

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMBALAGENS
ATIVAS COMPOSTAS DE PBAT COM INCORPORAÇÃO DE
NISINA**

Gislene Zehetmeyer

Tese de Doutorado

Porto Alegre, Junho de 2016.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMBALAGENS
ATIVAS COMPOSTAS DE PBAT COM INCORPORAÇÃO DE
NISINA**

Gislene Zehetmeyer

Tese realizada sob a orientação da Prof^a. Dr^a.
Rosane Michele Duarte Soares e co-orientação
do Prof. Dr. Adriano Brandelli, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Materiais da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul em preenchimento parcial dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor
em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, Junho de 2016.

Esta Tese é dedicada àqueles que sempre acreditaram no meu sonho, nos meus esforços e dedicação, e que mesmo longe, se fizeram presentes, me apoiando de maneira incondicional não somente nesta caminhada, mas em todas as etapas da minha vida: À minha mãe Ilaine, Pai Volnei, mano Geferson, cunhada Natália e Bruninha, que veio para alegrar a vida da Dinda. Em especial à minha primeira Professora: Mãe, que desde sempre me mostrou e incentivou a buscar e desvendar o desconhecido!!

MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Rosane M. D. Soares por ter me acolhido no meio do caminho e ter aceito o desafio até o término da tese, agradeço a oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança depositada, pelo incentivo para o meu crescimento pessoal e profissional, pelas valiosas conversas sobre inúmeros assuntos, pelos ensinamentos e acima de tudo, pela amizade.

Ao meu co-orientador Professor Adriano Brandelli pela carinhosa receptividade em seu grupo de pesquisa, pela confiança, por toda a ajuda, pelos ensinamentos, incentivo, pela amizade e pelo exemplo de profissional.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME – UFRGS) pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e microscopia eletrônica confocal.

À Braskem pelas análises de permeabilidade.

Ao ISI Engenharia de Polímeros pela análise de variação de cor e ensaio de degradação dos filmes. Em especial à Cristiane M. Becker por ter facilitado a realização destes ensaios, mas acima de tudo, pela grande amizade, companheirismo e pelas incansáveis conversas.

A grande oportunidade de ter conhecido uma pessoa fantástica e que me contagiou desde o início com a sua alegria, sorriso largo e com a sua garra. Por ter dividido vários momentos comigo durante este período e por toda a sua ajuda nas análises de atividade antimicrobiana, mas principalmente por ter se tornado uma grande amiga e que me faz tanta falta: Stelinha Obrigada!!

Um agradecimento mais do que especial à Júlia Ávila, que apareceu em minha vida como um anjo, e por ser este Ser inexplicável que é, pelas longas conversas, pelas palavras, sempre tão lindas e confortantes, pelos ensinamentos e por cuidar de mim. À amiga Nara, que quando está por perto traz muita energia boa e muita luz, por ser tão querida e amável, obrigada por tudo! Obrigada por me fazerem entender o sentido da palavra AMIZADE, pelas palavras tão sábias, pelos gestos de carinho, pela cumplicidade. Obrigada por existirem em minha vida, AMO VOCÊS!

À minha florzinha Jóice M. Scheibel, que me acompanhou durante todo o doutorado e esteve junto comigo em todas as situações, por ter tido a oportunidade de dividir tantas experiências químicas, pelas loooooongas horas de processamento, pelas incansáveis conversas, e estas eram longas, porque assunto é o que não faltava hehehe,

pelas risadas, pelo apoio, mas acima de tudo agradeço pela amizade de todos estes anos, e dos muitos que virão.

Agradeço ao presente que o Mestrado me deu, que foi conhecer a Gisele M. Rasia, e que se tornou minha grande amiga e companheira de todas as horas, minha dupla sertaneja: Gislene e Gisele (Gi's). E que se tornou a minha “família” aqui em Porto Alegre junto com o Fabi, seu namorado.

À Juliana Boelter do laboratório de análises microbiológicas do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA – UFRGS) pela ajuda nos ensaios, mas acima de tudo pela amizade. Obrigada Júúú por ser tão querida!

A todo o pessoal do laboratório K208-A e o K-102 pelo carinho, troca de experiências, prestatividade e pelo convívio alegre nestes anos. Ao Felipe Ornaghi por ser essa pessoa tranquila e querida. Aos alunos de iniciação científica, Jônatas, Ketlyn, e ao Ítalo querido um obrigada especial, e também aos demais ex-colegas e colegas, Otávio, Johnny, César, Eliane, Andressa, Luciano, Jaque e Nataly.

A todos os professores do PGCIMAT que me deram a oportunidade de conhecimento de novos materiais através de suas disciplinas e que foram fundamentais no decorrer destes anos.

Ao técnico do LAMAT Júlio C. P. Vaguetti pela sua disposição e ajuda na realização das análises de DSC e TGA.

À BASF pela doação do polímero.

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, e que por ventura, eu possa ter esquecido de listar aqui, os meus sinceros agradecimentos.

Aos professores membros da Banca de Avaliação deste trabalho por aceitar o convite e ajudar com as suas valiosas contribuições.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e pelas oportunidades oferecidas durante estes anos.

Em especial aos melhores pais do mundo, Volnei e Ilaine, obrigada por tudo, por todo o amor, pela educação e por sempre terem acreditado em mim e não medirem esforços para me ver feliz. Amo vocês, mais que tudo na vida! Agradeço ao meu irmão Geferson e cunhada Natália pela amizade e companheirismo, e pelo maior presente que eu pude receber na finaleira do doutorado e que me enche de alegria: Bruninha a Dinda te ama!!!

À Deus, por sempre me dar forças e me iluminar.

“Liberdade é pouco, o que eu desejo ainda não tem nome.”

(Clarice Lispector)

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,
perca com classe e vença com ousadia!
Porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito bela para ser insignificante!!”*

(Charles Chaplin)

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE

Partes deste trabalho foram publicadas, ou enviadas para publicação, em periódicos internacionais e/ou em congressos.

Trabalho publicado em periódico internacional

Zehetmeyer, Gislene; Meira, S.M.M.; Scheibel, J.M.; Oliveira, R.V.B.; Brandelli, A.; Soares, R.M.D. Influence of melt processing on biodegradable nisin-PBAT films intended for active food packaging applications. *Journal of Applied Polymer Science (Print)* **JCR**, v. 133, p. 1-10, 2015.

Trabalhos em preparação

Zehetmeyer, Gislene; Meira, S.M.M.; Scheibel, J.M.; Rodembusch, F.S.; Brandelli, A.; Soares, R.M.D. Biodegradable and antimicrobial films based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) electrospun fibers. *Journal of Material Science*, 2016.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

Zehetmeyer, G.; Scheibel, J.M.; Meira, S.M.M.; Brandelli, A.; Soares, R.M.D. Efeito do método de processamento nos filmes e nanofibras de Poli(butileno adipato-co-tereftalato) incorporados com nisina. In: 13º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, Natal, RN, 2015.

Zehetmeyer, G.; Scheibel, J.M.; Meira, S.M.M.; Brandelli, A.; Soares, R.M.D.; Oliveira, R.V.B. Biodegradable films by melt processing as active food packaging. In: XIV Latin American Symposium on Polymers, XII Ibero American Congresso n Polymers – SLAP, Porto de Galinhas, PE, 2014.

Scheibel, J.M.; **Zehetmeyer, G.;** Meira, S.M.M.; Brandelli, A.; Soares, R.M.D.; Oliveira, R.V.B. Filmes biodegradáveis de PBAT com Nisina obtidos por eletrofiação. In: XIV Latin American Symposium on Polymers, XII Ibero American Congresso n Polymers – SLAP, Porto de Galinhas, PE, 2014.

Zehetmeyer, G.; Scheibel, J.M.; Oliveira, R.V.B. Nanocompósitos Biodegradáveis de PBAT/Nanopartículas de Prata: Caracterização das propriedades mecânicas. In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, Florianópolis, SC, 2013.

Scheibel, J.M.; **Zehetmeyer, G.;** Oliveira, R.V.B. Análises térmicas dos nanocompósitos de PBAT/Nanopartículas de Prata. In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, Florianópolis, SC, 2013.

Demais trabalhos relacionados ao tema desta tese de doutorado

Scheibel, J.M.; Zehetmeyer, G.; Oliveira, R.V.B. Filmes biodegradáveis de PBAT/nisina obtidos por eletrofição. In: XXVI SIC – Salão de Iniciação Científica, UFRGS, 2014. PRÊMIO DESTAQUE.

Scheibel, J.M.; Zehetmeyer, G.; Oliveira, R.V.B. Desenvolvimento de nanocompósitos de PBAT/AgNP para a aplicação em embalagens de alimentos biodegradáveis e ativas. In: XXV SIC – Salão de Iniciação Científica, UFRGS, 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xix
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS.....	8
3.2 POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) (PBAT)	9
3.2.1 Propriedades do PBAT	12
3.2.2 Legislações para contato com alimento.....	13
3.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	13
3.3.1 Bacteriocinas	14
3.3.2 Classificação das bacteriocinas	15
3.3.2.1 Classe I – Lantibióticos	15
3.3.2.2 Classe II.....	16
3.3.2.3 Classe III.....	16
3.3.2.4 Classe IV	16
3.4 NISINA	17
3.4.1 Mecanismo de ação	19
3.4.2 Aplicações em alimentos	20
3.5 TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO	21

3.5.1 EXTRUSÃO.....	21
3.5.1.1 Tipos de moldagem por extrusão	23
3.5.1.2 Fatores que interferem na qualidade dos produtos extrudados.....	24
3.5.2 ELETROFIAÇÃO	25
3.5.2.1 Parâmetros importantes no processo de eletrofiação.....	26
3.5.2.2 Propriedades da solução polimérica	27
3.6 EMBALAGENS ATIVAS.....	32
3.6.1 Tipos de embalagens ativas	34
3.6.2 Tecnologias em sistemas de embalagens ativas	35
3.7 EMBALAGENS ATIVAS BIODEGRADÁVEIS	37
4 EXPERIMENTAL	39
4.1 MATERIAIS	39
4.2 MÉTODOS	40
4.2.1 Preparação das amostras.....	40
4.2.2 Extrusão de filmes planos.....	41
4.2.3 Preparo das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação ...	42
4.2.4 Processo de eletrofiação	42
4.2.5 Preparação dos filmes bicamada.....	43
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	44
4.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier modo Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	44
4.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	44
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	45
4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)	46
4.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	46
4.3.7 Difração de Raios-X (DRX).....	47

4.3.8 Determinação de Ângulo de Contato da Água (WCA - Water Contact Angle).....	47
4.3.9 Microscopia eletrônica confocal.....	47
4.3.10 Perfilometria.....	48
4.3.11 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA).....	48
4.3.12 Ensaio de Tração.....	49
4.3.13 Permeabilidade ao vapor de água.....	49
4.3.14 Permeabilidade ao oxigênio.....	50
4.3.15 Determinação das Propriedades Antimicrobianas dos Filmes.....	50
4.3.16 Migração do Aditivo Antimicrobiano.....	51
4.3.17 Determinação do pH e condutividade das soluções de electrospinning.....	51
4.3.18 Determinação da viscosidade.....	51
4.4 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DOS FILMES ATIVOS OBTIDOS POR EXTRUSÃO.....	52
4.4.1 Preparo do solo.....	52
4.4.2 Ensaio de biodegradação.....	53
4.4.3 Análise das amostras.....	54
4.4.4 Dados meteorológicos.....	54
4.5 DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA.....	56
4.5.1 Degradação hidrolítica - meio ácido.....	56
4.5.2 Degradação hidrolítica - meio básico.....	57
4.6 DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA <i>in vitro</i> PARA OS FILMES DE PBAT... ..	58
4.6.1 Variação de cor.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ POLIMÉRICA.....	60
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ADITIVO.....	63

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PBAT E PBAT/NISINA OBTIDOS PELO PROCESSAMENTO NO ESTADO FUNDIDO	65
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PBAT E PBAT/NISINA OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO	123
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BICAMADA DE PBAT PURO E PBAT/NISINA	151
6 CONCLUSÕES.....	157
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	158
8 ANEXOS.....	173

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais setores consumidores de transformados plásticos ⁶	6
Figura 2. Demanda por segmento e tipo de polímero ¹⁷ tais como: polietileno, polipropileno, poliestireno, policloreto de vinila, polietileno tereftalato, acrilonitrilo-butadieno-estireno, estireno acrilonitrilo, polimetil-metacrilato, poliamida, policarbonato, poliuretanos, entre outros.	7
Figura 3. Classificação de alguns polímeros biodegradáveis de acordo com a sua fonte de obtenção ²⁵	9
Figura 4. Estrutura química do poli(butileno adipato- <i>co</i> -tereftalato) ^{13, 32}	10
Figura 5. Biodegradação de um filme de Ecoflex [®] (PBAT) após 4 semanas no solo a 55°C ⁴	11
Figura 6. Estrutura química da nisina ⁹⁰	18
Figura 7. Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (Nisina) e classe IIa (pediocina) ^{53, 59}	20
Figura 8. Principais componentes de uma extrusora ¹⁰⁷	23
Figura 9. Esquema do processo de eletrofiação.	27
Figura 10. Nanofibras lisas de PBAT obtidas por eletrofiação, (Fonte: Próprio Autor).	29
Figura 11. Morfologia das fibras com beads ¹³³	29
Figura 12. Efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica sobre a morfologia das fibras de electrospinning.	30
Figura 13. Fibras ramificadas de poli(butileno adipato- <i>co</i> -tereftalato), (Fonte: Próprio Autor).	31
Figura 14. Funcionamento da embalagem ativa com ação antimicrobiana.....	34
Figura 15. Possíveis formas de embalagens ativas de alimentos: A) agentes antimicrobianos no material da embalagem; B) revestimento antimicrobiano em materiais de embalagem convencional; C) imobilização de agentes antimicrobianos em materiais de embalagem poliméricos; D) bandejas/almofadas antimicrobianas; E) sachês contendo agentes antimicrobianos voláteis; F) revestimento de agentes antimicrobianos comestíveis em alimentos.....	35
Figura 16. Extrusora utilizada para a preparação das amostras de PBAT/nisina.	41
Figura 17. Extrusora utilizada para preparação dos filmes planos.	42

Figura 18. Equipamento de electrospinning utilizado para a preparação das nanofibras de PBAT e PBAT/nisina.	43
Figura 19. Fotografia ilustrando o ensaio de biodegradação no solo: a) Preparo do canteiro e (b) Disposição final das amostras no canteiro preparado para 6 meses de ensaio de biodegradação.	53
Figura 20. Dados das temperaturas ambientes (°C) para o período de Maio a Outubro de 2014.	55
Figura 21. Dados de precipitação no período de Maio a Outubro de 2014.	56
Figura 22. Degradação hidrolítica: a) Banho com recirculação utilizado para realização do experimento e b) disposição dos frascos dentro do banho durante o período do ensaio.	57
Figura 23. Variação da cor nas coordenadas L^* , a^* , b^*	59
Figura 24. Espectros de FTIR para o PBAT antes e após o processamento.	61
Figura 25. Espectro de FTIR para a Nisaplin [®]	63
Figura 26. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para a Nisaplin [®] em solução: (a) dispersão da Nisaplin [®] em solução, (b) cristal de NaCl presente na Nisaplin [®]	64
Figura 27. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para a Nisaplin [®] em pó... 64	
Figura 28. Espectros de FTIR-ATR para os filmes extrudados de PBAT e PBAT/nisina.	65
Figura 29. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina: (a) filme de PBAT puro, (b) 99,75/0,25%, (c) 99,5/0,5%, (d) 99/1%, (e) 98/2%, (f) 97/3%, (g) e (h) 95/5% de nisina.	67
Figura 30. Curvas de TGA para o filme de PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina... 69	
Figura 31. Termogramas de DSC (ciclo do 1° resfriamento) para os filmes de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	72
Figura 32. Termogramas de DSC (2° ciclo de aquecimento) para os filmes de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	73
Figura 33. Difrátogramas de Raios-X para os filmes de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	75
Figura 34. Fotografia da gota na superfície do filme de PBAT puro para determinação do ângulo de contato da água.	76
Figura 35. Diferentes tipos de hidrofiliicidade da superfície de materiais ²⁰⁴	77

Figura 36. Imagens de perfilometria das superfícies dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina: a) PBAT puro, b) 0,25%, c) 0,5%, d) 1%, e) 2%, f) 3% e g) 5% de nisina.	79
Figura 37. Módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E'') para as amostras de PBAT puro e PBAT/nisina.	81
Figura 38. Curvas de $\tan \delta$ para as amostras de PBAT puro e PBAT/nisina em função da temperatura.	82
Figura 39. Propriedades mecânicas sob tração para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	84
Figura 40. Atividade antimicrobiana do filme de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina testados contra <i>L. monocytogenes</i> em placas de ágar BHI.	88
Figura 41. Fotografias das amostras dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (100/0) (99,5/0,5), (99/1), (98/2), (97/3) e (95/5): (a) amostras antes do ensaio de biodegradação, (b) 30 dias, (c) 60 dias, (d) 90 dias, (e) 120 dias, (f) 150 dias e (g) 180 dias de compostagem.	93
Figura 42. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina após 30 dias de compostagem: (a) PBAT puro, (b) (99,5/0,5), (c) (99/1), (d) (98/2), (e) (97/3) e (f) (95/5).	94
Figura 43. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para a superfície dos filmes de PBAT puro e filmes de PBAT/nisina após 150 dias de compostagem: (a,b) PBAT puro, (c,d) (99,5/0,5), (e,f) (99/1), (g,h) (98/2), (i,j) (97/3) e (k,l) (95/5).	97
Figura 44. Massa residual dos filmes de PBAT puro e filmes de PBAT/nisina em função do tempo de exposição no solo durante 150 dias, no período de Maio a Setembro de 2014.	98
Figura 45. Espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina (95/5) antes do ensaio de degradação e após o período de 180 dias de compostagem.	101
Figura 46. Filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina) antes e após a degradação em meio ácido: (a) filmes antes da degradação, (b) 5 dias, (c) 10 dias, (d) 15 dias, (e) 20 dias, (f) 25 dias e (g) 30 dias de imersão em solução de HCl.	102
Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina antes da degradação: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.	103

Figura 48. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina após 5 dias de degradação: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.....	104
Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina após 30 dias de degradação: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.....	105
Figura 50. Massa residual para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina em função do tempo de degradação ácida.....	107
Figura 51. Espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina com 5% de nisina antes e após a degradação hidrolítica em meio ácido por 30 dias.	108
Figura 52. Filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina) antes e após a degradação em meio básico: (a) filmes antes da degradação, (b) amostra no frasco de vidro antes da imersão na solução, (c) amostra imersa na solução após 5 dias de degradação, (d) quantidade de amostra para análise após degradação de 5 dias (identificada na Figura).	109
Figura 53. Espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina com 5% de nisina antes e após a degradação hidrolítica em meio básico por 30 dias.....	110
Figura 54. Degradação dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina): (a) incubação em meio líquido em solução salina, (b) incubação em meio líquido em solução de PDB, (c) incubação em meio líquido em solução de PDA, (d) incubação em meio sólido com ágar e (e) incubação em meio sólido em PDA.....	112
Figura 55. Filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina) após 30 dias de degradação: (a) Solução salina, (b) solução PDB, (c) ágar e (d) PDA.....	113
Figura 56. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em solução salina por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.	114
Figura 57. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em PDB por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.....	115
Figura 58. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em ágar por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.....	116

Figura 59. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em PDA por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.....	117
Figura 60. Espectros de FTIR dos filmes de PBAT/nisina (95/5) após degradação em diferentes meios durante o período de 30 dias.	119
Figura 61. Espectros da variação de cor relacionados aos parâmetros L^* , a^* , b^* para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina até 5% de concentração, antes da degradação....	120
Figura 62. Espectros da variação de cor relacionados aos parâmetros L^* , a^* , b^* para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina após degradação em diferentes meios: sólido (Ágar e PDA) e em meio líquido (salina e PDB).	123
Figura 63. Espectros de FTIR para as nanofibras de PBAT puro e nanofibras de PBAT/nisina.	125
Figura 64. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina e as respectivas distribuições de frequência em função do diâmetro das nanofibras: (a) PBAT puro, (b) $2,5 \text{ mg g}^{-1}$, (c) $5,0 \text{ mg g}^{-1}$, (d) 10 mg g^{-1} , (e) 20 mg g^{-1} , (f) 30 mg g^{-1} e (g) 50 mg g^{-1}	128
Figura 65. Termogramas de TGA para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	130
Figura 66. Termogramas de DSC para as nanofibras de PBAT puro e para as nanofibras de PBAT/nisina: (a) ciclo do 1º resfriamento e (b) ciclo do 2º aquecimento.....	132
Figura 67. Difrátogramas de DRX para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	135
Figura 68. Fotografia da gota de água na superfície das nanofibras de PBAT puro para determinação do WCA.	136
Figura 69. Imagens de microscopia eletrônica confocal das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina: (a, b) PBAT puro, (c, d) 50 mg g^{-1} e (e, f) 100 mg g^{-1} de nisina.	138
Figura 70. Imagens de perfilometria das superfícies das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina: a) PBAT puro, b) $2,5 \text{ mg g}^{-1}$, c) $5,0 \text{ mg g}^{-1}$, d) 10 mg g^{-1} , e) 20 mg g^{-1} , f) 30 mg g^{-1} e g) 50 mg g^{-1} de nisina.	141
Figura 71. Efeito da adição da nisina nas soluções de PBAT nas propriedades dinâmico-mecânicas das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina: (a) módulo de armazenamento (E') e (b) módulo de perda (E'') em função da temperatura.....	143
Figura 72. Curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	145

Figura 73. Propriedades mecânicas sob tração para os filmes das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	147
Figura 74. Atividade antimicrobiana do filme das nanofibras de PBAT puro e das nanofibras de PBAT/nisina testados contra <i>L. monocytogenes</i> em placas de ágar BHI.	148
Figura 75. Valores do diâmetro das zonas de inibição das nanofibras do PBAT puro e PBAT/nisina.	149
Figura 76. Propriedades dinâmico-mecânicas para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina: (a) módulo de armazenamento (E') e (b) módulo de perda (E'') em função da temperatura.	152
Figura 77. Curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.	153
Figura 78. Propriedades mecânicas sob tração para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.	155
Figura 79. Atividade antimicrobiana para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina testados contra a <i>L. monocytogenes</i> em placas de ágar BHI.	156
Figura 80. Termograma de TGA do PBAT puro.	173
Figura 81. Termograma de TGA da nisina.	173
Figura 82. Termogramas de DTG para os filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina.	174
Figura 83. Curva de DSC para a nisina.	174
Figura 84. Curvas de DSC do 1º ciclo de aquecimento para os filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina.	175
Figura 85. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina após 30 dias de degradação, apresentando regiões esbranquiçadas, indicando a degradação dos filmes.	176
Figura 86. Espectros de FTIR para o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE).	176
Figura 87. Termogramas de DTG para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	177
Figura 88. Curvas de DSC do 1º ciclo de aquecimento para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Países que permitem a utilização da nisina, aplicações e níveis máximos ⁷¹ .	19
Tabela 2. Exemplos de sistemas de embalagens ativas ^{137, 143, 150, 160, 161}	36
Tabela 3. Condições climáticas para o período de Maio a Outubro de 2014.	55
Tabela 4. Valores de massa molar média (M_n) e ponderal (M_w) para o PBAT antes e após o processamento.	62
Tabela 5. Resultados de TGA e DSC para o filme de PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina.	70
Tabela 6. Percentual de cristalinidade dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina calculados por DRX.	75
Tabela 7. Valores das medidas de ângulo de contato para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina.	77
Tabela 8. Valores de rugosidade expressos como RMS (μm) da superfície do filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	78
Tabela 9. Resultado das propriedades mecânicas sob tração para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	83
Tabela 10. Resultados de permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.	87
Tabela 11. Diâmetro das zonas de inibição e espessura dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina obtidos por extrusão.	89
Tabela 12. Atividade antimicrobiana liberada a partir de filmes de PBAT puro e de PBAT/nisina após os períodos de tempo em soluções simulantes contendo: água destilada (A), Tween 20 (B) e ácido acético (C).	91
Tabela 13. Massas molares médias (M_n) obtidas por GPC antes e após o período de biodegradação do filme de PBAT puro e filmes de PBAT/nisina e o percentual de perda de massa dos filmes após 30 dias de biodegradação.	100
Tabela 14. Resultados da massa molecular do filme de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina após a degradação hidrolítica em meio ácido por 30 dias.	108
Tabela 15. Resultados da massa molecular dos filmes de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina após a degradação por 30 dias.	118
Tabela 16. Parâmetros da variação de cor para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina após degradação em meio sólido (Ágar e PDA) e em meio líquido (salina e PDB), após 45 dias de incubação.	121

Tabela 17. Caracterização das soluções poliméricas.....	124
Tabela 18. Resultados de TGA e DSC para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	131
Tabela 19. Valores de rugosidade expressas como RMS (μm) das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	142
Tabela 20. Resultado das propriedades mecânicas para o filme das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	146
Tabela 21. Atividade antimicrobiana liberada a partir dos filmes das nanofibras de PBAT puro e de PBAT/nisina após os períodos de tempo em soluções simulantes contendo: água destilada (A), Tween 20 (B) e ácido acético (C).....	151
Tabela 22. Resultado das propriedades mecânicas sob tração para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.	154
Tabela 23. Resultados de DSC do 1º ciclo de aquecimento para os filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina.	175
Tabela 24. Resultados de DSC do 1º ciclo de aquecimento das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.	178
Tabela 25. Espessura dos filmes extrudados, eletrofiados e bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.	178

RESUMO

Neste trabalho foram preparados filmes biodegradáveis de poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) com incorporação de um aditivo antimicrobiano (nisina), utilizando três diferentes metodologias. A primeira consiste na preparação dos filmes contendo nisina a partir do processamento no estado fundido utilizando uma extrusora dupla-rosca. A segunda fundamenta-se na preparação dos filmes utilizando a técnica de eletrofição. Já a terceira, consiste na preparação de filmes bicamada como materiais de embalagens ativas. A morfologia destes filmes foi avaliada, bem como, as propriedades térmicas, estruturais, mecânicas e antimicrobianas. Além disso, a biodegradabilidade dos filmes extrudados foi investigada. As micrografias para todas as metodologias mostraram que a nisina apresentou-se bem dispersa na matriz do polímero, apresentando alguns aglomerados em amostras com maiores concentrações do aditivo. A temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m) não foram afetadas pela incorporação da nisina nos filmes. A adição da nisina não causou modificação na resistência à tração dos filmes, por outro lado, a presença da bacteriocina causou uma pequena diminuição no alongamento na ruptura para as amostras mais concentradas de nisina quando comparadas àquelas do polímero puro. O módulo elástico foi alterado com a adição de nisina nos filmes, sugerindo uma leve redução na rigidez destes materiais. Os filmes ativos demonstraram inibição contra a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes*. A atividade antimicrobiana dos filmes foi investigada em soluções simulantes de alimentos e todas as amostras foram mais ativas em soluções contendo o surfactante Tween 20 ou ácido acético, aumentando até 48 h. A presença da nisina aumentou as propriedades de barreira ao oxigênio para os filmes de PBAT/nisina. A evolução da biodegradação pôde ser confirmada logo no decorrer de 30 dias, os filmes apresentavam indícios de biodegradação e mudança de coloração (manchas marrons) que indicam a ação de fungos. Os filmes bicamada apresentaram propriedades mecânicas elevadas em função da combinação dos filmes extrudados e eletrofiados. Por conseguinte, os filmes de PBAT/nisina apresentaram resultados promissores, indicando que estes novos materiais podem ser possivelmente empregados como materiais de embalagem ativa na indústria de alimentos visando o melhoramento da segurança alimentar e prolongando a vida de prateleira do produto embalado.

ABSTRACT

In this study biodegradable films were developed composed by poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) using an antimicrobial additive (nisin) at different concentrations through three different methodologies. In the first method, films were prepared from the melt processing technique using a twin-screw extruder. The second method was based on electrospinning technique. Finally, the third methodology consists of the preparation of active bilayer films composed by extruded and electrospun matrices. The film morphology was evaluated, as well as the structural, mechanical, thermal and antimicrobial properties. Furthermore, the biodegradability of the extruded films was investigated. The micrographs for films processed by extrusion and electrospinning showed that nisin was well dispersed in the polymer matrix, presenting some agglomerates when the nisin concentration was increased. The glass transition temperature (T_g) and melting temperature (T_m) were not affected by nisin incorporation. Besides, the addition of nisin did not change the tensile strength of the films. However, the presence of nisin in higher concentration caused a decrease in elongation at break. The Young's modulus changed with presence of nisin, suggesting a slight reduction in stiffness of these materials. The active films demonstrated inhibition against Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes*. Antimicrobial activity of the films was investigated in food simulant solutions, all samples were more active in the surfactant solutions containing Tween 20 or acetic acid, increasing until 48 h. The presence of nisin increased oxygen barrier properties to PBAT/nisin films. The biodegradation was detected after 30 days, when the films showed changes on visual aspect, then confirming the fungi action. The bilayer films showed high mechanical properties due to the synergism of the films. Therefore, PBAT/nisin films showed promising results, indicating that these new materials may be possible used as active packaging materials in food industry aiming enhanced food safety and extending the shelf life of the packaged product.

1 INTRODUÇÃO

Materiais poliméricos têm ocupado um lugar de destaque no mercado mundial quando se refere aos principais setores consumidores de transformados plásticos. Este intenso consumo é devido ao seu baixo custo, suas excelentes propriedades térmicas e mecânicas e ainda, à diversidade de aplicações destes materiais. A importância dos polímeros como materiais disponíveis para a aplicação tecnológica deste século é tão grande, que é difícil imaginar o nosso dia-a-dia sem a presença de plásticos, borrachas e fibras. Em vista disso, ao longo de décadas, foi possível acompanhar o crescimento do uso do plástico e a evolução de suas aplicações, que trouxeram para a sociedade mais comodidade e praticidade.

