação, que não permite maior ampliação da imagem, sendo as de menor diâmetro subestimadas. Além disso, o recobrimento com ouro utilizado para preparação da amostra para a microscopia pode ter ocultado a presença das nanopartículas de menor tamanho. Dessa forma o diâmetro médio pode ter sido superestimado. Com a Figura 9 é possível observar que a distribuição tem forma monomodal e foram detectadas nanopartículas de tamanho mínimo de 40 nm e de tamanho máximo igual a 280 nm. A maior quantidade de AgNP foi detectada na faixa de 100 a 200 nm.

O espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das AgNPs é apresentado na Figura 11.

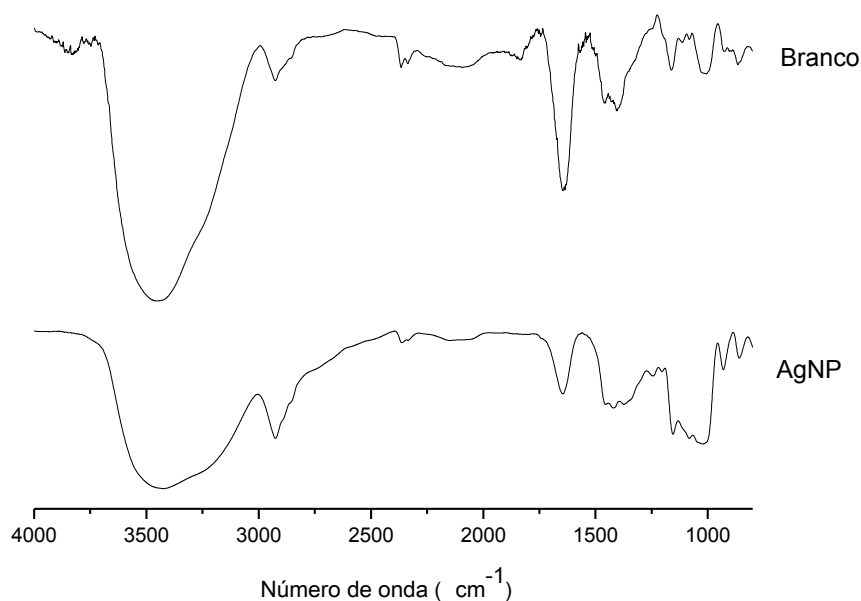


Figura 11 – Espectroscopia de infravermelho de nanopartículas de prata.



É possível observar que o espectro de infravermelho da amostra de AgNPs apresenta um aumento na intensidade das bandas localizadas em 1.027, 1.160 e 2.930  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem a grupamentos aldeído, OH e ácido carboxílico, respectivamente. Esse aumento pode estar relacionado com a oxidação da D-glicose na síntese das AgNPs. A banda correspondente ao grupamento C=O (1.640  $\text{cm}^{-1}$ ) apresentou menor intensidade indicando possível interação entre as AgNPs e subprodutos da oxidação da D-glicose. O alargamento da banda localizada em 1.374  $\text{cm}^{-1}$  pode indicar também a formação de ácidos carboxílicos e álcoois terciários na oxidação da D-glicose. A banda referente ao estiramento OH teve um alargamento indicando interação entre as AgNPs e os grupamentos OH do amido (KHANNA et al., 2005; GHASEMINEZHAD; HAMED; SHOJAOSADATI, 2012).

Na Tabela 8 são apresentados os valores determinados para as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e para as concentrações bactericidas mínimas (CBM) da solução de AgNPs, obtida pela técnica de síntese verde frente aos microrganismos avaliados.

Tabela 8- Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) da solução de AgNPs.

Bactéria	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Bacillus cereus</i> (IAL 55)	2,34	2,34
<i>Staphylococcus aureus</i> ( IAL 1875)	37,50	75,00
<i>Esclerichia coli</i> (IAL339)	1,17	4,69
<i>Pseudomanas aeruginosa</i> (IAL 2081)	4,69	9,38

A solução de AgNPs exibiu atividade antibacteriana contra as bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Dentre os microrganismos testados, a bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou inibição ao crescimento a uma menor diluição e, portanto, maior concentração inibitória mínima, que foi de 37,50  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja, foi o microrganismo que apresentou maior resistência a solução de prata. A bactéria *E. coli* apresentou menor resistência ao efeito inibitório das nanopartículas.

Resultados semelhantes também foram obtidos por outros autores. Martínez-Castañón et al. (2008) determinaram a CIM de AgNPs frente a diferentes microorganismos porém o efeito mais significativo observado foi sobre a *E. coli*, além disso o microorganismo Gram positivo *S. aureus* apresentou uma CIM maior do que os microorganismos Gram negativos. Fernandes (2010) observou para AgNPs de tamanho médio igual a 89 nm uma CIM semelhante ao obtido neste trabalho para *S. aureus* (33,71 µg/mL).

Sondi et al. (2004) explicam que a diferença na atividade antimicrobiana entre microorganismos Gram positivos e Gram negativos pode ser atribuída à estrutura das suas paredes celulares. A parede celular de microorganismos Gram negativos é composta por uma camada fina de peptidoglicano e uma camada de lipopolissacarídeo, que proporcionam uma barreira de permeabilidade fraca para as AgNPs. Em contraste, a parede celular de microorganismos Gram positivos é composta por uma camada espessa de peptidoglicanos consistindo de cadeias lineares de polissacáridos reticulados por peptídeos curtos, que formam uma estrutura rígida tridimensional. Dessa forma esta camada dificulta a penetração e absorção das AgNPs na célula.

### 5.3 Caracterização dos laminados tratados com AgNPs

Imagens dos laminados tratados superficialmente com reticulação enzimática para incorporação das AgNPs (FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina) estão apresentadas na Figura 12 e as micrografias de MEV na Figura 13.

