

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**Hermano de Vasconcelos Pina**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE FILMES À BASE  
DE PCL/ZnO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS**

Campina Grande – PB

2019

**Hermano de Vasconcelos Pina**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE FILMES À BASE  
DE PCL/ZnO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.**

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renate Maria Ramos Wellen

**Orientador:** Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Campina Grande – PB

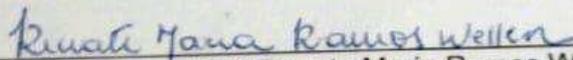
2019

HERMANO DE VASCONCELOS PINA

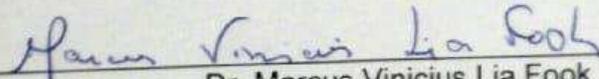
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE FILMES À BASE  
DE PCL/ZNO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais como requisito  
parcial à obtenção do título de **Mestre  
em Ciência e Engenharia de  
Materiais**.

Aprovado em: 30/08/2019



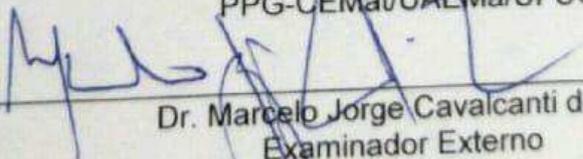
Dr.<sup>a</sup> Renate Maria Ramos Wellen  
Orientadora  
CGEMAT/UFPB



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
Orientador  
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.<sup>a</sup> Suédina Maria de Lima Silva  
Examinadora Interna  
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá  
Examinador Externo  
CSTR/UFCG

P645s Pina, Hermano de Vasconcelos.  
Síntese, caracterização e avaliação biológica de filmes à base de PCL/ZnO para aplicações em embalagens de alimentos / Hermano de Vasconcelos Pina. – Campina Grande, 2019.  
57 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019.

"Orientação: Profa. Dra. Renate Maria Ramos Wellen, Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".

Referências.

1. Embalagens. 2. Filmes de PCL. 3. ZnO. 4. Análises Antimicrobianas. 5. Polímeros Biodegradáveis. I. Wellen, Renate Maria Ramos. II. Fook, Marcus Vinicius Lia. III. Título.

CDU 678.7:664(043)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, porque sem a fé que eu tive n'Ele, nada disso estaria acontecendo. E, principalmente, por todas as conquistas alcançadas, além de ter colocado as pessoas ideais que interferiram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

Quero agradecer à minha família, sem eles eu jamais estaria aqui escrevendo essas palavras, obrigado mãe pela grande pessoa que és, meu eterno agradecimento pela torcida e pelas orações.

À minha noiva querida, por tudo que passamos e vencemos juntos, e que sempre estive ao meu lado com sua dedicação, alegria, parceria, paciência; amor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renate Maria Ramos Wellen, pela orientação, incentivo, paciência, por acreditar nesse projeto, pela confiança e afinidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinicius, pela oportunidade, colaborações, por acreditar e pela confiança.

À banca examinadora composta pelo Profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva e Prof. Dr Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá, pelo tempo despendido, pela leitura atenta e cuidadosa, pela disponibilidade na conclusão deste trabalho.

Aos professores e secretaria do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS *PPG-CEMat*.

Ao José William Souza, Francivandi Coelho, Marcio Cardoso, o meu especial agradecimento, por auxiliarem nas análises de grande importância para meu trabalho. Obrigado pela disponibilidade, amizade, incentivo e paciência.

Aos meus colegas de laboratório Patrícia, Valéria, Paloma pelo auxílio nos experimentos, troca de conhecimentos.

Aos amigos Arley Jackson e Rita de Cássia por todo incentivo e apoio e pela amizade que construímos durante todos esses anos.

Com todo carinho, quero agradecer aos amigos e colegas do Laboratório De Avaliação e Desenvolvimento De Biomateriais Do Nordeste – CERTBIO que de alguma forma me ajudaram na conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal de Campina Grande, ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pela oportunidade concedida para a realização deste mestrado.

Ao Laboratório De Avaliação e Desenvolvimento De Biomateriais Do Nordeste – CERTBIO por permitir realizar toda pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

## RESUMO

O papel tradicional das embalagens de alimentos continua evoluindo em resposta às mudanças das necessidades do mercado. Inovações que ofereçam soluções no segmento de embalagens são necessárias, tendências atuais sugerem o desenvolvimento de embalagens funcionais contendo agentes antimicrobianos, que são capazes de inibir ou até mesmo causar a morte de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos e embalagens ambientalmente favoráveis às quais possuem um baixo nível de impacto ambiental. O desenvolvimento de filmes biodegradáveis contendo substâncias ativas é de interesse para a indústria alimentícia. Devido ao seu caráter dúctil, a policaprolactona (PCL), um poliéster biodegradável, com propriedades mecânica e cinética de degradação adequadas quando descartadas no meio ambiente, com rotas de produção relativamente baratas em relação a outros poliésteres alifáticos, surge com um grande potencial de utilização para embalagens biodegradáveis para alimentos. Neste trabalho o óxido de zinco nanoestruturado ( $ZnO_{nano}$ ) foi incorporado a matriz polimérica PCL, filmes puros e filmes PCL aditivados com  $ZnO_{nano}$  5, 10 e 15% foram produzidos com sucesso, a técnica de *Solvent Casting* mostrou-se satisfatória para a preparação dos filmes poliméricos. Em seguida, foram realizadas análises de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO), Microscopia de Força Atômica (AFM), atividade antimicrobiana e citotoxicidade. Os resultados demonstraram que a identidade química dos componentes individuais não foi modificada, o controle superficial pode ser alcançado através da variação da composição, na concentração 5% o filme PCL/ $ZnO$  apresenta-se bem distribuído ao longo da matriz polimérica, apresentando uma superfície uniforme ao longo de todo o filme, ocorreu inibição do crescimento da bactéria patogênica para os filmes aditivados com  $ZnO$  e especificamente no filme nanocompósito contendo 5%  $ZnO_{nano}$  obteve-se a eficácia antibacteriana ótima e a toxicidade ausente. Filmes de PCL com nanopartículas de  $ZnO$  dispersas homoganeamente na matriz polimérica oferecem grande potencial para serem aplicados em filmes de interesse comercial para utilização como embalagens de alimentos.

**Palavras-chave:** Filmes de PCL,  $ZnO$ , embalagens, análises antimicrobianas, polímeros biodegradáveis.

## ABSTRACT

Global world packaging market grows constantly trying to fill the society needs. Innovations offering solutions for the industrial packaging segment are needed, and current trends suggest functional packages' development containing antimicrobial agents able to avoid or even to kill pathogenic microorganisms, parallelally being environmentally friendly packaging, providing lower environmental damages. Development of biodegradable films with active substances is interesting for the food industry. Due to its ductile character, polycaprolactone (PCL), biodegradable polyester with proper mechanical and degradation kinetic properties when disposed to the environment, presenting relatively satisfactory processing costs among aliphatic polyesters has great potential use for the biodegradable food packaging. In this work nanostructured zinc oxide ( $\text{ZnO}_{\text{nano}}$ ) was added to PCL matrix, neat PCL films and  $\text{ZnO}_{\text{nano}}$  films with 5, 10 and 15 % were successfully produced by Solvent Casting. Films were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Optical Microscopy (MO) and Atomic Force Microscopy (AFM), additionally antimicrobial activity and cytotoxicity were also performed. Main results showed the chemical identity of individual components was not modified; the surface control could be achieved changing composition. At 5% of ZnO, this filler is well distributed along PCL matrix, presenting uniform surface. Pathogenic bacterial growth was inhibited throughout PCL film specifically for films with 5%  $\text{ZnO}_{\text{nano}}$ . Optimum antibacterial efficacy and absent toxicity were obtained. PCL films with homogeneously dispersed ZnO nanoparticles along with the matrix offer great potential to be commercially applied being interesting films for the food packaging industry.

**Keywords:** PCL films, ZnO, packaging, antimicrobial analysis, biodegradable polymers.

## PUBLICAÇÕES

ANDRADE, Rivaildo Miranda de et al. PCL/ZnO Bio-friendly Films as Food Packaging Material. Thermal and morphological analysis. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 4, 2018.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição percentual em massa dos materiais que compõem os resíduos sólidos urbanos.....	15
Figura 2 - Classificação de alguns polímeros biodegradáveis de acordo com a sua fonte de origem.....	18
Figura 3 - Processo de polimerização da Policaprolactona.....	19
Figura 4 - Representação da estrutura cristalina do ZnO: (a) Tipo sal de rocha, (b) tipo blenda de zinco, e (c) tipo wurtzita.....	20
Figura 5 - Esquema resumido das possíveis interações das NPs de ZnO com células bacterianas.....	23
Figura 6 - Método de preparo dos filmes PCL/ZnO.....	25
Figura 7 - Estruturas químicas: (a) separadamente, estruturas do PCL e ZnO; (b) interação química entre o PCL e o ZnO.....	31
Figura 8 - Espectros de FTIR dos filmes: (a) PCL puro; (b) PCL/ 5%ZnO; (c) PCL/ 10%ZnO; (d) PCL/ 15%ZnO.....	32
Figura 9 - Difractogramas dos filmes de PCL puro, PCL/ZnO com 5%, 10%, 15%.....	34
Figura 10 - Imagens de microscopia óptica dos filmes de PCL pura (a), PCL/5% ZnO (b), PCL/10% ZnO (c) e PCL/15% ZnO (d).....	35
Figura 11 - Filmes PCL/5% de ZnO (a), PCL/15% de ZnO (b), PCL/15% de ZnO (c), amplificação dos círculos vermelhos mostrados em (c) para PCL/15% de ZnO (d).....	36
Figura 12 - Imagem topográfica por AFM dos filmes de PCL puro (a), PCL/5% de ZnO (b), PCL/10% de ZnO (c), PCL/15% de ZnO (d).....	37
Figura 13 - Fotomicrografias obtidas por MEV e seus respectivos pares de mapeamento de superfície referentes a quantificação de bactérias por área analisada.....	39
Figura 14 - Imagens com 100X de aumento da linhagem celular L929 das zonas de descoloração de materiais experimentais no teste de difusão em ágar: controle negativo (PEAD) (a), controle positivo (látex tóxico) (b) e dos filmes de PCL puro (c), PCL/5% de ZnO (d), PCL/10% de ZnO (e), PCL/15% de ZnO (f).....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de degradação de materiais quando descartados em lixões.....	15
Tabela 2 - Graus de citotoxicidade.....	30
Tabela 3 - Dados de quantificação de área de superfície para as amostras analisadas por MEV.....	40
Tabela 4 - Resultados do ensaio por Difusão em Ágar.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais
DRX	Difração de Raios X
FDA	Food Drug and Administration
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GRAS	Generally Recognized as Safe
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Ótica
NPS	Nanopartículas
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de alta densidade
PHB	Poli(3-hidroxi-butirato)
PP	Poli(propileno)
ROS	Reactive Oxygen Species
USA	United States of America
ZnO	Óxido de Zinco

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 Embalagens .....	15
2.2 Filmes Biodegradáveis .....	17
2.3 Policaprolactona (PCL) .....	19
2.4 Óxido de zinco nanoestruturado .....	20
2.4.1 Atividade antimicrobiana do ZnO .....	21
2.5 Compósitos poliméricos .....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1 Materiais .....	25
3.2 Métodos .....	25
3.2.1 Preparação das amostras .....	25
3.2.2 Caracterizações das amostras .....	26
3.2.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	26
3.2.2.2 Difração de Raios X (DRX) .....	26
3.2.2.3 Microscopia Óptica (MO) .....	26
3.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	27
3.2.2.5 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	27
3.2.2.6 Atividade antimicrobiana .....	27
3.2.2.6.1 Análise qualitativa e quantitativa da atividade antibacteriana dos filmes por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	28
3.2.2.7 Toxicidade celular .....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	31
4.2 Difração de Raios X (DRX) .....	33
4.3 Microscopia Óptica (MO) .....	35
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	36
4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	37
4.6 Atividade Antimicrobiana .....	39
4.6 Citotoxicidade .....	41
5 CONCLUSÃO .....	44
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	45
REFERÊNCIAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A moderna indústria de alimentos necessita de embalagens que protejam os produtos alimentícios, prolonguem a vida útil deles, mantendo-os frescos e seguros, permitindo que os mesmos sejam transportados por longas distâncias, atendendo assim o mercado consumidor. Dessa forma, o papel tradicional das embalagens de alimentos continua evoluindo em resposta às mudanças das necessidades do mercado. Inovações que ofereçam soluções no segmento de embalagens são necessárias uma vez que o desenvolvimento das chamadas “embalagens ativas”, além de servirem como barreira entre o meio externo e interno, devem contribuir na preservação do alimento, que é uma abordagem inovadora para manter ou prolongar o prazo de validade dos produtos alimentares, assegurando simultaneamente a sua qualidade, segurança e integridade (Han *et al.*, 2018).

Tendências atuais sugerem o desenvolvimento de embalagens funcionais contendo agentes antimicrobianos, que são capazes de inibir ou até mesmo causar a morte de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos e embalagens ambientalmente favoráveis às quais possuem um baixo nível de impacto ambiental. O desenvolvimento de filmes biodegradáveis contendo substâncias ativas é de interesse para a indústria alimentícia. Por essas razões, o óxido metálico nanoestruturado ZnO e o polímero biodegradável, como a policaprolactona (PCL), são bons candidatos na produção de embalagens alimentícias (Yildirim *et al.*, 2018).

Policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático termoplástico biodegradável que apresenta propriedades flexíveis com grande potencial para aplicações tecnológicas e tem como características principais boa tenacidade e flexibilidade (Sogut, 2019). Ela apresenta propriedades viscoelásticas superiores a outros poliésteres, que é compatível com polímeros de fontes renováveis e permite a formação de estruturas multicamadas promovendo o aumento das propriedades mecânicas e de barreira importante para embalagens de alimentos (Figueroa-Lopes *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018), entretanto, tais embalagens têm altos custos de produção (Bumbudsanpharoke & Ko, 2015). Portanto, o desenvolvimento de embalagens monocamadas com propriedades aprimoradas, peso leve, transparência e biodegradabilidade é desejável, e os avanços da nanotecnologia podem tornar isso possível (Garcia, Shin e Kim, 2018).