Por outro lado, a maioria dos materiais de aplicação de curto prazo (por exemplo, embalagens), são à base de polímeros sintéticos. Os plásticos ou polímeros não biodegradáveis contribuem para os problemas ambientais, uma vez que podem demorar muitos anos para se degradar e ocupam grandes volumes em aterros sanitários.

Em virtude de preocupações de caráter ambiental e econômico, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de substituir os polímeros convencionais por polímeros biodegradáveis. Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com a sua forma de obtenção. Podem ser provenientes de fontes naturais renováveis como o milho, celulose, batata, cana-de-açúcar. Podem ser sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas, ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina, quitosana ou proteínas. Outros polímeros biodegradáveis podem ser obtidos de fontes fósseis, petróleo, ou da mistura entre biomassa e petróleo.

Uma das definições mais amplamente empregadas para polímeros biodegradáveis é dada pela ASTM (*American Society for Testing and Materials*), Norma D-883 e Norma D-6400, as quais descrevem polímeros biodegradáveis como: “*polímeros degradáveis nos quais a degradação resulta da ação de micro-organismos que ocorre naturalmente, tais como bactérias, fungos e algas*”^{1,2}.

Os polímeros biodegradáveis têm sido utilizados em escala industrial desde o final da década de 1990 quando a BASF lançou o Ecoflex[®]. Este polímero é considerado o primeiro plástico 100% biodegradável e que atende a todas as normas internacionais. Trata-se de um copoliéster alifático-aromático obtido através de uma reação de policondensação entre o poli(butileno adipato) (PBA) e o poli(butileno

tereftalato) (PBT), apresentando 43% de PBT e 57% de PBA³. A sua estrutura modular foi desenvolvida sob medida, com o objetivo de balancear biodegradação, propriedades mecânicas e processabilidade⁴. Por esta razão, este polímero tem despertado especial interesse na substituição de polímeros sintéticos não biodegradáveis, devido às suas características físicas, compatibilidade com outros materiais e devido a sua excelente propriedade para extrusão de filmes⁵.

Um dos principais setores consumidores de transformados plásticos é o de alimentos e bebidas. Na indústria alimentícia, os plásticos permitem maior tempo de prateleira (*shelf life*) devido às suas propriedades de barreira física. Para o setor de bebidas, por sua vez, as garrafas de plástico para refrigerantes conferem a impermeabilidade aos gases, não permitindo que eles escapem antes do consumo⁶. Neste contexto, este setor necessita de alternativas para diminuir o impacto ambiental.

E, para ir ao encontro a esta necessidade, novas embalagens vêm sendo desenvolvidas para substituir as embalagens convencionais. Geralmente, estas embalagens possuem algumas funções que as convencionais não possuem, pois interagem com o alimento de uma forma intencional, prolongam a vida de prateleira, aumentam a segurança e mantêm as propriedades sensoriais enquanto mantêm a qualidade do produto⁷.

Quando substâncias antimicrobianas são incorporadas ou imobilizadas ao polímero destinado ao processamento e à utilização como embalagem, surge o termo “embalagem ativa”. Uma das vantagens da adição de compostos antimicrobianos é o fato dos mesmos não serem adicionados diretamente no produto alimentar e/ou adicionados em concentrações reduzidas. Desta forma, permitem eliminar ou inibir micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos, liberando em níveis controlados o conservante pela matriz polimérica⁸.

A substância ativa destinada para desempenhar a função tecnológica no alimento deve ser autorizada como aditivo alimentar pela União Europeia, sendo que a sua utilização deve respeitar as restrições e condições aplicáveis⁹. Ao contrário da Europa, não há regulamentações legais específicas quando se refere a materiais de embalagens ativas e inteligentes nos Estados Unidos. Entretanto, diversos setores de alimentos, medicamentos e de cosméticos aplicam-se diretamente a eles. As primeiras regulamentações aplicáveis relacionadas a aditivos alimentares são aquelas baseadas na Food and Drug Administration, as quais baseiam-se na determinação da segurança das embalagens inteligentes e ativas¹⁰. No Brasil, aconselha-se a basear nos requisitos

exigidos pela ANVISA através da Resolução RDC 51/2010¹¹, a qual define critérios gerais para determinação da migração total e específica de materiais, embalagens e plásticos destinados ao contato com alimentos.

Um dos aditivos antimicrobianos que vem sendo frequentemente testado para inibir o desenvolvimento de micro-organismos em embalagem de alimentos é a nisina. A nisina é utilizada como um preservativo natural em queijos e requeijões. Esta bacteriocina é produzida por *Lactococcus Lactis*, uma bactéria comumente presente no leite. Exibe atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e é reconhecida como segura pela World Health Organization e aprovada para utilização como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration¹².

Atualmente, estudos envolvendo substâncias antimicrobianas em matriz polimérica de PBAT são desenvolvidos utilizando o método de *casting*^{13, 14}. No entanto, existem poucos estudos referentes à obtenção de filmes extrudados e eletrofiados utilizando PBAT como matriz polimérica e a incorporação de bacteriocinas, como a nisina. Desta forma, esta tese apresenta o estudo acerca do desenvolvimento destes filmes utilizando outras metodologias para a sua obtenção. Visando aprofundar os efeitos da adição da nisina na matriz do polímero, a caracterização do material e a comprovação da atividade antimicrobiana na combinação destes dois materiais.

Este trabalho está descrito em três seções: inicialmente será descrita a metodologia de obtenção dos filmes por extrusão, em termos de processamento no estado fundido utilizando extrusora dupla-rosca. Com o intuito de investigar se o método utilizado para a obtenção dos filmes pode influenciar nas propriedades finais destes, em relação às propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas, estruturais e antimicrobianas. Na segunda etapa será apresentada e discutida a caracterização dos filmes obtidos por eletrofiação. A terceira e última etapa apresentará os resultados dos filmes bicamada, que consiste na junção das duas técnicas utilizadas anteriormente para a obtenção dos filmes. Até o presente momento, não há relatos na literatura de filmes para uso em embalagens ativas de alimentos utilizando esta combinação de materiais, bem como, das técnicas adotadas (polímero biodegradável e nisina, obtidos pelo processamento no estado fundido e por eletrofiação).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver embalagens ativas e biodegradáveis utilizando poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) (PBAT) com incorporação de nisina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver filmes biodegradáveis de PBAT com a incorporação de diferentes proporções do aditivo antimicrobiano utilizando o processamento no estado fundido;
- Preparar filmes biodegradáveis compostos de PBAT e nisina a partir da combinação de diferentes formulações utilizando a técnica de eletrofição;
- Obter filmes bicamada a partir da combinação de filmes processados em extrusora e de filmes obtidos por eletrofição;
- Investigar a morfologia dos filmes através de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a influência da adição da nisina nas propriedades térmicas e mecânicas dos filmes através das diferentes técnicas utilizadas para a obtenção destes;
- Verificar as propriedades de barreira dos filmes obtidos por extrusão;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes através do ensaio por zonas de inibição e verificar a migração da bacteriocina para soluções em contato com os filmes;
- Investigar a degradação por compostagem, hidrolítica e *in vitro*, dos filmes de PBAT e PBAT/nisina obtidos por extrusão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os produtos plásticos tornaram-se parte essencial do nosso estilo de vida moderno, pois estão materializados em diversos produtos, bem como, incorporados em diversos segmentos da indústria, dada a versatilidade de aplicação e facilidade na produção de artigos e/ou artefatos plásticos. Logo, pode-se afirmar que, durante os últimos 150 anos, plásticos têm sido elementos fundamentais para a inovação e têm contribuído para o desenvolvimento e progresso da sociedade. O auge do desenvolvimento da indústria petroquímica e, conseqüentemente, da indústria de transformados plásticos, ocorreu nos períodos entre guerras e no 2º pós-guerra, quando Alemanha e EUA lideraram o progresso tecnológico e a descoberta de novos produtos petroquímicos e artigos plásticos, que foram difundidos pelo mundo. Assim, foram desenvolvidos produtos comerciais importantes, como a fibra de nylon e as fibras de politereftalato de etileno (PET) para confecção de tecidos bem como janelas de avião a partir do acrílico.

Quantificando a importância desse produto no mundo, estima-se que a produção total de resinas termoplásticas atualmente exceda 250 milhões de toneladas⁶. Mais de 40% da produção total de plástico é utilizada como material de embalagem, dos quais, aproximadamente 50% são utilizados nas indústrias de embalagens de alimentos¹⁵.

Atualmente, a China responde por 24,8% de toda a produção mundial de resinas termoplásticas, posição de destaque conquistada a partir da adoção de uma estratégia de industrialização com enfoque na exportação. Tal liderança em termos de volume de produção é seguida de perto pela Europa (União Europeia, Suíça e Noruega), que representa 20,0% de toda a produção mundial e o bloco econômico NAFTA (composto por EUA, Canadá e México), com 19,4%. No contexto global, a participação brasileira na produção mundial de resinas termoplásticas, de 6,5 milhões de toneladas representa 2,7% da produção mundial, sendo a mais significativa da América Latina⁶.

Muito embora o Brasil tenha segmentos de alta competitividade, o consumo per capita brasileiro de plástico gira em torno de 35 kg/hab consumido por pessoa, porém bem abaixo dos índices observados em países desenvolvidos, que têm consumo per capita próximo a 100 kg/hab.

No Brasil, a indústria de transformação de plásticos compreende 11.690 empresas que empregam cerca de 348 mil trabalhadores¹⁶. A versatilidade do material

plástico é comprovada pela sua presença em segmentos industriais distintos que permeiam toda a matriz industrial. Os principais setores consumidores de transformados plásticos estão associados a mercados que experimentaram um intenso crescimento nos últimos anos no país, como a construção civil, alimentos e bebidas, automóveis e autopeças. O plástico ocupa um dos maiores lugares entre estes setores, no segmento de embalagens para alimentos e bebidas (Figura 1).

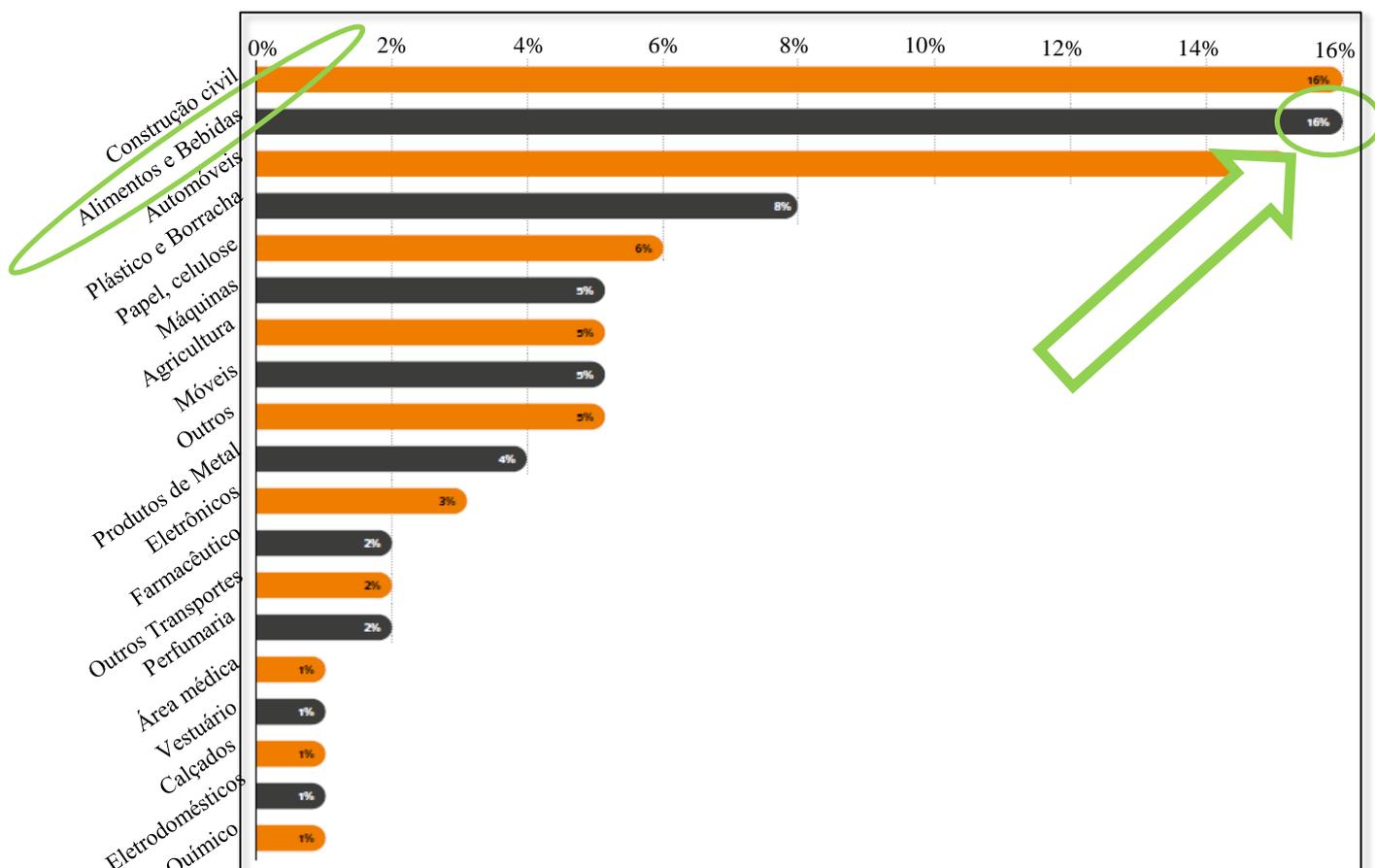


Figura 1. Principais setores consumidores de transformados plásticos⁶.

Em 2014, as importações de transformados plásticos em quantidade cresceram 5%, ganhando mais espaço frente à produção nacional. A participação dos importados no consumo aparente brasileiro cresceu 7,9% quando comparado com o ano de 2013. No ano de 2014, de todo consumo brasileiro de transformados plásticos, 10,6% foi proveniente das importações. O coeficiente de importação de transformados plásticos passou de 12,7% para 13,9%¹⁶. Frente a estes números, é possível observar que é um setor que se encontra em constante crescimento. O que é muito favorável para a economia do país, e, além disso, para a área de pesquisa e desenvolvimento,

favorecendo assim o estímulo para novos e melhores materiais, que vêm a facilitar o nosso cotidiano, uma vez que o plástico permite soluções inovadoras. De acordo com a European Plastics, o setor de embalagens foi o que mais se destacou em 2013 com um total de 39,6% quando comparado com os outros segmentos¹⁷. Em adição, relata que embalagens, construção civil e setor automotivo são os três principais mercados para o plástico e estima que 2016 seja um ano propício para o desenvolvimento e crescimento deste setor. (Figura 2).

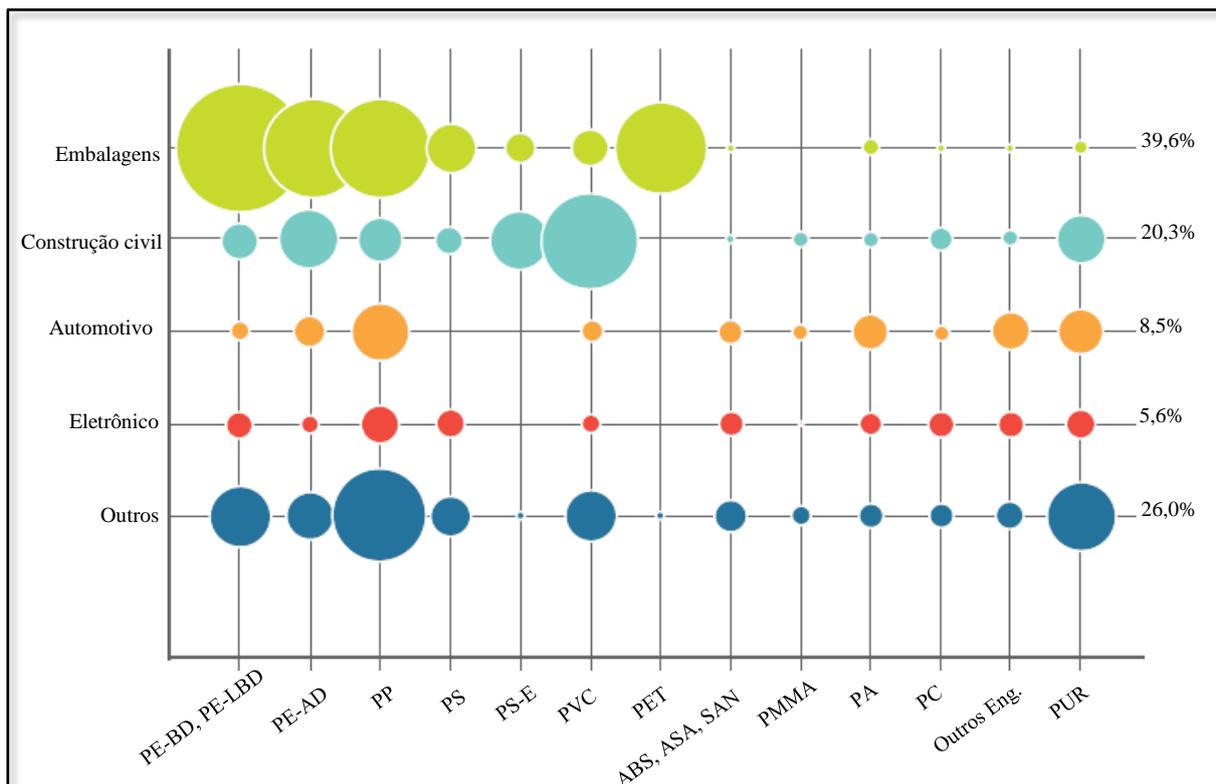


Figura 2. Demanda por segmento e tipo de polímero¹⁷ tais como: polietileno, polipropileno, poliestireno, policloreto de vinila, polietileno tereftalato, acrilonitrilo-butadieno-estireno, estireno acrilonitrilo, polimetil-metacrilato, poliamida, policarbonato, poliuretanos, entre outros.

Neste contexto, a possibilidade de combinação com outros materiais associada ao desenvolvimento de tecnologias de acondicionamento, cria oportunidades de aplicações muito diversificadas, favorecendo a expansão do uso do plástico para praticamente todos os tipos de alimentos industrializados¹⁸.

A escolha de um determinado tipo de embalagem é fundamentada em requisitos essenciais de proteção ao alimento acondicionado. Os materiais plásticos utilizados na embalagem são muito diversificados na sua estrutura química e apresentam

propriedades variáveis em função do processamento, dos aditivos incorporados e da combinação com outros polímeros¹⁹.

3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Ultimamente, pesquisas técnico-científicas vêm se aperfeiçoando na busca do descobrimento de materiais versáteis para o nosso cotidiano, estes materiais, devem ter baixo custo e durabilidade. Dentro desta perspectiva, e aliado ao constante desenvolvimento industrial, o uso de materiais poliméricos é cada vez mais disseminado.

Como consequência, a utilização destes materiais para as diversas situações do cotidiano, ampliou a geração de resíduos poliméricos no meio ambiente, causando preocupação com o acúmulo de lixo, e aliado a isso, uma grave poluição ambiental. Contemporaneamente a estes eventos tecnológicos, a sociedade começou a se preocupar com relação ao meio ambiente e busca meios para contornar esta situação, com a substituição de materiais convencionais por polímeros biodegradáveis. A Figura 3 ilustra o fluxograma que classifica alguns polímeros biodegradáveis de acordo com a sua fonte de obtenção^{20, 21}. O PBAT encontra-se na classe dos petroquímicos, sendo um copoliéster alifático aromático.

A biodegradação é um processo natural pelo qual substâncias químicas orgânicas no ambiente são convertidas a compostos simples, mineralizados e redistribuídos por ciclos elementares tais como, ciclo de carbono, nitrogênio e ciclo de enxofre²².

Polímeros biodegradáveis são classificados como aqueles que apresentam considerável taxa de biodegradação, que pode ser promovida por bactérias, fungos e algas. Segundo a ASTM D-6954, polímeros biodegradáveis são aqueles que passam por alterações significativas em sua estrutura química como resultado da ação dos micro-organismos de ocorrência natural²³. Este processo de degradação acontece em período reduzido de tempo (semanas, meses) e levam a formação de subprodutos como o CO₂, CH₄, H₂O, carbono, dentre outros²⁴⁻²⁶.

Como uma classe de polímeros biodegradáveis ambientalmente corretos, poliésteres alifáticos aromáticos têm atraído considerável atenção em função da sua biodegradabilidade, resistência mecânica, favorável estabilidade térmica e processabilidade. Dentre esta classe, um dos polímeros biodegradáveis que mais tem se

destacado e com um potencial uso comercial é o poli(butileno adipato-*co*-tereftalato). O PBAT é certificado como compostável e biodegradável pela Biodegradable Products Institute (BPI) conforme especificação da ASTM D-6400²⁷.

O mecanismo de biodegradação de poliésteres alifáticos aromáticos é geralmente considerado em ambas as formas, enzimática ou hidrolítica. A quebra primária da cadeia principal do poliéster é realizada na presença de enzimas específicas que são excretadas por micro-organismos tais como bactérias ou fungos, e os fragmentos residuais serão utilizados pelos micro-organismos como fontes de energia²⁸. Os polímeros biodegradáveis são sensíveis à hidrólise sob condições de temperatura e umidade mais elevadas²⁹. A região amorfa do PBAT é mais susceptível à degradação do que a região cristalina neste polímero^{28, 29}.

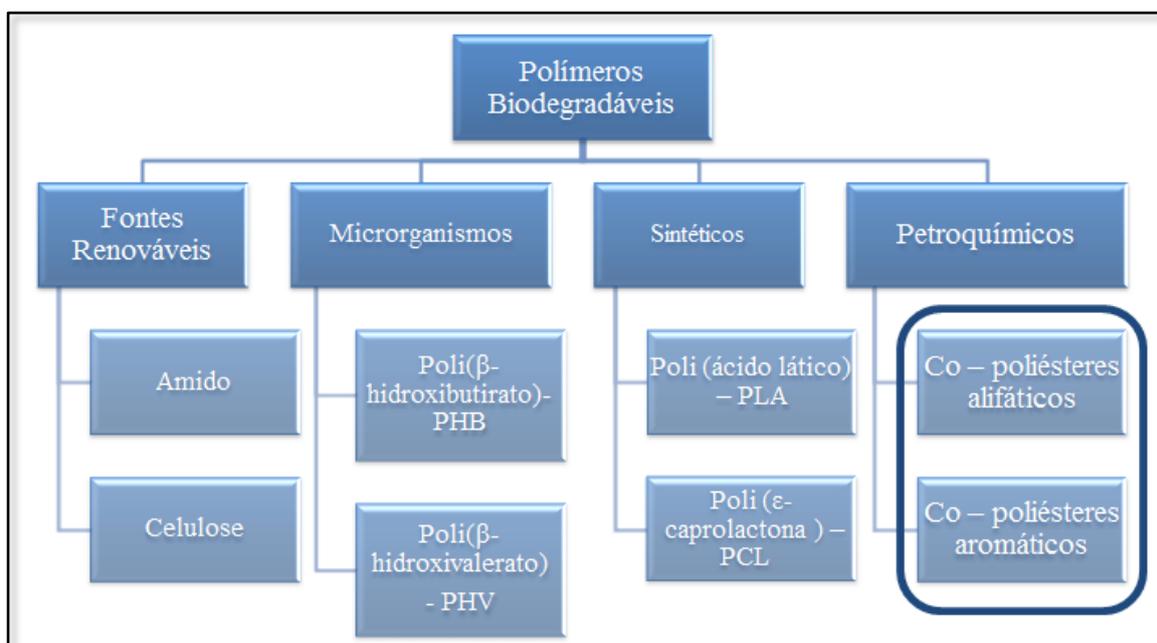


Figura 3. Classificação de alguns polímeros biodegradáveis de acordo com a sua fonte de obtenção²⁵.

3.2 POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) (PBAT)

O poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) (PBAT) é um copoliéster alifático-aromático de cadeia linear^{13, 14, 30, 31}. Sua estrutura química está apresentada na Figura 4. A unidade repetitiva “x” (butileno adipato) representa 57% da sua composição e a unidade repetitiva “y” (butileno tereftalato) ocupa o resto da sua estrutura. PBAT é obtido pela reação de policondensação do poli(butileno adipato) e poli(butileno

tereftalato)^{32, 33}, em que os monômeros aromáticos contribuem para a boa estabilidade térmica e propriedades mecânicas e os monômeros alifáticos fornecem flexibilidade e boa biodegradabilidade³³.

Este polímero exibe boas propriedades térmicas e mecânicas, as quais podem ser comparadas com aquelas do polietileno de baixa densidade (PEBD) em relação às propriedades de tração^{29, 34}. O PBAT possui um elevado alongamento na ruptura^{35, 36}, em alguns casos, superior a 600%³⁷, apresenta temperaturas de processamento mais baixas, na faixa de 120-150°C^{3, 38}. Além disso, apresenta baixa permeabilidade ao vapor de água¹⁵.

Como a maioria dos polímeros semicristalinos, as propriedades finais do PBAT são conduzidas em função da sua morfologia, que por sua vez é controlada pela razão da composição entre as unidades do butileno tereftalato (BT) e as unidades do butileno adipato (BA). O PBAT contém pequenos cristais com uma ampla faixa de distribuição após a fusão, e a região cristalina é composta basicamente por unidades BT, enquanto que, todas as unidades BA se localizam na região amorfa^{39, 40}.

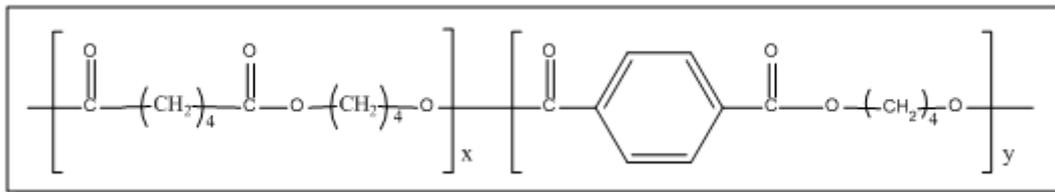


Figura 4. Estrutura química do poli(butileno adipato-*co*-tereftalato)^{13, 32}.

O PBAT é um polímero totalmente livre de metais pesados, não apresenta toxicidade e é autorizado para aplicações em embalagens de alimentos pela Food and Drug Administration (FDA)^{31, 41}.

O poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) tem despertado especial interesse na substituição de polímeros sintéticos não biodegradáveis quando se leva em consideração fatores como o balanço da sua biodegradabilidade (ou seja, tempo de vida) e as suas propriedades físicas (por exemplo, propriedades mecânicas e térmicas), as quais podem ser ajustadas pelo controle da razão molar dos co-monômeros nestes polímeros⁴⁰. Além disso, por apresentar excelente compatibilidade com outros materiais e ainda, por apresentar excelente propriedade para extrusão de filmes. O PBAT é considerado um polímero completamente biodegradável¹³, apresentando um processo de degradação

bastante acelerado. Pode degradar em poucas semanas uma vez que entre em contato com o meio ambiente, através da intervenção de enzimas naturais. E como resultado, o produto final deste processo inclui água e dióxido de carbono, junto com a nova biomassa^{42, 43}.

O PBAT possui certificações europeias e norte-americanas (DIN EN 13432 e ASTM D-6400), e ainda, a norma Japonesa Green PLA, atendendo desta forma, todas as normas internacionais que comprovam a sua biodegradabilidade e compostabilidade⁴, visto que este polímero pode ser degradado por micro-organismos. O processo de biodegradação no solo depende de um ambiente específico, sendo influenciado pelo clima, qualidade do solo e população de micro-organismos. A Figura 5 ilustra os estágios de degradação após 4 semanas no solo de um filme de Ecoflex[®], desenvolvido pela empresa alemã BASF Corporation.



Figura 5. Biodegradação de um filme de Ecoflex[®] (PBAT) após 4 semanas no solo a 55°C⁴.

Os poliésteres podem ser considerados materiais biodegradáveis, visto que a ligação éster pode sofrer hidrólise. Esta ligação é suscetível a ataques químicos e/ou biológicos, transformando as moléculas iniciais em fragmentos menores, capazes de atravessar a membrana celular de organismos⁴⁴. O PBAT apresenta na sua cadeia polimérica uma estrutura aromática, em contrapartida, a existência de heteroátomos e carbonila favorecem a ação de degradação. Além do mais, a degradação do PBAT é favorecida pelo polímero apresentar estrutura linear⁴⁴, uma vez que quanto maior o número de ramificações, menor ou mais lenta é sua degradação. A biodegradação de polímeros biodegradáveis em geral, ocorre com a colonização de sua superfície por micro-organismos e a formação de biofilme⁴⁴.

Até o momento, o PBAT tem sido utilizado para a fabricação de filmes agrícolas, filmes para embalagens de alimentos rígidas e sacolas compostáveis^{13, 45}. Além disso, o poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) é muito utilizado para melhorar as propriedades de outros polímeros no que diz respeito à resistência ao impacto, flexibilidade, propriedades de barreira aos gases, estabilidade térmica, mistura e compatibilização, ampliando a janela de processamento destes, e também as suas aplicações.

Lins *et al.*⁴⁶ desenvolveram blendas de poli(butileno adipato-*co*-tereftalato)/poli(ácido láctico) (PBAT/PLA) e observaram que o PBAT foi um ótimo candidato para melhorar as propriedades mecânicas do PLA, uma vez que a adição do PBAT na matriz do PLA levou a um significativo aumento na tenacidade e alongamento na ruptura. Zhang *et al.*⁴⁷ relataram também que as propriedades mecânicas aumentaram drasticamente com o aumento do teor de PBAT na blenda de PBAT/PLA na faixa de 5-20%.

Da mesma forma, Wang *et al.*⁴⁸ prepararam blendas de PBAT/PLA para aplicações em embalagens de alimentos e verificaram que PBAT é muito interessante para este fim, uma vez que é completamente biodegradável, flexível e com um elevado grau de compatibilidade com o PLA, apresentando as propriedades requeridas.

O PBAT também vem sendo utilizado para equilibrar custo e propriedades, sendo aplicado a polímeros de procedência natural, tais como amido, farelo de soja e glúten de milho^{33, 49, 50}.