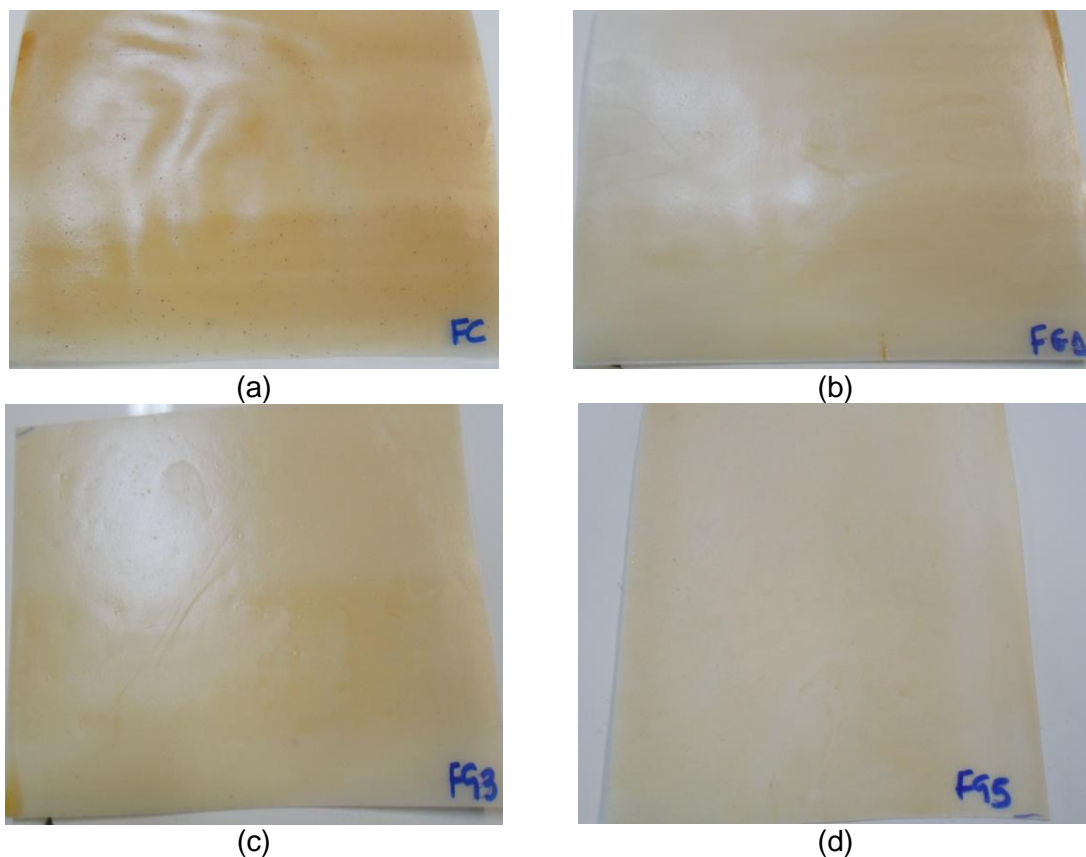


Figura 12. Laminados de PLLA / TPS / gelatina produzidos por extrusão e tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs: (a) FCR (controle, 0% gelatina), (b) FG1R (1% gelatina), (c) FG3R (3% gelatina), (d) FG5R (5% gelatina).

Podemos notar, com as imagens da Figura 12, do ponto de vista macroscópico a reticulação com a enzima transglutaminase não conduziu a qualquer alteração na aparência dos filmes em comparação com os que foram preparados sem a enzima. Resultados semelhantes foram observados por Giosafatto et al. (2014) quando avaliaram filmes produzidos com pectina e a proteína faseolina reticulados com transglutaminase.

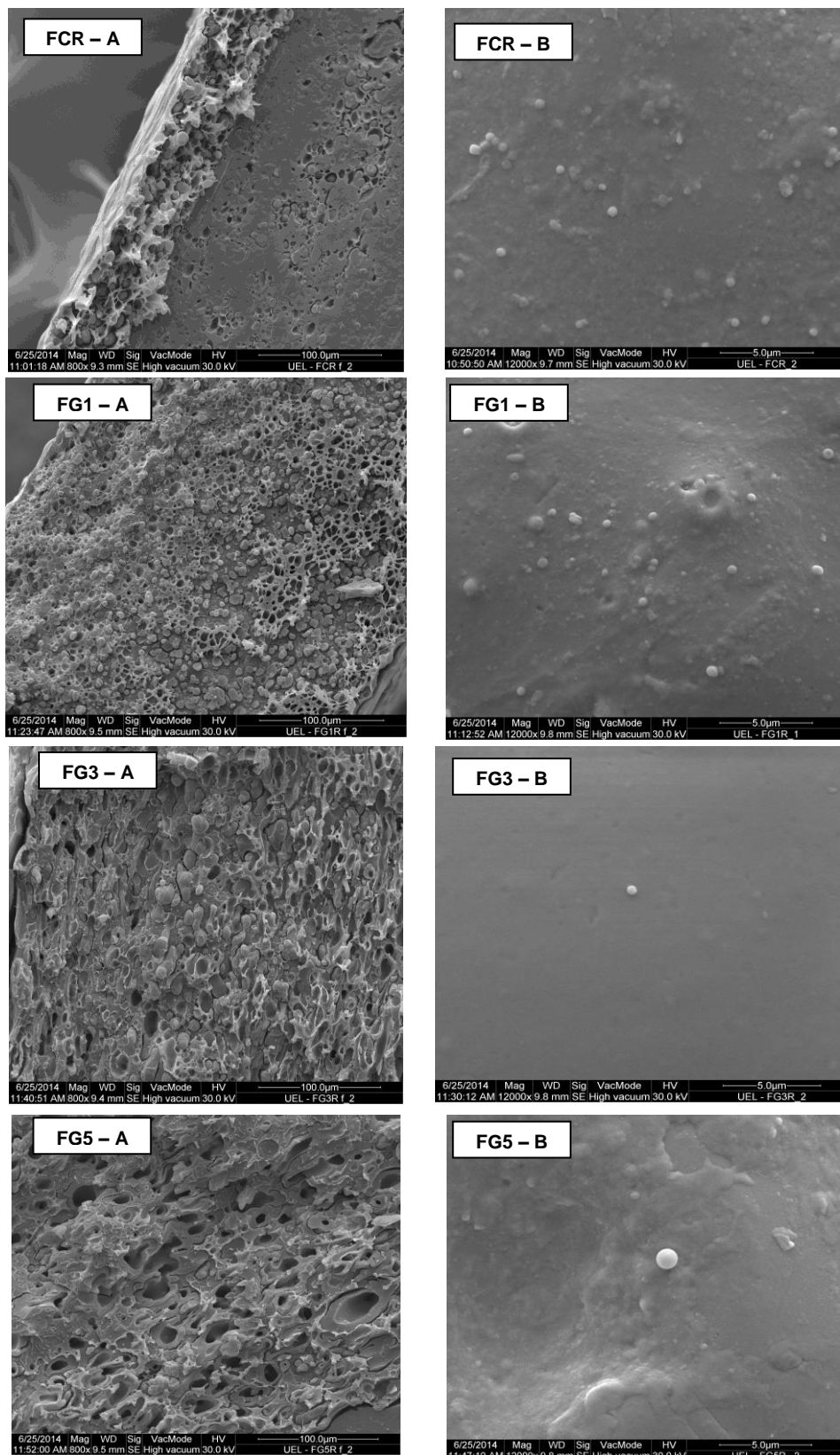


Figura 13 – Micrografias dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs, onde (A) fratura (magnificação: 800 x) e (B) superfície (magnificação: 12.000 x). FCR (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

Quanto à microestrutura dos laminados (Figura 13) nota-se a presença de grânulos de amido como discutido anteriormente para os laminados sem a presença da prata (Figura 5). É possível notar também um aumento na porosidade no interior dos laminados após o tratamento. Isso possivelmente ocorreu devido à migração e rearranjo dos componentes hidrossolúveis no momento do tratamento. Um maior destaque para a interface da área fraturada dos laminados com a superfície é dado na Figura 14.