A PCL é um polímero que apresenta estabilidade térmica e química, biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixa imunogenicidade e baixos riscos de contaminações (Sogut, 2019). Com isso, oferece uma matriz biodegradável ideal para agentes antimicrobianos nano estruturados tipo óxidos metálicos como o ZnO, pois além de melhorar as propriedades mecânicas, de barreira e térmicas, é possível agregar a atividade antimicrobiana aos filmes poliméricos sem comprometer sua degradabilidade (Capelezzo *et al.*, 2018).

Nanopartículas metálicas têm sido incorporadas em filmes poliméricos, dentre elas o ZnO para produção de embalagens com atividade antimicrobiana devido, principalmente, ao seu pequeno tamanho e grande área superficial específica (Espitia *et al.*, 2013; Kanmani e Rhim, 2014; Arfat *et al.*, 2015). Mesmo a definição de “nanomaterial” em si não sendo homogênea, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, em seu “Guidance for Industry”, concedeu status GRAS para o ZnO que demonstra ser seguro ao contato com alimentos (FDA, 2017), assim como a União Europeia, no qual o ZnO é aprovado para aplicações de embalagens de alimentos (EC, 2017). Contudo, apesar da existência de legislação específica para o ZnO, os riscos para a saúde da exposição a nanopartículas para embalagens de alimentos permanecem insuficientemente avaliados e estudos mais profundos que avaliam a citotoxicidade são necessários (Mertens *et al.*, 2016; Maisanaba *et al.*, 2014; Maisanaba *et al.*, 2015). A eficácia antibacteriana ótima e a toxicidade reduzida ainda permanecem um desafio (Hu *et al.*, 2018; Yamani *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; Wiesenthal *et al.*, 2011).

Estudos relataram que a incorporação de ZnO nano estruturado com propriedades antimicrobianas a filmes baseados em polímeros biodegradáveis pode melhorar suas propriedades de barreira (à água e gases) e propriedades mecânicas, aumento do bloqueio da luz UV e vapor de água (Li & Li, 2009; Pantani, Gorrasi, Vigliotta, Murariu e Dubois, 2013; Venkatesan & Rajeswari, 2017). A dispersão das nanopartículas na matriz tem influência direta nas propriedades mecânicas, de barreira e possivelmente nas propriedades biológicas, assim, um estudo de superfície associado a propriedades biológicas é de grande importância.

No presente trabalho, filmes compósitos antibacterianos à base de PCL/ZnO foram desenvolvidos. As propriedades antibacterianas de superfície dos filmes contra *S. aureus* foram avaliadas pelo método de adesão microbiana. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o método de difusão em ágar. Caracterizações químicas e

topográficas também foram investigadas e associadas às propriedades biológicas com o objetivo de avaliar o potencial dos filmes como embalagens de alimentos ativos.

Ademais, este trabalho tem como objetivo promover novos conhecimentos sobre comportamento antimicrobiano e citotóxico dos filmes PCL/ZnO, o que contribuirá para futuras aplicações em embalagens de alimentos com eficácia antibacteriana ótima e toxicidade reduzida.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Embalagens

A embalagem exerce um papel primordial na indústria alimentícia, com diversas aplicações como: conter, conservar, manter a qualidade e segurança do produto, impossibilitando a deterioração química, física e microbiológica do alimento (Azeredo, 2004).

Dentre os materiais com maior volume de descarte em lixões e aterros municipais, destacam-se o papel, papelão e os polímeros sintéticos, conhecidos comercialmente como plásticos, conforme a Figura 1. A contribuição do plástico é relativamente pequena quando comparada a resíduos como material orgânico ou papel e papelão, entretanto o aspecto negativo é o tempo de degradação deste material ao ser descartado em lixões, como mostra a Tabela 1 (Yoshiga *et al.*, 2004).

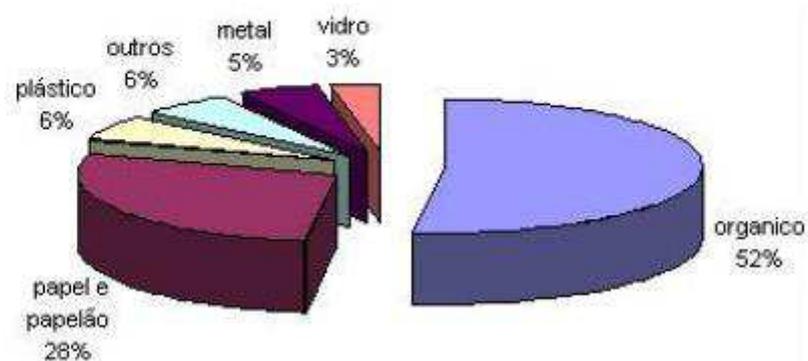


Figura 1 - Composição percentual em massa dos materiais que compõem os resíduos sólidos urbanos (Yoshiga *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Tempo de degradação de materiais quando descartados em lixões. Adaptado de (Magalhães, 2001).

<b>MATERIAL</b>	<b>TEMPO DE DEGRADAÇÃO</b>
Aço (latas)	10 anos
Alumínio	200 a 500 anos
Isopor	Indeterminado
Madeira	6 meses
Madeira pintada	13 anos
Papel	1 a 6 meses
Plásticos	450 anos
Plástico (PET)	100 anos
Vidro	Indeterminado

As embalagens plásticas para alimentos podem ser classificadas como rígidas, semirrígidas e flexíveis que são os filmes e estruturas laminadas. Em decorrência do baixo custo e praticidade dessas embalagens, a produção e comercialização de filmes flexíveis vêm aumentando nos últimos anos, mostrando que outro fator que impulsiona este aumento é a disponibilidade de diferentes resinas no mercado (Jorge, 2013).

Filmes flexíveis garantem uma boa processabilidade na indústria de alimentos, possibilitando o seu uso em diversas aplicações, a citar em polpas de frutas, leite, carnes, vegetais, produtos minimamente processados. Além disso, reduz a troca de umidade e a permeabilidade aos gases entre o alimento e o ambiente, controla a atividade microbiana e preserva a integridade estrutural dos produtos (Sarantópoulos *et al.*, 2002).

Um dos principais problemas enfrentados na produção de embalagens flexíveis é a gestão de resíduos de materiais plásticos (Realini e Marcos, 2014). Dessa forma, a reciclagem é uma maneira eficaz para reduzir esses resíduos, contudo, a contaminação do material com matéria orgânica, areia ou óleo dificulta a reciclagem de plásticos (Santos e Yoshida, 2011). Outro fator importante é o fato das embalagens serem feitas de diferentes tipos de polímeros, com diferentes aditivos como cargas, colorantes e plastificantes. A contaminação e a diversidade dos componentes das embalagens dificulta o processo de seleção para o reprocessamento, tornando a reciclagem um processo de alto custo (Davis e Song, 2006).

O uso de biopolímeros e polímeros biodegradáveis surge com uma alternativa eficaz na produção de embalagens. Nos últimos anos, tem ocorrido um considerável aumento nas pesquisas relacionadas a polímeros biodegradáveis, na tentativa de substituir os polímeros sintéticos por matérias-primas que possam ser assimiladas pelo meio ambiente, principalmente como filmes flexíveis biodegradáveis, possibilitando a substituição aos resíduos não degradáveis derivados dos plásticos convencionais (Canché-Escamilla *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2012).

## 2.2 Filmes Biodegradáveis

Embalagens flexíveis em forma de filmes conquistaram o mercado de embalagens para alimentos por apresentar boa transparência, flexibilidade, ótima resistência ao impacto, rasgo e baixo custo. Essas embalagens eram produzidas por poliolefinas como Polietileno (PE) e Polipropileno (PP), como também pelo Poli (cloreto de vinila) (PVC) (Anyadike, 2010), entretanto, o descarte irracional, elevados custos de reciclagem e o elevado período de degradação geraram impactos ao meio ambiente, promovendo a diminuição do seu uso (Santos e Yoshida, 2011).

Buscando menor impacto ambiental, pesquisas estão sendo realizadas com materiais que possuam uma degradação em menor tempo após o descarte. Uma alternativa para a diminuição da acumulação de resíduos plásticos são os polímeros biodegradáveis (Fukushima *et al.*, 2012).

Polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação é um processo natural, cujo material é resultante da ação de microrganismos da natureza, como bactérias, fungos e algas, sendo este um processo natural, sob condições favoráveis (Rosa e Pântano Filho, 2003). A biodegradação inicia quando os microrganismos desenvolvem-se na superfície do polímero e secretam enzimas, quebrando o polímero e transformando a macromolécula em pequenos fragmentos. Dessa forma, o processo de biodegradação depende de diversos fatores, como a atividade microbiana no ambiente, temperatura, pH, peso molecular e cristalinidade do polímero (Avella *et al.*, 2005; Davis e Song, 2006).

Os polímeros biodegradáveis podem ser provenientes de fontes naturais renováveis, como cana-de-açúcar, milho e celulose, sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas, como o ácido butírico ou o ácido valérico, dando origem ao polihidroxibutirato – PHB e ao polihidroxibutirato- co- valerato – PHB-HV, derivados de fonte animal, como a quitina e a quitosana; proveniente de fontes fósseis (petroquímicos), obtidos através do petróleo como a policaprolactona – PCL (Brito *et al.*, 2011). Estes polímeros podem ser classificados como na Figura 2.

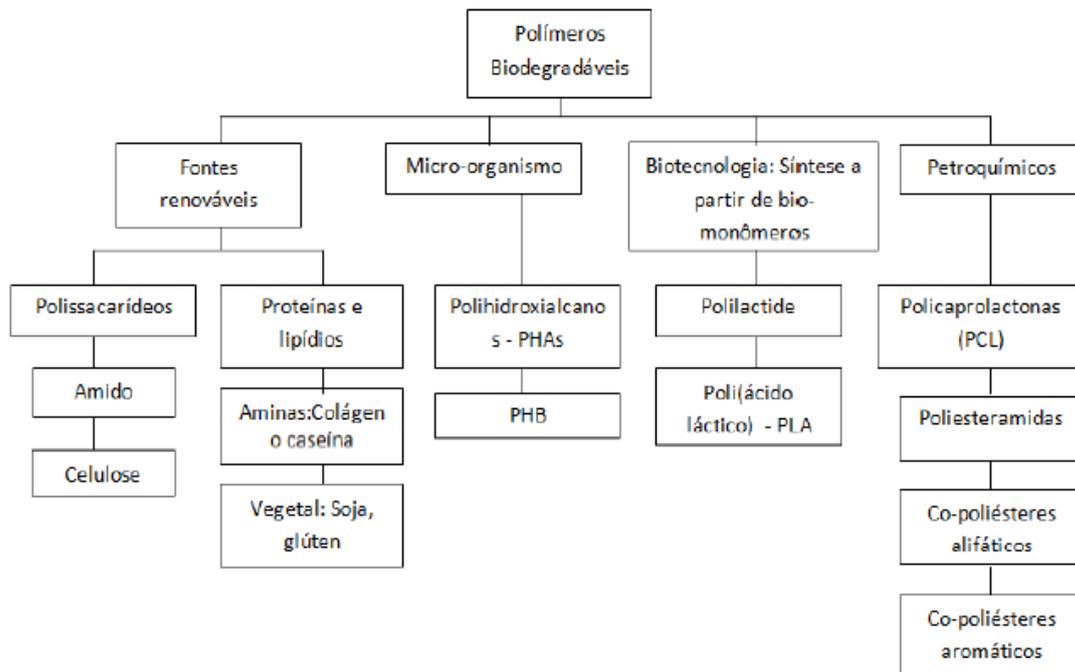


Figura 2 - Classificação de alguns polímeros biodegradáveis de acordo com a sua fonte de origem (Brito *et al.*, 2011).

Os biopolímeros possuem destaque na fabricação dos filmes biodegradáveis, pois, quando assim aplicados, apresentam propriedades de barreira adequadas contra o oxigênio, intermediária resistência mecânica e umidade relativa baixa. Apesar de todas as vantagens, os biopolímeros possuem limitações técnicas que dificultam sua processabilidade e seu uso. Assim, para superar tais desvantagens, grupos de pesquisa têm estudado e proposto modificações, dentre elas: modificação química, adição de plastificantes, mistura com outros polímeros formando blendas (Chen e Wang, 2002; Balakrishnan *et al.*, 2010), inclusão de nanopartículas produzindo compósitos (Wong *et al.*, 2004; Fachine, 2010), no intuito de melhorar propriedades como processabilidade, resistência térmica, propriedade mecânica, propriedade reológica, permeabilidade a gases e taxa de degradação, além de acrescentar propriedades como atividade antimicrobiana, tornando-os atrativos para a indústria de processamento (Garavand *et al.*, 2017).

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados são o PLA Poli (ácido láctico), o poli (ácido glicólico) - PGA, o poli (ácido glicólico-ácido láctico) - PLGA e a PCL (Amass *et al.*, 1998). Observam-se características de uma área de grande importância para viabilização de seu uso, uma vez que eles possuem áreas de desenvolvimento e aplicação com crescente utilização para embalagens, como

também para os mais variados setores (Falcone *et al.*, 2007). Assim, o uso de biopolímeros em filmes biodegradáveis para embalagens de alimentos (rígidos e flexíveis) tem se mostrado uma área de grande aplicação no Brasil (Brito *et al.*, 2011). Porém, alguns fatores devem ser considerados antes do uso dos mesmos como: as taxas de degradação em situações adversas, possíveis mudanças de algumas propriedades físicas, mecânicas e térmicas durante o armazenamento e a sua resistência contra o crescimento de microrganismos (Cabedo *et al.*, 2006).