3.2.1 Propriedades do PBAT

O poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) apresenta propriedades características, tais como⁴:

- Transparente a translúcido e com estrutura semicristalina;
- Boa estabilidade térmica até 230°C;
- Facilidade de laminação com outras estruturas ou co-extrudado;
- Altamente compatível com materiais obtidos através de fontes renováveis (amido, pó de madeira, papel, casca de arroz, fibras naturais, etc);
- Além de ser um polímero 100% biodegradável e compostável, é também reciclável.

3.2.2 Legislações para contato com alimento

O PBAT é um dos poucos polímeros biodegradáveis que em relação a sua composição, cumpre com legislação Europeia, Americana e Japonesa. Tratam-se de normas que compreendem o gênero de materiais para contato com alimentos^{51,52}:

- Norma Americana: FDA
- Norma Europeia: EC 90/128
- Norma Japonesa: JHOSPA

Além destas, o PBAT encontra-se em análise para a aprovação segundo a resolução N° 105/99 da ANVISA, que se refere às disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

3.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos antimicrobianos são caracterizados por apresentar uma ação rápida e possuem uma ampla atividade de espectro, o que diminui a possibilidade de desenvolver resistência contra espécies alvo⁵³. São produzidos na natureza por quase todas as espécies de vida, desde micro-organismos (bactérias e fungos), insetos, plantas, animais até humanos⁵⁴. A maioria deles tem como alvo a membrana citoplasmática das células. Em sua maioria, são catiônicos sob condições fisiológicas e assumem estrutura de hélice e, em alguns casos, folha pregueada, estruturas essas importantes para o seu mecanismo de ação⁵⁵.

As proteínas e os peptídeos antimicrobianos, sintetizados nos ribossomos e secretados por bactérias, são denominados bacteriocinas. As bactérias lácticas produzem uma ampla variedade de substâncias antimicrobianas e entre elas, se destacam os peptídeos ou proteínas conhecidas como bacteriocinas^{55,56}.

Peptídeos com propriedades antimicrobianas são utilizados geralmente como primeira barreira química contra o ataque microbiano, sendo sintetizados em resposta a infecções microbianas. No ambiente natural a produção e secreção de peptídeos antimicrobianos pode representar uma vantagem competitiva para colonização de determinado nicho ecológico⁵⁷.

3.3.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos ou proteínas produzidas por bactérias, geralmente ativos contra membros da mesma espécie ou espécies relacionadas à linhagem produtora, ou ainda, contra espécies do mesmo gênero^{53, 58}. As bacteriocinas são liberadas no meio extracelular e apresentam ação bactericida e/ou bacteriostática sobre bactérias alvo. Dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*⁵⁹.

As primeiras bacteriocinas descritas foram as colicinas, que são ativas contra *Escherichia coli*. Atualmente muitas outras bacteriocinas vêm sendo descritas, principalmente aquelas produzidas por micro-organismos Gram-positivos, patogênicos ou não^{55, 57}.

Bacteriocinas que são sintetizadas por várias bactérias ácido lácticas (LAB), exibem atividade antimicrobiana e vem sendo utilizadas para conservação de alimentos em embalagens ativas⁶⁰. As bacteriocinas produzidas por LAB podem ser consideradas como conservantes naturais ou bioconservantes em alimentos, representando desta forma uma potencial alternativa para a conservação de alimentos minimamente processados^{61, 62}. As bacteriocinas não apresentam até o momento aplicação clínica e não alteram a microbiota do trato digestivo, pois estas são digeridas por enzimas como tripsina e pepsina encontradas no trato digestivo. Se as bacteriocinas fossem consideradas antibióticos, não poderiam ser usadas em alimentos, uma vez que o uso de antibióticos em alimentos é ilegal⁵⁵.

A bacteriocina nisina é licenciada como um aditivo seguro em alimentos^{53, 62}. É uma bacteriocina produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis*, cujo nome é derivado do termo "N-inhibitory substance" (NiS) adicionado ao sufixo INA⁵⁷.

Para que bacteriocinas possam ser utilizadas na indústria de alimentos, estas devem cumprir com alguns requisitos, como por exemplo, a linhagem produtora deve ser considerada segura, isto é, deve ter registro GRAS (Generally Regarded As Safe) pela Food and Drug Administration (FDA)⁶³. A bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser específica sobre algum deles. Além disso, deve ter uma boa estabilidade térmica, e ainda, não deve apresentar risco algum à saúde do consumidor. Espera-se que a bacteriocina empregada na indústria de alimentos tenha efeito benéfico sobre o produto no qual for aplicado e

que, aumente a segurança alimentar sem afetar a qualidade sensorial e nutricional do produto^{53, 59}.

3.3.2 Classificação das bacteriocinas

As bacteriocinas são representadas por uma classe dita como bacterianos heterogêneos que variam significativamente em seu modo de ação, espectro de atividade, massa molar, propriedades bioquímicas e ainda, em função da sua origem genética. A maioria das bacteriocinas apresenta baixa massa molar (< 10 kDa), variam de 30 a 60 aminoácidos, são catiônicos e apresentam boa estabilidade térmica⁶⁴. O modo de ação envolve despolarização da membrana da célula alvo ou inibição da síntese da parede celular de bactérias Gram-positivas, podendo ser efetiva também contra bactérias Gram-negativas quando a membrana externa for desestabilizada. A ação da bacteriocina não afeta a bactéria produtora porque possui um mecanismo de imunidade específico^{53, 64}.

Baseados na estrutura primária, massa molecular, estabilidade ao calor e organização molecular, as bacteriocinas de bactérias ácido lácticas podem ser divididas em três ou quatro classes, conforme a diversidade de características. A classificação apresentada a seguir é baseada na de Klaenhammer⁶⁵, porém é tema de frequente debate entre os pesquisadores e sujeita a mudanças pelo constante descobrimento de novas bacteriocinas.

3.3.2.1 Classe I – Lantibióticos

A classe I ou os lantibióticos correspondem a peptídeos termoestáveis e de baixa massa molecular (< 5 kDa). Os lantibióticos são peptídeos pequenos (19 a 38 resíduos de aminoácidos) caracterizados por conter em sua composição aminoácidos raramente encontrados, como a lantionina ou β -metilantionina, dehidroalanina (Dha) e dehidrobutirina (Dhb) em sua molécula⁶⁶.

Os lantibióticos atuam na membrana citoplasmática da bactéria, primeiramente passam pela parede celular bacteriana. Em geral, os lantibióticos atuam no potencial da membrana independente da presença de um receptor^{55, 67}.

Os lantibióticos constituem o mais significativo grupo, no qual o principal representante desta classe é a nisina^{59, 68, 69}, devido à sua extensiva utilização na cadeia alimentar industrial⁷⁰. Moléculas de ligação como o lipídeo II, presente nas membranas

de bactérias-alvo, podem servir como receptores de membrana nas bactérias sensíveis aumentando a condutividade e a estabilidade de poros feitos por lantibióticos⁵⁵.

3.3.2.2 Classe II

Esta classe é composta por diversas bacteriocinas constituídas de pequenas moléculas de peptídeos termoestáveis. Geralmente formadas de peptídeos não modificados menores de 10 kDa^{53, 71}. Estes peptídeos geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite a sua inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e a morte celular⁵⁷. São propostas três subdivisões para esta classe^{64, 72}: Subclasse IIa – inclui as bacteriocinas pediocina e enterocina. Estas bacteriocinas apresentam alta especificidade contra *Listeria monocytogenes*. Subclasse IIb – esta subclasse é composta por bacteriocinas heterodiméricas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos. Estes peptídeos apresentam atividade muito baixa se forem empregados individualmente. Inclui as bacteriocinas lactocina G. E por fim, a subclasse IIc – as bacteriocinas presentes nesta classe apresentam uma estrutura cíclica, são dependentes de baixas concentrações de cisteína para a sua ação, como a lantocina B.

3.3.2.3 Classe III

Esta classe é composta por grandes proteínas antimicrobianas termolábeis, geralmente a massa molar é superior a 30 kDa. São bacteriocinas complexas quanto à atividade e à estrutura protéica⁵⁹. Seu mecanismo de ação se diferencia das demais bacteriocinas, promovendo a lise celular através da lise da parede celular do micro-organismo alvo. São compostas por peptídeos como helveticina J produzidas por *Lactobacillus helveticus*^{57, 64}.

3.3.2.4 Classe IV

Nesta classe encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidratos ou lipídios em sua estrutura⁵⁹. Compostas por leuconocina S. A função e a composição dessas porções não proteicas são desconhecidas⁵⁹.

Contudo, assume-se que este tipo de bacteriocina são artefatos de purificação parcial, devido às propriedades catiônicas e hidrofóbicas das bacteriocinas, o que resulta na complexação com outras moléculas em extrato bruto⁷¹. Contudo, não são classificadas como uma nova classe de bacteriocinas.

A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias associadas com alimentos pertencem à classe I e II.

3.4 NISINA

A nisina é um dos compostos antimicrobianos naturais mais utilizados no desenvolvimento de embalagens ativas. É uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, uma bactéria comumente presente no leite^{7, 53, 73, 74}. É considerada um peptídeo de tamanho molecular pequeno (3353 g mol⁻¹), com fórmula química (C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇). É catiônica, hidrofóbica, composta por 34 resíduos de aminoácidos^{69, 75}. Sua solubilidade, estabilidade e atividade biológica são altamente dependentes do pH, da temperatura e da natureza do substrato^{76, 77}.

Devido à natureza ácida da molécula de nisina, esta é completamente estável em soluções de pH 2,0, podendo ser estocada durante um período prolongado a temperaturas de 2 a 7°C. A inativação desta bacteriocina pode ocorrer em temperatura ambiente mesmo quando estiver acima de pH 7,0⁵⁹.

A nisina (Figura 6) é essencialmente ativa contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas^{62, 78, 79}. É reconhecida como um aditivo seguro pela Food and Drug Administration (FDA) e é aprovada como um agente antimicrobiano natural para utilização em alimentos em mais de 50 países⁸⁰⁻⁸⁴. No Brasil, a utilização da nisina foi aprovada desde 1996 para utilização em queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg⁸⁵. Esta bacteriocina tem sido empregada como bactericida ou como conservante na indústria de alimentos^{7, 86}. A Tabela 1 apresenta alguns países que permitem a utilização da nisina e o nível máximo permitido.

Além disso, a nisina é considerada um peptídeo antimicrobiano termoestável, até 120°C^{60, 87}, não tóxico, sensível a proteases digestivas, uma vez que pode ser digerida em nosso sistema digestivo pela enzima α -quimotripsina. Além disso, quando utilizada, não contribui para alterações no sabor⁸⁸. É reportada como uma substância similar ao sal quando administrada oralmente⁵⁵.

A nisina pertence à classe dos peptídeos lantibióticos por conter os aminoácidos *meso*-lantionina e 3-metil-lantionina, provavelmente responsáveis por importantes propriedades funcionais, como tolerância a acidez, termoestabilidade a baixo pH e modo de ação bactericida específico⁸⁹.

O seu tamanho molecular pequeno, permite a produção de filmes que liberam o peptídeo quando em contato com alimentos sólidos ou líquidos¹³.

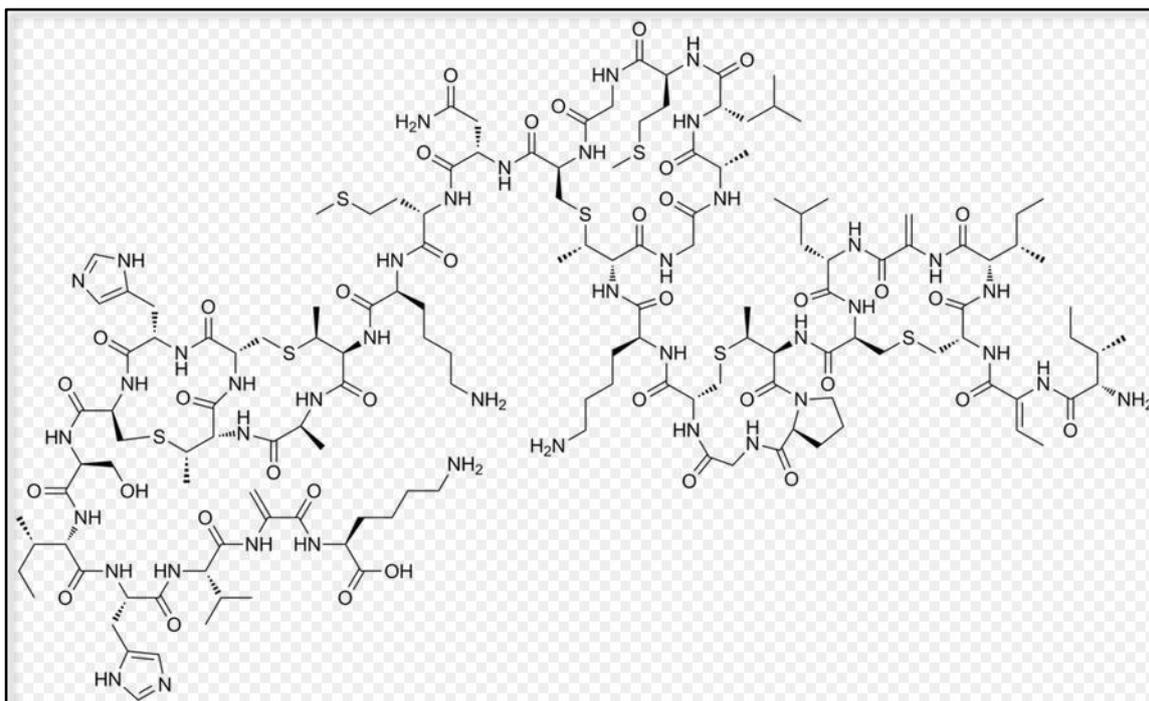


Figura 6. Estrutura química da nisina⁹⁰.

A incorporação desta bacteriocina em materiais de embalagem pode controlar a contaminação microbiana pela inativação de bactérias alvo, pelo contato ou pela redução da taxa de crescimento e da população máxima⁸⁸. A adição direta de nisina resulta em uma redução imediata de populações bacterianas⁹¹. Apresenta amplo espectro antimicrobiano com ação sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, além de outros patógenos e espécies de bactérias lácticas^{59, 92}.

Esta bacteriocina é considerada efetiva em baixa concentração, por exemplo, 10 mg kg⁻¹, e não promove alteração na qualidade sensorial do produto⁵⁹. Por este motivo, observa-se crescente interesse da indústria de alimentos sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos.

Tabela 1. Países que permitem a utilização da nisina, aplicações e níveis máximos⁷¹.

Países	Alimento em que é permitido o uso da nisina	Nível máximo (UI/g)
Argentina	queijo processado	500
Austrália	queijo, queijo processado, tomates enlatados	sem limite
Bélgica	queijo	100
Brasil	queijo, vegetais enlatados, salsichas	500
EUA	queijo processado e pasteurizado	10000
França	queijo processado	sem limite
Holanda	queijo industrializado, processado e ralado	800
Inglaterra	queijo, alimentos enlatados, creme	sem limite
Itália	queijo	500
México	sem descrição	500
Peru	sem descrição	sem limite
Rússia	queijo processado dietético, vegetais enlatados	8000

3.4.1 Mecanismo de ação

Estudos tem mostrado que a nisina possui duplo mecanismo de ação (Figura 7), interferindo na síntese da parede celular e promovendo a formação de poros na membrana celular, resultando em alteração na permeabilidade da mesma, com efluxo de moléculas essenciais (íon K⁺, aminoácidos e ATP) através dos poros, acarretando a morte celular^{93, 94}. Consequentemente, nisina pode induzir a autólise celular e inibir o crescimento de esporos bacterianos⁹⁴⁻⁹⁶.

A atividade antimicrobiana da nisina se dá basicamente pela interação do peptídeo com a membrana celular bacteriana por meio do acúmulo de peptídeos na superfície da membrana, forçando a inserção da nisina no interior da membrana. Desta forma, ocorre um ancoramento do peptídeo com o lipídeo II, que é um componente precursor da parede do peptideoglicano, resultando na perturbação do plasma da membrana⁹⁷.

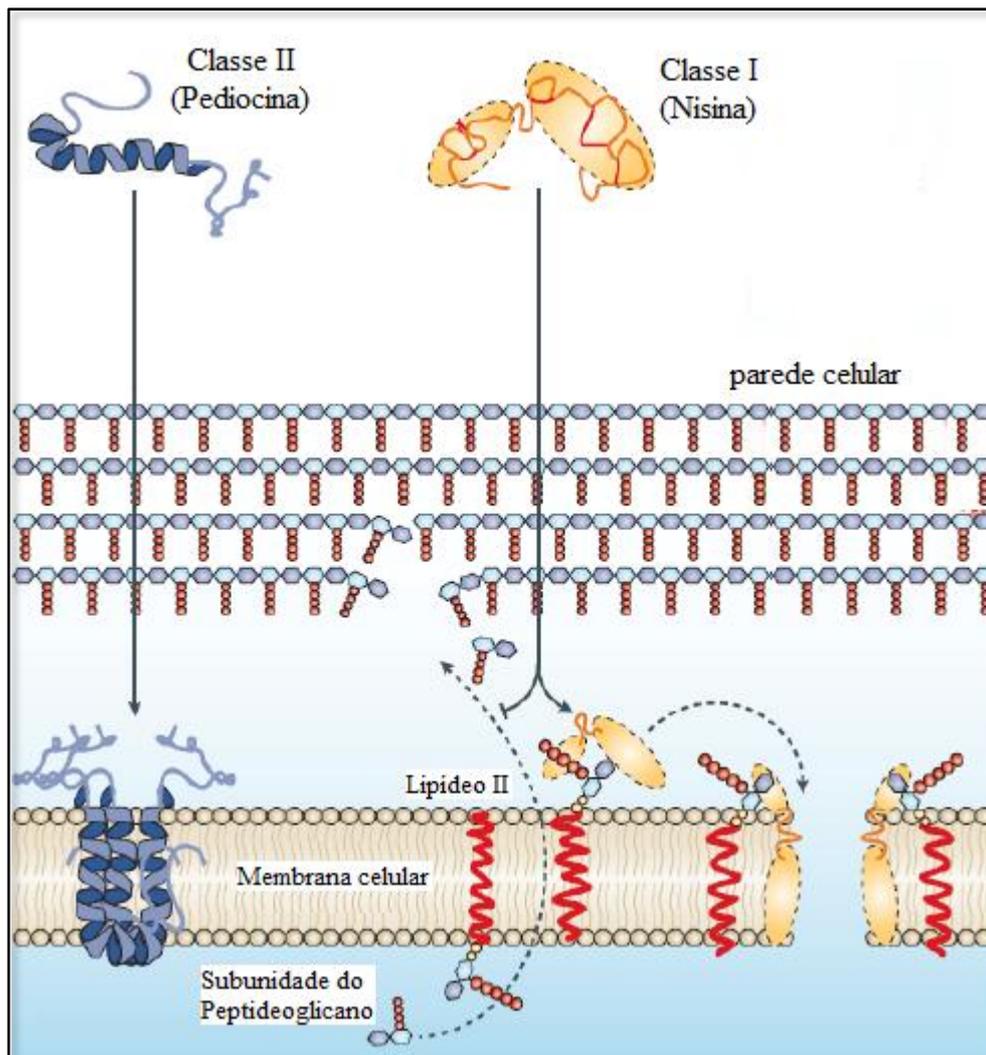


Figura 7. Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (Nisina) e classe IIa (pediocina)^{53, 59}.

3.4.2 Aplicações em alimentos

As bacteriocinas podem ser introduzidas em alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: podem ser produzidas *in situ* em alimentos fermentados pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; podem ser aplicadas pela adição destas culturas como adjuntas; ou ainda pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou semipurificadas nos alimentos (por exemplo, a nisina, comercializada como Nisaplin[®])^{53, 98}.

A eficiência das bacteriocinas em alimentos depende de vários fatores, tais como, aqueles relacionados ao próprio alimento: composição química e das condições físicas dos alimentos. Podem ainda depender das condições de processamento,

temperatura de estocagem, pH do alimento e da instabilidade da bacteriocina em função de alterações do pH^{59, 77, 98}. Além disso, a eficácia da bacteriocina no alimento pode ser afetada pela má distribuição das moléculas da bacteriocina na matriz, por adsorção da bacteriocina a componentes alimentares, como as gorduras ou proteínas, ou pela baixa solubilidade⁵³.

A outra possibilidade de aplicação das bacteriocinas é na forma de preparações imobilizadas, onde a bacteriocina parcialmente purificada ou o meio de cultivo concentrado é ligado a um suporte⁹⁸. Este suporte atua como um reservatório e um difusor das moléculas da bacteriocina no alimento, utilizando menor quantidade de bacteriocina (aplicação comparada no volume total do alimento) e assegurando a proteção do peptídeo da inativação por enzimas ou pela interação com componentes do alimento. Desta forma, uma variedade de métodos podem ser propostos para a imobilização da bacteriocina: adsorção às células produtoras e à superfícies, como a sílica; encapsulação em lisossomas; a incorporação em géis de revestimento e filmes de diferentes materiais, tais como, gelatina, celulose, proteínas de soja, colágeno, amido de milho, alginato de cálcio, polietileno, nylon e também aos outros filmes plásticos poliméricos⁹⁸.

Neste contexto, a nisina em conjunto com outras substâncias inibidoras, podem fornecer uma barreira para o crescimento de bactérias contaminantes indesejáveis. Desta forma, pode-se reduzir a quantidade de produtos químicos adicionados aos alimentos, diminuindo a intensidade das condições de processamento, e contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias de barreira⁶⁰. Além disso, a utilização de embalagens contendo estes compostos antimicrobianos pode ser mais eficiente, pelo controle da migração destes compostos no alimento ao longo do tempo, durante o transporte e armazenamento dos alimentos durante a distribuição.

3.5 TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO

3.5.1 EXTRUSÃO

A extrusão é sem dúvida a técnica de processamento mais largamente utilizada na fabricação de artigos baseados em polímeros⁹⁹. A extrusão é um processo termomecânico, em que os materiais são fisicamente e quimicamente transformados, devido às tensões térmicas e mecânicas geradas pelos parafusos rotativos e barris

aquecidos^{100, 101}. O processo de extrusão de plásticos consiste basicamente em forçar a passagem (controlada) do material granulado por dentro de um cilindro aquecido, por meio de uma ou duas roscas “sem fim”, que promovem o cisalhamento, homogeneização, bem como a plastificação do material (Figura 8), mais especificamente, transportam, misturam, compactam e permitem a retirada de gases liberados no processo¹⁰².

Extrudar significa “empurrar” ou ainda “forçar a sair” da extrusora, equipamento utilizado para este fim¹⁰³. Na saída do cilindro, o material é comprimido contra uma matriz de perfil desejado, a qual dá formato ao produto, sendo este, em seguida calibrado, resfriado, cortado e/ou enrolado¹⁰⁴. O material plástico sai da extrusora em forma de filme ou de chapa plástica com dimensões que dependem da matriz¹⁹.

A técnica de extrusão é especialmente adaptada para produzir comprimentos contínuos tendo geometrias de seção reta constantes, como por exemplo, hastes, tubos, canais de mangueiras, folhas, filamentos e filmes¹⁰⁵. Este é portanto, um processo muito versátil. O material extrudado pode ser gerado através de uma fenda plana simples, e conforme a espessura, o produto extrudado é classificado como filme, folha ou placa. A extrusora pode ainda funcionar como câmara de mistura ou de homogeneização para a preparação de composições poliméricas moldáveis e como câmara de reação (extrusão reativa), modificando a estrutura do polímero e ampliando suas possibilidades de aplicação¹⁰⁶.

A extrusão do filme plano ocorre geralmente em uma matriz mais larga, de espessura regulável, onde o filme é resfriado rapidamente, ou por imersão em um tanque de água ou pelo contato com rolos metálicos com resfriamento interno. Rolos de tração estiram o filme diminuindo sua espessura. O filme é continuamente puxado pelos roletes de tração, até ser bobinado em cilindros (rolos) específicos para esta função. Antes do bobinamento, as laterais do filme são aparadas e bobinadas para futuro reprocessamento. Esta operação é feita porque as laterais podem ser mais espessas que o restante do filme, ou para determinar a largura desejada para o filme, já que durante a extrusão pode haver variações na largura do extrudado. Quando uma bobina é completada, corta-se transversalmente o filme, troca-se a bobina e enrola-se a extremidade do filme na nova bobina, dando continuidade à produção.

Para a obtenção de filmes utilizando uma extrusora de filmes planos, a matriz é horizontal. A matriz possui uma régua estranguladora que faz com que a pressão do termoplástico seja introduzida no centro e distribuída por toda a largura, tendo na saída

a mesma pressão. Consequentemente, teremos a mesma espessura em toda a largura do filme. Na saída existe um jogo de lábios para regular a matriz, na espessura desejada. A abertura da matriz é regulável através de parafusos dispostos ao longo do comprimento da mesma para ajustar a espessura do filme. Na saída da matriz os filmes têm espessuras que variam de 0,2 a 0,6 mm¹⁰⁴. Porém, a espessura do filme é regulada pela velocidade dos rolos de tração que estiram o filme. A Figura 8 ilustra o esquema do processo de extrusão e os principais componentes de uma extrusora: 1) Rosca ou parafuso; 2) Funil de alimentação; 3) Matriz; 4) Produto extrudado e/ou produto final.

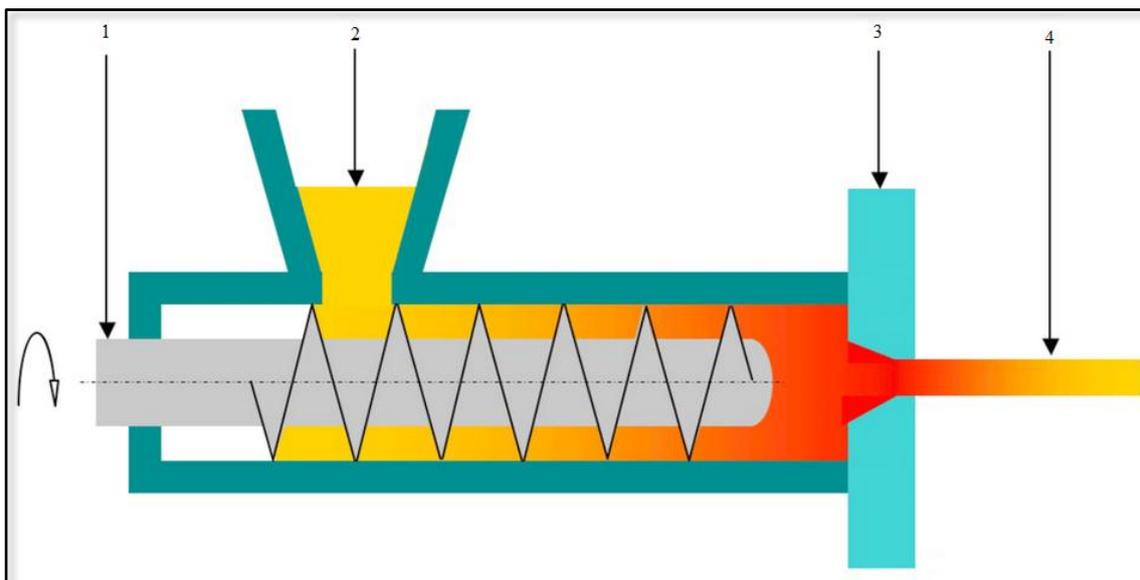


Figura 8. Principais componentes de uma extrusora¹⁰⁷.

3.5.1.1 Tipos de moldagem por extrusão

A técnica de extrusão pode oferecer diferentes tipos de moldagem por extrusão¹⁰⁷. Dentre as quais podem ser citadas:

- Perfis: consiste em forçar o material granulado através do cilindro aquecido. Na saída do cilindro, o material é comprimido contra uma matriz que possui o perfil (desenho) desejado, o qual dará a forma ao produto, em seguida, este é calibrado (a fim de manter as suas dimensões), resfriado, cortado (para perfis rígidos) ou enrolado;

- Sopro: processo utilizado na fabricação de peças ocas, consiste na produção de um parison (pré-forma) o qual é introduzido em um molde, em seguida injeta-se gás dentro deste parison forçando-o em direção às paredes do molde. Quando a peça solidifica, o molde é aberto e a peça é removida;

- Filmes: Processo utilizado na fabricação de produtos com espessuras muito pequenas para serem posteriormente utilizados na produção de sacolas, sacos plásticos, e embalagens flexíveis;

- Chapas: produto final que consiste de laminados ou chapas.

3.5.1.2 Fatores que interferem na qualidade dos produtos extrudados

Os fatores que mais influenciam a natureza dos produtos extrudados podem estar relacionados com as características da matéria-prima e as condições de operação do equipamento^{103, 107}.

As propriedades da matéria-prima têm importante influência na textura e coloração do produto. Os fatores mais importantes são: tipo, teor de umidade, estado físico e composição química. O pH do material umidificado também pode interferir. A composição da matéria-prima, seu teor de umidade e tamanho de suas partículas influenciam a viscosidade do produto na extrusora.

As condições que o operador deve ficar atento podem ser descritas como um dos fatores de extrema importância, uma vez que o operador deve ter completo conhecimento do funcionamento do equipamento, do material que está utilizando e das propriedades finais do produto que quer obter. O controle das condições de processo de extrusão é uma tarefa fundamental e devem ser observados os seguintes parâmetros para que se tenha um produto final bem acabado: a umidade do processamento, a temperatura do cilindro, a configuração da rosca, velocidade de rotação e a configuração da matriz. A temperatura do material extrudado desempenha um papel muito importante em todas as etapas do processo de extrusão. A partir de alterações físico-químicas na extrusora até a estruturação do produto na saída do equipamento, devido às transformações químicas (por exemplo, temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão, fragmentação e velocidades de reação). Além disso, as propriedades-chave do material (como por exemplo, a viscosidade, pressão de vapor) são dependentes da temperatura¹⁰⁰.