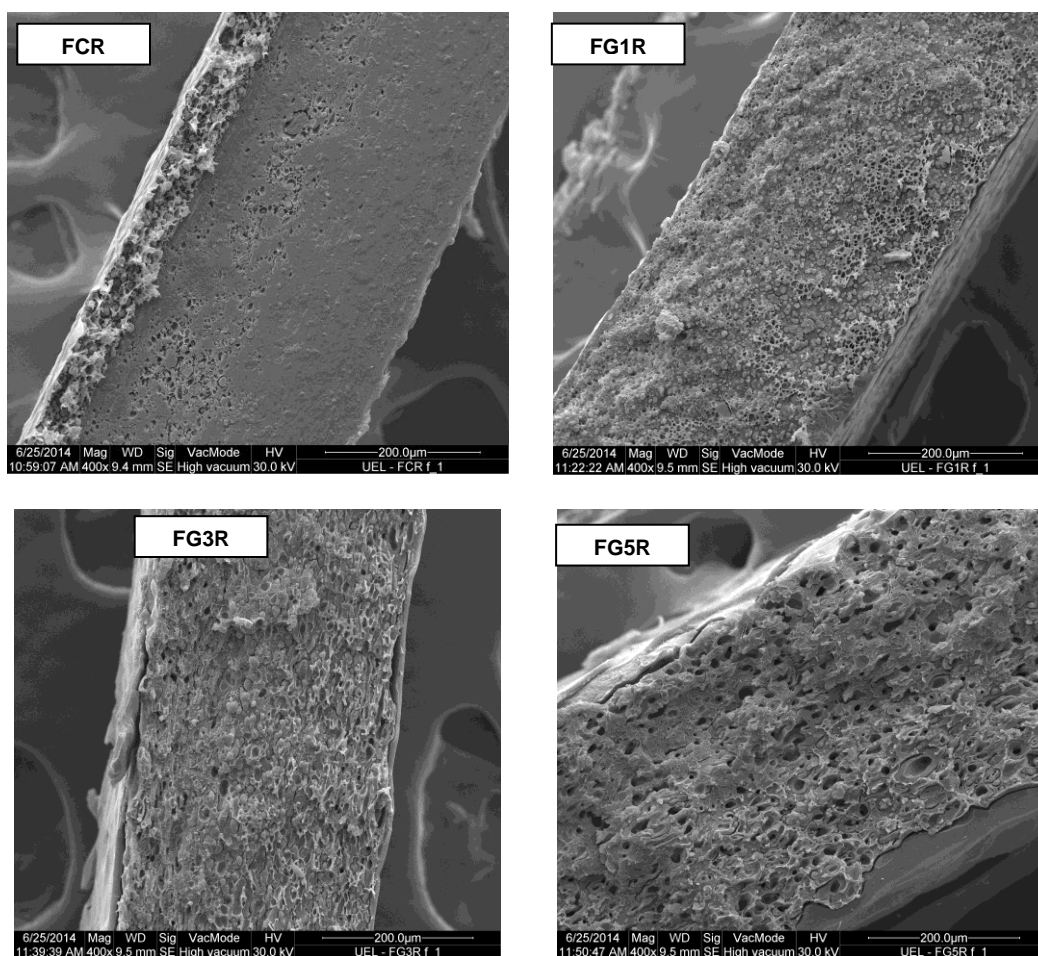


Figura 14 – Micrografias da fratura dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs, onde FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina) (magnificação: 400 x).

Analisando as imagens da Figura 14 pode-se notar que a espessura da camada formada com o tratamento superficial tem em torno de 60  $\mu\text{m}$  para a formulação controle (FCR), 15  $\mu\text{m}$  para as formulações com 1 e 3% de gelatina e em torno de 30  $\mu\text{m}$  para a formulação com 5% de gelatina. Essa diferença se

deve possivelmente à etapa de secagem que foi realizada com os filmes úmidos posicionados verticalmente. A maior espessura provavelmente se deve a maior deposição de solução reticulante contendo a prata na parte inferior dos laminados.

As formulações que contem maior concentração de gelatina (FG3R e FG5R) apresentam a camada superficial menos aderida. Ichinose et al. (1999) produziram filmes ultrafinos pela técnica de *layer-by-layer* com poli(cloridrato de alilamina) e o copolímero de poli(vinil metil éter) e monometil maleato (MMC) com ligações cruzadas por glutaraldeído e também verificaram estruturas em descascamento. Liu, Yao e Fang (2008) produziram compósitos compostos de fibras de proteína de soja não tecidas e quitosana reticulada com genipina. Os autores observaram a formação de duas camadas uma de fibras e outra de quitosana reticulada que ficou aderida à superfície das fibras, porém não se infiltrou entre as mesmas. Na Figura 14 também é possível verificar adesão da camada superficial ao laminado.

Os valores determinados para a espessura e a densidade dos laminados tratados superficialmente podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultados obtidos para espessura e densidade dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>
FCR	0,378 ± 0,009	1,35 <sup>a</sup> ± 0,04
FG1R	0,368 ± 0,008	1,29 <sup>a,b</sup> ± 0,13
FG3R	0,381 ± 0,018	1,36 <sup>a</sup> ± 0,01
FG5R	0,459 ± 0,033	1,12 <sup>b</sup> ± 0,05

<sup>a,b,c</sup>. As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Para a análise de espessura os resultados não apresentaram diferença significativa entre as formulações. Esse resultado está em concordância com os resultados da Tabela 3 (laminados sem tratamento superficial), além disso o tratamento superficial se mostrou igual para todos os laminados já que não alterou o resultado anterior.

Já para o caso da densidade os resultados apresentaram diferença significativa a um nível de significância de 5% para todos os valores entre as

formulações controle (FCR) e com 5% de gelatina (FG5R) e entre 3% (Fg3R) e 5% (FG5R).

Os resultados obtidos para a análise de permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática para incorporação das AgNPs estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10- Resultados obtidos para a análise de PVA dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>PVA (g.m<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) (x 10<sup>-6</sup>)</b>
FCR	3,79 <sup>a</sup> ± 8,16
FG1R	4,86 <sup>b</sup> ± 4,50
FG3R	5,14 <sup>b</sup> ± 1,28
FG5R	6,93 <sup>c</sup> ± 1,68

<sup>a,b,c</sup> As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostraram que há diferença significativa a um nível de 5% de significância entre a formulação controle (FCR) e a formulação com 5% de gelatina (FG5R) e as formulações com 1 e 3% de gelatina (FG1R e FG3R) com o laminado contendo 5% de gelatina. A PVA aumentou com a quantidade de gelatina nas formulações. Além disso, quando comparados os resultados da Tabela 4 (PVA dos laminados sem tratamento superficial) pode-se notar que houve um aumento nos valores de PVA. Yildirim e Hettiarachchy (1998) obtiveram resultados semelhantes para filmes baseados isolado protéico de soro tratados com transglutaminase onde se observou aumento de PVA de filmes em cerca de 55-64%.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Chambi e Grosso (2006), que produziram filmes de gelatina, caseína e gelatina-caseína reticulados com transglutaminase e sem reticulação. Segundo os autores o aumento na PVA provavelmente está relacionada com o grau de organização da proteína na rede polimérica, já que as moléculas com cadeias volumosas, como as proteínas, apresentam menor grau de empacotado, apresentando assim uma maior permeabilidade. A estrutura mais aberta na camada superficial possivelmente afetou significativamente a propriedade de transferência de vapor de água. Além disso, observando as imagens de fratura

dos laminados nas Figuras 5 (laminados não tratados superficialmente) e 13 e 14 (laminados tratados superficialmente) pode-se notar que houve um aumento na porosidade no interior dos laminados. A porosidade permite que haja maior difusão de água no interior dos laminados.

Os resultados obtidos para a análise de umidade e solubilidade dos laminados tratados superficialmente estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11- Resultados obtidos para umidade e solubilidade dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>U (%)</b>	<b>SOL (%)</b>
FCR	4,51 ± 0,32	8,67 <sup>a</sup> ± 0,34
FG1R	4,39 ± 1,78	11,44 <sup>b</sup> ± 0,65
FG3R	5,73 ± 0,28	20,34 <sup>c</sup> ± 2,09
FG5R	5,44 ± 0,18	27,72 <sup>d</sup> ± 2,79

<sup>a,b,c,d</sup> As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey..

Os resultados apresentados na Tabela 11 não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para a análise de umidade. Já para os resultados referentes à solubilidade houve diferença significativa entre todos os valores. Pode-se observar um aumento gradativo da solubilidade de acordo com o aumento da concentração de gelatina nas formulações. O tratamento superficial permitiu que a solubilidade dos laminados controle (FCR) e com 1% de gelatina (FG1R) fosse reduzida quando comparada com os laminados sem tratamento (Tabela 5). Esse fato também foi observado por Carvalho e Grosso (2004) que descrevem este comportamento como função da retenção de parte do glicerol na matriz polimérica, resultado do aumento de ligações covalentes introduzidas pela reticulação. Possivelmente não só o glicerol tenha sido mantido com maior eficiência na matriz polimérica, mas também o amido e a gelatina.