### 2.3 Policaprolactona (PCL)

A PCL é um polímero sintético fabricado a partir de fontes de petróleo do tipo poliéster alifático, tem cadeia linear, é semicristalino e de caráter hidrofóbico. Possui boas propriedades mecânicas como resistência à tração e alongamento, sendo biodegradável, biocompatível e apresenta facilidade em formar compósitos com óxidos metálicos. Ademais, tem uma temperatura de fusão baixa,  $T_m$ , (55-60°C) e temperatura de transição vítrea,  $T_g$  de -60 °C (Fambri *et al.*, 2002; Nair e Laurencin, 2007). Sua sintetização é feita pela polimerização na abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona a partir de catalisadores aniônicos e catiônicos, que vão liberar radicais livres para abrir o anel de 2-metileno-1-3-dioxepano (Woodruff e Hutmacher, 2010), como apresenta a Figura 3.



Figura 3 - Processo de polimerização da Policaprolactona (Giménez *et al.*, 2017).

A processabilidade de filmes de PCL por solução ocorre de maneira satisfatória, uma vez que esta possui a capacidade de solubilização em diversos solventes orgânicos, dentre eles o tetracloreto de carbono, benzeno, clorofórmio, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano à temperatura ambiente.

Estes filmes, quando obtidos pela técnica de *casting*, apresentam boa transparência e flexibilidade, exibindo, assim, atributos semelhantes aos filmes de polímeros comerciais como PE e PP (Ponce *et al.*, 2009).

Em função de estudos realizados com a PCL, como: testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso deste material para fins médicos e farmacêuticos (Khor *et al.*, 2002).

## 2.4 Óxido de zinco nanoestruturado

O óxido de zinco (ZnO) é um material inorgânico semicondutor com características iônicas e covalentes bem conhecidas, é considerado um dos materiais mais versáteis devido às suas propriedades: alta estabilidade química, estabilidade mecânica e térmica o que permite uma gama de aplicações (Ann *et al.*, 2014), além de ser um aditivo importante na indústria de borracha e plástico para fins de transferência de proteção antimicrobiana, proteção UV e propriedades de desodorização (Padmavathy e Vijayaraghavan, 2008; Díez-Pascual e Díez-Vicente, 2014).

O ZnO possui as estruturas wurtzita, blenda de zinco e sal de rocha (Özgür *et al.*, 2005), como mostra a Figura 4. Na sua forma mais comum, a wurtzita, apresenta picos de difração que podem ser indexados com a estrutura wurtzita (Mishra *et al.*, 2012). Quando em escala nanométrica, pode assumir várias formas, em diferentes arranjos estruturais (Ma *et al.*, 2007). Esse material tem custo relativamente baixo, e com transparência óptica na região do visível, típico de um material semicondutor.

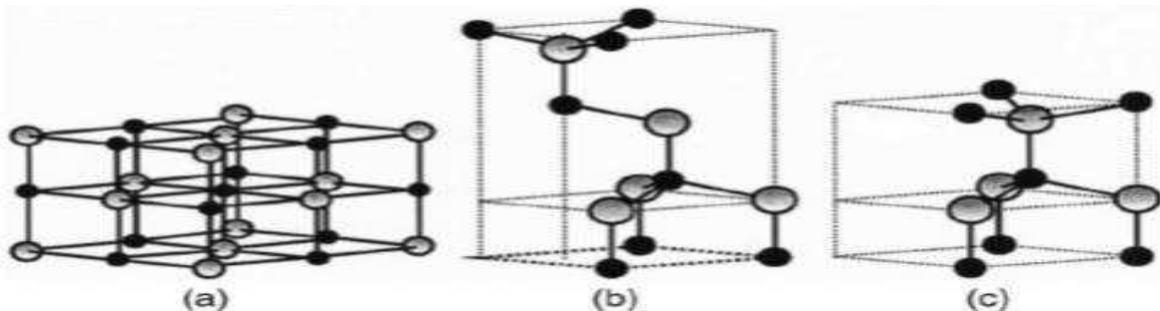


Figura 4 - Representação da estrutura cristalina do ZnO. (a) Tipo sal de rocha; (b) tipo blenda de zinco, e (c) tipo wurtzita (Özgür *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que o ZnO integra a lista GRAS (*Generally Recognized as Safe*) da FDA/USA (*Food Drug and Administration*) e tem se mostrado como um forte antimicrobiano contra patógenos alimentares (Espitia *et al.*, 2013).

Filmes poliméricos têm sido incorporados com nanopartículas metálicas, dentre elas o ZnO para produção de embalagens com atividade antimicrobiana (Espitia *et al.*, 2013; Kanmani e Rhim, 2014; Arfat *et al.*, 2015). Dessa maneira, o ZnO, atuando como agente antimicrobiano, aumenta a biodegradabilidade dos filmes e é economicamente mais viável quando comparado a outros metais em nanopartículas, como prata e ouro. Portanto, o ZnO<sub>nano</sub> apresenta forte potencial de uso em embalagem para alimentos.

#### **2.4.1 Atividade antimicrobiana do ZnO**

A atividade antimicrobiana é uma das propriedades mais promissoras da nanopartícula de ZnO, como pode ser observado em diversos trabalhos da literatura (Sawai, 2003; Adams *et al.*, 2006; Franklin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Uma maior estabilidade e uma maior vida de prateleira foram verificadas com a inclusão de nanopartículas inorgânicas com atividade antimicrobiana quando comparadas com os compostos orgânicos (Raghupathi *et al.*, 2011).

Desde a década de 50, estudos avaliando a atividade antimicrobiana de óxidos metálicos como Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Chang *et al.*, 2012), TiO<sub>2</sub> (Gupta *et al.*, 2013), Ag<sub>2</sub>O (Allahverdiyev *et al.*, 2011), CaO (Allahverdiyev *et al.*, 2011), MgO (Jin e He, 2011) e CuO (Azam *et al.*, 2012) comprovam sua eficiência como agente bactericida, assim como o ZnO, estudos apresentam propriedades bactericidas significativas em uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kumar *et al.*, 2017). O mecanismo de ação antimicrobiana de nanopartículas de ZnO mais aceito está relacionado a dois fatores principais: formação e liberação de espécies ativas de oxigênio e dano à parede celular devido à interação e adesão das partículas (Liu *et al.*, 2009).

Nesse mecanismo, ocorre a formação e liberação de espécies reativas de oxigênio (do inglês reactive oxygen species–ROS), em especial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH• e OH<sup>-</sup> aumentando a atividade oxidativa do meio. A eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio está relacionada com a densidade de defeitos de superfície nos óxidos metálicos, no qual os defeitos funcionam como núcleos

catalíticos promovendo reações de oxirredução permitindo a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio (Pacchioni, 2003; Dutta *et al.*, 2013; Lakshmi Prasanna e Vijayaraghavan, 2015).

As ROS podem causar dano aos constituintes celulares como lipídeos, proteínas e material genético e sua formação é potencializada por fotocatalise. Neste processo, as nanopartículas de ZnO irradiadas com uma fonte de luz UV promovem a transferência de elétrons da banda de valência para a banda de condução, formando-se vazios de elétrons com alto poder oxidante e elétrons na banda de condução com capacidade redutora que, em conjunto com moléculas de água, podem formar espécies reativas de oxigênio como radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (Kansal *et al.*, 2008). Outro fator envolvido é o efeito tóxico de íons de  $Zn^{2+}$  que interagem com os clusteres de Ferro-enxofre, substituindo o ferro levando a quebra do cluster. Esta quebra inibe o transporte de elétrons, induzindo a formação de ROS (Lemire *et al.*, 2013). Estas espécies reativas são responsáveis pela quebra das moléculas de DNA e perda de fluidez da membrana que levam aos processos de peroxidação lipídica e finalmente processo de vazamentos de material citoplasmático (Liu *et al.*, 2013).

O mecanismo de interação e adesão das partículas de ZnO à superfície das células (Figura 5) se dá por forças eletrostáticas. A superfície positivamente carregada de  $ZnO_{nano}$  liga-se fortemente à parede celular das bactérias gram negativas, e esta interação direta das partículas com a superfície celular pode levar a modificações morfológicas, internalização das partículas, alteração na permeabilidade da membrana e também liberação do conteúdo celular (Sawai, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Espitia *et al.*, 2012). A penetração na membrana da célula e a desorganização da membrana bacteriana após contato com  $ZnO_{nano}$  também foram indicados como causadores da inibição do crescimento bacteriano (Brayner *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010), como apresentados na Figura 5.

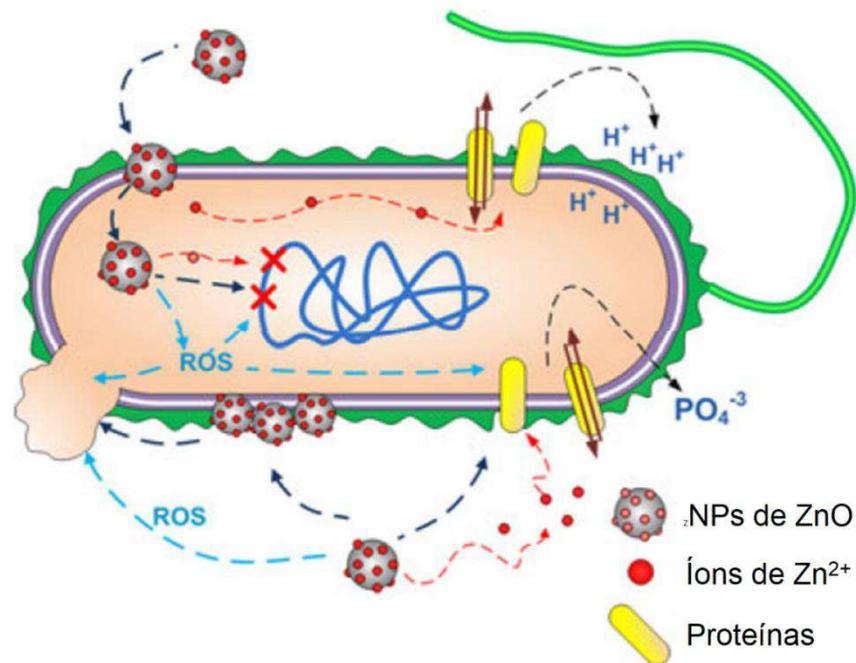


Figura 5 - Esquema resumido das possíveis interações das NPs de ZnO com células bacterianas. As NPs de ZnO podem: (1) libertar íons Zn<sup>2+</sup> e originar ROS, (2) interagir com as proteínas da membrana afetando as suas funções, (3) acumular-se na membrana celular afetando a sua permeabilidade e (4) entrar na célula onde pode originar ROS, libertar íons Zn<sup>2+</sup> e afetar o DNA. As espécies ROS e íons Zn<sup>2+</sup> podem também afetar o DNA, a membrana celular e as proteínas da membrana. Adaptada de (Marambio-Jones e Hoek, 2010).

Diferentes trabalhos descrevem a eficiência antimicrobiana por efeitos abrasivos das nanopartículas sobre as membranas plasmáticas, relacionando com menores tamanhos de partícula e com maior eficiência bactericida (Jones *et al.*, 2008; Navale *et al.*, 2015). O efeito abrasivo está diretamente relacionado com a morfologia da partícula encontrando-se maior efeito antimicrobiano em estruturas com formas de flores (Cai *et al.*, 2016).

## 2.5 Compósitos poliméricos

Compósito consiste em um material multifásico, com as fases dos constituintes quimicamente diferentes. Alguns compósitos são formados por apenas duas fases: uma é chamada matriz (contínua e envolve a outra fase), e a outra é conhecida como fase dispersa (Callister, 2000).

Os compósitos poliméricos são materiais bifásicos constituídos por matriz polimérica e uma fase dispersa (cargas), cujo propósito é a combinação das propriedades dos constituintes individuais (Wang *et al.*, 2001). Estudos indicam que

a adição de óxidos metálicos em polímeros, principalmente com o óxido na sua forma nanoestruturada, representam ganho em propriedades mecânicas, elétricas, de barreira e antimicrobiana nesse composto (Shen *et al.*, 2012).

Materiais resultantes da nanoestruturação apresentam propriedades físicas e químicas significativamente diferentes quando comparados com materiais em macro e micro escala constituídos pelas mesmas substâncias (Duncan, 2011). O tamanho das partículas, sua composição química e a estrutura superficial resultam em grande área superficial específica da fase dispersa, intensificando as forças interfaciais das interações polímero-fase dispersa (Bouwmeester *et al.*, 2009). Logo, é importante que o enchimento esteja uniforme em relação à matriz polimérica, garantindo que suas propriedades sejam homogêneas e obtendo o máximo aproveitamento da área superficial (Arora e Padua, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

A poli ( $\epsilon$  caprolactona) (PCL) nome comercial CAPA 6500 foi adquirida na Perstorp Winning Formulas (Suécia) e foi utilizada sem qualquer tratamento adicional. O óxido de zinco (ZnO) foi adquirido na Acros Organics (pureza de 99,5%, área superficial específica de 28 m<sup>2</sup>/g). Neste trabalho, o ZnO foi incorporado na matriz PCL sem o uso de nenhum agente de dispersão. A acetona foi adquirida na Química Moderna (99,5% de pureza). A pesquisa ocorreu no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO).

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Preparação das amostras

Filmes de PCL foram produzidos dissolvendo-se pellets de PCL em 50 ml de acetona, na concentração de 5% (massa/volume). A mistura foi agitada a 40 °C durante 30 min, condição na qual a PCL foi completamente dissolvida. A solução foi colocada em placas de petri de 15 cm de diâmetro, seguida de secagem em estufa a 40°C por 18 h. Os filmes de PCL/ZnO foram obtidos seguindo a mesma metodologia e foram produzidos com 5, 10 e 15% de ZnO (peso), como pode ser visto na Figura 6. Assim, a adição de ZnO foi realizada na solução de PCL.