A técnica de extrusão é uma técnica relativamente simples, que viabiliza a processabilidade da resina base. Geralmente uma extrusora dupla-rosca é utilizada para a obtenção de blendas poliméricas ou polímeros com adição de cargas e/ou aditivos, pelo fato de que este equipamento apresenta uma alta taxa de cisalhamento. A melhoria das propriedades finais dos materiais obtidos utilizando esta técnica depende geralmente

do grau de esfoliação, e dispersão do aditivo incorporado na matriz polimérica. A extrusão é considerada uma técnica ambientalmente correta, devido à ausência de solventes orgânicos. Além disso, o processamento no estado fundido é compatível com processos industriais, tais como moldagem por injeção, e ainda, permite a utilização de uma ampla variedade de polímeros, desde os sintéticos como os naturais^{101, 108, 109}.

3.5.2 ELETROFIAÇÃO

A técnica de eletrofiação consiste na produção de fibras a partir da aplicação de um forte campo elétrico, tipicamente 10-30 kV¹¹⁰, e da existência de uma diferença de potencial entre o tubo capilar que contém a solução de interesse e o coletor (Figura 9). Ambos são eletricamente condutores e separados a uma distância ótima entre os dois¹¹¹. Inicialmente, a solução é mantida pela sua tensão superficial na forma de uma gota na extremidade do capilar. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se alonga proporcionando a formação de uma gota, conhecida como cone de Taylor, a qual é ejetada quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial da solução¹¹²⁻¹¹⁴. Durante a trajetória do jato, o solvente evapora e o polímero solidifica-se, resultando na formação de fibras ultrafinas que se depositam na superfície do coletor¹¹⁵⁻¹¹⁷.

A eletrofiação é uma técnica muito eficaz para a produção de fibras poliméricas com diferentes formas e tamanhos, dentro de uma escala entre micro e nanométrica, as quais são chamadas de estruturas primárias^{112, 117, 118}. O diâmetro final da fibra depende principalmente de três principais variáveis no processamento (taxa de fluxo da solução, tensão aplicada, distância entre a ponta da agulha e o coletor), além disso, depende também das propriedades da solução (viscosidade, condutividade e tensão superficial)¹¹⁹.

Nanofibras poliméricas podem ser obtidas por diferentes técnicas de processamento, tais como, síntese, separação de fase, auto organização e electrospinning^{111, 120}. Entretanto, o processo de eletrofiação tem um grande potencial para aplicação em escala industrial^{120, 121}. Além disso, as fibras obtidas por electrospinning são consideravelmente muito mais finas em diâmetro e, portanto, superiores em relação superfície-volume do que as fibras obtidas por extrusão mecânica convencional ou processo de fiação^{122, 123}.

Neste sentido, o processamento de materiais poliméricos em escala sub e nanométrica ganha constante atenção em função das novas propriedades associadas à

escala nanométrica, bem como das possíveis novas aplicações para estes materiais. Diferentes geometrias podem levar a diferentes propriedades e aplicações, permitindo que trabalhos acerca do processamento destas nanoestruturas ganhem elevada importância¹²⁴.

Nanofibras são fibras sólidas ultrafinas notáveis por seu diâmetro muito pequeno (menores que 100 nm), sua grande área superficial por unidade de massa e tamanho de poro pequeno. Devido às propriedades inerentes do processo de electrospinning, que pode controlar a deposição das fibras de polímero sobre um substrato alvo, nanofibras com complexo e formas tridimensionais sem emendas podem ser formadas^{116, 125}.

Devido ao melhorado aumento da área superficial destes materiais, a técnica de electrospinning é considerada uma técnica promissora para obtenção de filmes ativos para embalagens de alimentos. E nesta aplicação mencionada, é necessário um aumento na interação entre o aditivo e o alimento.

Conforme mencionado, devido à área superficial extremamente grande, a alta porosidade e a interconectividade das fibras, este tipo de material apresenta uma ampla gama de aplicações em diversas áreas, tais como, vestuário¹²⁶, embalagens de alimentos, liberação de drogas, membranas⁵⁰, dispositivos médicos e aeroespacial^{123, 127, 128}. Fibras ultrafinas de polímeros têm sido também investigadas como potenciais biomateriais para liberação de peptídeos, proteínas, enzimas e drogas¹²⁹.

3.5.2.1 Parâmetros importantes no processo de eletrofição

Existem alguns parâmetros que influenciam nas propriedades das fibras obtidas, como por exemplo^{114, 120}:

- a viscosidade da solução;
- tensão elétrica aplicada;
- a vazão de alimentação (saída da solução do capilar);
- a distância de trabalho (entre a ponta da agulha e o coletor);
- a temperatura da solução;
- umidade;
- a velocidade do ar na câmara do electrospinning.

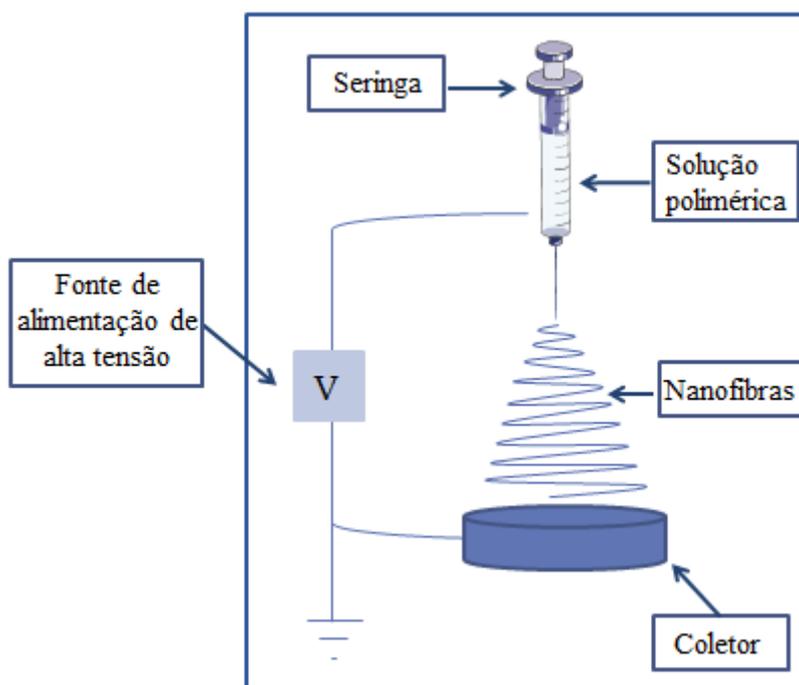


Figura 9. Esquema do processo de eletrofição.

3.5.2.2 Propriedades da solução polimérica

As propriedades da solução do polímero têm a influência mais significativa na eletrofição e no resultado da morfologia das fibras. A tensão superficial desempenha um papel na formação de beads ao longo do comprimento da fibra. A viscosidade da solução e suas propriedades elétricas determinarão a extensão de alongamento da solução. Isto por sua vez tem um efeito resultante no diâmetro das fibras eletrofiadas¹³⁰.

As nanofibras resultam da evaporação do solvente e solidificação do jato do polímero e o seu diâmetro está essencialmente relacionado com o jato característico de cada material. Um parâmetro muito importante que influencia no diâmetro da fibra é a viscosidade da solução. Quando a concentração for muito baixa, o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas é pequeno, causando uma instabilidade capilar na extremidade do jato. Esta instabilidade pode ocasionar num espalhamento eletrostático (electrospraying) ao invés da eletrofição. Neste caso, partículas esféricas ou nanofibras com beads são obtidas. Com o aumento da viscosidade e mantendo-se fixo os demais parâmetros do processo, existe uma tendência à formação de uma fibra contínua de polímero^{123, 124}. Uma solução muito viscosa resulta em um diâmetro de fibra maior. No entanto, quando um polímero é dissolvido em um solvente, a viscosidade da

solução é proporcional à concentração do polímero. Neste sentido, quanto maior a concentração do polímero maior será o diâmetro final das nanofibras¹²⁰.

O diâmetro da fibra também pode ser alterado através da tensão elétrica aplicada. Em geral, a aplicação de uma tensão elevada ejeta mais fluidos em um jato, resultando em diâmetros de fibras maiores¹²⁰. A tensão superficial está diretamente relacionada com a formação do cone de Taylor, pois este fenômeno ocorre quando a voltagem aplicada é suficientemente alta para fazer com que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. A partir deste valor de voltagem, chamada de voltagem crítica, inicia-se o processo de fiação¹²⁴. No entanto, como o jato se desloca no sentido da placa coletora, a tensão superficial pode causar a formação de beads ao longo do jato¹³⁰. Para se obter nanofibras uniformes, é necessário que se tenha um grau de emaranhamento de cadeias na solução polimérica, a qual corresponde a um valor de concentração (viscoelasticidade) mínimo¹²⁴, caso contrário, ocorre a liberação de pequenas gotas ou resulta em fibras contendo beads. E, quando a viscosidade é muito alta, a solução pode secar na ponta da agulha antes de iniciar a eletrofiação¹³⁰.

A solução de electrospinning sofre algumas mudanças decorrentes da tensão elétrica envolvida durante o processo, como por exemplo, a alongação da solução, que é causado pela repulsão das cargas na sua superfície. Por conseguinte, a adição de um sal à solução faz com que a condutividade elétrica da solução aumente, resultando em uma maior mobilidade dos íons na solução^{124, 130}.

A formação de beads pode ocorrer se a solução não for suficientemente alongada. Portanto, quando uma pequena quantidade de sais é adicionada na solução, o aumento de cargas carregadas pela solução pode aumentar a sua alongação. E como resultado, fibras lisas são formadas que podem de outro modo produzir fibras com beads¹³⁰. Na Figura 10 podem ser visualizadas fibras lisas de PBAT obtidas por eletrofiação, as quais foram produzidas controlando as propriedades da solução e ambiente.

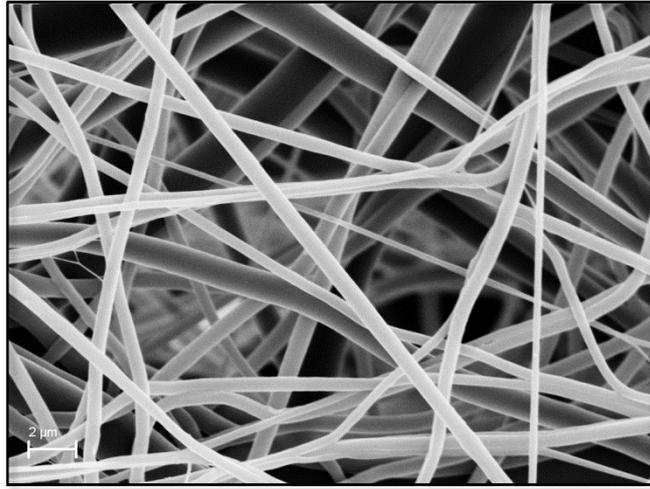


Figura 10. Nanofibras lisas de PBAT obtidas por eletrofiação, (Fonte: Próprio Autor).

Beads podem ser considerados como uma instabilidade capilar do jato devido ao desequilíbrio causado pelas flutuações na forma e densidade de cargas elétricas do jato^{124, 131}. A Figura 11 mostra a morfologia de fibras com a presença de beads. Existem muitos fatores que afetam a formação de beads nas nanofibras e que podem também ser considerados os parâmetros mais significativos, como a voltagem aplicada, a viscoelasticidade da solução, a densidade de cargas elétricas e a tensão superficial da solução^{124, 125}. Segundo Rutledge e Fridrikh¹³² beads podem surgir devido a instabilidade no rompimento da gota que fica presa na ponta da agulha, dependente da concentração do polímero e composição do solvente. Além disso, beads também podem ser observados devido à baixa condutividade da solução, que resulta na elongação insuficiente do jato pela força elétrica para produzir uma fibra uniforme. Embora tais beads tenham sido classificados como defeitos ou subprodutos, e considerados indesejáveis, a sua presença pode ter benefícios para aplicações selecionadas, tais como, molhabilidade¹³².

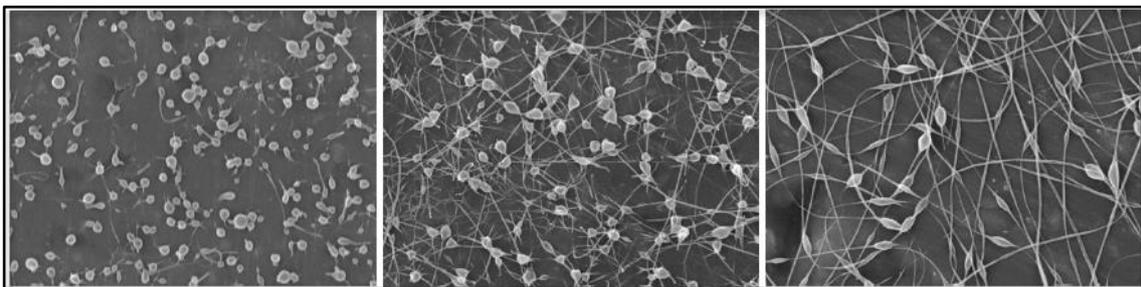


Figura 11. Morfologia das fibras com beads¹³³.

De forma interessante, a morfologia dos beads nas fibras muda de aspecto conforme a viscosidade da solução modifica¹³⁴. A partir de uma morfologia de gota arredondada com soluções de baixa viscosidade, para a forma de gotas alongadas ou até fibras lisas quando uma viscosidade suficiente é alcançada, como mostrado nas Figuras 11 e 12. Não somente a forma dos beads pode modificar com a viscosidade, mas também o espaçamento entre eles aumenta.

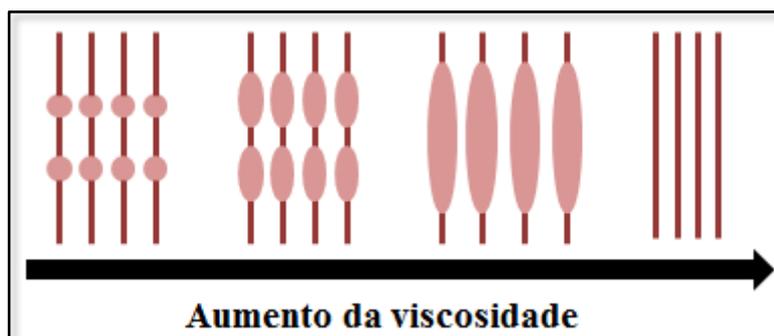


Figura 12. Efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica sobre a morfologia das fibras de electrospinning.

A técnica de eletrofiação apresenta grande versatilidade, através da qual é possível obter além de excelentes propriedades, os mais diversos tipos de fibras através de simples ajustes nas variáveis do processo¹³¹. O fenômeno da formação de poros nas nanofibras obtidas por eletrofiação se dá devido à evaporação do solvente. E é durante a evaporação do solvente que a solução torna-se termodinamicamente instável. Este fenômeno ocorre devido à formação de duas fases na nanofibra, uma fase é rica em polímero e a outra é rica em solvente¹²⁴. Desta forma a fase rica em polímero se solidifica logo que ocorre a segregação das duas fases enquanto que a evaporação do solvente ocasiona a formação de nanofibras porosas. Costa *et. al.*¹²⁴ salientam que o processo de formação de poros não pode ser atribuído aos fenômenos eletrostáticos desenvolvidos durante a eletrofiação, uma vez que a formação de fibras porosas podem ser obtidas por métodos que não usam tensão elétrica como é o caso da fiação por sopro em solução.

Ramakrishna¹³⁰ discute a formação de nanofibras e um provável mecanismo da formação de nanofibras ramificadas durante a eletrofiação pode ser explicado pela formação de jatos secundários a partir da formação do jato primário, ou pela separação do jato inicial em dois jatos menores. A formação de nanofibras ramificadas pode ser

observada na Figura 13. O alongamento e a evaporação do solvente leva a uma mudança dinâmica na forma e distribuição de cargas ao longo do jato. Desta forma, o desequilíbrio entre as forças elétricas e a tensão superficial do jato pode levar a instabilidade. Uma opção para reduzir esta instabilidade é através da criação de jatos secundários que darão origem as ramificações¹²⁴.

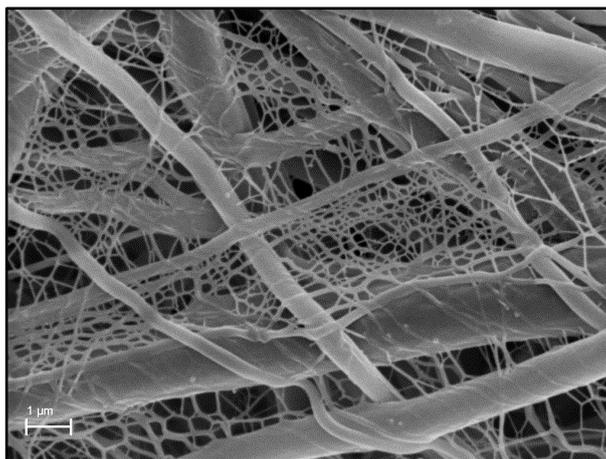


Figura 13. Fibras ramificadas de poli(butileno adipato-*co*-tereftalato), (Fonte: Próprio Autor).

A eletrofiação tem despertado muito a atenção de pesquisadores na década passada, não somente pela sua versatilidade de fiação de uma ampla variedade de fibras poliméricas, mas também devido a sua capacidade de produzir fibras em escalas nanométricas que são difíceis de obter por outras técnicas de fiação. Por sua vez, a aplicação da técnica de eletrofiação permite a produção de nanofibras contínuas que possuem uma área superficial muito grande formando uma rede com várias interconexões que facilitam a área de contato. Um procedimento bastante usado tem sido a incorporação de agentes antimicrobianos possibilitando a ação antimicrobiana destes materiais. Além disso, as fibras formadas são relativamente grandes em comprimento e são totalmente interligadas formando uma rede tridimensional. Como resultado, uma grande área de contato é acessível, como por exemplo, para reações de espécies químicas, migração de substâncias ou para afetar propriedades físicas desejadas, como por exemplo, na matriz do alimento¹²³.

3.6 EMBALAGENS ATIVAS

Embalagem ativa é um sistema que pode eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos, aumentando a vida de prateleira de produtos perecíveis e a segurança de produtos embalados¹³⁵.

A definição para estes novos materiais de acordo com a Regulação EU 450/2009 define que os mesmos podem prolongar a vida de prateleira de alimentos embalados e permitir a incorporação de componentes especificamente designados para liberar substâncias sobre o alimento⁷. Este tipo de embalagem desempenha um papel dinâmico em conservação de alimentos e permite à embalagem interagir com o alimento e o ambiente^{92, 136}. Estes filmes são capazes de oferecer funções extras não encontradas em sistemas de embalagens convencionais^{7, 137, 138}. Vale salientar que o termo “embalagem ativa” foi aplicado pela primeira vez por Labuza (1987) e pode ser definido como: a embalagem que realiza alguma função desejada que não seja simplesmente fornecendo uma barreira ao ambiente externo¹³⁹. Os compostos antimicrobianos incorporados dentro ou revestidos sobre as embalagens reduzem a taxa de crescimento e a população de micro-organismos, prolongando a fase lag, ou inativando micro-organismos presentes na superfície do alimento¹⁴⁰.

Atualmente, embalagem ativa é um dos conceitos mais inovadores em embalagem de alimentos¹⁴¹, que tem sido desenvolvida nas últimas décadas para atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente¹⁴². Observa-se uma crescente preferência por alimentos minimamente processados e por aditivos naturais. A utilização destas novas estratégias de embalagens compatíveis com processamento mínimo tem atraído muito a atenção na indústria de alimentos, porque tem um impacto significativo na extensão da vida de prateleira sem comprometer a segurança alimentar¹⁴⁰.

Os aditivos antimicrobianos podem ser incorporados diretamente no material de embalagem para uma liberação lenta para a superfície do alimento ou pode ser utilizada na forma de vapor (substâncias voláteis)¹⁴³. A atividade antimicrobiana nos filmes pode ocorrer de duas formas: Os agentes antimicrobianos podem ser tanto liberados através da evaporação no espaço livre da embalagem (substâncias voláteis) ou migrar para dentro do alimento (aditivos não voláteis) através da difusão^{144, 145}. No primeiro caso, a substância correspondente pode ser liberada completamente ou em uma quantidade específica na superfície do alimento para executar a sua ação biocida. No segundo caso,

a atividade antimicrobiana é executada uma vez que os micro-organismos entrem em contato com a superfície do material de embalagem¹⁴⁶, o que faz desta tecnologia uma opção adequada para o armazenamento de diversos tipos de alimentos embalados.

Muitos antimicrobianos são incorporados em concentrações de 0,1 – 5% m/m nos materiais de embalagem, particularmente em filmes^{144, 147}. Os métodos de processamento empregados para polímeros, tais como, extrusão e moldagem por injeção podem ser utilizados juntamente com agentes antimicrobianos estáveis termicamente. Além disso, o aditivo antimicrobiano pode ser liberado da embalagem durante um período prolongado, e assim, a atividade pode também ser prolongada na fase de transporte e armazenamento na distribuição do alimento¹⁴⁸.

As embalagens ativas incluem componentes nos sistemas de embalagem que são capazes de absorver/eliminar oxigênio¹⁴⁹⁻¹⁵² e etileno¹⁴³, absorvedores e emissores de CO₂^{136, 153, 154}, agentes antimicrobianos^{61, 155-157} e enzimas imobilizadas em suportes poliméricos^{142, 158}.

Alguns compostos aplicados em sistemas ativos de embalagens visando inibir, reduzir, interromper e/ou inativar o desenvolvimento de micro-organismos apresentam ação antimicrobiana em alimentos, como é o caso da nisina. A ação ocorre pela migração na superfície do produto (Figura 14).

A nisina é um dos agentes antimicrobianos mais utilizados em embalagens de alimentos, uma vez que as bacteriocinas são ideais para aplicação em embalagens antimicrobianas porque elas interagem com a superfície externa do micro-organismo¹⁵⁹ (parede celular e membrana plasmática) e não necessitam ser internalizadas para exibirem o efeito antimicrobiano.

Na literatura⁶¹ encontramos que a nisina, incorporada a uma concentração de 7500 e 15000 UI mL⁻¹ em filmes de acetato de celulose obtidos pelo método de evaporação do solvente, foi capaz de inibir significativamente *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *B. Cereus*. A atividade antimicrobiana destes filmes permaneceu estável mesmo depois de 70 dias em geladeira ou em salas refrigeradas.

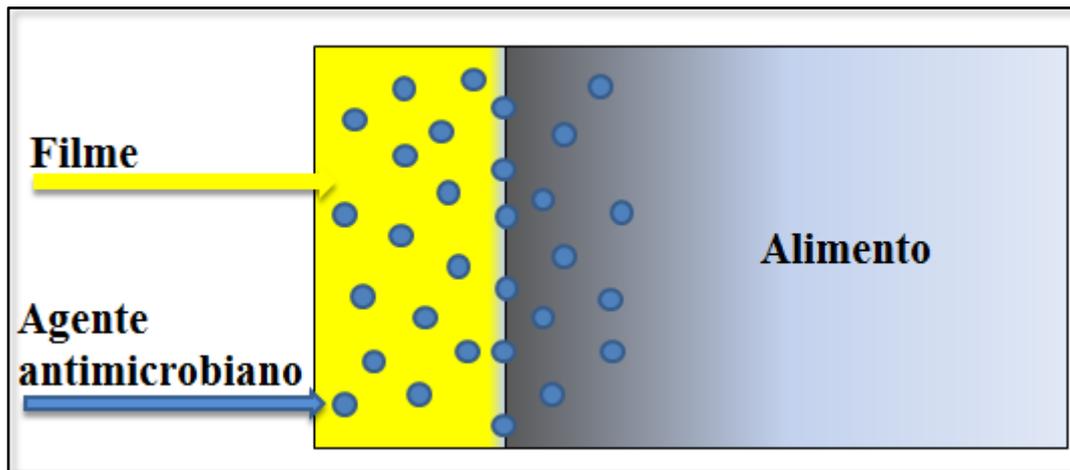


Figura 14. Funcionamento da embalagem ativa com ação antimicrobiana.

3.6.1 Tipos de embalagens ativas

Geralmente a escolha da forma que as embalagens ativas devem assumir é feita com base em três considerações gerais¹³⁹: O requisito mais importante é o alimento, seguido pelo formato da embalagem e então é necessário levar em consideração as exigências do agente ativo. As embalagens antimicrobianas (Figura 15) podem assumir diferentes formas^{140, 144}:

- adição de sachês contendo agentes antimicrobianos voláteis nas embalagens;
- incorporação direta de agentes antimicrobianos voláteis ou não voláteis no polímero;
- revestimento da embalagem com a matriz que atua como um veículo para o agente antimicrobiano;
- utilização de polímeros que são inteiramente antimicrobianos.

A aplicação de maior sucesso comercial de embalagens antimicrobianas tem sido os sachês que são colocados soltos ou conectados no interior da embalagem. Estes podem assumir 3 formas¹⁴⁴: Absorvedores de oxigênio, absorvedores de umidade e geradores de vapor de etanol. Os absorvedores de oxigênio promovem uma redução de oxigênio a qual inibe o crescimento de micro-organismos aeróbios, principalmente fungos, assim como os absorvedores de umidade. Os agentes antimicrobianos que não podem tolerar as temperaturas utilizadas no processamento de polímeros são frequentemente utilizados para revestir o material após a formação ou são adicionados na matriz do polímero para obter os filmes por *casting*.

Alguns polímeros são considerados inerentemente antimicrobianos e têm sido utilizados em filmes e revestimentos. Embora o efeito antimicrobiano seja atribuído às propriedades antifúngicas da quitosana, pode ser que esta atue como uma barreira entre os nutrientes presentes no produto e os micro-organismos¹⁴⁴.

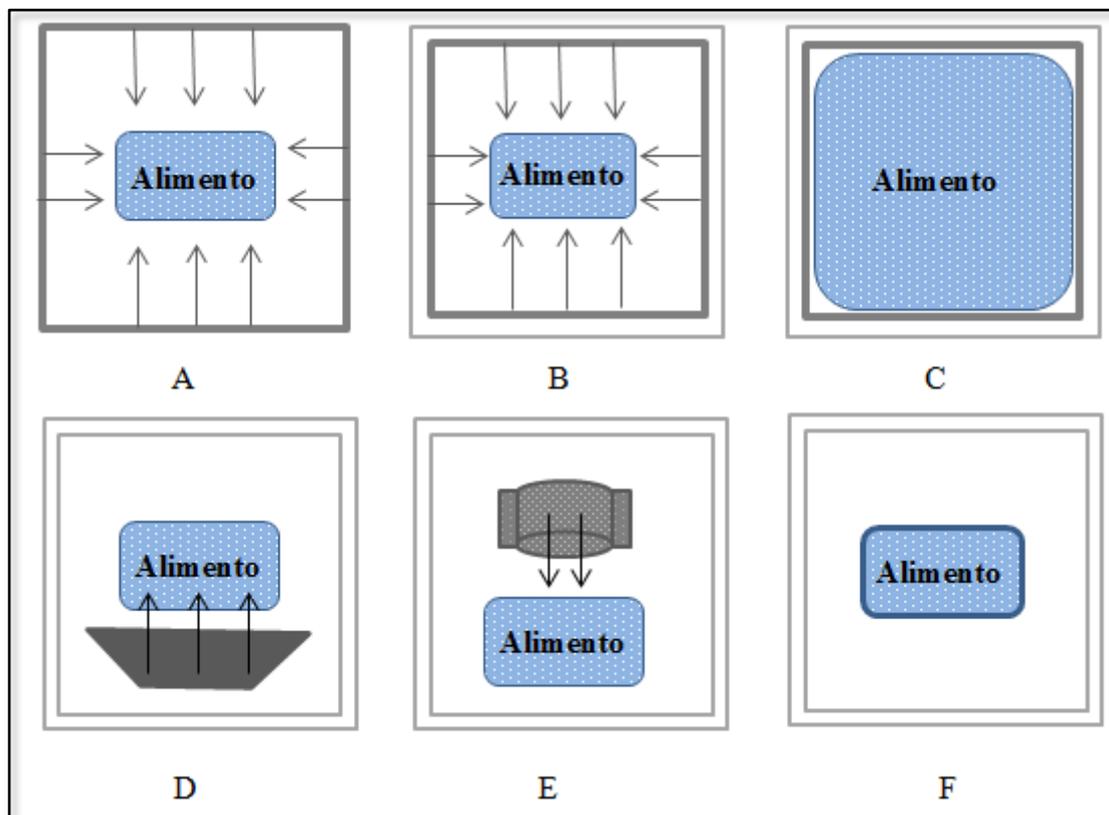


Figura 15. Possíveis formas de embalagens ativas de alimentos: A) agentes antimicrobianos no material da embalagem; B) revestimento antimicrobiano em materiais de embalagem convencional; C) imobilização de agentes antimicrobianos em materiais de embalagem poliméricos; D) bandejas/almofadas antimicrobianas; E) sachês contendo agentes antimicrobianos voláteis; F) revestimento de agentes antimicrobianos comestíveis em alimentos.

3.6.2 Tecnologias em sistemas de embalagens ativas

Algumas das aplicações em alimentos que são beneficiadas com a tecnologia das embalagens ativas, bem como o mecanismo de ação de cada sistema de embalagem, podem ser observadas na Tabela 2. Os produtos alimentícios possuem diferentes mecanismos de deterioração e estes devem ser observados antes de aplicar esta tecnologia. A vida de prateleira do alimento embalado é dependente de numerosos fatores, tais como a natureza intrínseca do alimento (pH, conteúdo de nutrientes,

compostos antimicrobianos) e fatores extrínsecos (temperatura de armazenamento e umidade relativa)¹⁵⁰. Por considerar cuidadosamente todos estes fatores é possível desenvolver tecnologias de embalagens ativas e aplicá-las para manter a qualidade e estender a vida de prateleira de diferentes produtos alimentícios.

Tabela 2. Exemplos de sistemas de embalagens ativas^{137, 143, 150, 160, 161}.