Outros autores também observaram uma diminuição de solubilidade de filmes após o procedimento de reticulação, como Yildirim e Hettiarachchy (1998) para filmes de proteína e soro e 11S globulina com transglutaminase e Galietta et al. (1998) para filmes de proteínas de soro do leite tratados com formaldeído.



Os resultados das propriedades mecânicas em termos de resistência à tração, módulo de Young e alongação na ruptura estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Propriedades mecânicas dos laminados tratados superficialmente por reticulação enzimática e incorporação de AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).

<b>Formulação</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>	<b>Elongação na ruptura (%)</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>
FCR	26,7 <sup>a</sup> ± 4,1	7,0 <sup>a,b</sup> ± 2,5	614 <sup>a</sup> ± 64
FG1R	21,6 <sup>a,b</sup> ± 5,2	7,5 <sup>a</sup> ± 3,8	477 <sup>b</sup> ± 88
FG3R	19,0 <sup>b,c</sup> ± 3,3	7,1 <sup>a,b</sup> ± 1,7	471 <sup>b</sup> ± 45
FG5R	15,9 <sup>c</sup> ± 5,1	3,6 <sup>b</sup> ± 1,7	437 <sup>b</sup> ± 89

<sup>a,b,c</sup> As medias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Podemos notar através da análise dos resultados da Tabela 12 que houve uma tendência de resposta parecida com as amostras sem prata (Tabela 6), ou seja, com a adição de maior concentração de gelatina ocasionou um aumento na fragilidade do filme.

A alongação na ruptura apresentou diferença significativa entre a formulação com 5% de gelatina (FG5R) e as formulações controle (FCR) e com 1% de gelatina (FG1R). O menor valor apresentado pela formulação com mais gelatina pode estar relacionado com a possibilidade maior número de pontos de reticulação entre a gelatina do laminado e a gelatina do tratamento superficial levando a um maior número de pontos de concentração de tensão.

Quanto ao módulo de Young a mesma tendência (Tabela 6) de diminuição com o aumento da concentração de gelatina pode ser observado e a diferença significativa se deu entre a amostra controle e as demais. Comparando com os laminados sem tratamento (Tabela 6) nota-se uma redução do módulo de Young. Bigi et al. (2001) avaliando efeito da reticulação de filmes de gelatina com glutaraldeído observaram que quando o grau de reticulação se aproximava de 100% havia um aumento do módulo de Young em cerca de 20 vezes quando comparado com os filmes não reticulados. No caso dos filmes avaliados por Bigi et al. (2001) toda a estrutura apresentava reticulação enquanto que no caso dos laminados do presente trabalho somente

a superfície foi tratada por reticulação. Possivelmente o efeito de redução do módulo de Young deve estar associado à modificação da estrutura interna dos laminados após o tratamento. Com a maior porosidade, discutida anteriormente, pode agir como um ponto e concentração de tensão, bem como a interface entre o laminado e a camada superficial reticulada.

Os resultados relacionados a isoterma de sorção dos laminados tratados superficialmente e contendo as AgNPs estão apresentados na Figura 15 e os parâmetros do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), na Tabela 13.

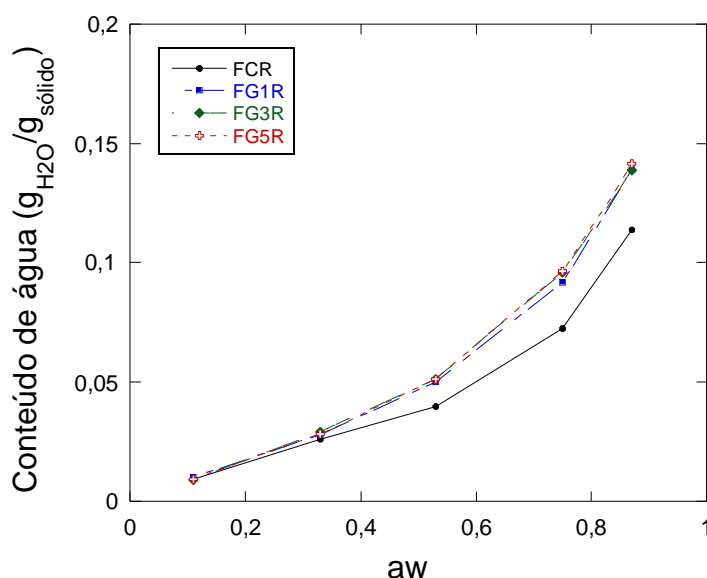


Figura 15- Isoterma de sorção dos laminados tratados superficialmente contendo AgNPs: FCR (controle, 0% gelatina), FG1R (1% gelatina), FG3R (3% gelatina), FG5R (5% gelatina).

Tabela 13. Parâmetros do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) para as isotermas de sorção dos laminados FC (controle, 0% gelatina), FG1 (1% gelatina), FG3 (3% gelatina), FG5 (5% gelatina).

Parâmetro	FC	FG1	FG3	FG5
C	5,09	2,78	2,05	2,01
K	0,91	0,86	0,81	0,82
m <sub>0</sub>	0,025	0,039	0,049	0,048
R <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,99	0,99

Onde : C = Constante de Guggenheim, que representa o calor de sorção na primeira camada, K = Calor de sorção das múltiplas camadas, m<sub>0</sub> = Teor de água na monocamada, R<sup>2</sup>=corresponde ao coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>>0,99).

Como relatado anteriormente as formulações com gelatina absorveram mais água que a controle como pode ser visto na Figura 15, e ainda pode-se notar que as formulações reticuladas com as AgNPs, quando comparamos com

a isoterma sem reticulação os filmes de maneira geral absorveram menos água. De acordo com Jimin (2013), que produziu filmes de gelatina reticulados com dialdeído carboximetilcelulose, foi observado que o aumento na reticulação do material provocou uma diminuição na capacidade de ligação de água, o que teria conduzido a uma diminuição na solubilidade dos filmes modificados (PATIL et al, 2000). Isso é o que pode ter acontecido com o filme reticulado com a transglutaminase, que se ligou com a gelatina do filme e diminuiu a disponibilidade de grupos funcionais para interagir com a água.

Analisando os parâmetros obtidos com o modelo de GAB, os dados experimentais tiveram um ótimo ajuste ( $R^2 > 0,99$ ). Os valores de monocamada do filme reticulado foram menores que as dos filmes sem reticulação, indicando que os filmes absorveram menos água na monocamada. Isso pode ser notado em outros estudos, pois a adição de nanopartículas diminuiu o comportamento hidrofílico dos filmes de biopolímeros.

De acordo com o estudo de Nafchi, Moraspour e Saedi (2014) que produziram filmes como óxido de zinco com diferentes concentrações de gelatina, pode ter ocorrido interação entre o agente plastificante, a matriz de biopolímero, e óxido de zinco, o que reduziu os grupos hidroxilas disponíveis para interação com água, tornando a matriz menos higroscópica. Este fato também observado no trabalho de Müller, Laurindo e Yamashita (2012) que produziu filme de fécula de mandioca com adição de nanoargila.

O valor de K diminuiu com o aumento da concentração de gelatina nas formulações, pois com a adição de mais gelatina, o material ficou mais hidrofílico, e houve maior número de interações entre o vapor de água e as multicamadas por isso os valores ficaram mais distantes de um.