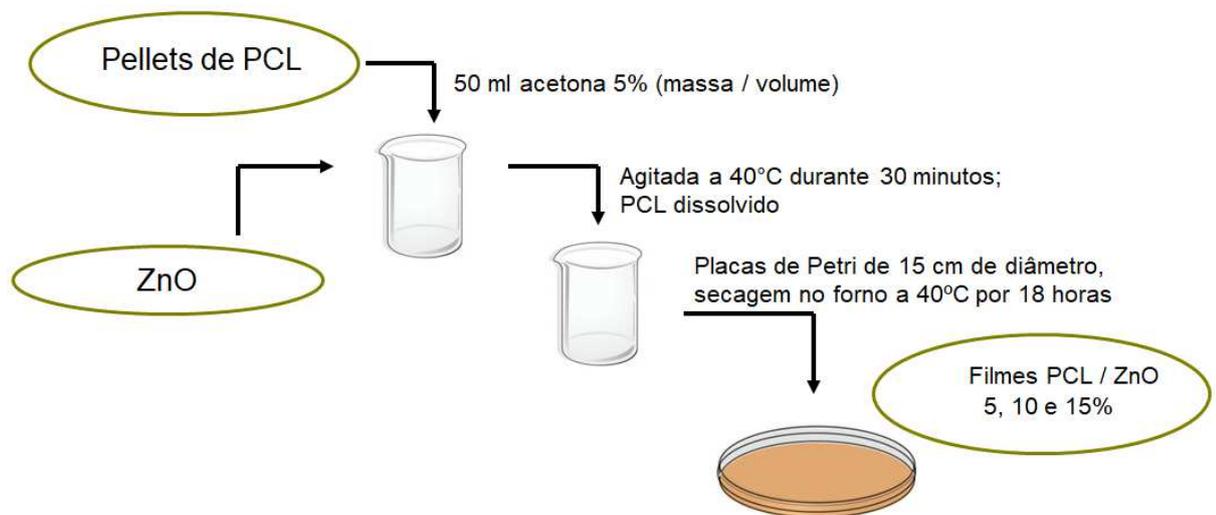


Figura 6 - Método de preparo dos filmes PCL/ZnO.

### **3.2.2 Caracterizações das amostras**

Filmes de PCL e PCL/ZnO, com concentração de ZnO entre 0 e 15% em massa, foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), atividade antimicrobiana e citotoxicidade. As caracterizações foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO).

#### **3.2.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise por FTIR foi realizada em um espectrômetro modelo Spectrum 400 FT Mid-IR PerkinElmer, USA, com varredura de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ . Essa técnica foi utilizada para verificar a composição dos filmes, permitindo que as informações sobre as diferentes concentrações dos filmes fossem comparadas através de informações estruturais sobre as bandas características dos grupos funcionais das moléculas e sobre os grupos atômicos que participam da estrutura dos filmes. Esse ensaio foi realizado de acordo com a norma ASTM F2778 – 09.

#### **3.2.2.2 Difração de Raios X (DRX)**

As medidas de difração de raios-X (DRX) foram realizadas para as quatro amostras de filmes (PCL pura, PCL/5% ZnO, PCL/10% ZnO e PCL / 15% ZnO) de dimensão 1  $\text{cm}^2$  a fim de determinar a presença das fases cristalinas e a cristalinidade dos filmes PCL e o efeito da adição do óxido de zinco. As análises de difração de raios X foram conduzidas em um aparelho DRX-7000 fabricado pela Shimadzu (Japão), utilizando radiação Ka do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA a uma velocidade de 2°/min, passo de 0,2 e faixa de varredura de 5-70°.

#### **3.2.2.3 Microscopia Ótica (MO)**

Para analisar a topografia da superfície dos filmes, assim como a distribuição das nanopartículas de ZnO na matriz PCL, foi usada a técnica de

Microscopia Ótica na qual aplicou-se o método de iluminação por reflexão de luz visível. O canhão acoplado à estação de captura de imagem foi o da série Mx sendo o Mx (G) – 2016Z. Foram utilizados dois tipos de lentes adaptadoras para essa análise: a lente AD – 2016S que permite, no modo de observação normal, um aumento de 20-160X e a lente AD-2016LOW, que na observação em modo de baixa ampliação, possibilita aumentos de 6-48X. O Software usado para a obtenção das imagens foi o 2D meansure e o equipamento o Microscópio Hirox de modelo KH-1300.

#### **3.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia dos filmes foi avaliada usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), através de um microscópio da marca World Phenom, modelo Pro – X 800-07334, que possui uma tensão de aceleração dos elétrons que pode ser ajustável (5kV, 10kV e 15kV) e com detector de elétrons retroespalhados (BSED), o que possibilita a análise elementar por energia dispersiva de raios X (EDS), sendo possível uma magnificação de 120 a 45.000 vezes. As superfícies dos filmes foram previamente revestidas com ouro para evitar o acúmulo de cargas e avaliadas utilizando diversos campos de imagem com ampliações apropriadas para revelar maiores detalhes da estrutura, a interface de interação entre a matriz e a distribuição das bactérias fixadas nas amostras.

#### **3.2.2.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Para a caracterização por AFM, as amostras foram cortadas em pedaços de 1 cm<sup>2</sup> e a topografia de superfície das amostras foi realizada em um Microscópio de Força Atômica fabricado pela Park NX-Bio, (Suwon, Coreia), com uma faixa de escaneamento XY: 100 µm x 100 µm. Foram obtidas micrografias em diferentes regiões da superfície dos filmes de PCL com e sem presença do ZnO, a fim de verificar a topografia superficial e rugosidade da membrana e observar se a dopagem com óxido de zinco altera esse perfil.

#### **3.2.2.6 Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana das amostras de PCL/ZnO foi avaliada através do ensaio de adesão microbiana de acordo com a norma JIS Z 2801:2000(E). A bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi selecionada como o organismo de teste. A estirpe teste foi cultivada em BRAIN-HEART INFUSIO AGAR (BHI) (acumedia) em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A solução bacteriana foi preparada e inoculada com o organismo teste em solução salina a 0,5 escala de McFarland. Então, filmes nanocompósitos foram cortados com cerca de 1cm<sup>2</sup>, esterilizados por UV e colocados em placa de cultura de 24 poços com 900 µl meio de cultura caldo MUELLER HINTON (KASVI) e 100 µl do inóculo bacteriano usando uma pinça estéril. A amostra foi fixada com glutaraldeído 2,5% e desidratada sequencialmente usando 15, 30, 50, 70, 85 e 99,6% de etanol, após a incubação a 37 °C durante 24 h em estufa bacteriológica.

#### **3.2.2.6.1 Análise qualitativa e quantitativa da atividade antibacteriana dos filmes por Microscopia Eletrônica de Varredura**

Após a fixação e desidratação das amostras, os filmes foram avaliados quanto à evidência de sua atividade antibacteriana por imagens de MEV em um microscópio Pro – X 800-07334 World Phenom, Eindhoven, Holanda. Por intermédio do uso do software de domínio público Fiji-ImageJ versão 1.53i, foi possível quantificar o tamanho médio das bactérias e o percentual da área ocupada em relação à área total analisada das amostras. Com magnificação de 3000X, analisou-se uma área total das amostras correspondente a aproximadamente 10 µm. As superfícies foram avaliadas utilizando diversos campos de imagem com ampliações apropriadas para revelar maiores detalhes da estrutura, a interface de interação entre a matriz e a distribuição das bactérias fixadas nas amostras.

#### **3.2.2.7 Toxicidade celular**

A atividade citotóxica das amostras foi avaliada utilizando o método de difusão em ágar conforme ISO 10993-5 (2009) e adaptada do método utilizado por Torabinejad *et al.* (1995) e Kim *et al.* (2005).

A Linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929 (ATCC NCTC clone 929, Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil) foi cultivada em meio RPMI

1640 (Gibco – Invitrogen Corporation, Grad Island, EUA) até a confluência e tripsinizadas utilizando tripsina a 0,25% (Gibco®, Life Technologies). A densidade celular foi determinada utilizando um contador celular automático (Introgen – Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA), a concentração foi ajustada para  $1,0 \times 10^5$  células/mL. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de 6 poços (4mL/poço) e incubadas por aproximadamente 48 horas. Aquelas que apresentaram uma monocamada celular uniforme e confluência superior a 80%, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de meio de ágar recém-preparado contendo 2X Eagle MEM (Gibco®-Invitrogen Corporation, Grad Island, EUA) e 0,01% de solução vermelha neutra (Sigma-Aldrich, EUA).

Dessa forma, as placas com meios de ágar permaneceram por 10 min no escuro a temperatura ambiente para solidificação. As amostras de tamanho 1 cm<sup>2</sup> foram colocadas no centro das superfícies de ágar, juntamente com os controles positivo (folha de látex) e negativo (polietileno de alta densidade - PEAD) em duplicata. As placas foram encubadas na posição invertida, embrulhadas em folha de papel de alumínio para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro (ISO 10993-5), por pelo menos 24 horas em estufa a 37 °C ± 1°C, umidificada e com 5% ± 1% de CO<sup>2</sup> para avaliação da citotoxicidade.

As zonas descoloradas foram quantificadas conforme indicado na Tabela 2. A lise Celular foi avaliada usando um microscópio invertido digital Nikon Eclipse TS100 (Minato, Tóquio, Japão).

Tabela 2 – Graus de citotoxicidade.

<b>GRAU</b>	<b>CITOTOXICIDADE</b>	<b>DESCRIÇÃO DA ZONA DE CITOTOXICIDADE</b>
0	Ausência	Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra.
1	Leve	Zona de descoramento limitada à área sob a amostra.
2	Branda	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,45 cm.
3	Moderada	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,45 cm a 1,0 cm.
4	Severa	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Com base na estrutura química da PCL e do ZnO e por meio da análise por FTIR, baseando-se em estudos como os de Augustine *et al.* (2014) e Mallakpour and Nouruzi (2016), foi possível atribuir informações sobre a interação química entre esses dois materiais.

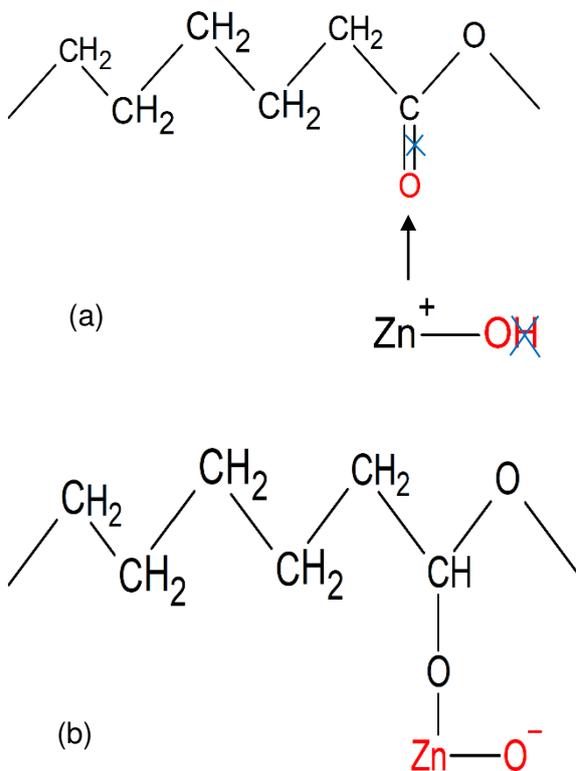


Figura 7 – Estruturas químicas: (a) separadamente, estruturas do PCL e ZnO; (b) interação química entre o PCL e o ZnO.

De acordo com esses autores, o que ocorre são interações do tipo dipolo-dipolo ou pontes de hidrogênio (Figura 7 (a)), no qual os átomos de oxigênio, por serem mais eletronegativos, ficam carregados com os elétrons livres resultantes da quebra de dupla ligação (Figura 7 (b)), e é este efeito que faz com que haja uma ressonância eletromagnética que permite que essas ligações sejam reordenadas e suas cargas reequilibradas após desfeitas as interações com as nanopartículas de ZnO.

Na identificação por FTIR, segundo Augustine *et al.* (2014) e Hu *et al.* (2018), observou-se as seguintes bandas de absorção (Figura 8): a 2942 e 2870  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup> atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação CH<sub>2</sub>, a 1722 cm<sup>-1</sup> o estiramento carboxílico (C = O) do grupo éster de PCL, e as bandas de 1243 e 1166 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico (C - O - C).

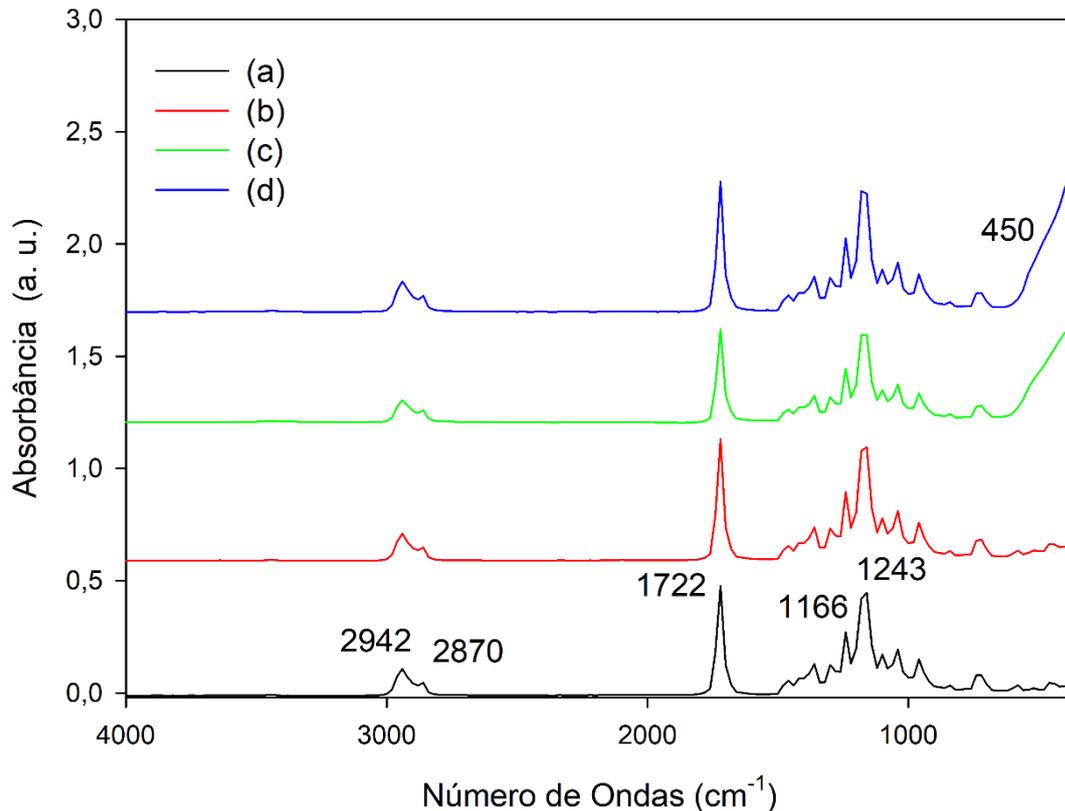


Figura 8 – Espectros de FTIR dos filmes: (a) PCL pura; (b) PCL/ 5%ZnO; (c) PCL/ 10%ZnO; (d) PCL/ 15%ZnO.