SISTEMA DE EMBALAGEM ATIVA	MECANISMOS	APLICAÇÕES EM ALIMENTOS
Absorvedores e/ou Filtros de Oxigênio	Ferro Metal/Ácido Nylon MXD6 Catalisadores de Metal (Platina) Ascorbato/Sais metálicos Enzimas	Pão, bolo, arroz cozido, biscoitos, pizza, macarrão, queijo, carnes curadas e peixe, café, salgadinhos, alimentos secos e bebidas
Absorvedores e/ou Emissores de CO ₂	Óxido de Ferro/Hidróxido de Cálcio Carbonato de Ferro/Iodetos metálicos Óxido de Cálcio/Carvão ativado Ascorbato/Bicarbonato de Sódio	Café, carnes frescas e peixes, nozes, outros lanches, pão de ló
Absorvedores de Etileno	Permanganato de Potássio Carvão ativado Argilas/Zeólitas ativadas	Frutas, vegetais e outros produtos hortícolas
Liberadores de Conservantes	Ácidos Orgânicos Prata zeólita Antioxidantes BHA/BHT Antioxidante Vitamina E Dióxido de Cloro/Dióxido de Enxôfre	Cereais, carnes, peixes, pão, queijos, salgadinhos, frutas e vegetais
Emissores de etanol	Etanol encapsulado	Crostras de pizza, bolo, pão, biscoitos, peixe e produtos de padaria
Absorvedores odor/sabor	Triacetato de celulose Papel acetilado Ácido cítrico Sais ferrosos/ascorbato Carvão ativado/argilas/zeólitas	Sucos de frutas, salgadinhos fritos, peixes, cereais, aves, produtos lácteos e frutas
Embalagens de Controle de Temperatura	Gás hidrofluorocarbono Cal/Água Nitrato de Amônio/Água Cloreto de Cálcio/Água Super ligas de corrosão/Água salgada Permanganato de Potássio/Glicerina	Comida pronta, carnes, peixes, aves e bebidas

3.7 EMBALAGENS ATIVAS BIODEGRADÁVEIS

Para expandir ainda mais o mercado de alimentos minimamente processados, é necessário desenvolver técnicas de preservação que mantêm a qualidade nutricional e sensorial do produto e garantir a segurança microbiológica.

A literatura reporta que a superfície de filmes antimicrobianos bicamada e totalmente biodegradáveis foram carregados com nisina ($0,51 \text{ mg cm}^{-2}$) pelo método de *dipping*. Estes filmes efetivamente suprimiram o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*. Os filmes revestidos com a mistura de quitosana e nisina exibiram a maior atividade contra *Listeria* e reduziram a população de células para níveis indetectáveis ($<10 \text{ UFC mL}^{-1}$) de 0 a 48 h¹⁵⁷.

Filmes biodegradáveis de poli(butileno adipato-*co*-tereftalato), farinha de arroz e sorbato de potássio foram preparados por extrusão de sopro, para aplicação de embalagem ativa em massa de lasanha fresca. Os filmes foram investigados depois de 45 dias de contato com o alimento a 7°C e mostraram que a adição de 1 a 5% de sorbato de potássio em blendas de PBAT e farinha de arroz é recomendado para a produção de embalagens ativas para alimentos, uma vez que não afetam as propriedades de extrusão e a integridade da embalagem se manteve após o tempo de armazenamento¹⁶².

Além disso, filmes biodegradáveis de poli ácido lático (PLA) incorporados com nisina ($0,04 \text{ mg cm}^{-2}$) pelo método de evaporação do solvente, inibiram significativamente *L. monocytogenes* em clara de ovo líquido e em meio de cultura. Estes filmes reduziram também a população celular de *Escherichia coli* em suco de laranja e diminuíram os níveis de *Salmonella enteritidis* em clara de ovo líquido⁹¹.

Bhatia e Bharti¹⁶³ avaliaram a atividade antimicrobiana da nisina, lisozima e EDTA incorporados em filmes de amido verificando a sua eficácia no desenvolvimento de filmes antimicrobianos. As amostras foram investigadas em intervalos de 2, 4 e 24 h para verificar a eficácia dos efeitos combinados dos agentes antimicrobianos. Estes filmes revelaram um efeito bactericida transitório para curtos tempos de incubação e foram observados halos de inibição indicando o efeito antimicrobiano destes materiais.

Uma blenda de PLA e nisina foi obtida utilizando uma mini-extrusora para misturar e processar o material. A nisina foi adicionada a uma concentração máxima de 5% do total da massa. As amostras tiveram a capacidade de suprimir o crescimento de

bactérias patogênicas como a *L. monocytogenes*, demonstrando uma significativa atividade antimicrobiana⁸⁷.

Neste contexto, os polímeros biodegradáveis podem apresentar uma alternativa muito interessante, principalmente na utilização como embalagens. E um dos polímeros que pode desempenhar muito bem esta função é o poli(butileno adipato-*co*-tereftalato). Na área de embalagens, especialmente no setor alimentício, novas tecnologias se fazem necessárias para atender à um mercado consumidor cada vez mais exigente. A utilização de polímeros biodegradáveis incorporados com agentes antimicrobianos, dão origem à uma nova classe de materiais conhecidas como embalagens ativas. Desta forma, a incorporação de agentes antimicrobianos (como a nisina), em filmes poliméricos é uma vantagem, porque estes aditivos inibem o crescimento de micro-organismos e estendem a vida de prateleira do alimento. E é por este motivo que esta abordagem se torna tão interessante, adicionar as bacteriocinas nas embalagens. Porque é interessante que a migração deste conservante ocorra de maneira controlada no alimento, de maneira gradual e ao longo da vida útil deste alimento. Atualmente a incorporação de agentes antimicrobianos (nisina) em matriz polimérica (PBAT) para a obtenção de filmes ativos é realizada pela metodologia de *casting*. Com o intuito de obter filmes ativos de PBAT/nisina utilizando outras metodologias, os autores utilizaram neste trabalho, duas diferentes técnicas. E, apresentam resultados promissores, os quais apontaram pela primeira vez, o desenvolvimento de filmes ativos utilizando a técnica de extrusão utilizando uma temperatura de 140°C e o uso inovador da técnica de eletrofiação para desenvolver embalagens ativas de alimentos.

4 EXPERIMENTAL

Este capítulo apresentará a parte experimental da preparação dos filmes antimicrobianos obtidos por extrusão, eletrofição, bem como dos filmes bicamada.

Primeiramente serão apresentados os materiais utilizados para a preparação dos filmes antimicrobianos. Os métodos utilizados para a obtenção destes será descrito posteriormente, e por fim, serão descritas as técnicas de caracterização empregadas neste estudo.

4.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais:

- poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) (PBAT) sob o código (Ecoflex[®] F Blend C1200), fornecido pela BASF Corporation (Florham Park, NJ, USA), na forma de pellets, densidade de $1,27 \text{ g cm}^{-3}$ a 23°C , índice de fluidez $13 \text{ g } 10^{-1} \text{ min}$ ($190^{\circ}\text{C}/2,16 \text{ kg}$).

- nisina comercializada sob o código (Nisaplin[®]), fornecida pela Danisco Brasil Ltda (Cotia, Brazil). De acordo com o fabricante, a formulação contém NaCl e sólidos lácteos, apresentando 2,5% de nisina pura. A nisina será utilizada na forma de pó.

- 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) 99%, comercializado pela Sigma Aldrich. De acordo com o fabricante, a fórmula química deste, é representado por $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, possui ponto de ebulição em $74,0^{\circ}\text{C}$.

- os micro-organismos indicadores para atividade antimicrobiana foram: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901 e *Clostridium perfringens* ATCC 3624. As culturas foram mantidas congeladas em caldo BHI contendo 20% de glicerol a 20°C . Para uso, foram inoculadas em caldo BHI e posteriormente em placa contendo ágar BHI, com períodos de incubação por 24 horas a 37°C .

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados para a preparação e caracterização dos filmes por extrusão, eletrofiação e filmes bicamada, compostos por PBAT e nisina estão descritos nesta seção do trabalho.

4.2.1 Preparação das amostras

O polímero utilizado neste estudo foi previamente seco em estufa a vácuo a 60°C por 24 horas antes do uso. As amostras foram preparadas utilizando diferentes concentrações de nisina (até 5% em massa). O PBAT foi misturado previamente com o agente antimicrobiano antes do processamento. As amostras de PBAT/nisina foram preparadas através do processamento no estado fundido, utilizando uma extrusora dupla rosca co-rotante Haake H-25, modelo Rheomex PTW 16/25, L/D 25, matriz com L/D = 3 (Polylabsystem, Karlsruhe, Alemanha). A rotação foi mantida a 150 rpm e uma taxa de alimentação constante de 10 g min⁻¹. O perfil de temperatura da zona de alimentação para a matriz foi de 130-140°C. A escolha deste perfil de temperatura foi utilizada para minimizar a degradação do polímero e também do agente antimicrobiano no interior da extrusora. Para isso, foram adotados os valores mínimos necessários para o processamento do material, considerando que o PBAT apresenta temperatura de fusão em torno de 116°C^{14, 30, 164}. Depois de processadas, todas as amostras foram granuladas em um peletizador Sagec SG-35 (Sagec Máquinas LTDA, Diadema, Brasil) conforme descrito por Zehetmeyer *et al.*¹⁶⁵. Para comparação, PBAT puro também foi reprocessado como um material de referência, servindo como amostra padrão (sem adição de nisina) com o intuito de avaliar mudanças nas propriedades do poli(butileno adipato-*co*-tereftalato), conferidas pela adição do agente antimicrobiano ao mesmo. A Figura 16 ilustra o processo de transformação do polímero por extrusão.



Figura 16. Extrusora utilizada para a preparação das amostras de PBAT/nisina.

As formulações das amostras de PBAT foram de forma geral preparadas com seis concentrações diferentes do aditivo antimicrobiano. Sistemas de PBAT/nisina com teores de 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 3% e 5% em massa de nisina. Também foi utilizado o PBAT puro (sem adição de nisina).

Serão adotados os seguintes nomes para as amostras: (100/0), (99,75/0,25), (99,5/0,5), (99/1), (98/2), (97/3) e (95/5).

4.2.2 Extrusão de filmes planos

A partir do polímero puro e as amostras de PBAT/nisina, filmes planos foram processados em extrusora AX Plásticos, modelo AX 16:26 Chill Roll (AX Plásticos, Diadema, Brasil) (Figura 17). O material granulado foi colocado diretamente no funil de alimentação da extrusora, com um perfil de temperatura da zona de alimentação para a matriz de 135-145°C, a rotação da rosca foi mantida em 65 rpm e torque de 40-50 Nm, conforme descrito por Zehetmeyer *et al.*¹². Filmes de PBAT puro também foram preparados e utilizados como material de referência. Para determinar a espessura dos filmes, foi utilizado um micrômetro Mitutoyo modelo Digimatic caliper BD013913. Um

total de 7 medidas foram realizadas no filme para obter o valor médio da espessura. Os filmes foram produzidos com uma espessura de ~ 0,07 mm.

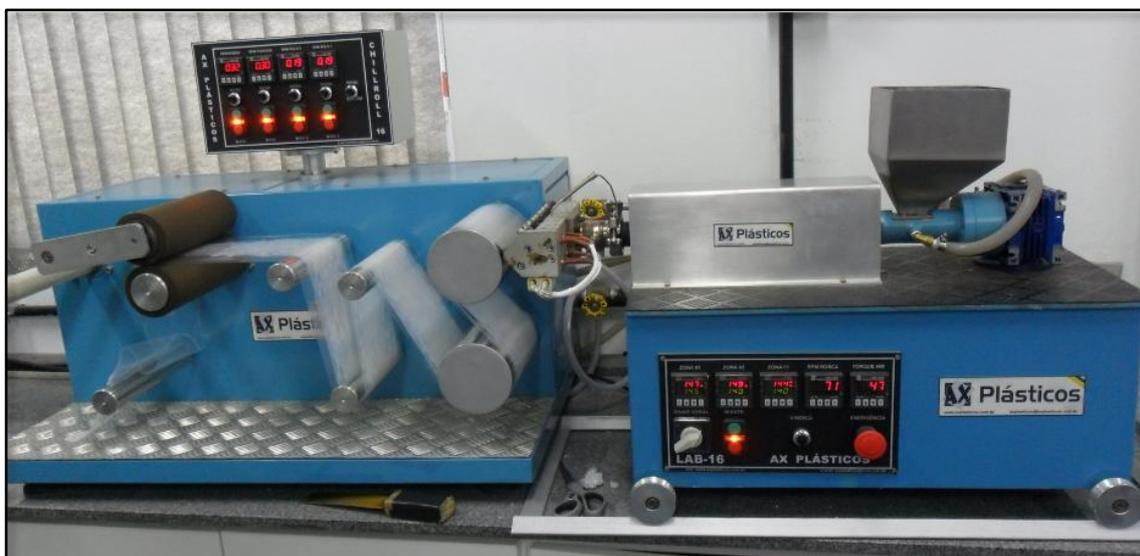


Figura 17. Extrusora utilizada para preparação dos filmes planos.

4.2.3 Preparo das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação

O PBAT foi seco em estufa a vácuo a 60°C por 24 horas antes do uso e diferentes composições de PBAT/nisina foram preparadas contendo 2,5, 5,0, 10, 20, 30 e 50 mg g⁻¹ de nisina em soluções de 30 g L⁻¹ de PBAT. Uma amostra controle também foi preparada, composta somente por PBAT (sem nisina). As sete diferentes formulações foram dissolvidas em 5 mL de TFE sob constante agitação, por 24 horas e em temperatura ambiente. Este solvente foi utilizado, pois a solução foi totalmente solubilizada e apresentou uma viscosidade ideal para a sua eletrofiação. Como sumarizado na literatura^{111, 130}, a maior parte do solvente é evaporado durante a eletrofiação.

4.2.4 Processo de eletrofiação

A eletrofiação de todas as soluções poliméricas foi feita utilizando um equipamento modelo INSTOR (Projetos e Robótica, Porto Alegre, Brasil), (Figura 18). O sistema era composto por uma fonte de alta tensão, um coletor cilíndrico rotatório coberto com folha de alumínio e uma seringa de 1 mL. A solução foi colocada em uma

seringa de 1 mL com diâmetro de agulha de 0,4 mm. Nanofibras de PBAT/nisina foram preparadas em uma voltagem de 16 kV, taxa de fluxo constante de 1 mL h⁻¹ e uma distância de 16 cm da ponta da agulha até o coletor. A seringa foi disposta na posição vertical com a agulha em direção ao coletor. A agulha foi conectada ao eletrodo emissor da polaridade positiva da fonte de alimentação da alta tensão. Todas as soluções foram eletrofiadas a temperatura ambiente. Para determinar a espessura dos filmes, foi utilizado um micrômetro Mitutoyo modelo Digimatic caliper BD013913. Um total de 7 medidas foram realizadas no filme para obter o valor médio da espessura. Os filmes foram produzidos com uma espessura de ~ 0,10 mm.

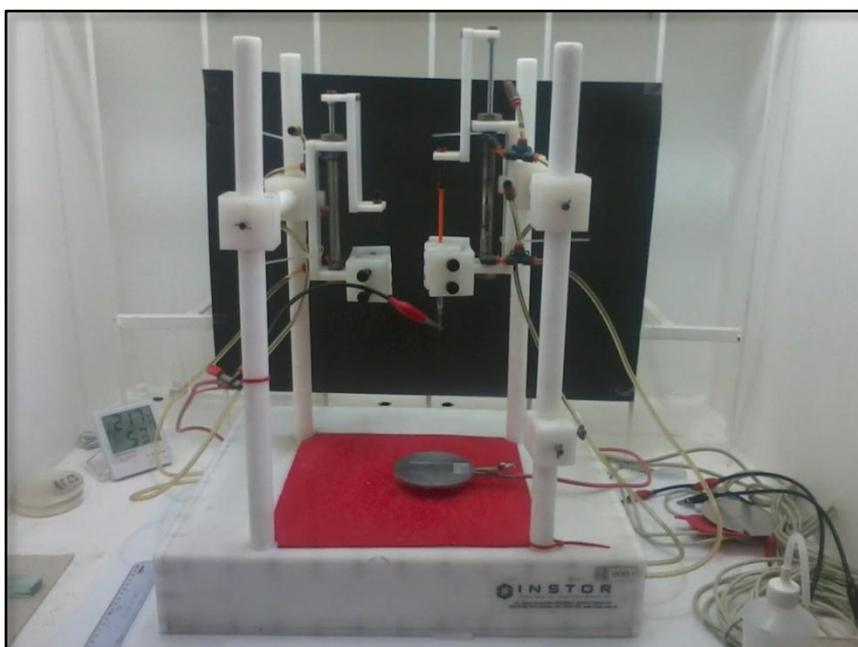


Figura 18. Equipamento de electrospinning utilizado para a preparação das nanofibras de PBAT e PBAT/nisina.

4.2.5 Preparação dos filmes bicamada

Os filmes bicamada foram preparados utilizando as mesmas condições adotadas na técnica de extrusão e de eletrofição para preparar os filmes, conforme descrito anteriormente. A primeira camada deste filme é composta pelo filme extrudado, em seguida, as nanofibras foram eletrofiadas sobre este filme.

A primeira etapa de preparação dos filmes bicamada consistiu em cortar um pedaço do filme obtido por extrusão, colocando-o sobre o coletor. Em seguida, a segunda camada de filme foi eletrofiada sobre a amostra depositada no coletor.

Foram preparados sete tipos de formulações diferentes, que foram identificadas como: 0%-0 mg g⁻¹, 0%-10 mg g⁻¹, 0%-20 mg g⁻¹, 0%-50 mg g⁻¹, 1%-10 mg g⁻¹, 2%-20 mg g⁻¹ e 5%-50 mg g⁻¹.

As primeiras quatro amostras são dos filmes bicamada utilizando o filme de PBAT puro obtido por extrusão como a primeira camada, a segunda camada foi eletrofiada sobre este filme com uma solução de PBAT puro, e soluções com 10, 20 e 50 mg g⁻¹ de nisina respectivamente. As outras três amostras são dos filmes bicamada onde a primeira e a segunda camada do filme possuem a mesma concentração de nisina, ou seja, na amostra 1%-10 mg g⁻¹, a primeira camada é do filme de PBAT/nisina 1% obtido por extrusão e a segunda camada foi eletrofiada sobre este filme com uma solução de PBAT com 10 mg g⁻¹ de nisina, e assim sucessivamente.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

As técnicas empregadas na caracterização dos filmes preparados neste trabalho assim como os equipamentos e condições utilizadas nas análises encontram-se descritas nesta seção do trabalho.

4.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier modo Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros de FTIR das matérias-primas e filmes foram obtidos através de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando um equipamento da marca Varian 640 IR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As medidas foram realizadas em modo de Refletância Total Atenuada (ATR), utilizando 40 scans. A região espectral investigada foi entre 3500-500 cm⁻¹, com uma resolução espectral de 4 cm⁻¹.

4.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molecular do PBAT antes e após o processamento foi avaliada por cromatografia de permeação em gel. A massa molecular média (M_n) e a distribuição das massas molares (M_w/M_n) foram determinadas em relação à padrões de poliestireno e foram realizadas utilizando um aparelho GPCMax VE2001 (Viscotek), equipado com

detector triplo acoplado (Índice de Refração, Viscosimétrico e Espalhamento de Luz) Viscotek TDA 302, com colunas de PS/PDVB. As amostras foram solubilizadas em THF e filtradas em filtros de PVDF com diâmetro de poros de 0,45 µm e analisadas a 45°C, utilizando THF como eluente a uma vazão de 1 mL min⁻¹.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia do agente antimicrobiano utilizado na preparação das amostras de PBAT/nisina foi examinada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando um microscópio JEOL modelo JEM-1200 EX II, operando em uma voltagem de 80 kV. Para a realização desta análise, foi preparada uma solução de nisina e acetona, deixada no ultrassom durante meia hora para completa dissolução, em seguida, uma gota desta solução foi depositada sobre uma grade de cobre de 300 mesh e posteriormente analisada.

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica capaz de produzir imagens de alta magnificação da superfície da amostra analisada¹⁶⁶.

A morfologia da nisina, dos filmes extrudados e dos filmes eletrofiados foram analisados através das imagens obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL modelo JSM 5800 (Tokyo, Japão), operando a uma voltagem de 10 kV. A superfície e secção transversal dos filmes foi analisada visando obter informações sobre a morfologia e dispersão do aditivo.

A nisina (pó) foi depositada diretamente sobre a fita condutora no suporte metálico. A morfologia dos filmes extrudados foi analisada nos cortes das seções transversais, estes, foram obtidos a partir da quebra dos materiais previamente congelados em N₂ líquido. As amostras foram acopladas na vertical aos suportes metálicos (stubs), de modo que as faces onde houve o corte do material (seções transversais) permanecessem para cima. A superfície dos filmes eletrofiados foi analisada e as amostras foram preparadas destacando uma parte deste filme, e então colocadas sobre os suportes metálicos. Todas as amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro, de modo a aumentar a condutividade elétrica.

O diâmetro médio das nanofibras foi determinado utilizando um software de análise de imagens (Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A avaliação da estabilidade térmica da nisina, dos filmes de PBAT e PBAT/nisina foi realizada utilizando um equipamento TA Instruments modelo TGA Q50 (New Castle, DE, USA). Para a realização da análise foram utilizadas em torno de 7,0 mg de amostra. As amostras foram submetidas a uma varredura de temperatura, a partir da temperatura ambiente 25°C até 800°C, a uma taxa de aquecimento de 20°C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). O teor inorgânico (resíduo a 600°C), juntamente com as temperaturas características de degradação $T_{10\%}$ e $T_{50\%}$, que são respectivamente a temperatura de decomposição inicial (para 10% de perda de massa) e a temperatura de máxima taxa de degradação (obtida a partir do pico da DTG) foram determinadas.

4.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise do comportamento térmico da nisina, dos filmes de PBAT e PBAT/nisina foi determinada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), utilizando um equipamento Thermal Analyst Instruments Q20 (New Castle, DE, USA). Para a realização das análises foram utilizadas em torno de 5,0 ± 0,3 mg de amostra. As amostras foram aquecidas de 25°C à 180°C, com isoterma de 2 minutos. As amostras foram então resfriadas até -50°C e aquecidas novamente até 200°C. Todas as corridas foram conduzidas a uma taxa de aquecimento de 20°C min⁻¹ e as análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). As medidas foram realizadas no primeiro resfriamento e no segundo ciclo de aquecimento, conforme norma ASTM D3418-08.

A partir dessas medidas foram avaliadas a temperatura de fusão (T_m), a temperatura de transição vítrea (T_g) dos materiais e a temperatura de cristalização (T_c). O grau de cristalinidade (X_c) dos materiais foi determinado a partir da seguinte relação:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{w \cdot \Delta H_m^0} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde ΔH_m é a entalpia de fusão (J g^{-1}) da amostra, w é a fração em massa do PBAT na amostra e ΔH_m^0 é a entalpia de fusão do polímero puro, para o PBAT ($\Delta H_m^0 = 114 \text{ J g}^{-1}$)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

4.3.7 Difração de Raios-X (DRX)

A investigação estrutural das amostras foi realizada utilizando um Difratorômetro Siemens D-500 (Siemens, Karlsruhe, Alemanha). Nisina em pó, os filmes de PBAT e PBAT/nisina foram analisados à temperatura ambiente no modo transmissão e a radiação incidente foi $\text{CuK}\alpha$ com filtro de comprimento de onda de $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Os dados foram coletados em uma faixa angular de (2θ) entre 1 a 35° e ângulo de passo de $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$ e tempo por ponto = 2s.

4.3.8 Determinação de Ângulo de Contato da Água (WCA - Water Contact Angle)

A superfície dos filmes foi analisada quanto ao seu caráter hidrofílico/hidrofóbico através de medidas de ângulo de contato da água (WCA), obtidas à temperatura ambiente, utilizando o método da gota sésil. Que consiste em depositar gentilmente uma gota (4 – 6 μL) de água deionizada sobre a superfície da amostra, utilizando uma microseringa e sua imagem é fotografada utilizando uma câmera CCD. A imagem é então exportada para o software SurftensTM 3.0, que calcula o valor do ângulo de contato, de acordo com os três pontos determinados pelo usuário.

O ângulo de contato é definido como o ângulo entre a superfície do substrato e a linha tangente do ponto de contato entre a gota e a superfície. Foram utilizadas cinco gotas, colocadas em lugares diferentes na superfície dos filmes. Os valores de WCA reportados são as médias de três medidas, realizadas em diferentes áreas de cada superfície. Os valores de WCA foram calculados utilizando o software Surftens v. 3.0.

4.3.9 Microscopia eletrônica confocal

A distribuição e a dispersão da nisina ao longo das nanofibras foi investigada, e para isso a nisina foi marcada com 2-(5'-isotiocianato-2'-hidroxifenil)benzoxazole¹⁷⁰, em solução de DMSO à temperatura ambiente, e as fibras foram depositadas sobre

lâminas de vidro. As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica confocal utilizando um microscópio Olympus Fluoview™ 1000 (Olympus® Inc., Tokyo, Japan). As imagens têm dimensões de 512 pixels, adquiridas com magnificação 40 x com a lente objetiva UPLSAPO a 405 nm. O software Olympus Fluoview Viewer Version 3.1. foi utilizado para a aquisição e processamento das imagens.

4.3.10 Perfilometria

A rugosidade da superfície dos filmes foi medida utilizando um perfilômetro Bruker Countor GT (Bruker Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA, USA). Foram realizadas cinco medidas para cada amostra e os resultados da rugosidade média quadrática (R_q), também conhecida por RMS, foram obtidos. A média das medidas de RMS foi calculada e os dados foram apresentados na forma de tabelas.

4.3.11 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

A análise dinâmico-mecânica tem sido amplamente utilizada como uma técnica de caracterização de polímeros através da detecção dos processos de relaxação, tanto macroscópico quanto molecular, pois apresenta grande sensibilidade. Esta técnica fornece informações a respeito do comportamento viscoelástico do sistema. Através desta análise torna-se possível relacionar propriedades macroscópicas (mecânicas, por exemplo), com as relaxações moleculares associadas a mudanças conformacionais e a deformações microscópicas geradas a partir de rearranjos moleculares. Esta análise consiste em aplicar no material uma tensão ou deformação de modo oscilatório de baixa amplitude com temperatura variada e medir a deformação ou a tensão resultante¹⁷¹.

As análises dinâmico-mecânicas foram conduzidas em um aparelho de DMA Q800 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Os testes foram realizados com amostras retangulares dos filmes, com dimensões aproximadas de 25 x 6 x 0,10 mm (comprimento x largura x espessura), e dispostos em suportes do tipo *cantilever*. As medidas foram realizadas com frequência de 1 Hz para todas as amostras, a faixa de temperatura investigada variou de -50°C até 100°C com taxa de aquecimento de 3°C min⁻¹.

4.3.12 Ensaio de Tração

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando um equipamento TA.XT *Plus* Texture Analyzer (Texture Technologies Corp and Stable Micro Systems, Hamilton, MA, USA). As amostras foram previamente ambientadas por 24 horas a $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ com umidade de $50\% \pm 5$ de acordo com a ASTM D-638. Os ensaios de tração foram realizados utilizando filmes com diâmetro de aproximadamente $50 \times 20 \times 0,10$ mm (comprimento x largura x espessura), e a resistência à tração (MPa), deformação na ruptura (%) e módulo elástico (MPa) dos filmes foi determinado, a partir de cinco replicatas para cada filme. A espessura dos filmes foi medida com um micrômetro digital Mitutoyo (modelo Digimatic caliper BD013913, Mitutoyo, Japan). Foram padronizadas 3 medidas em diferentes pontos de cada filme, e o valor médio foi utilizado para calcular as propriedades mecânicas das amostras.

4.3.13 Permeabilidade ao vapor de água

Esta técnica permite calcular a quantidade de água que passa por unidade de área, por unidade de tempo, no estado estacionário, sob as condições do ensaio¹⁷². O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água é calculado pela equação:

$$\text{PVA} = \frac{\text{TPVA}}{e} \cdot \left(\frac{\text{URe}}{100} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde PVA é a permeabilidade ao vapor de água, TPVA é a taxa de permeabilidade ao vapor de água ($\text{g água m}^{-2} \text{ dia}$), e é a espessura do material (μm) e URe é a umidade relativa.

A determinação da permeabilidade ao vapor de água dos filmes de PBAT e PBAT/nisina foi obtida utilizando PERMATRAN-W 3/33 (Mocon, MG), a $37,8^{\circ}\text{C}$ e 90% de umidade relativa, em duplicata, de acordo com ASTM F-1249. O detector utilizado foi um sensor infravermelho e o teste é encerrado automaticamente após estabilização na permeação. Os filmes apresentaram uma espessura média de 0,07 mm. O equipamento utilizado pertence à Braskem S/A.

4.3.14 Permeabilidade ao oxigênio

Este ensaio permite calcular a taxa de permeabilidade ao oxigênio, em outras palavras, o volume de oxigênio que passa por unidade de área, por unidade de tempo, de um material¹⁷². O coeficiente de permeabilidade ao oxigênio é calculado através da Equação 2, porém utiliza a taxa de permeabilidade ao oxigênio (cm^3 oxigênio m^{-2} dia).

A determinação da permeabilidade ao oxigênio dos filmes de PBAT e PBAT/nisina foi obtida utilizando um equipamento OX-TRAN 2/21 (Mocon, MH), a 23°C e 0% de umidade relativa, em duplicata, de acordo com ASTM F-1927. O detector utilizado é um sensor coulométrico de oxigênio. O teste é encerrado automaticamente após estabilização na permeação e utiliza ar sintético (20% O_2) como gás permeante. Os filmes apresentaram uma espessura média de 0,07 mm. O equipamento utilizado pertence à Braskem S/A.

4.3.15 Determinação das Propriedades Antimicrobianas dos Filmes

A atividade antimicrobiana dos filmes de PBAT/nisina, bem como dos filmes de PBAT sem nisina (utilizado como controle), foram testadas utilizando o ensaio de zonas de inibição em placas de ágar^{12, 88, 173}. Para a realização do ensaio, foram utilizadas amostras com 2 cm^2 que foram cortadas a partir dos filmes e colocados sobre a placa contendo ágar Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK). Cada amostra de filme foi exposta a luz UV por 15 min de cada lado para eliminar possíveis contaminações microbianas. Em seguida, 10 mL de ágar BHI semi sólido (7,5 g L^{-1}) inoculado com indicador *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (10^7 UFC mL^{-1}) foi vertido sobre as placas. Também foram testados os indicadores *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Clostridium perfringens* ATCC 3624 e *Bacillus cereus* ATCC 9634. As placas de petri foram armazenadas a 4°C durante 12 horas para dar início a dessorção da nisina e depois incubadas a 37°C por 24 horas. A resposta da atividade antimicrobiana é confirmada por zonas claras, ou seja, nenhum crescimento de micro-organismos ou de sobrevivência ao redor das amostras de filmes.