O fator C não teve uma correlação com os outros valores de  $m_0$  e K, e nem com os outros resultados obtidos de PVA, solubilidade e umidade.

Avaliando a curva de sorção do ponto onde a atividade de água é igual a 0 até 0,3, não houve diferença na adsorção de água para nenhuma das amostras analisadas, na segunda parte da curva, de 0,5 a 0,9, assim como discutido anteriormente na isoterma sem a reticulação (Figura 6), a formulação controle foi a que adsorveu menos água.

Os resultados obtidos para atividade antimicrobiana dos laminados da formulação FG5 tratados superficialmente contendo a AgNPs estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Atividade antimicrobiana do laminado FG5R tratado superficialmente por reticulação enzimática contendo AgNPs.

<b>Bactéria</b>	<b>Zona de inibição (mm)</b>
<i>Bacillus cereus</i> (IAL 55)	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (IAL 1875)	0,8
<i>Escherichia coli</i> (IAL339)	0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IAL 2081)	0,6

Podemos observar com os resultados da Tabela 14 que houve formação de halo de inibição para todas as bactérias analisadas, mostrando que a prata após ser incorporada ao laminado pela reticulação da gelatina continuou apresentando sua ação antimicrobiana. Ainda a bactéria que apresentou a menor resistência à ação da prata foi a *Escherichia coli*, resultado que está em concordância com os valores obtidos nas análises de CIM e CBM (Tabela 8).

Galya et al. (2008) produziram filmes de PVA contendo nitrato de prata e obtiveram halos de inibição de 5 a 9 mm contra *E. coli* e observaram a dependência do diâmetro do halo de inibição em função da concentração do agente antimicrobiano incorporado ao filme. Os autores também obtiveram menor resistência de inibição para a bactéria *E. coli* e maior para *S. aureus*.

## 6 CONCLUSÃO

Quanto à produção dos laminados o processo de extrusão e calandragem foi uma forma viável para produzir blendas de PLLA / TPS / gelatina com propriedades funcionais interessantes e a aspecto bastante homogêneo. A adição de gelatina apresentou diferença significativa nos resultados das análises de solubilidade e PVA em função da hidrofiliabilidade da gelatina. As isotermas de sorção de água também revelaram maior adsorção pelos laminados contendo gelatina quando comparado ao controle. Além disso, a incorporação de gelatina na blenda afetou significativamente as propriedades mecânicas através da redução da rigidez associada à incompatibilidade entre PLLA, amido e gelatina, como revelado pelas micrografias de MEV.

As nanopartículas de prata foram sintetizadas com sucesso, e o diâmetro médio obtido está em concordância com os valores obtidos na literatura: 63 nm por DLS, 100 nm por FWHM e 145 nm por análise de imagem. Na análise de FTIR foram encontradas interações entre os grupamento C=O dos subprodutos de oxidação da D-glicose, produto da reação com o nitrato de prata. As AgNPs apresentaram ação antimicrobiana eficaz contra os microrganismo estudados com valores em concordância com os apresentados na literatura.

Os laminados tratados superficialmente com reticulação enzimática para incorporação das AgNPs não apresentaram alteração na aparência e quanto à microestrutura apresentaram maior porosidade em função da umidade promovida pelo tratamento. Foi possível observar do tratamento superficial através da porosidade criada nas análises de PVA e propriedades mecânicas, com aumento da permeação ao vapor e redução em todas as características mecânicas, principalmente no módulo de Young em função da criação de pontos de concentração de força. As isotermas apresentaram ajuste adequado ao modelo de GAB ( $R^2 > 0,99$ ) e as formulações contendo gelatina apresentaram maior adsorção de água. A atividade antimicrobiana dos laminados contendo AgNPs foi comprovada pela formação de halos de inibição contra os microrganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, J.P.; WARK, A.W.;BREVETM, P.F.;GIRAULT, H.H. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. **Chemical Communications**, v.7, p. 792–793, 2002.

ABDILLAHI, H.; CHABRATA, E.; ROUILLY, A.; RIGAL, L. Influence of citric acid on thermoplastic wheat flour/poly(lactic acid)blends. II. Barrier properties and water vapor sorption isotherms. **Industrial Crops and Products** , v. 50, p. 104– 111, 2013.

ALARCON, E.I.; UDEKWU, K.;SKOG, M.;PACIONI, N.L.;STAMPLECOSKIE, K.G.;GONZÁLEZ-BÉJAR, M.; POLISETTI, N.;WICKHAM, A.; RICHTER-DAHLFORS, A.;GRIFFITH, M.;SCAIANO, J.C. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. **Biomaterials**, v.33, n. 19, p. 4947–4956, 2012.

AL-HASSAN, A.A.; NORZIAH, M.H.; Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 108–117, 2012.

AN, J.; ZHANG, M.; WANG, S.; TANG, J. Physical, chemical and microbiological changes in stored greenasparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. **Food Science and Technology International**, v. 41, p. 1100–1107, 2008.

APPENDINI,P.;HOTCHKISS, J.H.. Imobilização de lisozima de polímeros em contacto com alimentos, como potenciais filmes antimicrobianos. **Packaging Technology and Science**, v.10, n. 5, p. 271-279, 2002.

BANKURA, K P. ; MAITY,D. ; Mollick, M.M.R.; Mondal, D.; BHOWMICK, B.;BAIN, M.K.;CHAKRABORTY,A.; SARKAR,J.; ACHARYA,K.; CHATTOPADHYAY, D. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in, aqueous medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1159–1165, 2012.

BASTARRACHEA, L.; DHAWAN, S.; SABLANI, S. Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging. **Food Engineering**, v. 3, p. 9–93, 2011.

BECHTOLD, M. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2011.

BENDIX, D. - "Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications", **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 129-135, 1998.

- BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22., p.763-768, 2001.
- BORDES, P.; POLLET, E.; AVEROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 125–155, 2009.
- BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M.V.E.G.; YAMASHITA, F. Effect of the method of production of the blends on mechanical and structural properties of biodegradable starch films produced by blown extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1344–1350, 2011.
- BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V.; YAMASHITA, F. Hidrofilicidade de Filmes de Amido/Poli(Butileno Adipato Co Tereftalato) (Pbat) Adicionados de Tween 80 e Óleo de Soja. **Polímeros**, v. 23., n. 2, p. 270-275, 2013.
- BRASKEM. <<http://www3.braskem.com.br/upload/rao/pt/polipropileno-verde/2010>.
- BRAVIN, B.; PERESSINI, D.; SENSIDONI, A. Development and application of polysaccharide–lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p.280–290, 2006.
- BRUNAUER, S.; DEMING, L. S.; DEMING, W. E.; TROLLER, E. On the theory of Van der Waal's adsorption of gases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62., p. 1723–1732, 1940.
- CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros**. São Carlos: Artliber, 2002.
- CAO, N.; FU, Y.; HE, J.. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. **Food Hydrocolloids** v. 21, p. 575–584, 2007.
- CAROTHERS, W. H.; DOROUGH, G. L.; NATTA, F. J. V. - Studies of polymerization and ring formation X The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. **Journal of The American Chemical Society**, v. 54, p.761, 1932.
- CARVALHO, R. A., GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, 717-726, 2004.
- CHAMBI, H., GOSSO, C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v. 39., p. 458–466, 2006.
- CHEN, X., SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, 1–12, 2008.

CHEN, P.; SONG, L.Y.; LIUY.K.. Synthesis of silver nanoparticles by  $\gamma$ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, n.7, p. 1165–1168, 2007.