É possível observar também o aparecimento de uma banda não finalizada com máxima intensidade em torno de 450 cm<sup>-1</sup> que corresponde à ligação formada pelo óxido de zinco (ZnO) para as composições contendo o percentual de 10 e 15% do mesmo, na qual a intensidade dessa banda aumenta devido a maior quantidade de nano partículas presente. Para a composição contendo 5% (ZnO), essa banda não foi observada provavelmente devido a menor concentração de NPs de ZnO e também a sua baixa intensidade de vibração, pois, a mesma já é observada ao final da faixa analisada no espectro. Tais afirmações estão de acordo com os estudos de Mallakpour and Nouruzi (2016) e Hu *et al.* (2018).

Apesar de confirmar anteriormente que as NPs de ZnO foram incorporadas, como sugerido pelos estudos citados, em busca de conhecer melhor o mecanismo de interação das nano partículas com os grupos funcionais da PCL que ocorre no grupamento de C = O caracterizado por alterações na banda de  $1722\text{ cm}^{-1}$ , realizou-se um estudo por meio da lei de Lambert-Beer e obteve-se os valores de área relativa para essas bandas. Em relação à PCL pura, a composição contendo 5% de NPs de ZnO obteve uma razão de 0,8 de aumento, enquanto as composições contendo 10 e 15% de NPs tiveram razões de 14 e 20, respectivamente. Ou seja, isto indica que quanto maior o valor dessa relação (como foi para a composição de 10 e 15% de ZnO) mais forte e/ou aumentada deve estar sendo a interação das NPs com a PCL e, conseqüentemente, menor será a sua atividade antimicrobiana (Augustine *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2018).

#### **4.2 Difração de Raios X (DRX)**

Na Figura 9, são apresentados os resultados de difração de raios-X obtidos para os filmes de PCL puro, PCL/ZnO com 5, 10 e 15%. Observa-se o perfil de difração semicristalino referentes ao filme de PCL, apresentando dois picos de cristalinidade em  $2\theta = 21^\circ$  e  $23^\circ$  (Figura 9), iguais aos picos encontrados por Correa, Moncada e Zapata (2017).

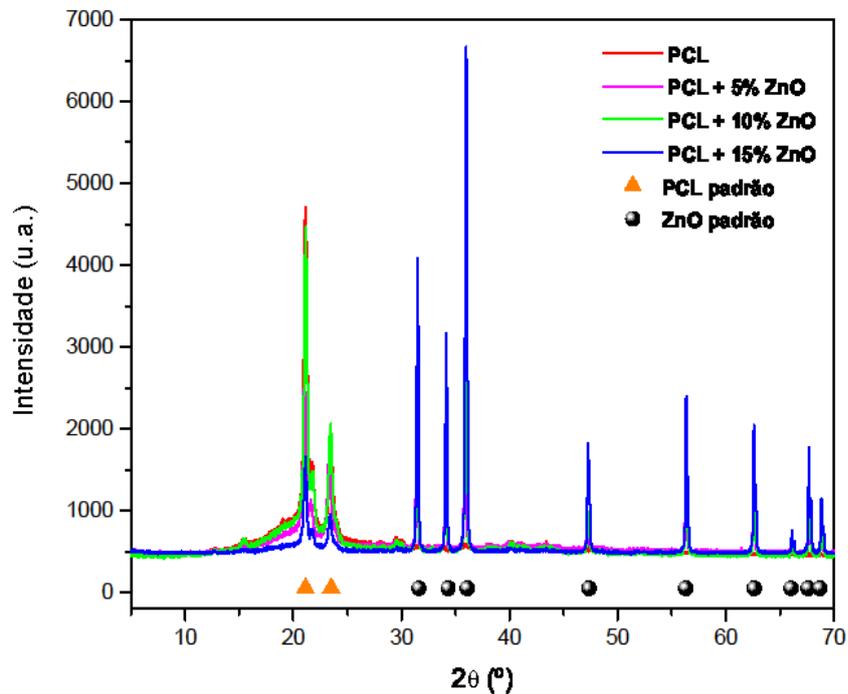


Figura 9 - Difractogramas dos filmes de PCL puro, PCL/ZnO com 5, 10 e 15%.

Os filmes contendo  $\text{ZnO}_{\text{nano}}$ , material cristalino, exibiram picos de difração cuja intensidade foi acentuada com o aumento da concentração das nano partículas. Os filmes nanocompósitos apresentaram picos de difração em  $2\theta$  igual a 31,6; 34,6; 36,5; 47,7; 56,7; 62,9; 67,9 e 69,2°, correspondendo aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200) e (112) do óxido de zinco, respectivamente (Zak *et al.*, 2011). Dessa forma, observa-se que a estrutura hexagonal (característica das wurtzitas) das nanopartículas de ZnO não foi alterada após sua incorporação à matriz de PCL.

Estes padrões de difração estão em concordância com dados de outros autores que sintetizaram ou utilizaram  $\text{ZnO}_{\text{nano}}$  em matrizes biopoliméricas (Trandafilović *et al.*, 2012; Thirumavalavan, 2013; Mohandas *et al.*, 2015). Logo, a adição das nanopartículas de ZnO não alterou significativamente a cristalinidade da matriz de PCL, assim como observado por Li *et al.* (2010) ao sintetizar  $\text{ZnO}_{\text{nano}}$  em filmes poliméricos.

### 4.3 Microscopia Óptica (MO)

Os ensaios de Microscopia Óptica (MO) foram realizados para visualizar as superfícies dos filmes compostos PCL e PCL/ZnO e as amostras foram analisadas sem qualquer tratamento.

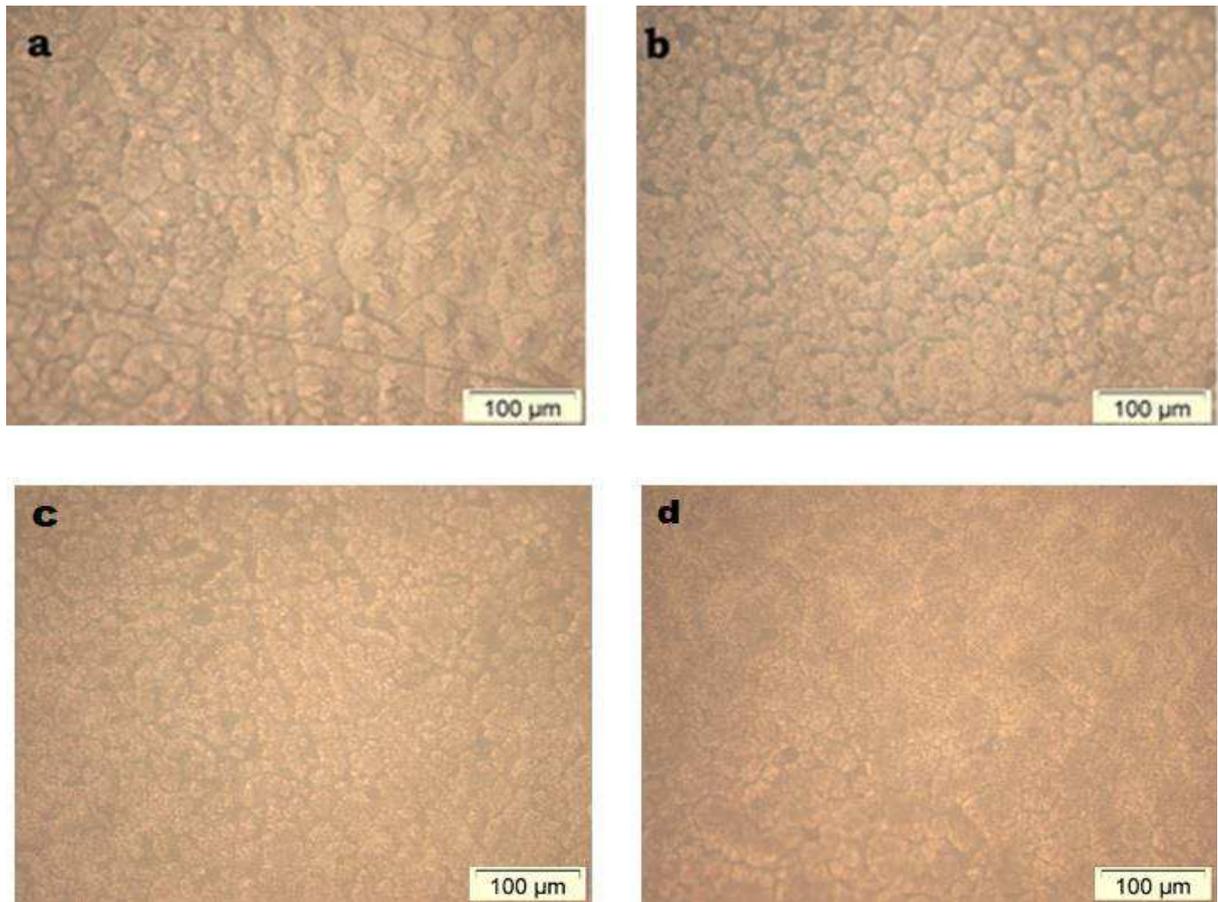


Figura 10 - Imagens de microscopia óptica dos filmes de PCL pura (a), PCL/5% ZnO (b), PCL/10% ZnO (c) e PCL / 15% ZnO (d).

A Figura 10 exibe imagens de Microscopia Óptica para compostos PCL pura, PCL/ZnO com 5, 10, 15%, na qual observa-se esferulitos em ambas as imagens. No entanto, no filme PCL pura, esses esferulitos são maiores, e possivelmente, o ZnO atua como um agente nucleante durante a cristalização da PCL. Em compostos com 10 e 15% de ZnO, os esferulitos da PCL são menores do que em compostos com 5% de ZnO. Essa é uma tendência observada com adição de agentes nucleantes, os quais tendem a facilitar a cristalização, paralelamente diminuindo o tamanho das entidades cristalinas (Jiang *et al.*, 2001; Lv *et al.*, 2015).

#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura para compósitos PCL/ZnO são apresentadas na Figura 11, obtidas de filmes de PCL revestidos de ouro sem realização de qualquer tratamento térmico ou químico. Na Figura 11 (a), uma superfície lisa é observável, a matriz polimérica apresenta-se em uma estrutura morfológicamente uniforme e de alta compactação sem presença de grandes fissuras ou poros, similar à da PCL pura. Resultados semelhantes foram obtidos por Augustine *et al.*, (2014).

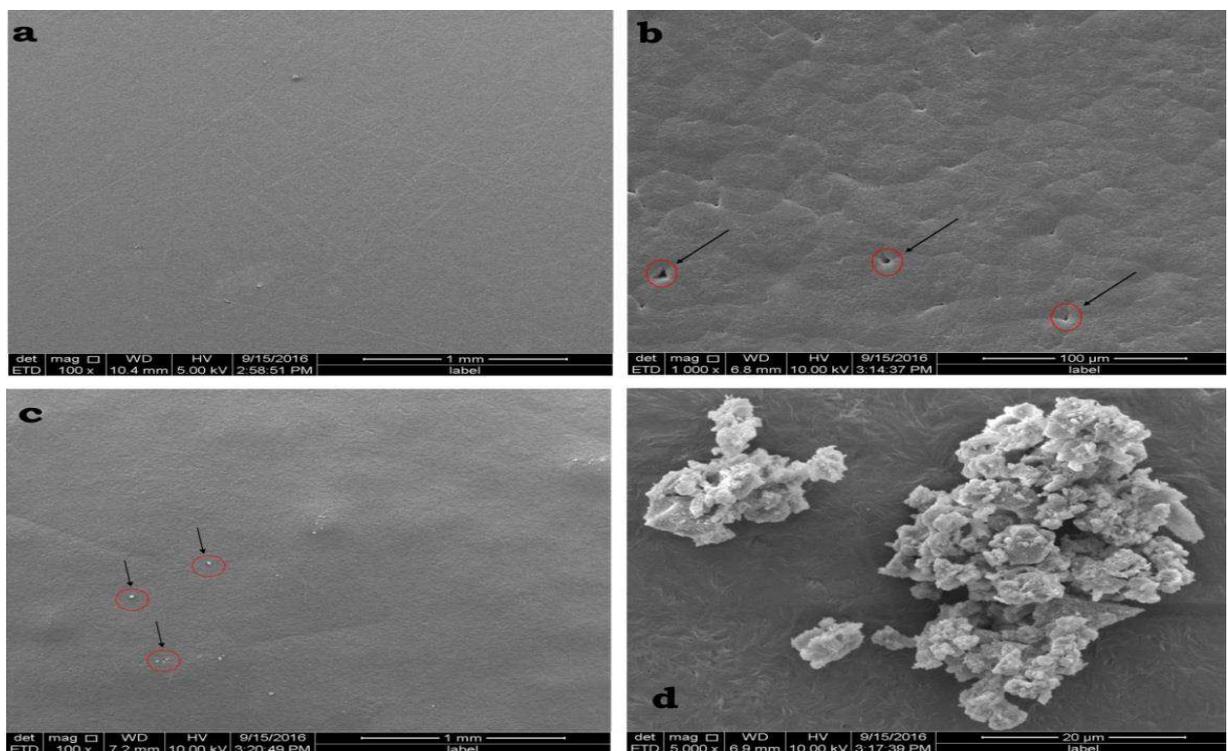


Figura 11 - Filmes PCL/5% de ZnO (a), PCL/15% de ZnO (b), PCL/15% de ZnO (c), amplificação dos círculos vermelhos mostrados em (c) para PCL/15% de ZnO (d).