Todas as bactérias foram armazenadas a -20°C em 20% (v/v) de glicerol e propagados duas vezes em caldo BHI antes do uso. Todas as determinações foram feitas em triplicata ($n=3$).

4.3.16 Migração do Aditivo Antimicrobiano

A migração da nisina a partir dos filmes das embalagens foi testada em três soluções simulantes¹⁷⁴: água destilada, solução salina com 5% (v/v) de Tween 20 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e solução de ácido acético 3% (v/v) (Dinamica Ltda, Diadema, Brasil). Cada amostra de filme (0,30 g) foi imersa em 3 mL das diferentes soluções simulantes para avaliar a possibilidade de migração do aditivo antimicrobiano. Estas soluções permaneceram em agitador orbital a 150 rpm e 25°C. Após 4, 24 e 48 horas, alíquotas foram removidas para determinação da atividade antimicrobiana em placas de ágar BHI previamente inoculadas com swab estéril submerso em suspensão da cultura indicadora (*L. monocytogenes* ATCC 7644), que correspondeu a aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹. A atividade foi definida como o valor recíproco da última diluição que apresentar zona de inibição e foi expressa em unidades de atividade por mililitro (UA mL⁻¹)¹⁷³.

4.3.17 Determinação do pH e condutividade das soluções de electrospinning

As medidas de pH das soluções foram realizadas em temperatura ambiente (22 a 25°C) utilizando um pHmetro digital QUIMIS, com um eletrodo de vidro combinado. O pHmetro foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. As análises foram conduzidas em triplicata. As medidas de condutividade foram realizadas utilizando um condutivímetro de bancada microprocessado Bel Engineering srl, modelo W12D, previamente calibrado com solução padrão. As análises foram realizadas em temperatura ambiente 25°C ± 3.0°C e em duplicata.

4.3.18 Determinação da viscosidade

Na determinação das viscosidades nas diferentes soluções poliméricas preparadas para o processo de eletrofiação, foi utilizado um viscosímetro Digital Brookfield modelo (HB DV-II). Em função da viscosidade da solução obtida foi utilizado o Spindle de referência S51. Um medidor de temperatura foi acoplado ao viscosímetro, permitindo assim mensurar a temperatura das soluções, que se mantiveram em 25,0 ou 26,0°C. O volume de amostra utilizado foi de aproximadamente 2,0 mL, com velocidade inicial de 50 rpm e torque variando de 18,0 a 24,0% para cada

amostra respectivamente. Os valores de viscosidade reportados neste trabalho referem-se aos valores médios, obtidos em duplicata.

4.4 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DOS FILMES ATIVOS OBTIDOS POR EXTRUSÃO

O estudo de biodegradação do PBAT e PBAT/nisina em solo e em condições reais de compostagem foi realizado na localidade de Bom Jesus II, no 2º distrito de São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul – RS. As coordenadas geográficas do local são especificadas como, 31º 21' 46'' Sul e 51º 58' 44'' Oeste. A altitude de São Lourenço do Sul é 8 m, e o clima é subtropical úmido. A biodegradação destes materiais em solo foi testada durante seis meses (Maio de 2014 a Outubro de 2014), adaptado a ASTM G-160¹⁷⁵. As condições climáticas, temperatura ambiente (média, máxima e mínima) e o total de precipitação durante o período do ensaio, foram adquiridos através do monitoramento dos boletins climatológicos mensais da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater) de São Lourenço do Sul e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Clima Temperado de Pelotas – RS.

4.4.1 Preparo do solo

A biodegradação dos filmes ativos foi avaliada em condições definidas de compostagem. A compostagem é um processo no qual os materiais biodegradáveis são decompostos e transformados por micro-organismos em substâncias, tais como húmus chamado de composto, CO₂, água e minerais²⁷.

O solo foi preparado misturando-se partes iguais de solo fértil com baixo teor de argila (ou nenhum), areia seca e esterco de cavalo seco ao sol por 4 dias. Foram misturados aproximadamente 10,0 Kg de solo, 10,0 Kg de areia e 10,0 Kg de esterco de cavalo. A mistura deste composto foi armazenada em saco plástico por três meses, e o pH deste composto foi acompanhado num intervalo de 14 dias de maneira que o pH mantivesse valores entre 6,5 – 7,5.

4.4.2 Ensaio de biodegradação

Para o ensaio de biodegradação, as amostras foram preparadas utilizando o processamento no estado fundido, conforme descrito anteriormente na seção 4.2.2. As amostras utilizadas no ensaio apresentaram dimensões de 10 x 10 cm, com espessura de aproximadamente 0,07 mm.

Para a realização do ensaio, foi preparado um canteiro com 25 cm de profundidade, onde as amostras foram armazenadas e devidamente identificadas (Figura 19). Cada amostra foi identificada com uma estaca de madeira, de maneira que facilitasse a sua identificação e localização na hora da coleta. Dessa mesma forma, cada mês de análise também foi identificado com uma respectiva estaca de madeira e devidamente numerado. As amostras foram enterradas com a mistura do composto, e retiradas após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, para análise de biodegradação. Foram enterradas 6 amostras, dentre elas o filme de PBAT puro utilizado como controle, e filmes de PBAT com 0,5, 1, 2, 3 e 5% de concentração de nisina, identificadas com as estacas de madeira com os números 1 até 6, respectivamente.

Após serem retiradas do solo, as amostras foram cuidadosamente armazenadas em papel alumínio e levadas para o laboratório K-208A, Instituto de Química da UFRGS para posterior tratamento. Antes das análises, todas as amostras foram cuidadosamente lavadas com água destilada em ultrassom UltraSonic Cleaner Thornton, por 1 min e secas com papel filtro para retirar o excesso de água, e então armazenadas em dessecador por 5 dias para completa retirada da umidade.



Figura 19. Fotografia ilustrando o ensaio de biodegradação no solo: a) Preparo do canteiro e (b) Disposição final das amostras no canteiro preparado para 6 meses de ensaio de biodegradação.

4.4.3 Análise das amostras

O potencial de biodegradação dos filmes ativos obtidos pela técnica de extrusão foi avaliado a partir de diversas técnicas de caracterização. Em intervalos de tempo determinados (30 dias), as amostras foram desenterradas e analisadas em respeito ao seu aspecto visual, a fim de verificar a evolução da biodegradação dos filmes.

Além disso, as amostras foram analisadas também utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), cromatografia de permeação em gel (GPC) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), já descritas anteriormente, na seção 4.3. Estas amostras foram submetidas à análise de IR utilizando o modo refletância total atenuada (ATR) antes e depois da degradação, a fim de obter as variações no espectro de infravermelho das amostras antes e depois do período de degradação.

Além disso, a análise de massa residual em % dos filmes, registrada antes e após o ensaio de biodegradação também foi realizado, para isso, utilizou-se a Equação 3.

$$Mr = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} * 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Onde M_r é a massa residual (%), m_i é a massa inicial da amostra, antes da biodegradação (g) e m_f é a massa final da amostra, após o ensaio de biodegradação (g).

4.4.4 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos do período do ensaio a partir de Maio de 2014 a Outubro de 2014 estão apresentados na Figura 20 e na Tabela 3. As temperaturas médias dos meses de Maio a Outubro foram 15,7°C, 20,5°C e 11,2°C respectivamente, enquanto que a precipitação total variou de 39,6 mm a 68,3 mm.

Tabela 3. Condições climáticas para o período de Maio a Outubro de 2014.

Mês	Temperatura do ar (°C)			Temperatura do solo a 5 cm	Chuva (mm)		Umidade relativa (%)	Velocidade do vento (km/h)		Direção do vento
	Média	Máxima	Mínima		Média	Máxima		Média	Máxima	
Maio	15,3	20,3	11,8	15,9	2,9	39,6	87,8	3,8	22,5	NNW
Junho	14	18,3	10,7	13,8	5,2	45,9	88,4	6,1	25,7	NNW
Julho	14,3	19,4	10,9	14,3	6,6	42,2	88,1	4,7	26,1	SE
Agosto	14,5	20,1	10,1	14,8	2,6	20,1	82,3	6,9	28,9	SE
Setembro	16,5	20,9	12,8	17,1	6	63,5	86,8	9,5	35,5	SSE
Outubro	19,4	24,2	15,9	21,3	6,9	68,3	85,1	9,6	33,1	SE

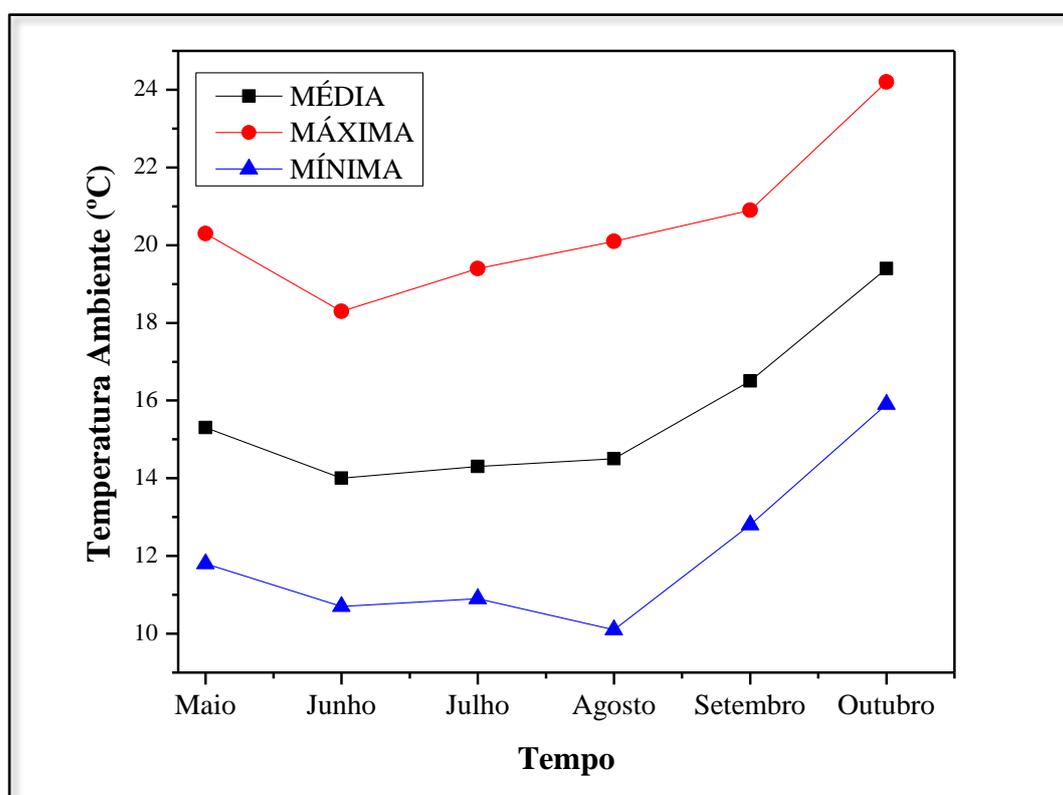


Figura 20. Dados das temperaturas ambientes (°C) para o período de Maio a Outubro de 2014.

Os padrões ou ensaios de biodegradação reportados na literatura são geralmente realizados em temperaturas elevadas em condições de compostagem controladas, tais como a metodologia mencionada na ASTM D-5338, que foi especificada a 58°C^{27, 28, 176}. No entanto, sabe-se que plásticos tem maior probabilidade de serem utilizados e descartados em condições mesofílicas ao invés de compostos com temperaturas relativamente elevadas¹⁷⁷. A temperatura ambiente média neste trabalho variou entre

10,1°C e 24,2°C. A Figura 21 apresenta a precipitação no período de realização do ensaio de biodegradação.

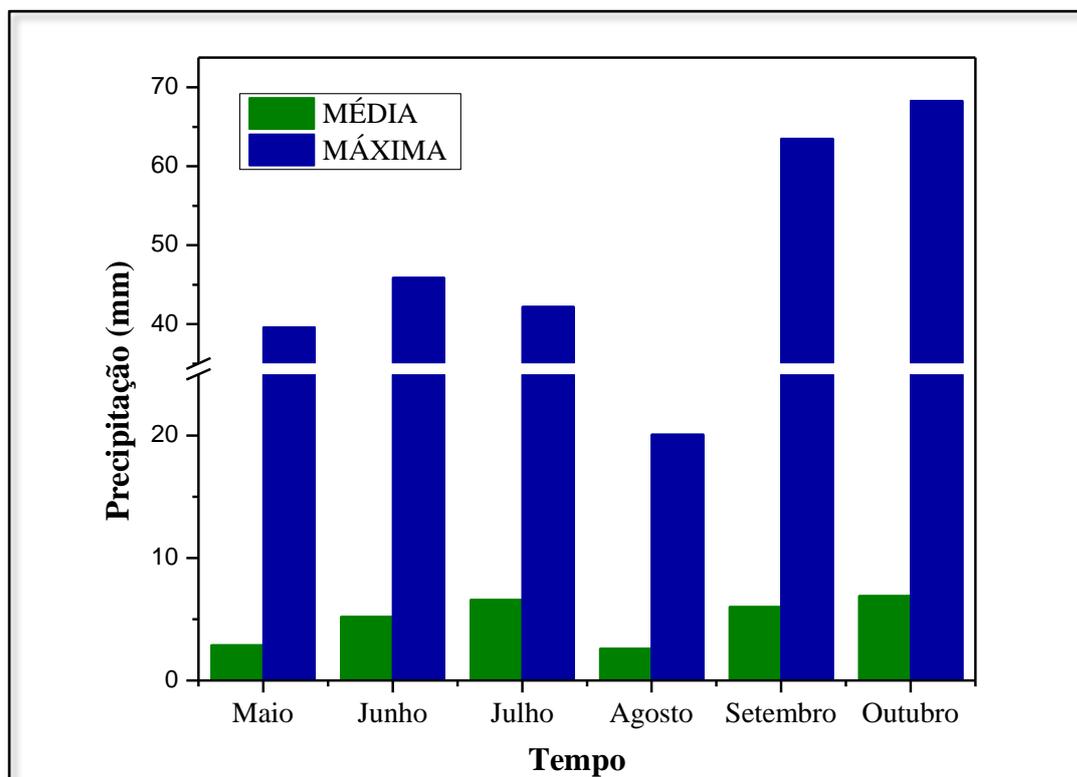


Figura 21. Dados de precipitação no período de Maio a Outubro de 2014.

4.5 DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA

Os filmes de PBAT e PBAT/nisina foram investigados quanto à degradação hidrolítica. A degradação das amostras foi analisada em duas condições, as quais constituíram testes de degradação hidrolítica ácida e básica. As amostras permaneceram imersas nestas soluções durante um período total de 30 dias.

Foram analisadas quatro amostras de filmes extrudados: PBAT puro, 0,5%, 2% e 5% de nisina. Os testes foram realizados em duplicata e à temperatura ambiente.

4.5.1 Degradação hidrolítica - meio ácido

Para a realização do ensaio, foram utilizados pequenos pedaços de amostras com igual tamanho e espessura, de aproximadamente 2 cm² e 0,10 mm, respectivamente, que foram cortadas a partir dos filmes extrudados. Estas amostras foram secas previamente em estufa à vácuo a 40°C durante 12 horas. Em seguida, cada amostra foi colocada em

frasco de vidro e este, foi preenchido com o mesmo volume de solução (5 mL) para cada sistema. A degradação hidrolítica em meio ácido foi realizada em solução de HCl 5%, com pH de 1,12. O ensaio foi realizado em um banho com recirculação de óleo de silicone (Figura 22), e mantido a temperatura ambiente. As amostras permaneceram imersas nesta solução durante o período total de 30 dias. Após a degradação, as amostras foram retiradas da solução durante o tempo pré-determinado (a cada 5 dias), lavadas com água destilada e secas em estufa à vácuo a 40°C por 12 horas. A perda de massa das amostras (M_r) foi calculada a partir da Equação 3. Todas as amostras foram secas e pesadas (m_i) antes do experimento.

4.5.2 Degradação hidrolítica - meio básico

Foram utilizadas amostras com as mesmas dimensões especificadas para a degradação ácida. As amostras foram previamente secas em estufa à vácuo a 40°C por 12 horas e então colocadas nos frascos de vidro. Cada frasco de vidro foi preenchido com o mesmo volume de solução padrão de NaOH 0,01 mol/L com pH de 13. O experimento foi realizado em um banho com recirculação de óleo de silicone (Figura 22), e mantido a temperatura 60°C. As amostras foram retiradas da solução com intervalos de 5 dias, lavadas com água destilada e secas em estufa à vácuo a 40°C por 12 horas, a perda de massa foi monitorada a partir da Equação 3.



Figura 22. Degradação hidrolítica: a) Banho com recirculação utilizado para realização do experimento e b) disposição dos frascos dentro do banho durante o período do ensaio.

4.6 DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA *in vitro* PARA OS FILMES DE PBAT

Para a realização do ensaio, foram utilizados pequenos pedaços de amostras de igual tamanho e espessura (2,0 cm² e 0,10 mm), respectivamente, que foram cortadas a partir dos filmes extrudados. Cada amostra de filme foi exposta a luz UV por 15 min de cada lado para eliminar possíveis contaminações microbianas. Uma solução de esporos de *Aspergillus niger* (10⁶ esporos/mL) foi inoculada nas superfícies de placas de Petri contendo de 3 a 6 mm de profundidade com meio de cultura (ágar batata dextrose (PDA) e ágar ágar). Os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina foram colocados na superfície dos meios de cultura e incubados em estufa a 30°C por 30 dias¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. O experimento foi feito em duplicata e a quantidade de meio de cultura não foi alterada no decorrer do experimento.

A incubação em meio líquido dos filmes de PBAT foi realizada em caldo batata dextrose (PDB). As amostras foram acomodadas em tubos de ensaio contendo 30 mL de solução salina 0,85% NaCl e PDB inoculados com esporos de *Aspergillus niger* (10⁶ esporos/mL). Os tubos foram colocados em uma incubadora termostatizada de agitação orbital, e mantidos a 37°C por 30 dias, a uma rotação de 120 rpm. Em intervalos de tempo de 7 dias as amostras foram observadas. Ao final do experimento, os filmes foram retirados dos respectivos meios e lavados várias vezes com água destilada, até que todo o material fúngico visível fosse retirado e, então, secas em estufa a 40°C por 5 horas.

4.6.1 Variação de cor

A avaliação da variação de cor nas amostras foi realizada utilizando um colorímetro Guide 45/0 (BYK Gardner Spectro-Guide Gloss 45/0 Spectrophotometer). As medidas foram feitas na escala CIELAB, que se apoia num modelo proposto pela "Commission Internationale de l'Eclairage" autoridade internacional em luz, iluminação, cor e diagrama. O CIELAB é uma escala que pode ser utilizada para especificar a mudança da coloração e/ou tolerância do material^{181, 182}. Onde as coordenadas representam: ΔE (diferença de cor), L^* (luminosidade na escala a partir de 0 para preto a 100 para branco), sendo, o eixo $L^*=100/L^*=0$ que indica a variação da cor mais clara ou mais escura (branco/preto e/ou mais opaco/menos opaco). a^* (razão entre o verde e vermelho, assumindo valores positivos (+ a^*) para o vermelho e negativos (- a^*) para o

verde). b^* (razão entre amarelo e azul, assumindo valores positivos ($+b^*$) para o amarelo, e negativos ($-b^*$) para o azul). A direção da diferença de cor é descrita pela magnitude e sinal algébrico destes componentes (Figura 23). O colorímetro foi calibrado com uma placa padrão branco, fornecida pelo fabricante. As medidas foram realizadas de acordo com a ASTM D-2457 e E-313, em pelo menos cinco posições selecionadas aleatoriamente para cada amostra. A área exposta foi suficientemente grande em relação à área iluminada para evitar qualquer efeito de intercepção da luz.

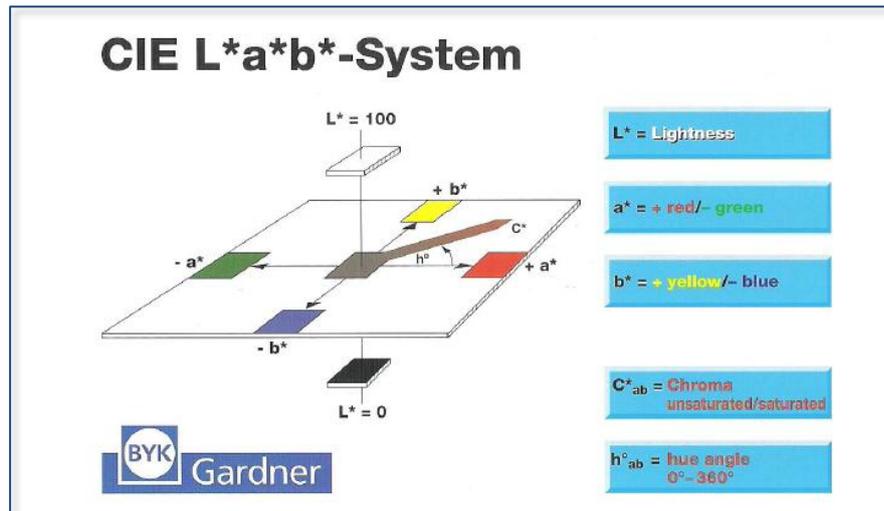


Figura 23. Variação da cor nas coordenadas L^* , a^* , b^* .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados das análises experimentais realizadas neste trabalho.

Esta seção encontra-se dividida em quatro partes. Primeiramente será apresentada uma breve caracterização da matriz polimérica e do aditivo utilizado. Em seguida, serão apresentados resultados referentes à caracterização dos filmes de PBAT com diferentes concentrações de nisina obtidos pelo processamento no estado fundido. Posteriormente, será feita a avaliação dos filmes de PBAT e PBAT/nisina obtidos pela técnica de eletrofiação. Por fim, serão apresentados os resultados para os filmes bicamada.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ POLIMÉRICA

O polímero puro poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) foi caracterizado através das análises de FTIR e GPC (antes e após o processamento no estado fundido), para melhor esclarecimento do tipo de material que estava sendo utilizado e se o método utilizado para o preparo das amostras afetou a estrutura final do polímero.

Os espectros de FTIR para o PBAT antes e após o processamento estão apresentados na Figura 24. A comparação entre os dois materiais foi feita para verificar a influência do processamento na estrutura do polímero. É importante ressaltar que empregou-se a menor temperatura possível para o processamento, visando manter a atividade antimicrobiana do aditivo utilizado (nisina), bem como, a preocupação em manter as propriedades do polímero utilizado.

Sabe-se que muitos mecanismos de degradação do PBAT podem ocorrer dependendo das condições do processamento^{168, 183}, por exemplo, temperaturas muito altas e tempo de residência muito longo do material no interior da extrusora podem levar a hidrólise da ligação éster, mecanismos de degradação hidrolítica que ocorrem aleatoriamente no polímero¹⁶⁷. A literatura reporta que nenhuma modificação significativa na cadeia do PBAT é esperada em temperaturas de processamento até 200°C³, sendo evidenciado que a degradação é mais pronunciada em temperaturas que variam de 270-360°C¹⁸⁴. Al-Itry *et al.*¹⁶⁷ desenvolveram blendas de PLA/PBAT utilizando temperaturas na faixa de 140 a 180°C, temperaturas de processamento muito

diferentes das que foram aplicadas neste trabalho. Mesmo utilizando temperaturas tão elevadas para processar o PBAT, estes autores identificaram as mesmas bandas de FTIR, sem nenhuma mudança na estrutura do PBAT, indicando a sua elevada estabilidade térmica e processabilidade¹⁸³.

Neste trabalho, os espectros de FTIR revelaram que o PBAT antes e após o processamento exibiram as mesmas bandas características, mostrando que os parâmetros de processamento não afetaram a estrutura química do polímero. O PBAT processado e o PBAT não processado apresentaram uma banda aguda em 726 cm^{-1} , referente às vibrações dos quatro ou mais grupos metileno adjacentes ($-\text{CH}_2-$) da estrutura do polímero. Uma banda na região de 1266 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O das ligações éster. A mais intensa de todas as bandas aparece na região de 1710 cm^{-1} , uma banda característica dos grupos carbonila C=O na ligação éster. Uma banda na região de 3000 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H das frações aromáticas e alifáticas.

Espectros similares de PBAT foram reportados por Brandelero *et al.*¹⁸⁵, que determinaram a presença de uma banda na região de 1708 cm^{-1} associada ao estiramento do grupo carbonila, e verificaram ainda, um estiramento entre 1020 e 880 cm^{-1} associado à presença do anel benzênico substituído.

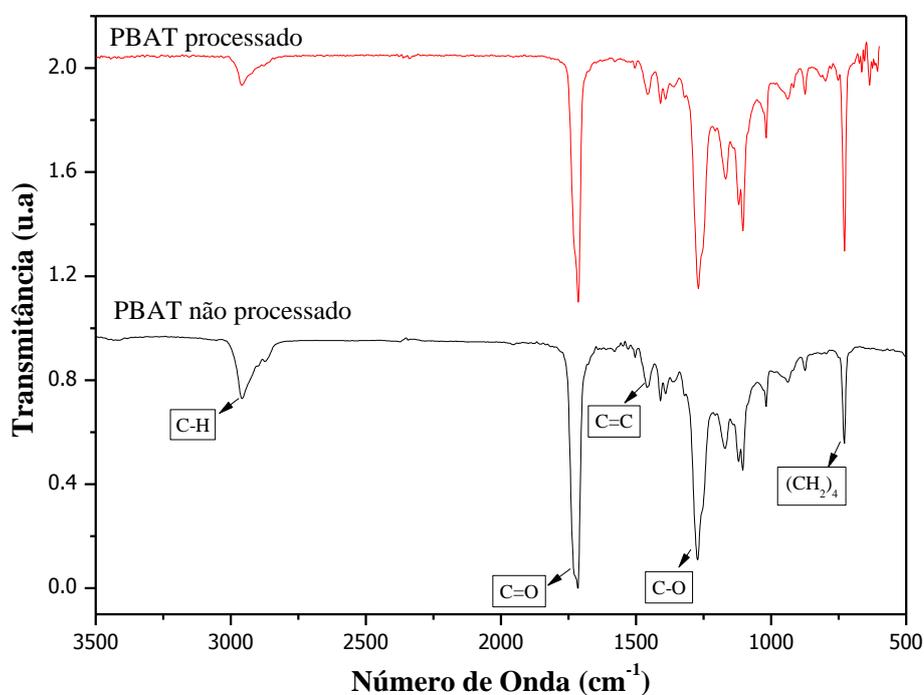


Figura 24. Espectros de FTIR para o PBAT antes e após o processamento.

A análise de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) foi utilizada para caracterizar o PBAT antes e após o processamento, a fim de verificar a massa molar do polímero utilizado e se houve diferença nos valores de massa molecular numérica média (M_n) e na polidispersidade (PDI) devido à extrusão do PBAT, uma vez que estes valores podem sofrer variações de acordo com o método de processamento utilizado.

As massas molares numéricas médias do PBAT antes e após o processamento estão apresentadas na Tabela 4. Os polímeros não apresentam um valor definido de massa e sim um valor médio com sua respectiva distribuição. Isto ocorre porque geralmente as reações de polimerização se desenvolvem de forma que no final da reação, as cadeias poliméricas não apresentam os mesmos tamanhos. Usualmente utilizamos três tipos de massas molares médias para polímeros¹⁸⁶. Massa Molecular Média (M_n), que relaciona a massa total de todas as moléculas presentes divididas pelo número total de moléculas. A Massa Molecular Ponderal Média (M_w), utilizada quando as moléculas maiores contribuem mais para a massa total do polímero. E a Massa Molar Média (M_z), que é utilizada quando se pretende valorizar ainda mais o efeito das frações de massa molar mais alta.

Tabela 4. Valores de massa molar média (M_n) e ponderal (M_w) para o PBAT antes e após o processamento.

Tipo de Massa Molar	PBAT não processado	PBAT processado
M_n (g mol ⁻¹)	15.700	15.700
M_w (g mol ⁻¹)	36.670	37.240
M_w/M_n	2,5	2,4

O PBAT utilizado como recebido (não processado), apresentou massa molar média (M_n) de 15.700 e polidispersidade PDI (M_w/M_n) de 2,5. A massa molar do PBAT processado apresentou M_n de 15.700 e PDI de 2,4. Estes resultados corroboram com a literatura e sugerem uma alta estabilidade térmica e boa processabilidade do polímero^{167, 183}, uma vez que não foram observadas mudanças na estrutura do polímero após o processamento no estado fundido.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ADITIVO

O aditivo utilizado na preparação dos filmes de PBAT/nisina foi investigado através de FTIR-ATR, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), e microscopia eletrônica de varredura (MEV), para melhor esclarecimento da sua estrutura e morfologia.

A preparação comercial da nisina (Nisaplin[®]) contém NaCl, sólidos lácteos e umidade na sua formulação¹⁸⁷. Neste contexto, o espectro de FTIR da Nisaplin[®] (Figura 25) apresenta uma banda intensa e larga em 3395 cm⁻¹, devido ao estiramento OH dos grupos COOH, uma banda em 2970 cm⁻¹, que pode estar atribuída ao estiramento C-H. Outra banda intensa pode ser observada em 1640 cm⁻¹, associada ao grupo amida, e a banda em 1124 cm⁻¹ pode ser atribuída ao grupo OH. Espectros de infravermelho muito similares para a nisina, com uma banda adicional em 1527 cm⁻¹ associadas às vibrações das amins primárias, têm sido previamente reportados^{95, 188}. Este resultado pode ser comparado com a preparação da nisina comercial que apresenta a maior banda em 3420 e 1634 cm⁻¹. A absorção nesta primeira área indica o estiramento das ligações (O-H) e (N-H) e o espectro na região de 1720-1589 cm⁻¹ está atribuído às bandas de amida^{185, 189}.