CHOI, Y.S.; HONG, S.R.; LEE, Y.M.; SONG,K.W.; PARK, M.H.; NAM, .Y.S. Study on gelatin-containing articial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. **Biomaterials**, v. 20, P.409 - 417, 1998.

DOI, Y.; FUKUDA, K.. Biodegradable plastics and polymers . Amsterdam: **Elsevier**,p.479-497, 1994.

DONG,Z.J.; Z.; XIA, S.Q.; HUA, S.;HAYAT, K.; ZHANG, X.M.; XU, S.Y. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**,v. 63, p. 41–47, 2008.

EHIVET, F.E.; MIN, B.; PARK, M.; OH, J. Characterization and Antimicrobial Activity of Sweetpotato Starch-Based Edible Film Containing Origanum (Thymus capitatus) Oil. **Journal of Food Science**, v. 76., n. 1,p. 178-184, 2011.

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

EOM, S.Y.; RYU, S.L., KIM, H.L.;KWON, C.H. Systematic preparation of colloidal silver nanoparticles for effective SERS substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.**, v. 422 , p. 39–43, 2013.

European Bioplastics e.V. <<http://en.european-bioplastics.org/market/>.2014

FAKHOURY, F.M.; COSTA,D.; YAMASHITA, F.; MARTELLI,S.M.; JESUS, R.C.; ALGANER, K.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; INNOCENTINI-MEI, L.H. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. **Carbohydrate Polymers**,v. 95, p. 681–689, 2013.

FAKHOURY, F.M.; MARTELLI, S.M.; , BERTAN , L.C.; YAMASHITA ,F.; MEI,L.H.I.; QUEIROZ, F.P.C. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin e Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. **LWT - Ciência e Tecnologia de Alimentos**,v. 49.,p. 149-154, 2012.

FAKHOURI, M.;FONTES, L.C.B.; INNOCENTINI-MEI,L.H.;COLLARES-QUEIROZ, F.P. Effect of fatty acid addition on the properties of biopolymer films based on lipophilic maize starch and gelatin. . **Starch/Starke** , v.61.,n. 9., p. 528–536, 2009.

FERNANDES, P.E. Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano. Programa de Pós-Graduação em



Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG, 2010.

FISHMAN, M.L.; COFFIN, D.R.; KONSTANCE, R.P.; ONWULATA, C.I. Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. **Carbohydrate Polymers**, v. 41., p. 317–325, 2000.

FORTUNATI, E.; LATTERINI, L.; RINALDI, S.; KENNY, J.M.; ARMENTANO, I. PLGA/Ag nanocomposites: in vitro degradation study and silver ion release. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v.22, p. 2735–2744, 2011.

GALIETTA G.; DI-GIOIA, L.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and cross-linking agents. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.12, p. 3123–3130, 1998.

GALYA, T.; SEDLAR'IK, V.; KUR'ITKA, I.; NOVOTNY', R.; SEDLAR'IKOVA', J.; SA'HA, P. Antibacterial Poly(vinyl Alcohol) Film Containing Silver Nanoparticles: Preparation and Characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 3178–3185, 2008.

GARCÍA, M. A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E.; PLATA, L. Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. **Starch/Stärke**, v. 52, n. 4, p. 118–124, 2011.

GENKINA, N.K.; KOZLOV, S.S.; MARTIROSYAN, V.V.; KISELEVA, V.I. Thermal behavior of maize starches with different amylose/amylopectin ratio studied by DSC analysis. **Starch/Stärke**, v. 66, p. 1 – 7, 2014

GHASEMINEZHAD, S. M.; HAMED, S.; SHOJAOSADATI, S. A. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 467– 472, 2012

GIOSAFATTO, C.V.L.; PIERROA, P.D.; GUNNING, P.; MACKIE, A.; PORTA, R.; MARINIELLO, L. Characterization of Citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. **Carbohydrate Polymers**, v.106, n.15, p. 200-208, 2014

GIRONI F, PIEMONTE V. Bioplastics disposal: how to manage it, Tallinn; 2010.

GODBILLOT, L.; DOLE, P.; JOLY, C.; ROGE, B.; MATHLOUTHI, M. Analysis of water binding in starch plasticized films. **Food Chemistry**, v. 96, n. 3, p. 380–386, 2006.

GOMEZ-ESTACA, J.G.; DICASTILLO, C.L.; MUNOZ, P.H.A.; GAVARA, R.C.R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, p. 42-51, 2014.

GUZMAN-SIELICKA, A.; JANIK, SIELICKI, P. Proposal of New Starch-Blends Composition Quickly Degradable in Marine Environment. **Journal of Environmental Studies**, v. 21, p.802–806, 2013.

HANANI, Z.A.N.; ROOS, Y.H.; KERRY, J.P. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. **INTERNATIONAL Journal of Biological Macromolecules**, v.1, p. 1-9, 2014.

HEMPEL, A.W.; O'SULLIVAN, M.G.O.; PAPKOVSKY, D.B.; KERRY, J.P. Use of smart packaging technologies for monitoring and extending the shelf-life quality of modified atmosphere packaged (MAP) bread: application of intelligent oxygen. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 117–124, 2013.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, M.; REID, D.S.; MCHUGH, T.H.; BERRIOS, J.D.J.; KROCHTA, J.M. Thermal transitions and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 169–175, 2008.

HUANG, Y.; YANG, H. Preparation and characterization of heparin-stabilized gold nanoparticles. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.27, p. 309–319, 2008.

ICHINOSE, I.; MIZURI, S.; OHNO, S.; SHIRAIISHI, H.; KUNITAKE, T. Preparation of Cross-Linked Ultrathin Films Based on Layer-by-Layer Assembly of Polymers. **Polymer Journal**, v. 31, n. 11-2, p. 1065-1070, 1999.

IMRAN, H.; REVOL-JUNELLES, A.M.; MARTYN, A.; TEHRANY, E.A.; JACQUOT, M.; LINDER, S. Desobry Active food packaging evolution: transformation from micro- to nanotechnology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 799–821, 2010.

IORIO, R.; SANDRO, A.D.; PARIS, R.; PAGLIARANI, G.; TARTARINI, S.; RICCI, G.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; VERDERIO, E.; DUCA, S.D. Simulated environmental criticalities affect transglutaminase of *Malus* and *Corylus* pollens having different allergenic potential. **Amino Acids**, v.42., p.1007–1024, 2012.

IRISSIN-MANGATA, J. et al. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, n. 11, p. 1533-1541, 2001.

ITO, E. N., PESSAN, L. A., HAGE JR, E., COVAS, J. A. *Análise do desenvolvimento morfológico da blenda polimérica PBT/ABS durante as etapas de mistura por extrusão e moldagem por injeção*. **Polímeros**, v. 14, p. 83-92, 2004.

JIMIN GUO, XINYING LI, CHANGDAO MU, HANGUANG ZHANG, PAN QIN, DEFU LI. Freezing-thawing effects on the properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin-MMT composite films. **Food Hydrocolloids**, v. p. 33, 273-279, 2013.

KANMANI, P., RHIM, J.M. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 644-652, 2014.