O ZnO está bem disperso na matriz PCL para a concentração PCL/ZnO 5% e não é observada a formação de poros, o que é indicativo de filmes de alta qualidade, com textura homogênea. No entanto, para concentrações mais elevadas de ZnO, nos filmes com 10 e 15%, uma superfície esferulítica com orifícios (círculos vermelhos) é verificável, sendo observada a formação de poros, como apresentado na Figura 11 (b). A Figura 11 (c) mostra agregados de ZnO na superfície do filme, o que é indicativo de uma fraca dispersão. Esses filmes possuem zonas com maiores

e menores concentrações de ZnO. A Figura 11 (d) é uma amplificação dos agregados de ZnO mostrados na Figura 11 (c). Em altas concentrações de ZnO, as partículas parecem estar destacadas na superfície do filme.

#### 4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Embora a MEV seja a ferramenta padrão para a investigação da morfologia superficial de filmes plásticos, a Microscopia de Força Atômica (AFM) foi introduzida com sucesso nos últimos anos para este fim. De uma forma concisa, mas eficaz, a AFM foi descrita como uma ferramenta analítica para medir características de superfície de materiais sintéticos e biológicos (Jones, 2016). A análise de AFM é particularmente adequada nesta categoria de filmes ativos para embalagem de alimentos devido à modificação topográfica como consequência da dispersão de substâncias ativas no material de embalagem de materiais ativados (Marinelo, 2018).

Para avaliar a topografia e a rugosidade dos filmes, foram feitas análises de AFM, conforme verificado na Figura 12.

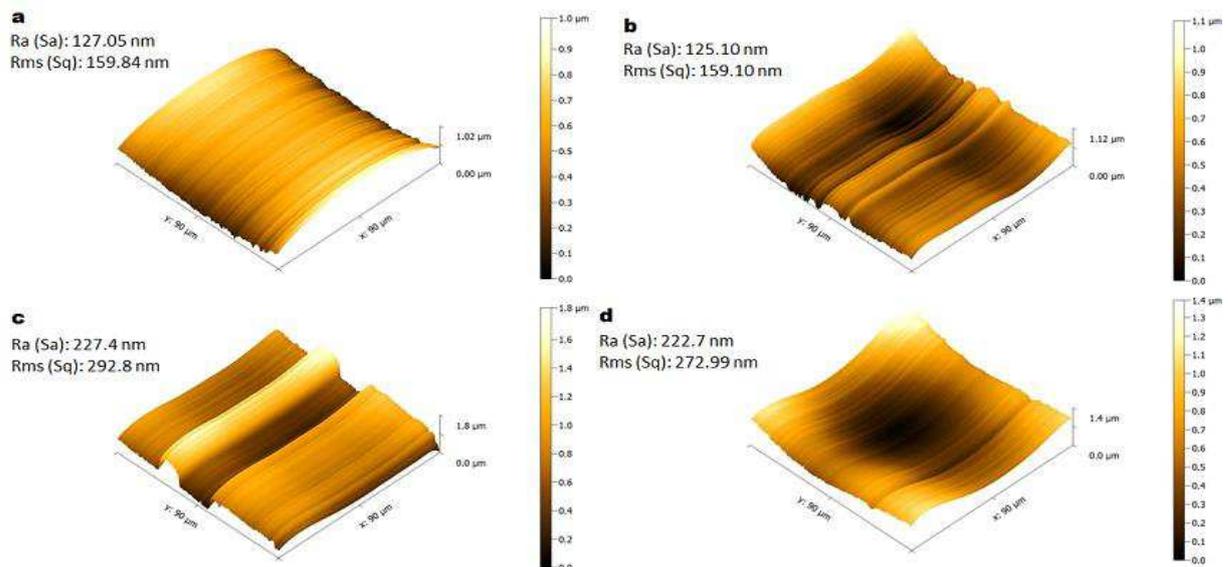


Figura 12 - Imagem topográfica por AFM dos filmes de PCL pura (a), PCL/5% de ZnO (b), PCL/10% de ZnO (c), PCL/15% de ZnO (d).

Observou-se que a altura máxima não teve alteração significativa e, em relação às linhas de orientação do material, não foi observada grande distinção neste aspecto. No entanto, verificou-se nitidamente o aumento da rugosidade na

morfologia dos filmes em função da concentração de ZnO, em filmes com 10 e 15% de ZnO, ocorreu um aumento significativo da rugosidade média e quadrática como apresentado na Figura 12, o que demonstra a modificação da topografia em comparação com os filmes PCL pura e do filme PCL/ZnO 5%. As modificações de rugosidade são associadas a alterações na aderência dos materiais, molhabilidade, funcionalidade química e funcionalidade biológica, e são, portanto, relevantes no campo da embalagem ativa (Barish e Goddard, 2011; Marinelo, 2018).

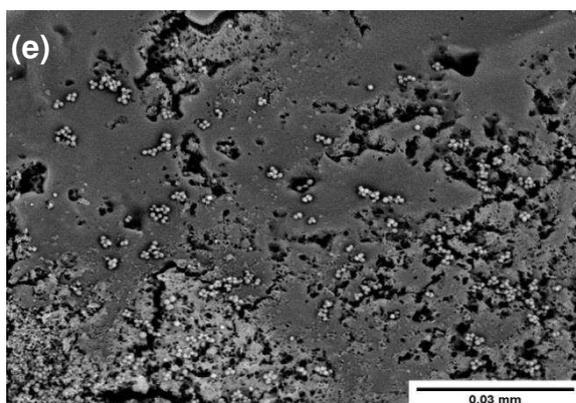
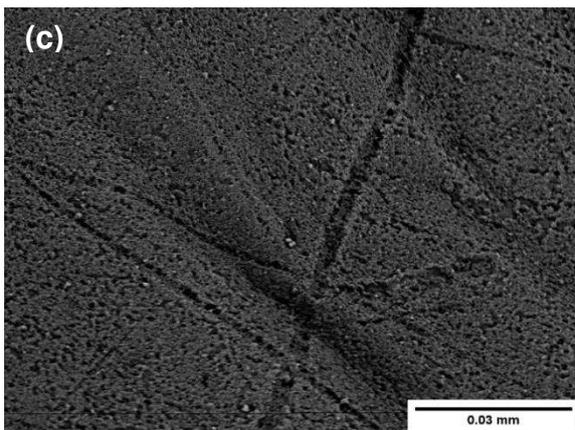
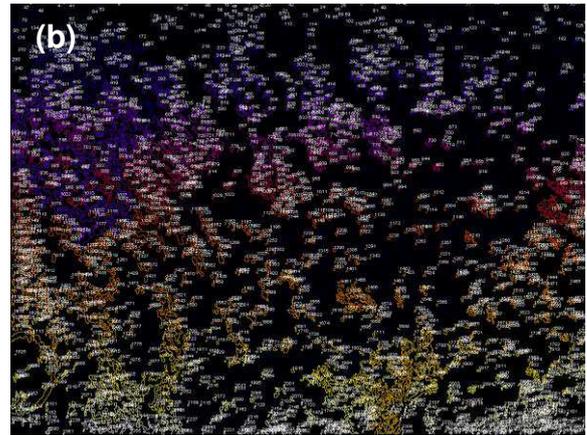
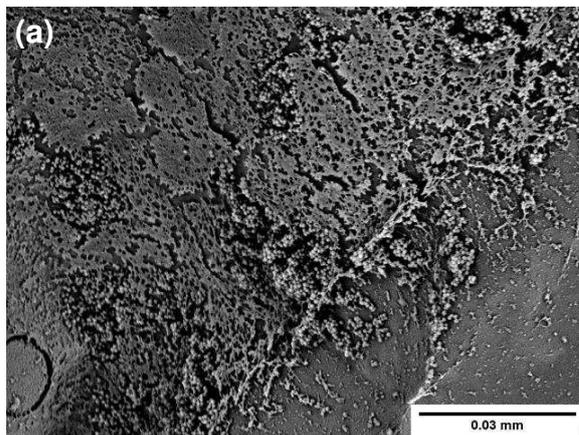
Sadeghi & Shahedi (2016) testaram concentrações de ZnO 1 e 2% em diferentes morfologias de filmes de copolímeros de álcool etileno vinílico e polímeros de quitosana. O aumento da concentração de ZnO evidenciou a formação de protruções e recortes devido à introdução de nanopartículas de óxido de zinco incorporadas na superfície do filme, o acréscimo de ZnO conduziu ao aumento da atividade antimicrobiana. Outro estudo implementou, de forma semelhante, a AFM para caracterizar superfícies com aptidão antimicrobiana ativa. Sadeghnejad, Aroujalian, Raisi e Fazel (2014) estudaram a modificação de superfície de filmes de PE por plasma de ar corona para melhorar o revestimento subsequente de nanopartículas de prata na superfície do filme tratado. O estudo mostra como o tratamento com corona aumenta a rugosidade dos filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD), dobrando em termos de Sa e Sq, permitindo um aumento do seguinte revestimento de prata e um aumento subsequente na quantidade de prata libertada dos filmes revestidos com atividade antibacteriana promissora contra bactérias gram positivas e negativas.

Esses resultados vão contra os resultados obtidos neste trabalho, que sugerem através do ensaio de adesão microbiana visto em MEV, que na superfície do filme a formação de protruções, ou seja, o aumento da rugosidade por adição de nanopartículas em altas concentrações formam cavidades que facilitam a proliferação microbiana reduzindo a atividade antimicrobiana do ZnO, como também mostrou o estudo por meio da lei de Lambert-Beer que obteve os valores de área relativa para as bandas de FTIR, indicando que quanto maior o valor dessa relação (como foi para a composição de 10 e 15% de ZnO) mais forte e/ou aumentada deve estar sendo a interação das NPs com a PCL e, conseqüentemente, menor será a sua atividade antimicrobiana (Augustine *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2018).

#### 4.6 Atividade Antimicrobiana

Para averiguar o potencial dos filmes da PCL com e sem adição do  $\text{ZnO}_{\text{nano}}$  na perspectiva de serem empregados para embalagens ativas para alimentos, um produto susceptível à ação microbiana que favorece sua degradação. Devido à posição de suas cargas negativas resultantes na superfície das NPs de  $\text{ZnO}$ , o efeito da atividade antibacteriana para bactérias gram positivas deve ser investigado. Dentre os patógenos de relevância para área de alimentos destacam-se as bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus*.

Os resultados obtidos são apresentados por meio das imagens das amostras de PCL pura (Figura 13 (a) e (b)), PCL+ZnO5% (Figura 13 (c) e (d)), PCL+ZnO10% (Figura 13 (e) e (f)) e PCL+ZnO15% (Figura 13 (g) e (h)).



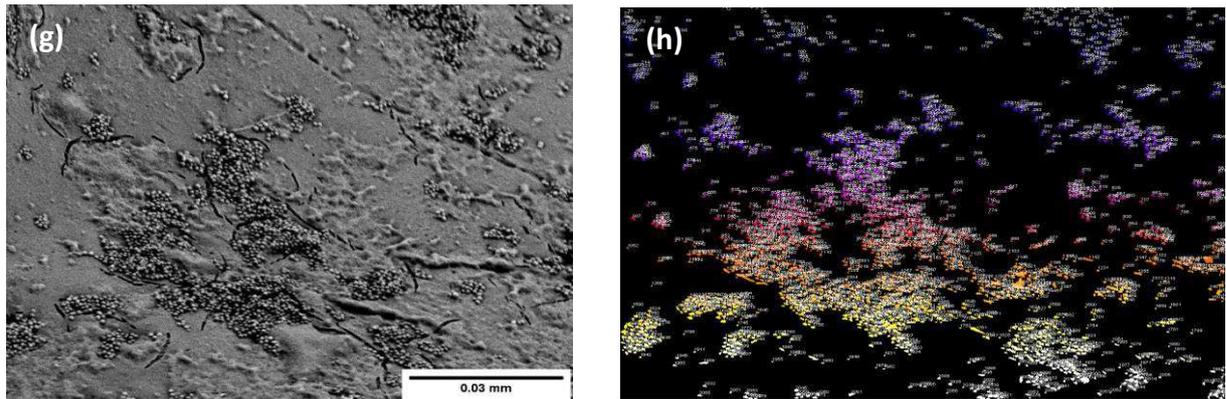


Figura 13 – Fotomicrografias obtidas por MEV e seus respectivos pares de mapeamento de superfície referentes a quantificação de bactérias por área analisada.

A dispersão das nanopartículas na matriz tem influência direta nas propriedades mecânicas, de barreira e também nas propriedades biológicas. O estudo de superfície associado a propriedades biológicas mostrou que o teor de NPs metálicas não é o fator determinante único na atividade antibacteriana, uma vez que à medida que se aumenta o teor de NPs não verifica-se o aumento da eficiência da atividade antimicrobiana na superfície. Possivelmente, como mostrou o estudo por meio da lei de Lambert-Beer que obteve os valores de área relativa para as bandas de FTIR, indicou que quanto maior o valor dessa relação (como foi para a composição de 10 e 15% de ZnO) mais forte deve estar sendo a interação das NPs com a PCL e, conseqüentemente, menor será a sua atividade antimicrobiana (Augustine *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2018). Corroborando com os resultados obtidos por AFM, entende-se que na superfície do filme há a formação de protruções, ou seja, o aumento da rugosidade por adição de nanopartículas em altas concentrações formam cavidades que facilitam a proliferação microbiana reduzindo a atividade antimicrobiana do ZnO na superfície do filme.

Tabela 3 – Dados de quantificação de área de superfície para as amostras analisadas por MEV.