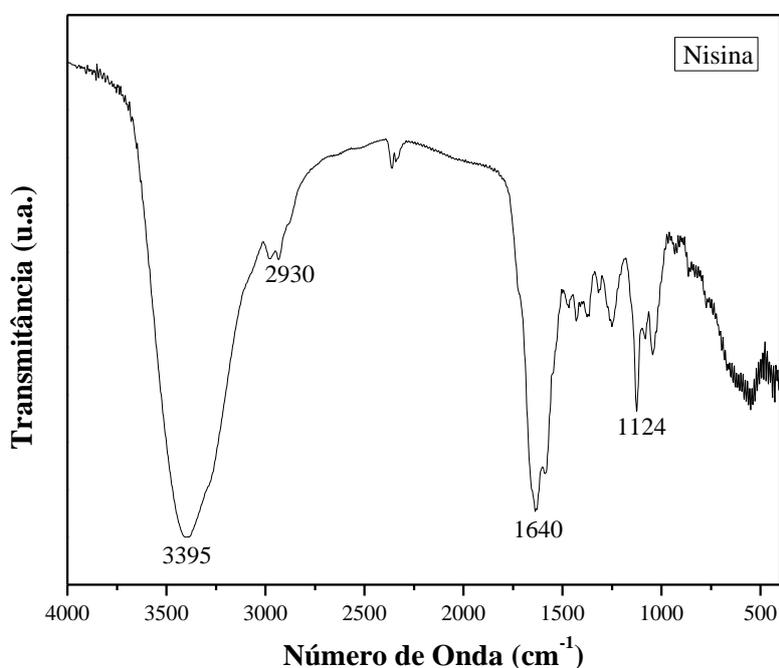


Figura 25. Espectro de FTIR para a Nisaplin[®].

A morfologia da Nisaplin[®] foi analisada por TEM (Fig. 26) e MEV (Fig. 27).

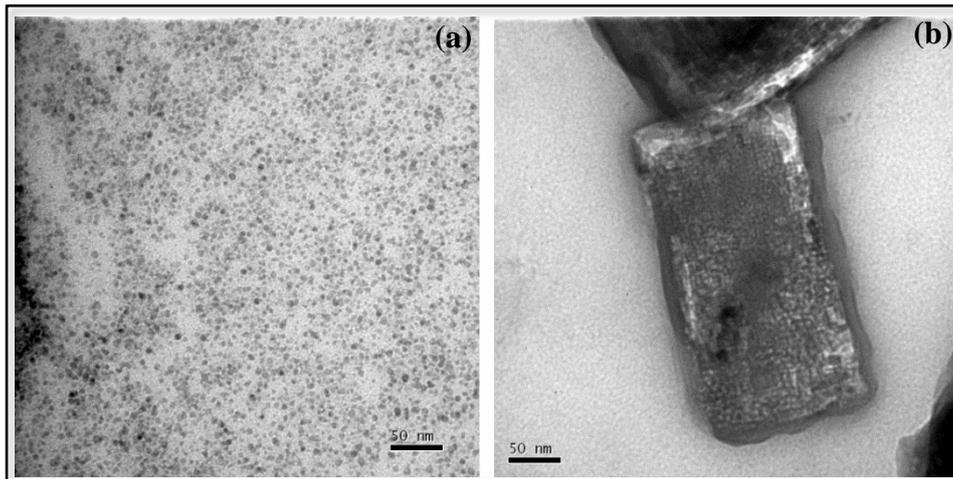


Figura 26. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para a Nisaplin[®] em solução: (a) dispersão da Nisaplin[®] em solução, (b) cristal de NaCl presente na Nisaplin[®].

Foi possível observar boa dispersão da nisina em solução e de forma homogênea (Fig. 26a). Além disso, a bacteriocina apresenta morfologia com geometria retangular, provavelmente decorrente da presença de NaCl em sua formulação (Fig. 26b). Esta morfologia pode ser comprovada pelas micrografias de MEV (Fig. 27).

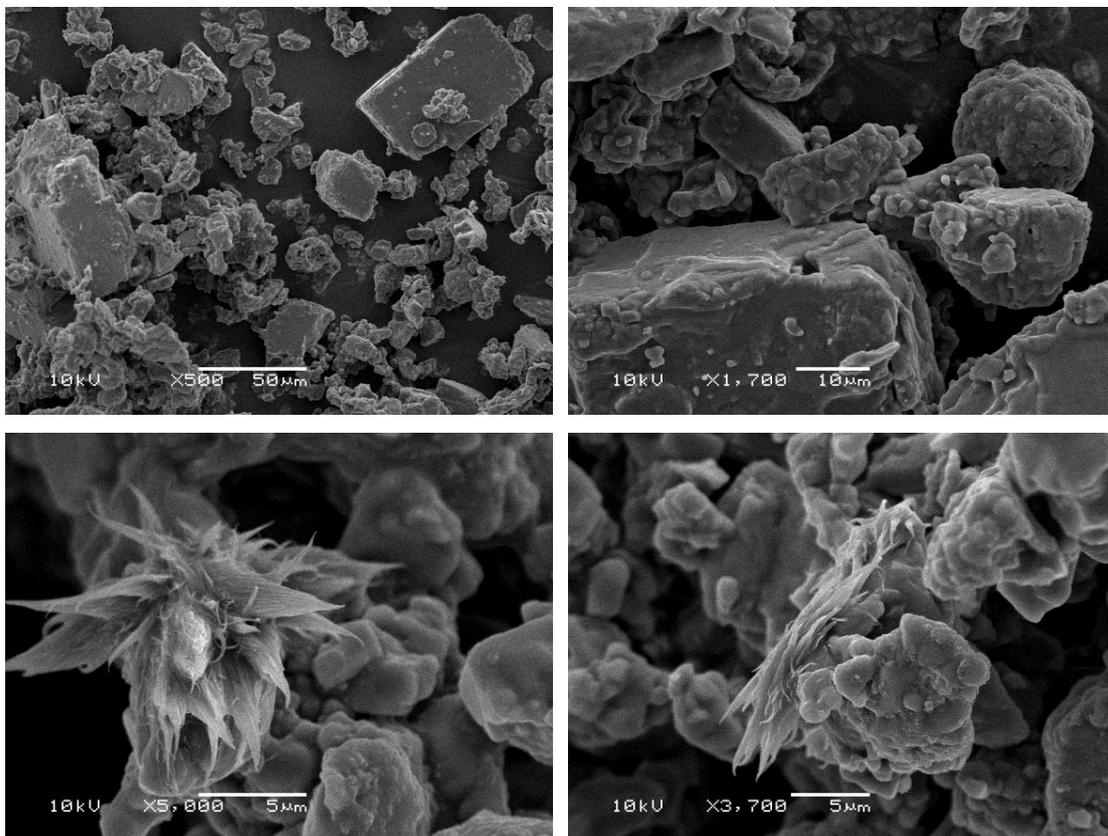


Figura 27. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para a Nisaplin[®] em pó.

As micrografias de MEV mostraram que a Nisaplin[®] apresentou vários agregados resultantes da aproximação de partículas do aditivo, irregulares, retangulares, globulares e na forma de cristais e/ou flores (Fig. 27). Corroborando com as imagens de MET (Fig. 26). Esta morfologia pode ser decorrente dos componentes presentes na nisina, uma vez que a preparação comercial desta bacteriocina contém 50% (em peso) de cloreto de sódio, proteínas de leite, carboidratos, dispersos em outros componentes⁷⁸ em sua formulação. Neste contexto, neste trabalho, para se referir ao aditivo antimicrobiano Nisaplin[®], será utilizada a nomenclatura de nisina.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PBAT E PBAT/NISINA OBTIDOS PELO PROCESSAMENTO NO ESTADO FUNDIDO

Os filmes extrudados de PBAT e PBAT/nisina com as diferentes concentrações do aditivo antimicrobiano foram analisados por FTIR-ATR e estão apresentados na Figura 28.

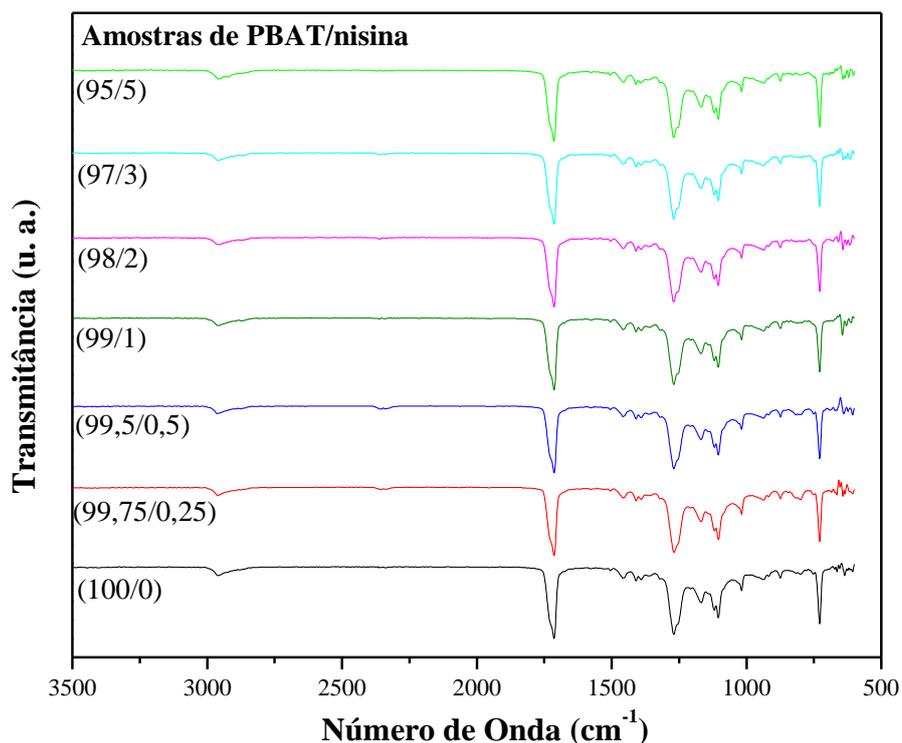


Figura 28. Espectros de FTIR-ATR para os filmes extrudados de PBAT e PBAT/nisina.

Os espectros de FTIR-ATR dos filmes de PBAT e PBAT/nisina foram muito semelhantes aos espectros do PBAT puro antes do processamento (Fig. 24), não apresentando alterações significativas na estrutura molecular das amostras durante o

processamento, e nenhuma alteração com a adição da nisina. Conforme esperado, a incorporação física da nisina na matriz do polímero não altera a estrutura química do PBAT, uma vez que não houve alterações na intensidade ou deslocamentos das bandas, mesmo para as amostras com maiores concentrações de nisina (5% nisina). Comportamento semelhante foi reportado por Scaffaro *et al.*¹⁹⁰ que apresentaram espectros de FTIR similares com aqueles obtidos para a matriz do polímero puro. Os autores também afirmaram que nenhuma banda específica associada à presença da nisina foi observada nos espectros. Em geral, uma das atribuições mais importantes observadas no espectro de FTIR para os filmes de PBAT/nisina foi a presença da banda próximo de 1720 cm^{-1} , atribuída ao grupo carbonila, que é característica de éster do PBAT. Outra banda característica de éster foi observada próximo a 1200 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-O, que geralmente aparece um pouco mais larga.

A morfologia dos filmes de PBAT e PBAT/nisina e sua respectiva superfície da seção transversal podem ser visualizadas na Figura 29. Como esperado, a morfologia da seção transversal do filme de PBAT puro (sem nisina) é homogênea e sem características granulares, enquanto partículas visíveis de nisina são visualizadas nos filmes contendo maiores concentrações do aditivo antimicrobiano (Fig. 29c-h). Neste contexto, à medida que a concentração de nisina aumenta na matriz do polímero, partículas desta substância antimicrobiana foram observadas, possivelmente devido à sua agregação parcial e migração para a superfície do filme. Meira *et al.*⁸⁸ reportaram um comportamento similar durante a preparação de nanocompósitos de polipropileno/montmorilonita contendo nisina.

Além disso, pequenos poros foram observados nos filmes com 2, 3 e 5% de nisina (Fig. 29 e-g). Estes poros observados na seção transversal da matriz do polímero foram criados provavelmente pelo ar que aderiu na superfície irregular das partículas do sal. O ar foi separado a partir do transporte durante a extrusão, formando bolhas sob pressão pela rotação da rosca da extrusora, e em seguida, escapando, e deixando espaços vazios⁸⁷. Fissuras, cavidades, cortes, flexões de cisalhamento tem sido identificados como importantes processos de dissipação de energia envolvidos na fratura de polímeros mais resistentes e/ou mais enrijecidos. Visto que o PBAT tem diferentes propriedades elásticas, comparado com outros polímeros, as partículas de PBAT podem atuar como concentradores de tensão sob pressão³⁰.

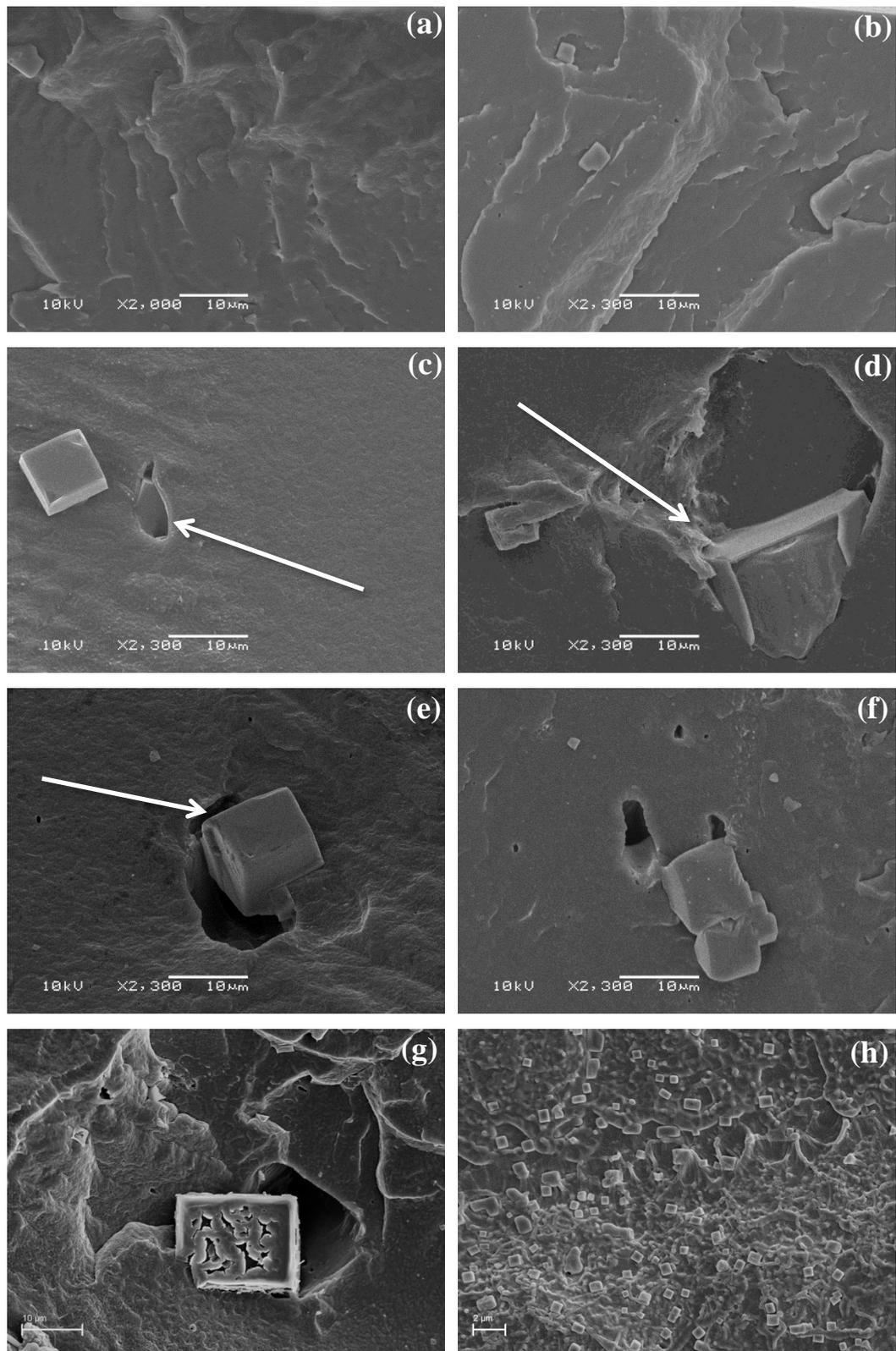


Figura 29. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina: (a) filme de PBAT puro, (b) 99,75/0,25%, (c) 99,5/0,5%, (d) 99/1%, (e) 98/2%, (f) 97/3%, (g) e (h) 95/5% de nisina.

Li *et al.*¹⁵⁷ também observaram pequenos orifícios e lacunas em seu estudo, e afirmaram que estes foram gerados durante o processo de extrusão do material. Liu *et al.*⁸⁷ investigaram poli(ácido láctico) e nisaplin na presença de plastificantes e a morfologia destas amostras revelou que as micropartículas foram uniformemente incorporadas na fase contínua e a incorporação da nisina também criou pequenos poros. Alguns componentes da nisina sensíveis ao calor podem ter degradado e “evaporado” em temperaturas mais altas e sob uma pressão mais elevada durante a extrusão; por consequência, poros foram criados e partículas segregadas. Bastarrachea *et al.*¹³ observaram uma morfologia muito similar com os filmes de PBAT/nisina, e relataram que a formação de vazios e poros na matriz do polímero é causada pela separação das cadeias do polímero, e este fenômeno ocorre geralmente em materiais amorfos.

Com relação à dispersão da nisina, esta parece ter sido homogênea e sua presença pôde ser observada em toda a superfície do filme e bem dispersa ao longo da matriz do polímero, partículas pequenas estão dispersas por toda a superfície (Fig. 29h). Além disso, a nisina encontra-se bem difundida na matriz do polímero (Fig. 29c, d, e), apontada pelas setas, estas partículas maiores que podem ser observadas através da análise de MEV possivelmente são partículas de NaCl, presentes na formulação comercial da nisina. A caracterização morfológica pode ser útil para explicar as interações entre a matriz do polímero e o aditivo, além do comportamento térmico e mecânico dos compostos resultantes.

A estabilidade térmica do filme de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina pode ser visualizada na Figura 30. O PBAT puro não sofre degradação quando aquecido até uma temperatura de 285°C. Este polímero começa a sua degradação/decomposição em torno de 320°C e termina em torno de 490°C, apresentando mais de 90% de perda de massa. A temperatura de decomposição máxima desse polímero pode ser indicada pelo ponto máximo da curva obtida pela derivada da massa, que foi de 415°C (Anexo 1, Fig. 80). A curva de TGA para a nisina está apresentada em anexo (Anexo 2, Fig. 81).

As curvas de TGA mostraram um comportamento de degradação muito similar para todas as amostras, além disso, evidenciaram que o aumento na concentração de nisina na matriz do polímero melhorou a estabilidade térmica da amostra com o maior teor do aditivo (amostra 95/5). Todas as amostras iniciam a etapa de degradação em torno de 320°C. As curvas de DTG para os filmes estão apresentadas em anexo (Anexo 3, Fig. 82).

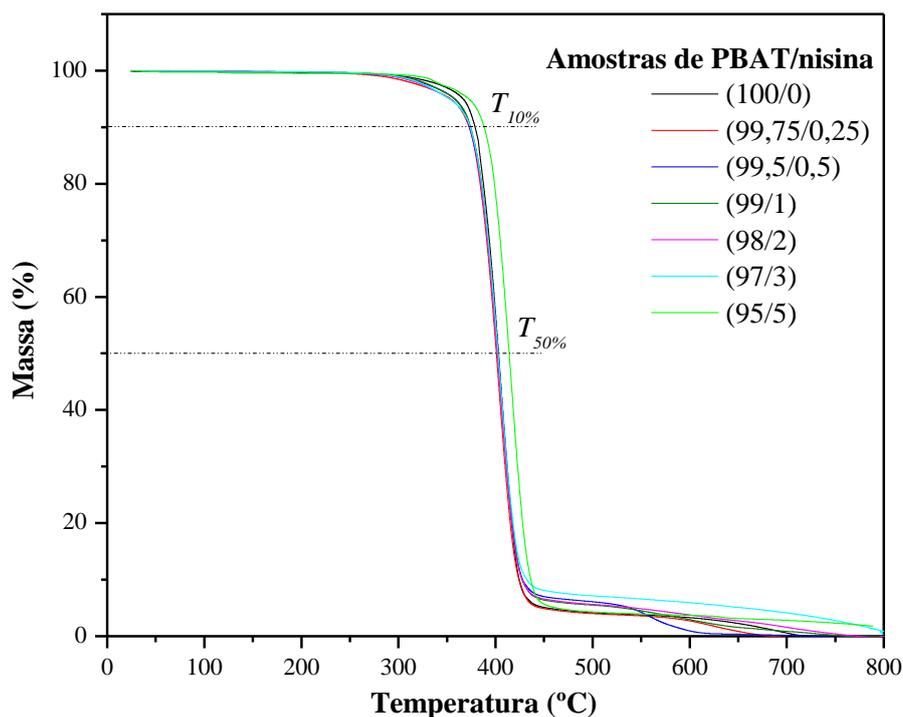


Figura 30. Curvas de TGA para o filme de PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina.

A Tabela 5 apresenta as temperaturas de decomposição características $T_{10\%}$ e $T_{50\%}$ correspondendo respectivamente, a temperatura de decomposição inicial (10% de degradação) e a temperatura na qual a taxa de degradação é máxima. O teor inorgânico real, medido como resíduo resultante a 600°C, também é apresentado.

Os filmes de PBAT/nisina mostraram temperatura de decomposição muito semelhante, mesmo com maiores concentrações de nisina, e esta temperatura permaneceu constante em torno de 374°C (Tabela 5). A perda de massa em 50% ($T_{50\%}$) ocorre na mesma temperatura para os diferentes filmes (em torno de 403°C). Os resultados de TGA para os filmes de PBAT/nisina foram muito similares. Não houve diferença significativa ($P > 0.05$) para os resultados de perda de massa em $T_{10\%}$ e $T_{50\%}$. Estes resultados estão de acordo com a literatura, a qual relata ainda que, o PBAT apresenta dois principais estágios de degradação. O primeiro estágio ocorre entre temperaturas de 340 e 400°C, que pode ser devido à decomposição máxima do copoliéster alifático ácido adípico e 1,4-butanodiol. O segundo ocorre em torno de 600°C com a decomposição do copoliéster aromático tereftalato^{12, 191}.

A literatura reporta outros tipos de comportamento para o PBAT, por exemplo, alguns autores observaram um aumento na temperatura de degradação de amostras de PBAT/montmorilonita contendo maiores concentrações de carga¹⁶⁸. Estes autores

verificaram que o maior aumento nas propriedades foram observadas para amostras com 3% de montmorilonita, e a temperatura de degradação para o PBAT foi de 395°C. Isto sugere que silicatos em camada aumentam a estabilidade térmica da matriz do polímero porque atuam como uma barreira ao calor. Chen e Yang¹⁹² prepararam nanocompósitos de PBAT/montmorilonita através do processamento no estado fundido e relataram que a incorporação da argila organofílica aumentou a estabilidade do nanocompósito.

Tabela 5. Resultados de TGA e DSC para o filme de PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina.

Amostras	$T_{10\%}$ (°C)	$T_{50\%}$ (°C)	T_g (°C)	T_m (°C)	T_c (°C)	X_c (%)	Resíduo
(100/0)	379	404	-30	125,4	75,1	10,7	0,14
(99,75/0,25)	373	400	-29,9	125,3	75,2	10,5	0,58
(99,5/0,5)	373	403	-29,6	126,2	74,8	10,5	0,58
(99/1)	374	403	-28,7	123,7	71,6	9,4	1,28
(98/2)	373	402	-28,4	124,4	70,4	8,9	2,71
(97/3)	374	403	-28,3	123,3	69,6	7,9	3,20
(95/5)	387	414	-28,3	124,6	73,1	7,8	5,17

As curvas de DSC para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina estão apresentados nas Figuras 31 e 32. Esta análise foi realizada para estudar o efeito do processamento no comportamento de cristalização do PBAT, além disso, avaliar o efeito da adição da nisina na matriz do polímero. A curva de DSC para a nisina não apresentou temperaturas de transições que pudessem ser identificadas¹⁹³, (Anexo 4, Fig. 83).

Os filmes de PBAT com 0,25% e 0,5% de nisina apresentaram temperatura de cristalização (T_c) semelhante ao PBAT puro (Fig. 31). No entanto, os sistemas com 1, 2, 3 e 5% de nisina apresentaram um ligeiro decréscimo nos valores de T_c . Este efeito pode estar relacionado com a quantidade de carga para estes sistemas, uma vez que a presença de nisina em maiores concentrações pode dificultar a mobilidade dos segmentos das cadeias poliméricas, diminuindo a fração cristalina e conseqüentemente a temperatura de cristalização. A temperatura de cristalização diminuiu de 75,1°C para o PBAT puro até 69,6°C na amostra com 3% de nisina (Tabela 5). O percentual de cristalinidade (X_c) foi de 10,7% para o filme de PBAT puro, enquanto os filmes com 3 e 5% de nisina apresentaram X_c de 7,9% e 7,8%, respectivamente. Neste sentido, a adição da nisina à matriz do PBAT reduziu a cristalinidade dos filmes. O que pode estar relacionado ao fato de que o PBAT é um copolímero randômico de difícil

cristalização¹⁶⁴, além disso, pela adição do aditivo amorfo, conforme DSC da nisina (Anexo 4, Fig. 83).

Bastarrachea *et al.*¹³ sugeriram que a cristalização de polímeros parcialmente amorfos, ao contrário de materiais de baixa massa molecular, tais como açúcares e sais, realiza-se a uma velocidade mais lenta e acima de uma ampla faixa de temperatura. Por conseguinte, a sobreposição das cadeias do polímero pode não ocorrer completamente e algumas regiões podem não cristalizar devido ao emaranhamento das cadeias do polímero.

Em adição, a presença de alguns aditivos, tais como antimicrobianos, pode reduzir o espaço disponível para o crescimento dos cristais, reduzindo assim a cristalinidade e induzir variações nas propriedades térmicas e mecânicas^{88, 194}. No entanto, no presente estudo, não foi possível observar uma correlação direta entre a adição da nisina e os valores de cristalinidade. Meira *et al.*¹⁹⁵ investigaram nanocompósitos de polipropileno/montmorilonita contendo nisina até 5% (m/m) e observaram que o percentual de cristalinidade das amostras variou de 57% (amostra sem nisina) para 47% (amostra com 5% de nisina), afirmaram que em proporções mais elevadas, as partículas de nisina podem dificultar a difusão das cadeias do polímero e diminuir sua cristalinidade.

Livi *et al.*¹⁹⁶ investigaram a estruturação de líquidos iônicos em amostras de poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) e em relação às propriedades térmicas, observaram que a adição de apenas 2% de sais de fosfônio na matriz de PBAT causou uma ligeira diminuição na cristalinidade das amostras de PBAT na faixa de 1,5 – 2%. Reportaram ainda que, a utilização de uma quantidade de líquidos iônicos maior que 3% impede a formação da região cristalina levando a uma rede cristalina menos eficaz.

A estrutura cristalina do PBAT tem sido previamente investigada, indicando que amostras de PBAT que sofreram a fusão de cristalização contêm pequenos cristais com ampla distribuição de tamanho³. A região cristalina do PBAT é composta por unidades do butileno tereftalato (BT), enquanto que a região amorfa é formada por todas as unidades do butileno adipato (BA).

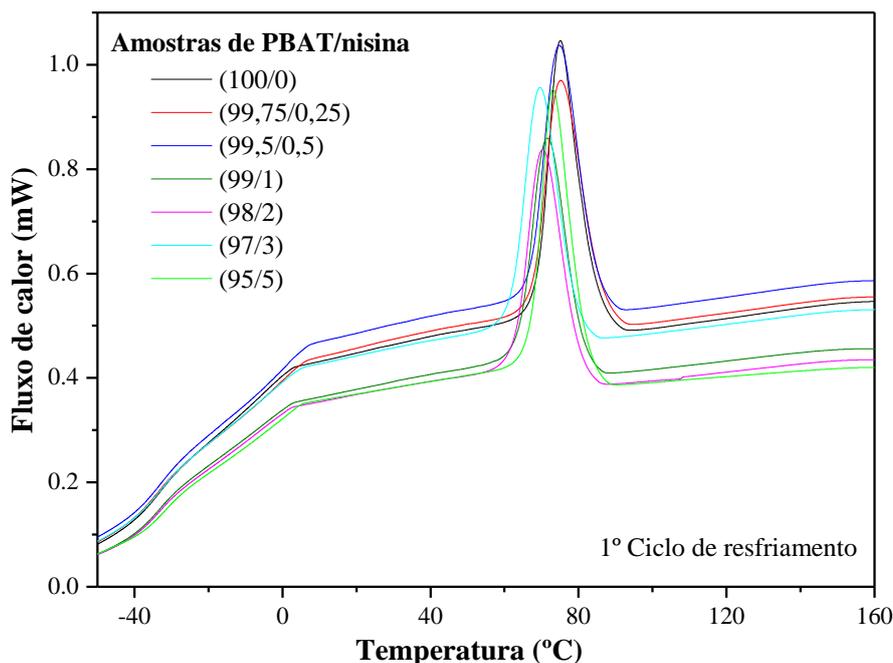


Figura 31. Termogramas de DSC (ciclo do 1° resfriamento) para os filmes de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

Na Figura 32 é possível visualizar a transição de fase endotérmica¹⁸⁶, mudança de fase do estado sólido para o estado fundido das amostras (T_m), que pode ser indicada pelo ponto mínimo da curva de aquecimento. O formato da curva de fusão determinado pelo ensaio de DSC permite tirar conclusões sobre a distribuição dos tamanhos de cristalitos¹⁹⁷. Desta forma, um pico de fusão largo denota uma variada distribuição de tamanhos dos cristalitos, enquanto que um pico de fusão dentro de uma faixa estreita de temperaturas indica cristalitos grandes e bem formados.