- KASSAEI, M.Z.; AKHAVAN, A.; SHEIKH, N.; BETESHOBABRUD, R.  $\gamma$ -Ray synthesis of starch-stabilized silver nanoparticles with antibacterial activities. *Radiat. Radiation Physics and Chemistry*, v. 77, p. 1074–1078, 2008.
- KHANNA, P.K.; SINGH, N.; CHARAN, S.V.V.V.S. SUBBARAO, R. GOKHALE, U.P. MULIK. Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. **Materials Chemistry and Physics**, v.93, n. 1, p. 117–121, 2005.
- KHAN, A.; EL-TONI, A.M.; ALROKAYAN, S.; ALSALHI, M.; ALHOSHAN, M.; ALDWAYYAN, A.S. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using poly-N-isopropylacrylamide/acrylic acid microgel particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 377., n. 1-3., p. 356–360, 2011.
- KHAN, Z.; L-THABAITI, S.A.A.; OBAID, Y.; KHAN, Z.A.; AL-YOUBI, A.A.O. Shape-directing role of cetyltrimethylammonium bromide in the preparation of silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.367, n. 1, p. 101–108, 2012.
- KIRWAN, M. J., & STRAWBRIDGE, J. W. Plastics in food packaging. **Food Packaging Technology**, p174-240, 2003.
- KULKARNI, R.K.; PANI, K. C.; NEUMAN, C.; LEONARD F. - "Polylactid Acid For Surgical Implants, **Archives of Surgery**, v. 93, p. 839-843, 1966.
- KUMAR, R., & MUNSTEDT, H. Silver ion release from  $\epsilon$  antimicrobial polyamide/silver composites. **Biomaterials**, v.26, p. 2081- 2088, 2005.
- LARA-LLEDÓ, M.; OLAIMAT, A.; HOLLEY, R.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna sausages by an antimicrobial film containing mustard extract or sinigrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 25–31, 2012.
- LEIMANN, F.V.; GONÇALVES, O.H.; MACHADO, R.A.F.; BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 430–436, 2008.
- LEIMANN, F. V. : Nanopartículas híbridas (polímero natural / polímero sintético) via polimerização em miniemulsão. Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2011.
- LIU, B.; YAO, C.; FANG, S. Evaluation of a Non-Woven Fabric Coated with a Chitosan Bi-Layer Composite for Wound Dressing. **Macromolecular Bioscience**, v.,8, p. 432–440, 2008.
- LIU, X.X.; WANG, Y.F.; ZHANG, N.; SHANKS, R.A.; LIU, H.S.; TONG, Z.; CHEN, L.; YU, L. Morphology and Phase Composition of Gelatin-Starch Blends. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 32, n. 1, p.108–114, 2014.

LLORET, E.; PICOUET, P.; FERNÁNDEZ, A. Matrix effects on the antimicrobial capacity of silver based nanocomposite absorbing materials. **LWT - Food Science and Technology** v. 49, p. 333-338, 2012.

LUCKACHAN, G. E.; PILLAI, C.K.S. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. **Journal of Polymers and the Environment**, v.,19, p.637-676, 2011.

LUNT, J. - Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p.145-152, 1998.

MA, X.; CHANG, P.; YU, J.; STUMBORG, M. Properties of biodegradable citric acid-modified granular starch/thermoplastic pea starch composites. **Carbohydrate Polymers**, v.75., p. 1-8, 2009.

MALI, S.; SAKANAKA, L. S.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 283-289, 2005.

MARTÍNEZ – CASTAÑÓN, G. A.; NIÑO- MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J.R.; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticles Research**., v. 10., p. 1343-1348,2008.

MOTTA, A. C. - "Síntese e caracterização do poli(L-ácido láctico) - PLLA e poli(L-ácido láctico - co-ácido glicólico) - PLGA, estudo da degradação in vitro", Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.

MORONES, J.R., ELECHIGUERRA, J.L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J.B., RAMIREZ, J.T. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2352, 2005.

MOURA, M.R.; MATTOSO, L.H.C.; ZUCOLOTTI, V. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 520-524, 2012.

MÜLLER, C.M.O., YAMASHITA, F., LAURINDO, J.B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72., p. 82-87, 2008.

MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; YAMASHITA, F. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 33., n. 3., p. 605-610, 2011.

MÜLLER, C. M., LAURINDO, J. B., YAMASHITA, F. Composites of thermoplastic starch and nanoclays produced by extrusion and thermopressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 504-510, 2012.

NAFCHI , A.M.; MORADPOUR , M.; SAEIDI , M.; Effects of nanorod-rich ZnO on rheological, sorption isotherm, and physicochemical properties of bovine gelatin films . **LWT - Food Science and Technology** , v. 58., p. 142-149, 2014.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility Testes Bacteria that grow aerobically. **Approved Standart - Sixt Edition**. NCCLS document N7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR,M.; VECEROVA,R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V,K.; NEVECNA, T.J.; ZBORIL, R,J.Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **Journal of Physical chemistry** , v. 11, n. 33, p. 16248 – 16253 - 2006.

PARK, J.W.; WHITESIDE, W.S.; CHO, S.Y. Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. **LWT - Food Science and Technology** ,v. 41, p. 692–700, 2008.

PARK, J.K.; LEE, D.J.; YOO,E.S.; IM, S.S. Biodegradable Polymer blends of Poly lactic acid)and starch. **Korea polymer journal** , .7 ,n.2, p.93-101,1999.

PARK, J.W.; IM, S.S.; KIM, S.H.; KIM, Y.H. Biodegradable Polymer Blends of Poly( L-lactic acid) and Gelatinized Starch. **Polymer engineering and science** , v.40, n. 12, p. 2539-2550, 2004.

PATIL, R.D.; DALEV, P.G.; MARK, J.E.; VASSILEVA,E.; FAKIROV. S. Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters. **Journal Applied Polymer Science**, v. 76, p. 29–37, 2000.

PEREDA, M., PONCE, A. G., MARCOVICH, N. E., RUSECKAITE, R. A., & MARTUCCI, J. F. Chitosanegelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1372-1381, 2011.

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

PINTO, V.V.;FERREIRA, M.J.; SILVA, R.;SANTOS, H.A.;SILVA, F.;PEREIRA., C.M.Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, p. 19–25, 2010.

PIRES, M.; PETZHOLD, C.L. SANTOS, R.V. Efeito da Migração de Composto Antimicrobiano nas Propriedades Finais de Selagem de Filme Poliolefinico. **Polímeros**, v. 24 , n. 2, p. 237-242, 2014

PRATA, A.S.; MENUT,C.; LEYDET, A.; TRIGO, J.R.; GROSSO, C.R.F. Encapsulation and release of a fluorescent probe, khusimyl dansylate, obtained rom vetiver oil by complex coacervation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 7–15, 2008.

- QIN, Y.; JI, X.; JING, J.; LIU, H.; WU, H.; YANG, W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.372., n. 1-3, p. 172–176, 2010.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p.76–83, 2009.
- RAFFI, M., HUSSAIN, F., BHATTI, T.M., AKHTER, J.I., HAMEED, A., HASAN, M.M. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against E. coli ATCC 15224. **Journal of Materials Science e Technology**, v. 24., p. 192–196, 2008.
- REICHA, F.M.; SARHAN, A.; ABDEL-HAMID, M.I.; IEL-SHERBINY, I.M. Preparation of silver nanoparticles in the presence of chitosan by electrochemical method. **Carbohydrate Polymers**, v.89, n. 1, p. 236–24, 2012.
- RHIM, J.-W., PARK, H.-M., & HA, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.38, n.10-11, p. 1629–1652, 2013.
- RODOLFO-JR, A.; NUNES, L.R.; ORMANJI, W. Tecnologia do PVC. São Paulo: ProEditores/Braskem, 2002.
- RYU, B.H.; CHOI, Y.; PARK, H.S.; BYUN, H.; KONG, K.; LEE, J.O.; CHANG, H. Synthesis of highly concentrated silver nanosol and its application to inkjet printing. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 270-271, p. 345–351, 2005.
- SANKAR, R.; KARTHIK, A.; PRABU, A.; KARTHIK, S.; SHIVASHANGARI, K.S. Origanum vulgare mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108., p. 80-84, 2013.
- SÁNCHEZ-VALDES, S.; ORTEGA-ORTIZ, H.; RAMOS-DE VALLE, L.F.; MEDELLI N-RODRIGUEZ, F.J.; GUEDEA-MIRANDA, R. Mechanical and Antimicrobial Properties of Multilayer Films with a Polyethylene/Silver Nanocomposite Layer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, p.953–962, 2009.
- SARASUA, J.R.; ARRAIZA, A.L. Crystallinity and Mechanical Properties of Optically Pure Polylactides and Their Blends. **Polymer engineering and science**, p. 745-753, 2005,
- SARKAR, A.; KAPOOR, S.; MUKHERJEE, T.. Synthesis of silver nanoprisms in formamide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.287, n. 2., p. 496–500, 2005.
- SHERVANI, Z.; YAMAMOTO, Y. Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites. **Carbohydrate Research**, v. 346, 5, p. 651–658, 2011.