Amostra	Tamanho médio das Bactérias Área ( $\mu\text{m}^2$ )	*Área ocupada por Bactérias (%)
PCL puro	0,673	59.210
PCL+ZnO5%	0,133	0.056
PCL+ZnO10%	0,193	2.317
PCL+ZnO15%	0,253	6.689

\*percentual calculado para uma área total de 10  $\mu\text{m}$ .

O filme controle não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias utilizadas no presente trabalho, apresentando uma área de 59.210 % de ocupação. Em contrapartida, os filmes nanocompósitos reduziram a contagem celular de *S. aureus* bacteriostático significativamente, a inibição do crescimento microbiano se deu principalmente por contato, possuindo como maior inibição o filme PCL/ZnO 5% com 0.056 % de área ocupada.

Os resultados são, portanto, satisfatórios, tendo em vista o poder antimicrobiano do nanocompósito em relação à alta carga dos microrganismos gram positivos avaliados. Os filmes nanocompósitos de PCL e ZnO produzidos neste trabalho foram capazes de controlar a população bacteriana por contato, o que suporta seu uso como embalagem antimicrobiana para alimentos, visto sua habilidade de inibir o crescimento de microrganismos na superfície das embalagens alimentícias e evitar a invasão de microrganismos contaminantes.

#### **4.6 Citotoxicidade**

De modo a permitir a utilização destes filmes para embalagens de alimentos, são necessários testes *in vitro* para avaliação da citotoxicidade. Os riscos para a saúde da exposição à nanopartículas para embalagens de alimentos permanecem insuficientemente avaliados e estudos mais profundos que avaliam a citotoxicidade são necessários (Mertens *et al.*, 2016; Maisanaba *et al.*, 2014; Maisanaba *et al.*, 2015). A eficácia antibacteriana ótima e a toxicidade reduzida ainda permanecem um desafio (Hu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014; Wiesenthal *et al.*, 2011).

Para avaliação da citotoxicidade dos filmes, foi escolhido o método qualitativo por difusão em Ágar, apropriado para dispositivos de alta densidade, que avalia os efeitos produzidos pela amostra através da camada de ágar, que protege as células de tecido conjuntivo de rato (fibroblastos de linhagem celular L-929) do dano mecânico durante a colocação da amostra e permite a difusão de substâncias químicas que migram das amostras poliméricas.

Os resultados do teste de difusão em ágar estão representados na Tabela 4 como valor médio dos valores dos 4 diferentes quadrantes das amostras em duplicata. Um molde de PEAD foi usado como controle negativo, o que não causou lise celular; enquanto látex tóxico, um controle positivo, uma clara formação de halo

foi observada, evidenciando a lise celular, o que resultou em um grau de citotoxicidade 4 (severamente citotóxico).

Os filmes de PCL puro e PCL+ZnO5% foram qualificados semelhantes ao controle negativo, apresentando ausência de citotoxicidade grau 0 e os filmes PCL+ZnO10% e PCL+ZnO15%, uma clara formação de halo foi observada sob e ao redor da amostra, qualificando a citotoxicidade da amostra em grau 3 (moderada), considerada insatisfatória de acordo com a ISO 10993–5 (2009).

Tabela 4 - Resultados do ensaio por Difusão em Ágar.

<b>AMOSTRA</b>	<b>GRAU</b>	<b>CITOTOXICIDADE</b>	<b>ZONA DE DESCORAMENTO (CM)</b>
Controle Positivo	4	Severa	1,08
Controle negativo	0	Ausência	0,0
PCL Puro	0	Ausência	0,0
PCL/ZnO 5%	0	Ausência	0,0
PCL/ZnO 10%	3	Moderada	0,725
PCL/ZnO 15%	3	Moderada	0,9375

A Figura 14 mostra, microscopicamente, as zonas de descoloração dos filmes PCL+ZnO10%, PCL+ZnO15% e do controle positivo (látex tóxico) que apresentou descoloração completa e lise celular sob e ao redor da amostra. Os filmes PCL pura, PCL+ZnO5% e controle negativo (PEAD) não mostraram qualquer zona de descoloração sob ou ao redor da amostra. As células foram visualizadas com ampliação de 100x. A absorção das células de fibroblastos do corante vermelho neutro após 24 horas, a presença de corante vermelho e a ausência de células lisadas mostram que estas células são vitais, reforçando a qualificação das amostras como ausente de citotoxicidade como visto na Tabela 4.

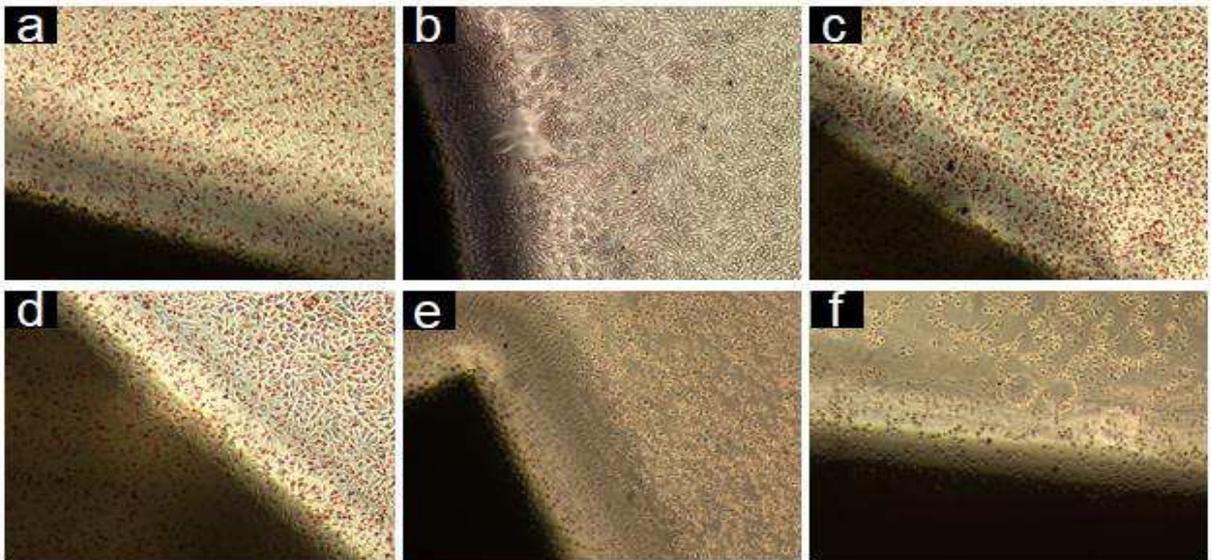


Figura 14 - Imagens com 100X de aumento da linhagem celular L929 das zonas de descoloração de materiais experimentais no teste de difusão em ágar: controle negativo (PEAD) (a), controle positivo (látex tóxico) (b) e dos filmes de PCL pura (c), PCL/5% de ZnO (d), PCL/10% de ZnO (e), PCL/15% de ZnO (f).

No presente trabalho, nenhum efeito citotóxico foi verificado com PCL+ZnO5%; no entanto, um aumento significativo na citotoxicidade celular dos filmes PCL+ZnO10% e PCL+ZnO15% foi observado para a linhagem celular L929. A citotoxicidade das NPs está altamente relacionada a suas cargas superficiais (Yu *et al.*, 2019). Com isso, NPs de metal com cargas negativas podem causar menos dano mitocondrial e ruptura da integridade da membrana de células de mamíferos do que NPs com cargas positivas (Fröhlich, 2012). Acredita-se que a maior dispersão e a menor interação entre PCL+ZnO5% é a causa da ausência de citotoxicidade destes filmes, como visto no FTIR.

## 5 CONCLUSÃO

Os filmes PCL/ZnO foram produzidos com sucesso, a técnica de *Solvent Casting* mostrou-se satisfatória para a preparação dos filmes poliméricos. Os caracteres cristalino e químico dos componentes individuais não foram modificados de forma significativa, como mostrou os espectros por DRX. O controle superficial pode ser alcançado através da variação da composição, as imagens de MEV e as imagens topográficas de AFM mostraram que na concentração PCL/ZnO5% o ZnO apresenta-se bem distribuído ao longo da matriz polimérica, apresentando uma superfície uniforme ao longo de todo o filme, tornando-os promissores para aplicações em embalagens de alimentos, principalmente devido as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de ZnO demonstradas através dos resultados do ensaio de adesão microbiana com maior eficiência da atividade antimicrobiana na superfície do filme PCL/ZnO5%. A ausência de citotoxicidade foi alcançada também para o filme PCL/ZnO5%.

Em conclusão, esse estudo foi o primeiro a investigar a superfície de filmes PCL/ZnO, associando a dispersão da nanopartícula, a interação intermolecular entre as cadeias de PCL e ZnO e as propriedades microbiológicas e citotóxicas, alcançando a eficácia antibacteriana ótima e a toxicidade ausente para o filme PCL/ZnO5%. O estudo sugere que filmes de PCL com nanopartículas de ZnO dispersas homogeneamente na matriz polimérica oferecem grande potencial para serem aplicados em filmes de interesse comercial para utilização como embalagens de alimentos.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As conclusões finais deste trabalho sugerem propostas para trabalhos futuros.

Início do estudo das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, utilizando como variável a espessura e tempo de secagem dos filmes e a concentração da nanopartícula.

Realizar ensaios antimicrobianos com bactérias gram positiva.

Realizar testes com o recobrimento de alimentos pelas embalagens, e o monitoramento do tempo de conservação desse alimento.

Testes de biodegradabilidade dos filmes também podem ser feitos.

Outra possibilidade a partir do resultado alcançando, que obteve a eficácia antibacteriana ótima e a toxicidade ausente e com a versatilidade da PCL já antes utilizada como suturas reabsorvíveis, liberação controlada de fármacos, substitutos ósseos temporários é a utilização dos filmes como biomateriais.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. **Water research**, v. 40, n. 19, p. 3527-3532, 2006.
- ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S.; BAGIROVA, M.; RAFAILOVICH, M. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future microbiology**, v. 6, n. 8, p. 933-940, 2011.
- AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer international**, v. 47, n. 2, p. 89-144, 1998.
- ANN, L. C.; MAHMUD, S.; BAKHORI, S. K. M.; SIRELKHATIM, A.; MOHAMAD, D.; HASAN, H.; SEENI, A.; RAHMAN, R. A. Antibacterial responses of zinc oxide structures against Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus pyogenes. **Ceramics International**, v. 40, n. 2, p. 2993-3001, 2014.
- ANYADIKE, N. Embalagens flexíveis. **Livro Amigo: São Paulo, Brasil**, 2010.
- ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; VONGKAMJAN, K.; SUMPAPAPOL, P.; YARNPAKDEE, S. Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices wrapped with fish protein isolate/fish skin gelatin-ZnO nanocomposite film incorporated with basil leaf essential oil. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 10, p. 6182-6193, 2015.
- ARORA, A.; PADUA, G. Nanocomposites in food packaging. **Journal of Food science**, v. 75, n. 1, p. R43-R49, 2010.
- AUGUSTINE, Robin et al. Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 3, p. 347, 2014.
- AVELLA, M.; DE VLIAGER, J. J.; ERRICO, M. E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; VOLPE, M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 467-474, 2005.

AZAM, A.; AHMED, A. S.; OVES, M.; KHAN, M.; MEMIC, A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and-negative bacterial strains. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3527, 2012.

AZEREDO, H. D. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.

BALAKRISHNAN, H.; HASSAN, A.; WAHIT, M. U.; YUSSUF, A.; RAZAK, S. B. A. Novel toughened polylactic acid nanocomposite: mechanical, thermal and morphological properties. **Materials & Design**, v. 31, n. 7, p. 3289-3298, 2010.

BARISH, Jeffrey A.; GODDARD, Julie M. Topographical and chemical characterization of polymer surfaces modified by physical and chemical processes. **Journal of applied polymer science**, v. 120, n. 5, p. 2863-2871, 2011.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; DE HEER, C.; TEN VOORDE, S. E.; WIJNHOFEN, S. W.; MARVIN, H. J.; SIPS, A. J. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 52-62, 2009.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano letters**, v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006.

BRITO, G.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.; MÉLO, T. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

BUMBUDSANPHAROKE, Nattinee; CHOI, Jungwook; KO, Seonghyuk. Applications of nanomaterials in food packaging. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 9, p. 6357-6372, 2015.

CABEDO, L.; LUIS FEIJOO, J.; PILAR VILLANUEVA, M.; LAGARÓN, J. M.; GIMÉNEZ, E. Optimization of biodegradable nanocomposites based on aPLA/PCL blends for food packaging applications. In: Macromolecular Symposia, **Wiley Online Library**, p.191-197, 2006.

CAI, Q.; GAO, Y.; GAO, T.; LAN, S.; SIMALOU, O.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; HARNOODE, C.; GAO, G.; DONG, A. Insight into biological effects of zinc oxide

nanoflowers on bacteria: Why morphology matters. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 16, p. 10109-10120, 2016.

CALLISTER, W. **Ciência E Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. Grupo Gen-LTC, 2000.

CANCHÉ-ESCAMILLA, G.; CANCHÉ-CANCHÉ, M.; DUARTE-ARANDA, S.; CÁCERES-FARFÁN, M.; BORGES-ARGÁEZ, R. Mechanical properties and biodegradation of thermoplastic starches obtained from grafted starches with acrylics. **Carbohydrate polymers**, v. 86, n. 4, p. 1501-1508, 2011.

CAPELEZZO, Ana P. et al. Antimicrobial biodegradable polymer through additivation with zinc based compounds. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 367-374, 2018.

CHANG, Y.-N.; ZHANG, M.; XIA, L.; ZHANG, J.; XING, G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. **Materials**, v. 5, n. 12, p. 2850-2871, 2012.

CHEN, L.; WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2631-2639, 2002.

CORREA, E.; MONCADA, M. E.; ZAPATA, V. H. Electrical characterization of an ionic conductivity polymer electrolyte based on polycaprolactone and silver nitrate for medical applications. **Materials Letters**, Medellín, v. 205, p. 155-157, 2017.