SHEWAN, H.M.; STOKES, J.R. Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. **Journal of Food Engineering** , v. 119 , p.781–792, 2013.

SHIRAI, M. A.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; GARCIA, P. S.; MÜLLER, C. M. O. Development of biodegradable flexible films of starch and poly ( lactic acid ) plasticized with adipate or citrate esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 19–22, 2013.

SHIRAI, M. A.; MULLER, C.M.O.; GROSSMANN, M.V. E.; YAMASHITA, F. Adipate and Citrate Esters as Plasticizers for Poly(Lactic Acid)/ Thermoplastic Starch Sheets. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 22, n. 2, 1-10, 2014.

SIRACUSA,V.; BLANCO,I.; ROMANI, S.; TYLEWICZ, U.; ROCCULI, P.; ROSA, M.D. Poly(lactic acid)-Modified Films for Food Packaging Application: Physical, Mechanical, and Barrier Behavior. **Journal of Applied Polymer Science** ,v. 125., p. 90–401, 2012.

SOARES, F.C.; YAMASHITA, F.; MÜLLER, C.M.O.;PIRES, A.T.N. . Thermoplastic starch/poly(lactic acid) sheets coated with cross-linked chitosan. **Polymer** ,v. 32 , p. 94–98, 2013.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI , B.Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**,v. 275, p. 177–182, 2004.

SONG, J.Y.; KIM, B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering** , v. 32, p. 79–84, 2009.

SOROUDI, A.; JAKUBOWICZ, I. Recycling of bioplastics, their blends and biocomposites: A review. **European Polymer Journal**, v.49 , p. 2839–2858, 2013.

STEVANOVIĆ, M.; KOVAČEVIĆ, B.;PETKOVIĆ, J.; FILIPIČ, M. USKOKOVIĆ, D. Effect of poly- $\alpha$ ,  $\gamma$ , L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine.**, v. 6., p. 2837–2847, 2011.

SUI, Z.M., CHEN, X., WANG, L.Y., XU, L.M., ZHUANG, W.C., CHAI, Y.C., YANG, C.J. Capping effect of CTAB on positively charged Ag nanoparticles. **Physica E** ,v. 33, p. 308–314, 2006.

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

TAGHIZADEH, A.; SARAZIN, P.; FAVIS, B,D. High molecular weight plasticizers in thermoplastic starch/polyethylene blends. **Journal of Materials Science** , v.48, p. 1799–1811, 2013.

TANKHIWALE, R.;BAJPAL, S.K. Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces** v. 69 , p.164–168, 2009.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L.M.; CEREDA, M.P.; SCAMPARINI, A.R.P. Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch–gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. **Food Chemistry** ,v. 103, p.255-262, 2007.

VICENTINI, N.; SOBRAL, P.; CEREDA, M. The influence of the thickness on the functional properties of cassava starch edible films. **Plant Biopolymer Science: Food and Non-Food Applications.**, p. 291–300, 2002.

WANG. Y.; RAKOTONIRAINY, A. M. ; PADUA, G.W. Thermal Behavior of Zein-based Biodegradable Films. **Starch/Stärke**, v. 55, p. 25–29, 2003.

WANG,H.; QIAO, X.;CHEN,J.; DING, S. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. **Colloids and Surfaces A :Physicochemical and Engineering Aspects**, v.256, n. 2-3, p. 111–115, 2005.

WEI,D.W.; SUN,W,Y.; QIAN, W.P.;YE, Y.Z.;MA, X.Y.. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers** , v. 344., p. 2375–2382, 2009

WILCOXON, J.P.; ABRAMS, B.L. Synthesis, structure and properties of metal nanoclusters. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 1162- 1194, 2006.

WU, R.T.; HSU, S.L.C. Preparation of highly concentrated and stable suspensions of silver nanoparticles by an organic base catalyzed reduction reaction. **Materials Research Bulletin** ,v. 43, n. 5, p. 1276–1281, 2008.

XIA, N.X.;CAI, Y.R.;JIANG, T.;YAO, J.M. Green synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction with hyaluronan. **Carbohydrate Polymers**, v.86, p. 956–961, 2011.

XU, H.; TENG, C.; Yu, M. Improvements of thermal property and crystallization behavior of PLLA based multiblock copolymer by forming stereocomplex with PDLA oligomer. **Polymer**, v. 47,n. 11., p. 39222-3928, 2006.

YAMANLAR, S.; SANT , S.; BOUDOU , T.; PICART , C.; KHADEMHOSEINI, A. Surface functionalization of hyaluronic acid hydrogels by polyelectrolyte multilayer films. **Biomaterials**, v .32, p. 5590-5599, 2011.

YANG,J.; PAN.J. Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles by sodium alginate and their applications in surface-enhanced Raman scattering and catalysis. **Acta Materialia** , v.60, n. 12, p. 4753–4758, 2012.

YILDIRIM, M., HETTIARACHCHY, N.S.Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. **Journal of Food Science**,v. 63, p. 248–252, 1998.



- YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science** , v.31, p. 576–602, 2006.
- ZAHEER, Z.; RAFIUDDI, Z. Multi-branched flower-like silver nanoparticles: preparation and characterization . **Colloids and Surfaces A :Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384 , p. 427–43, 2011.
- ZIELINSKA. A. et al. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. **Procedia Chemistry**, p. 1560–1566, 2009.
- ZHANG, N. LIU, H, YUA, L. LI, X. ZHANG, L. CHENA, L. SHANKS, R. Developing gelatin–starch blends for use as capsule materials. **Carbohydrate Polymers** , v.92, p. 455–461, 2013.
- ZHANG, W.Z.; QIAO,X.L.; CHEN, J.G.. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in AOT m. icroemulsion system. **Chemical Physics** , v. 300, n. 3 , p. 495–500, 2006.
- ZHAO, T.SUNA, R.; YU,S.; ZHANG, Z.; ZHOU, L.;HUANG,H.; DU,R.. Size-controlled preparation of silver nanoparticles by a modified polyol method. **Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects**, v.366., n. 1-3 ., p. 197–202, 2010.
- ZHAO, R.; TORLEY, P.;HALLEY, P.J. Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. . **Journal of Materials Science**, v. 43, p. 3058–3071, 2008.
- ZHAO, X.; LIU, W.; KANGDE YAO, K. Preparation and Characterization of Biocompatible Poly(L-lactic acid)/Gelatin Blend Membrane. **Journal of Applied Polymer Science**, v ,p.101, 269 –276 , 2006.