DAVIS, G.; SONG, J. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. **Industrial crops and products**, v. 23, n. 2, p. 147-161, 2006.

DÍEZ-PASCUAL, A. M.; DÍEZ-VICENTE, A. L. Poly (3-hydroxybutyrate)/ZnO bionanocomposites with improved mechanical, barrier and antibacterial properties. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 6, p. 10950-10973, 2014.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of colloid and interface science**, v. 363, n. 1, p. 1-24, 2011.

DUTTA, R. K.; NENAVATHU, B. P.; GANGISHETTY, M. K. Correlation between defects in capped ZnO nanoparticles and their antibacterial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 126, p. 105-111, 2013.

EC (2017). Commission Regulation (EU) 2017/752 of 28 April 2017 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union, L113, 18–23.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. D. F. F.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; DE ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1447-1464, 2012.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. D. F. F.; TEÓFILO, R. F.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; VITOR, D. M.; BATISTA, R. A.; FERREIRA, S. O.; DE ANDRADE, N. J.; MEDEIROS, E. A. A. Physical–mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 199-208, 2013.

FALCONE, D. M.; AGNELLI, J. A. M.; DE FARIA, L. I. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 1, p. 5, 2007.

FAMBRI, Luca et al. Polímeros biodegradáveis. In: **Ciência Integrada de Biomateriais**. p.119-187, 2002.

FDA (2017). **Substances generally recognized as safe**. Disponível em: <[https://www.ecfr.gov/cgi-bin/textid?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#se21.3.182\\_18991](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/textid?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#se21.3.182_18991)>

FECHINE, G. J. A era dos polímeros biodegradáveis. **Plástico Moderno**, v. 423, p. 28-38, 2010.

FIGUEROA-LOPEZ, Kelly et al. Antibacterial and barrier properties of gelatin coated by electrospun polycaprolactone ultrathin fibers containing black pepper oleoresin of interest in active food biopackaging applications. **Nanomaterials**, v. 8, n. 4, p. 199, 2018.

FRANKLIN, N. M.; ROGERS, N. J.; APTE, S. C.; BATLEY, G. E.; GADD, G. E.; CASEY, P. S. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. **Environmental science & technology**, v. 41, n. 24, p. 8484-8490, 2007.

FRÖHLICH, Eleonore. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 5577, 2012.

FUKUSHIMA, K.; FEIJOO, J. L.; YANG, M.-C. Abiotic degradation of poly (dl-lactide), poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and their blends. **Polymer degradation and stability**, v. 97, n. 11, p. 2347-2355, 2012.

GARAVAND, F.; ROUHI, M.; RAZAVI, S. H.; CACCIOTTI, I.; MOHAMMADI, R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 687-707, 2017.

GARCIA, Coralia V.; SHIN, Gye Hwa; KIM, Jun Tae. Metal oxide-based nanocomposites in food packaging: Applications, migration, and regulations. **Trends in Food Science & Technology**, 2018.

GIMÉNEZ, V. M. M.; RUIZ-ROSO, M. B.; CAMARGO, A. B.; KASSUHA, D.; MANUCHA, W. Nanotecnología, un nuevo paradigma en el tratamiento de la aterosclerosis. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 29, n. 5, p. 224-230, 2017.

GUPTA, K.; SINGH, R.; PANDEY, A.; PANDEY, A. Photocatalytic antibacterial performance of TiO<sub>2</sub> and Ag-doped TiO<sub>2</sub> against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 4, p. 345, 2013.

HAN, Jia-Wei et al. Food packaging: A comprehensive review and future trends. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 860-877, 2018.

HU, Min et al. Zinc oxide/silver bimetallic nanoencapsulated in PVP/PCL nanofibres for improved antibacterial activity. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 1248-1257, 2018.

HUANG, J.; WU, Y.; GU, C.; ZHAI, M.; YU, K.; YANG, M.; LIU, J. Large-scale synthesis of flowerlike ZnO nanostructure by a simple chemical solution route and its gas-sensing property. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, n. 1, p. 206-212, 2010.

HU, Min et al. Zinc oxide/silver bimetallic nanoencapsulated in PVP/PCL nanofibres for improved antibacterial activity. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 1248-1257, 2018.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, 2009.

JIANG, S.; JI, X.; AN, L.; JIANG, B., “Crystallization behaviour of PCL in hybrid confined environment”, **Polymer**, v. 42, pp. 3901-3907, 2001.

JIN, T.; HE, Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 6877-6885, 2011.

JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K. T.; MANNA, A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 279, n. 1, p. 71-76, 2008.

JONES, Owen Griffith. Developments in dynamic atomic force microscopy techniques to characterize viscoelastic behaviors of food materials at the nanometer-scale. **Current Opinion in Food Science**, v. 9, p. 77-83, 2016.

JORGE, N. Embalagens para alimentos. **São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação**, 2013.

KANMANI, P.; RHIM, J.-W. Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 106, p. 190-199, 2014.

KANSAL, S.; SINGH, M.; SUD, D. Studies on TiO<sub>2</sub>/ZnO photocatalysed degradation of lignin. **Journal of Hazardous materials**, v. 153, n. 1-2, p. 412-417, 2008.

KHOR, H. L.; NG, K. W.; SCHANTZ, J.-T.; PHAN, T.-T.; LIM, T. C.; TEOH, S.-H.; HUTMACHER, D. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent. **Materials Science and Engineering: C**, v. 20, n. 1-2, p. 71-75, 2002.

KIM, Dong-Hyun et al. Cytotoxicity of ferrite particles by MTT and agar diffusion methods for hyperthermic application. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 287-292, 2005.

KUMAR, R.; UMAR, A.; KUMAR, G.; NALWA, H. S. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. **Ceramics International**, v. 43, n. 5, p. 3940-3961, 2017.

LAKSHMI PRASANNA, V.; VIJAYARAGHAVAN, R. Insight into the mechanism of antibacterial activity of ZnO: surface defects mediated reactive oxygen species even in the dark. **Langmuir**, v. 31, n. 33, p. 9155-9162, 2015.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371, 2013.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D. Y.; BRUNET, L.; LIGA, M. V.; LI, D.; ALVAREZ, P. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water research**, v. 42, n. 18, p. 4591-4602, 2008.

LI, Xihong et al. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. **International journal of food science & technology**, v. 44, n. 11, p. 2161-2168, 2009.

LI, L. H.; DENG, J. C.; DENG, H. R.; LIU, Z. L.; XIN, L. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. **Carbohydrate Research**, v.345, p.994–998, 2010.

LI, Wenchao et al. Electrospinning of polycaprolactone nanofibers using H<sub>2</sub>O as benign additive in polycaprolactone/glacial acetic acid solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 3, p. 45578, 2018.

LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157: H7. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1193-1201, 2009.

LIU, J. L.; LUO, Z.; BASHIR, S. A progressive approach on inactivation of bacteria using silver–titania nanoparticles. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 2, p. 194-201, 2013.

LV, Q.; WU, D.; QIU, Y., et al., “Crystallization of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) composites with graphite nanoplatelets: Relations between nucleation and platelet thickness”, **Thermochimica Acta**, v. 612, pp. 25-33, 2015.

MA, T.; GUO, M.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; WANG, X. Density-controlled hydrothermal growth of well-aligned ZnO nanorod arrays. **Nanotechnology**, v. 18, n. 3, p. 035605, 2007.

MAGALHÃES, M. A. D. Tempo de degradação de materiais descartados no meio ambiente. **Jornal do Centro Mineiro para Conservação da Natureza (CMCN). Viçosa–MG**, ano, v. 8, 2001.

MAISANABA, Sara et al. Cytotoxicity and mutagenicity studies on migration extracts from nanocomposites with potential use in food packaging. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 366-372, 2014.

MAISANABA, Sara et al. Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: a review. **Environmental research**, v. 138, p. 233-254, 2015.

MALLAKPOUR, Shadpour; NOURUZI, Nasrin. Effect of modified ZnO nanoparticles with biosafe molecule on the morphology and physiochemical properties of novel polycaprolactone nanocomposites. **Polymer**, v. 89, p. 94-101, 2016.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.

MARINELLO, Francesco et al. Atomic Force Microscopy techniques to investigate activated food packaging materials. 2018.

MERTENS, Birgit et al. Evaluation of the potential health risks of substances migrating from polycarbonate replacement baby bottles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 108-119, 2016.

MISHRA, S. K.; SRIVASTAVA, R. K.; PRAKASH, S. G. ZnO nanoparticles: Structural, optical and photoconductivity characteristics. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 539, p. 1-6, 2012.

MOHANDAS, A.; PT KUMAR, S.; RAJA, B.; LAKSHMANAN, V.-K.; JAYAKUMAR, R. Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p.53-66, 2015.

MÜLLER, C. M.; PIRES, A. T.; YAMASHITA, F. Characterization of thermoplastic starch/poly (lactic acid) blends obtained by extrusion and thermopressing. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 3, p. 426-434, 2012.

NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NAVALE, G. R.; THRIPURANTHAKA, M.; LATE, D. J.; SHINDE, S. S. Antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi. **JSM Nanotechnol Nanomed**, v. 3, n. 1, p. 1033-1041, 2015.

ÖZGÜR, Ü.; ALIVOV, Y. I.; LIU, C.; TEKE, A.; RESHCHIKOV, M. A.; DOĞAN, S.; AVRUTIN, V.; CHO, S.-J.; MORKOÇ, H. A comprehensive review of ZnO materials and devices. **JOURNAL OF APPLIED PHYSICS**, v. 98, n. 2005, p. 17, 2005.

PACCHIONI, G. Oxygen vacancy: the invisible agent on oxide surfaces. **ChemPhysChem**, v. 4, n. 10, p. 1041-1047, 2003.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - an antimicrobial study. **Science and technology of advanced materials**, v. 9, n. 3, p. 035004, 2008.

PANTANI, Roberto et al. PLA-ZnO nanocomposite films: Water vapor barrier properties and specific end-use characteristics. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 11, p. 3471-3482, 2013.

PONCE, P.; BUENO, V. B.; LUGÃO, A. B. Filmes biodegradáveis produzidos com poli (caprolactona)(PCL) e nanopartículas de prata: embalagens ativas para maçã. In: **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**—Foz do Iguaçu, PR, 2009.

RAGHUPATHI, K. R.; KODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p. 4020-4028, 2011.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat science**, v. 98, n. 3, p. 404-419, 2014.

ROSA, D. S.; PÂNTANO FILHO, R. Biodegradação: um ensaio com polímeros. **Moara**, 2003.

- SADEGHI, Kambiz; SHAHEDI, Mohammad. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer/chitosan/nano-ZnO (ECNZn) nanocomposite films incorporating glycerol plasticizer. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 1, p. 137-147, 2016.
- SADEGHNEJAD, Abdolhamid et al. Antibacterial nano silver coating on the surface of polyethylene films using corona discharge. **Surface and Coatings Technology**, v. 245, p. 1-8, 2014.
- SANTOS, A.; YOSHIDA, C. Técnico em alimentos: Embalagens. **Recife: UFRPE**, 2011.
- SARANTÓPOULOS, C.; OLIVEIRA, L. D.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. V.; GARCIA, E. E. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. **Campinas: CETEA/ITAL**, v. 1, p. 267, 2002.
- SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of microbiological methods**, v. 54, n. 2, p. 177-182, 2003.
- SHEN, L.; BIAN, X.; LU, X.; SHI, L.; LIU, Z.; CHEN, L.; HOU, Z.; FAN, K. Preparation and characterization of ZnO/polyethersulfone (PES) hybrid membranes. **Desalination**, v. 293, p. 21-29, 2012.
- SOGUT, Ece; SEYDIM, Atif Can. The effects of chitosan-and polycaprolactone-based bilayer films incorporated with grape seed extract and nanocellulose on the quality of chicken breast fillets. **LWT**, v. 101, p. 799-805, 2019.
- THIRUMAVALAVAN, M.; HUANG, K. L.; LEE, J. F. Synthesis and properties of nano ZnO using polysaccharides as chelating agents: effects of various parameters on surface modification of polysaccharides. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.417, p.154–160, 2013.
- TORABINEJAD, M. et al. Cytotoxicity of four root end filling materials. **Journal of endodontics**, v. 21, n. 10, p. 489-492, 1995.
- TRANDAFILOVIĆ, L. V.; BOŽANIĆ, D. K.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S.; LUYT, A.S.; DJOKOVIĆ, V. Fabrication and antibacterial properties of ZnO-alginate nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v.88, p.263-269, 2012.

VENKATESAN, Raja; RAJESWARI, Natesan. ZnO/PBAT nanocomposite films: Investigation on the mechanical and biological activity for food packaging. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 28, n. 1, p. 20-27, 2017.

WANG, K. H.; CHOI, M. H.; KOO, C. M.; CHOI, Y. S.; CHUNG, I. J. Synthesis and characterization of maleated polyethylene/clay nanocomposites. **Polymer**, v. 42, n. 24, p. 9819-9826, 2001.

WIESENTHAL, Alison et al. Nanoparticles: small and mighty. **International journal of dermatology**, v. 50, n. 3, p. 247-254, 2011.

WONG, S.; SHANKS, R.; HODZIC, A. Interfacial improvements in poly (3-hydroxybutyrate)-flax fibre composites with hydrogen bonding additives. **Composites science and technology**, v. 64, n. 9, p. 1321-1330, 2004.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

YAMANI, Naouale et al. In vitro genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 117-126, 2016.

YILDIRIM, Selçuk et al. Active packaging applications for food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 165-199, 2018.

YU, Zhilong et al. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 887-894, 2019.

YOSHIGA, A.; TOFFOLI, S. M.; WIEBECK, H. Estudo do Composto PVC Reciclado/CaCO. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 3, p. 134-141, 2004.

ZAK, A. Khorsand et al. X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson–Hall and size–strain plot methods. **Solid State Sciences**, v. 13, n. 1, p. 251-256, 2011.

ZHANG, L.; JIANG, Y.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 3, p. 479-489, 2007.

ZHANG, Tianlu et al. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. **Yonsei medical journal**, v. 55, n. 2, p. 283-291, 2014.