As propriedades térmicas básicas são muito importantes para o estudo do comportamento de cristalização dos materiais poliméricos. No presente estudo, a temperatura de transição vítrea (T_g) do PBAT permaneceu quase inalterada com a adição da nisina. O PBAT puro apresentou T_g em -30°C , e os valores para os filmes de PBAT/nisina foram de $-29,9^\circ\text{C}$ e $-28,3^\circ\text{C}$, (amostras com 0,25% a 5% de nisina). A temperatura de fusão (T_m) do PBAT puro foi de $125,4^\circ\text{C}$ (Fig. 32). Arruda *et al.*¹⁶⁹ desenvolveram blendas de PLA/PBAT e investigando as propriedades térmicas do PBAT puro encontraram valores de temperatura de fusão de $126,4^\circ\text{C}$, muito similar ao valor encontrado neste estudo. Além disso, encontraram um segundo pico endotérmico em $60,4^\circ\text{C}$, atribuído à fusão da fase amorfa da fração BA da amostra. As curvas de DSC do primeiro aquecimento para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina estão

apresentadas em anexo (Anexo 5, Figura 84), bem como os valores dos picos de fusão e o percentual de cristalinidade (Anexo 6, Tabela 23). No 1º ciclo de aquecimento dos filmes são observados dois picos de fusão, que são característicos de poliésteres, e podem ser explicados pela recristalização de fusão do PBAT e/ou o mecanismo de re-fusão, enquanto ocorre o aquecimento. Estes duplos picos endotérmicos podem estar atribuídos aos cristais que fundem em diferentes temperaturas, que tem estrutura similar, mas diferente formação da espessura lamelar do cristal^{29, 198}.

Resultados similares para o PBAT foram encontrados por Abdelwahab *et al.*¹⁶⁴ que reportou valores de T_g e T_m de -35°C e 116°C , respectivamente. Resultados de T_g e T_m são importantes fatores que devem ser levados em consideração porque eles dão informações sobre o nível de associação entre as cadeias dos polímeros¹³. Quanto maiores os valores de T_g e T_m , mais fortes as ligações intermoleculares entre as cadeias dos polímeros. O polímero pode ser tanto um líquido super-resfriado com elevada viscosidade quanto um sólido cristalino se a temperatura ambiente estiver entre a T_g e a T_m ¹⁹⁹. A T_g e T_m dos filmes de PBAT/nisina não alteraram com a adição da nisina e este comportamento pode ser visualizado na Tabela 5 e na Figura 32.

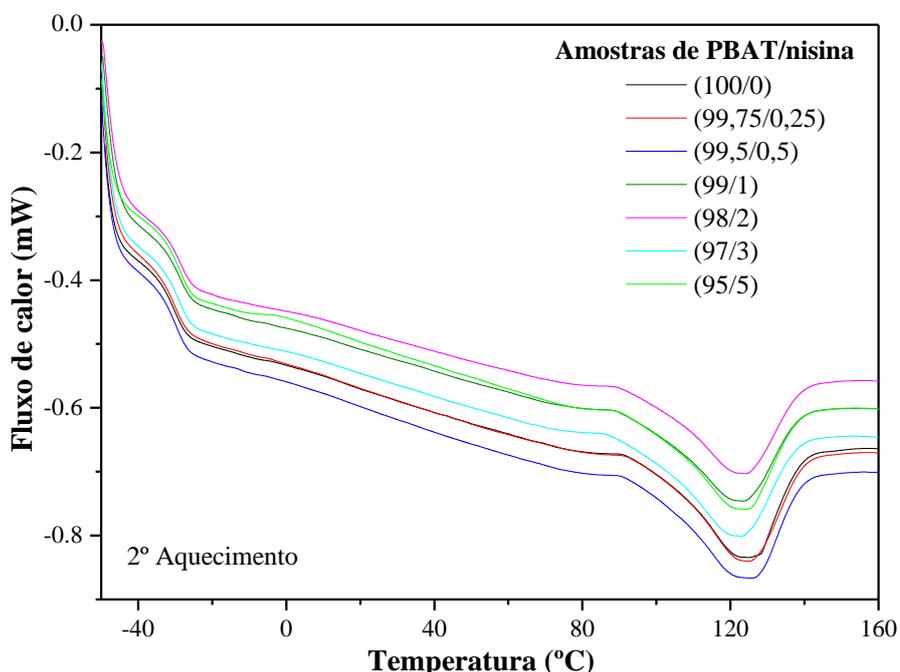


Figura 32. Termogramas de DSC (2º ciclo de aquecimento) para os filmes de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

A difração de Raios-X é uma técnica que utiliza o espalhamento coerente da radiação X por estruturas organizadas (cristais), permitindo realizar estudos estruturais

em materiais, determinando sua estrutura cristalina e sua fração percentual cristalina^{186, 200}. A difração de raios-X mostrou a estrutura cristalina dos filmes de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina e os difratogramas de DRX estão apresentados na Figura 33. O PBAT puro apresentou cinco picos de difração característicos da estrutura cristalina em ângulo de difração 2θ na região de 16,2°, 17,4°, 20,4°, 23,0° e 24,8°, respectivamente. Os cinco picos de difração característicos do PBAT puro foram também observados nas amostras de PBAT/nisina nos mesmos valores em ângulo de difração 2θ . No entanto, pequenas alterações na intensidade dos picos de difração do polímero foram detectadas para as amostras de PBAT/nisina, indicando cristalinidade baixa.

A diminuição ou a ausência do pico de difração indica a formação de uma estrutura bem dispersa e/ou esfoliada³. Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados descritos por Chivrac *et al.*¹⁶⁸, que também observaram a presença de cinco picos de difração em ângulos 2θ semelhantes. Os autores também observaram uma diminuição na intensidade dos picos de difração com a incorporação da nisina, indicando uma redução na cristalinidade do PBAT. Resultados similares foram encontrados na literatura³⁴, sugerindo que as nanopartículas provavelmente impedem o crescimento de cristais do PBAT.

Alguns autores sugerem que a nisina, como uma substância estranha, é capaz de prejudicar o crescimento de cristais^{13, 201}. No presente trabalho não foram observadas mudanças dos ângulos de difração 2θ , sugerindo que a adição do agente antimicrobiano não influenciou nas propriedades estruturais do polímero. Uma relação entre DRX e as propriedades térmicas pode ser estabelecida, a partir das amostras com 0,5% de nisina, as quais mostraram um maior nível de intensidade (Fig. 33) e o maior percentual de cristalinidade (Tabela 5).

Em adição, outro pico notável pôde ser observado no intervalo entre 31,7° e 31,8°. Este pico pertence ao padrão de difração característico do cloreto de sódio (NaCl), que é um componente presente na formulação comercial da Nisaplin[®]. Este pico começa a ser visualizado a partir das amostras de PBAT/nisina (99,75/0,25), e a intensidade deste pico de difração torna-se mais proeminente com o aumento da concentração de nisina na matriz do polímero. O padrão apresentado para a nisina está de acordo com a literatura⁸⁸. O padrão de DRX para o PBAT puro, nisina e amostras de PBAT/nisina corroboraram com as análises térmicas, evidenciando que o método de processamento adotado para a preparação dos filmes não afetou as propriedades estruturais dos filmes de PBAT.

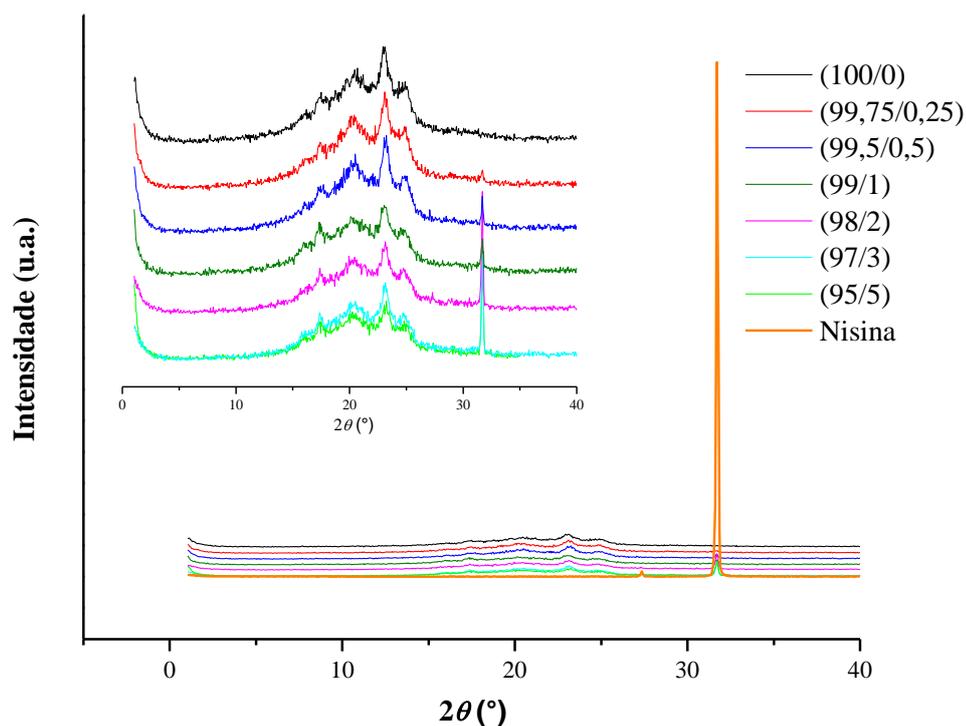


Figura 33. Difratogramas de Raios-X para os filmes de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

O percentual de cristalinidade das amostras de PBAT também foi quantificado utilizando métodos computacionais^{186, 200}. Por conseguinte, utilizou-se a adequação do modelo de Lorenz e os resultados estão apresentados na Tabela 6. O percentual de cristalinidade das amostras do PBAT puro e PBAT/nisina foram calculados a partir dos resultados de DRX, e estes resultados corroboram com os resultados apresentados pelas análises de DSC (Tabela 5), onde foi possível verificar que a adição da nisina à matriz do polímero reduz ligeiramente os resultados para a cristalinidade.

Tabela 6. Percentual de cristalinidade dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina calculados por DRX.

Amostra	Cristalinidade DRX (%)
100/0	27
99,75/0,25	27,4
99,5/0,5	26,4
99/1	22,5
98/2	16,2
97/3	9,2
95/5	8,7

A fim de verificar possíveis mudanças na hidrofiliicidade dos filmes pela adição de nisina na matriz de PBAT, medidas de ângulo de contato da água (WCA) foram realizadas na superfície destes filmes e os resultados estão apresentados na Tabela 7. A Figura 34 apresenta a imagem da gota de água na superfície do filme de PBAT puro. Quando uma gota de um determinado líquido é colocada na superfície de um sólido, podem ser observados dois comportamentos, a gota pode molhar total ou parcialmente a superfície. Em ambos os casos tem-se a formação da interface sólido-líquido, e este, é chamado de molhabilidade²⁰². Uma superfície é dita hidrofílica se o valor do ângulo de contato está entre 0 e 90°, e hidrofóbica quando o valor estiver entre 90 e 150°. E quando o ângulo de contato for superior a 150° a superfície é dita superhidrofóbica²⁰³. Baseado em definições da literatura, a Figura 35 ilustra o esquema das diferentes superfícies de hidrofiliicidade²⁰⁴.

Os ângulos de contato da água para o PBAT puro e PBAT/nisina foram menores que 90° na superfície de todos os filmes, indicando que as superfícies desses materiais são predominantemente hidrofílicas. A hidrofiliicidade da superfície do material é fortemente dependente das forças eletrostáticas que atuam entre a superfície e o fluido. Além disso, a afinidade do material com o fluido é também dependente da microestrutura da superfície do material²⁰⁵.

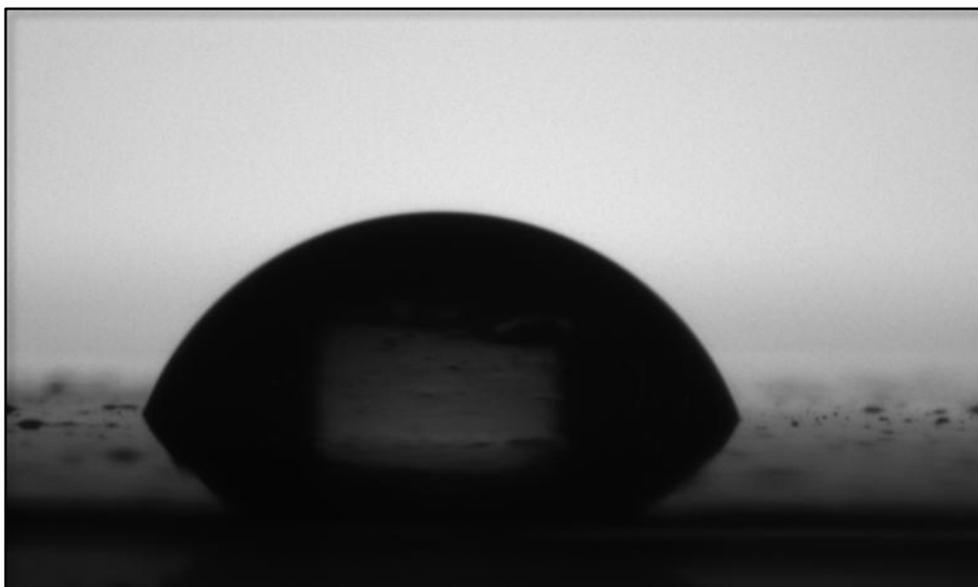


Figura 34. Fotografia da gota na superfície do filme de PBAT puro para determinação do ângulo de contato da água.

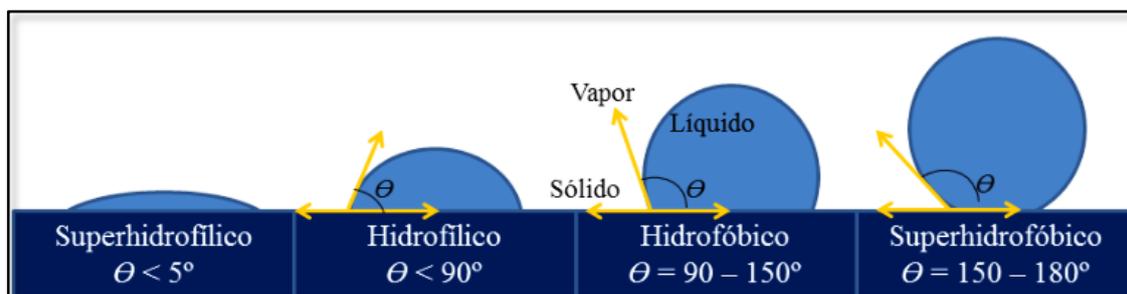


Figura 35. Diferentes tipos de hidrofobicidade da superfície de materiais²⁰⁴.

A Tabela 7 apresenta os valores das medidas do ângulo de contato para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina, juntamente com os respectivos desvios padrões para cada amostra. As análises mostraram que não houve diferenças expressivas para os valores de ângulo de contato nos filmes analisados, mesmo com amostras contendo maiores concentrações de nisina. O filme de PBAT puro apresentou ângulo de contato de 70° enquanto que a amostra de PBAT/nisina com 5% apresentou ângulo de contato de 66° . Estes resultados corroboram com a literatura^{15, 206}, a qual reporta valores de ângulo de contato para o PBAT na faixa de $68,9^\circ$ a $72,9^\circ$. Wang *et al.*⁴⁸ prepararam blendas de PLA/PBAT utilizando o método de casting e investigaram o ângulo de contato para estes materiais, verificaram que o filme de PBAT puro apresentou ângulo de contato de $72,9^\circ$. Li *et al.*²⁰⁷ investigaram a molhabilidade de poliésteres e utilizaram plasma para melhorar a hidrofobicidade das amostras. Em seu estudo, também verificaram superfícies hidrofílicas com ângulo de contato de 70° e imagens da gota muito semelhantes com a que foi apresentada neste estudo (Fig. 34).

Tabela 7. Valores das medidas de ângulo de contato para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina.

Amostras	Ângulo de Contato ($^\circ$)
(100/0)	$70,2 \pm 2$
(99,75/0,25)	$69,8 \pm 2$
(99,5/0,5)	$66,5 \pm 5$
(99/1)	$65,3 \pm 6$
(98/2)	$66,4 \pm 1$
(97/3)	$66,3 \pm 2$
(95/5)	$66,2 \pm 2$

Para quantificar as mudanças na microestrutura da superfície, os perfis topográficos dos filmes de PBAT e PBAT/nisina foram analisados e estão apresentados

na Figura 36 os valores da rugosidade das amostras foram de 0,8 μm para o filme de PBAT puro, e para os filmes de PBAT com 3% e 5% de nisina, estes valores variaram de 5,3 μm e 19,0 μm , respectivamente, apresentados na Tabela 8.

Quanto maior a concentração de nisina nas amostras, maior a rugosidade dos filmes. Este comportamento pode ser observado na superfície 3-D das imagens apresentadas na Figura 36, onde foi possível identificar que a superfície do filme de PBAT puro (Fig. 36a) tem a menor rugosidade, quando comparada com as amostras contendo nisina (Fig. 36 b-g). O filme de PBAT puro apresenta uma superfície lisa e sem qualquer aglomerado. No entanto, à medida que a nisina é adicionada na matriz de PBAT em maiores teores, aglomerados começam a ser observados nas superfícies e, conseqüentemente, um aumento na rugosidade (Tabela 8). Estes aglomerados são visíveis a partir da amostra contendo 0,5% de nisina (Fig. 36c). Filmes de PBAT/nisina com 5% do aditivo apresentaram a maior rugosidade média, de 19,0 μm e a maior rugosidade nas imagens da superfície 3-D. As amostras contendo 2% e 3% de nisina apresentaram os maiores aglomerados, possivelmente resultantes das partículas de NaCl presentes na formulação comercial da nisina (Fig. 36e-f).

Tabela 8. Valores de rugosidade expressos como RMS (μm) da superfície do filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

AMOSTRAS	RMS (μm)
(100/0)	0,8 \pm 0
(99,75/0,25)	4,0 \pm 2
(99,5/0,5)	2,5 \pm 2
(99/1)	1,4 \pm 0
(98/2)	3,4 \pm 1
(97/3)	5,3 \pm 2
(95/5)	19,0 \pm 5

Neste sentido, associando os resultados da hidrofobicidade (Tabela 7 e Fig. 34) e da rugosidade (Tabela 8 e Fig. 36), foi notado que o filme mais rugoso (amostra com 5% de nisina) foi também o mais hidrofílico. A presença da nisina afetou a rugosidade dos filmes e também a hidrofobicidade, sugere-se que este comportamento pode ser decorrente dos componentes presentes na formulação comercial da nisina, como o NaCl, carboidratos e proteínas do leite podem ter contribuído para esta mudança na superfície dos filmes. Além disso, a presença de espaços vazios na estrutura aumenta a área de contato entre a gota e a superfície²⁰⁵.

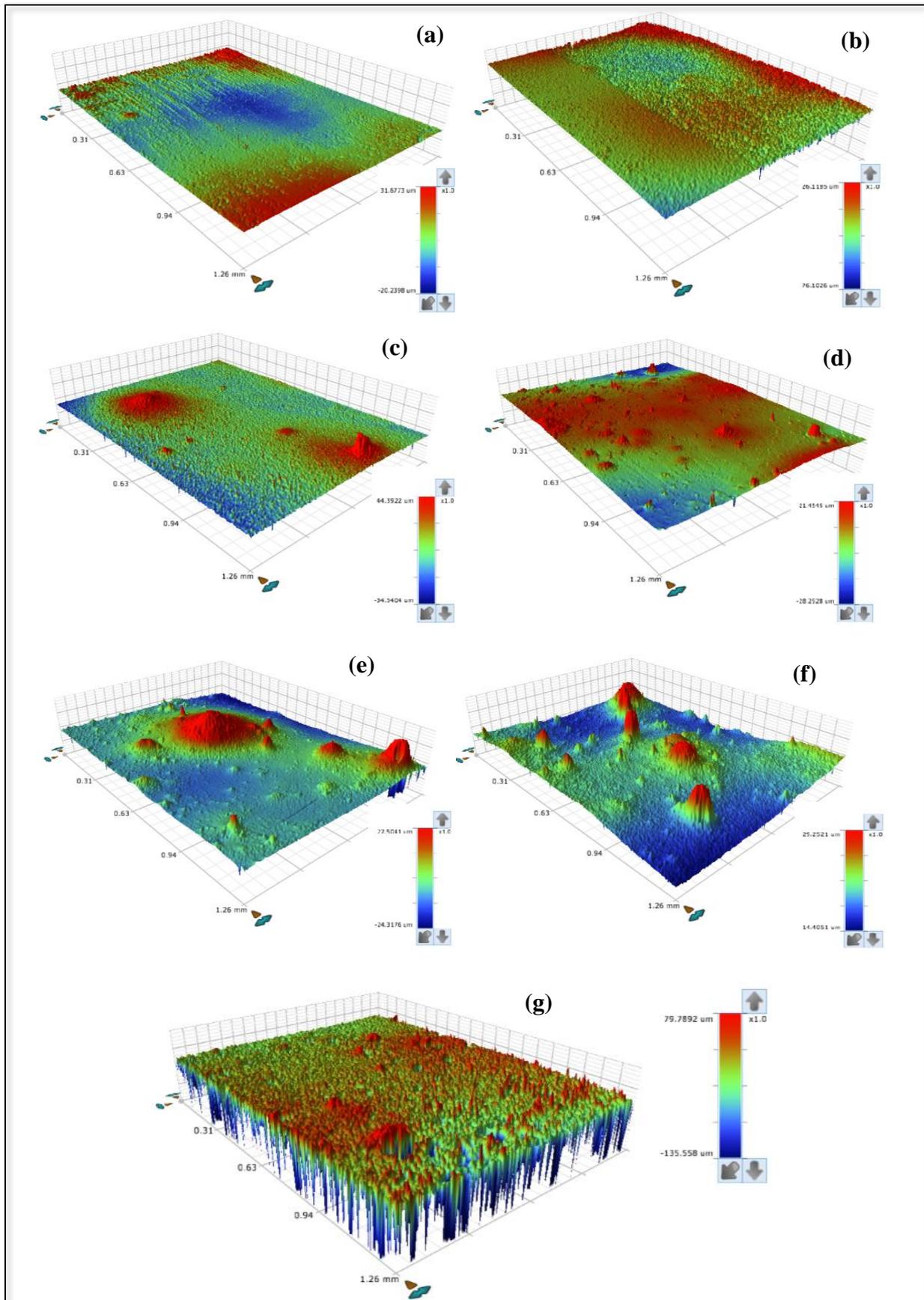


Figura 36. Imagens de perfilometria das superfícies dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina: a) PBAT puro, b) 0,25%, c) 0,5%, d) 1%, e) 2%, f) 3% e g) 5% de nisina.

Para investigar as características viscoelásticas dos materiais desenvolvidos neste trabalho, experimentos de análise dinâmico-mecânica (DMA) foram realizados. Esta técnica tem sido utilizada para medir as variações nas propriedades mecânicas do material plástico, e portanto, é muito sensível a variações na temperatura e medida de transições térmicas¹⁵⁷. A dependência do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan \delta$ em função da temperatura, para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina estão apresentados nas Figuras 37 e 38.

O módulo de armazenamento (E') do material está relacionado com a energia armazenada no sistema, enquanto que o módulo de perda (E'') descreve a energia dissipada durante o processo. Já os valores de $\tan \delta$ ou também chamado de fator de perda, é obtido através da razão E''/E' (relação entre a componente viscosa sobre a componente elástica), e que fornece informações sobre o amortecimento mecânico ou atrito interno de um material quando submetido a solicitações dinâmicas¹⁸⁶. Quando se observa uma redução na $\tan \delta$, costuma-se dizer que houve uma melhor dispersão das cargas. Isto porque, quanto menor este valor, menor a dissipação viscosa, porque há menor desenvolvimento de calor no sistema. Cabe ressaltar que a contribuição elástica e viscosa para a determinação do comportamento mecânico do polímero depende da temperatura e da escala de tempo do experimento²⁰⁸.

Após a realização do ensaio de DMA foi observado uma redução no módulo de armazenamento para o PBAT puro em função da temperatura (Fig. 37a). O mesmo comportamento é válido para o módulo de perda (Fig. 37b). Isto está atribuído ao aumento na mobilidade da cadeia polimérica com o aumento da temperatura. Filmes contendo nisina apresentaram pequenas alterações no módulo de armazenamento e no módulo de perda quando comparados com o filme de PBAT puro (sem nisina). O módulo de armazenamento do PBAT puro começa a diminuir em aproximadamente -30°C , que corresponde a T_g do polímero, confirmado por DSC (Fig. 32). Este comportamento, pode ser provavelmente atribuído ao amolecimento do polímero com o aumento da temperatura. O módulo de armazenamento é dependente do percentual de cristalinidade acima da T_g , enquanto que abaixo da T_g o módulo da cristalinidade assim como a fase amorfa é quase idêntica²⁹.

O módulo de armazenamento é menor para o PBAT quando comparado com outros polímeros, devido à rápida transição de fase do polímero amorfo para o estado elastomérico ou borrachoso²⁰⁹. Touati *et al.*²¹⁰ sugerem que a redução geral no módulo de armazenamento indica maior mobilidade das cadeias do polímero, que já está sendo

atribuída a degradação da cadeia, predominantemente através da cisão β . As amostras de PBAT/nisina apresentaram apenas pequenas variações no módulo de perda (E'') em temperaturas mais baixas, comparando-os ao polímero puro (Fig. 37b).

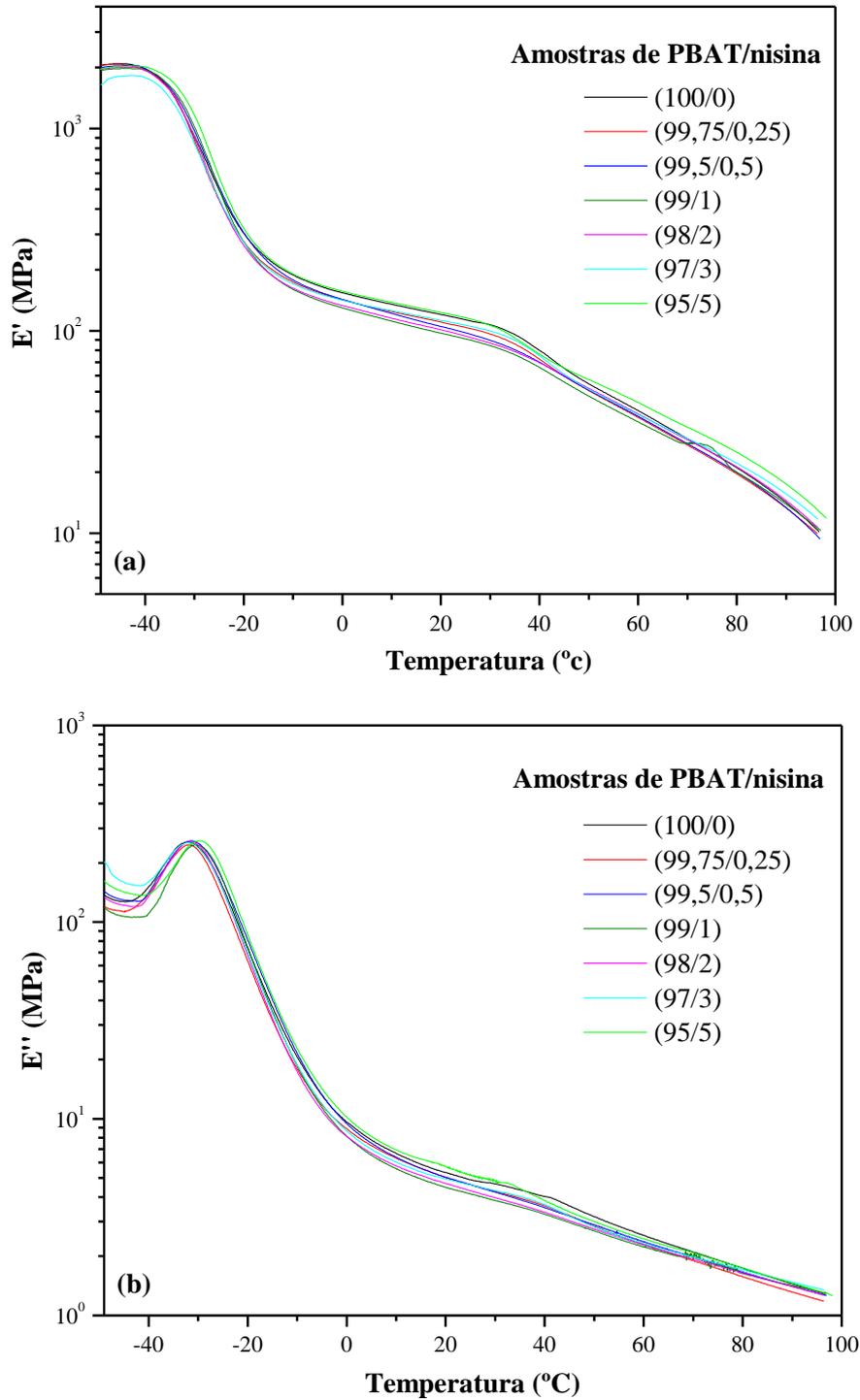


Figura 37. Módulo de armazenamento (E') e módulo de perda (E'') para as amostras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Abdelwahab *et al.*¹⁶⁴ observou um efeito adverso no módulo de armazenamento. Os autores relataram um aumento no módulo de armazenamento e justificaram que este comportamento pode ser atribuído ao aumento da adesão interfacial entre a matriz de poliéster e a lignina.

A Figura 38 apresenta as curvas de $\tan \delta$ para as amostras de PBAT puro e para as amostras de PBAT/nisina. Duas maiores transições foram observadas, a primeira, em torno de -20°C , associada à temperatura de transição vítrea (T_g) do material. Esta transição é atribuída ao movimento das unidades do poli(butileno adipato), de domínio alifático flexível. A segunda transição ocorre em torno de 50°C , e está atribuída ao movimento das unidades do poli(butileno tereftalato), de domínio aromático rígido^{211, 212}. A incorporação da nisina nas amostras não alterou de maneira significativa a T_g da matriz polimérica, uma vez que as amostras de PBAT puro e PBAT/nisina apresentaram a T_g no mesmo intervalo de temperatura, em torno de -20°C .

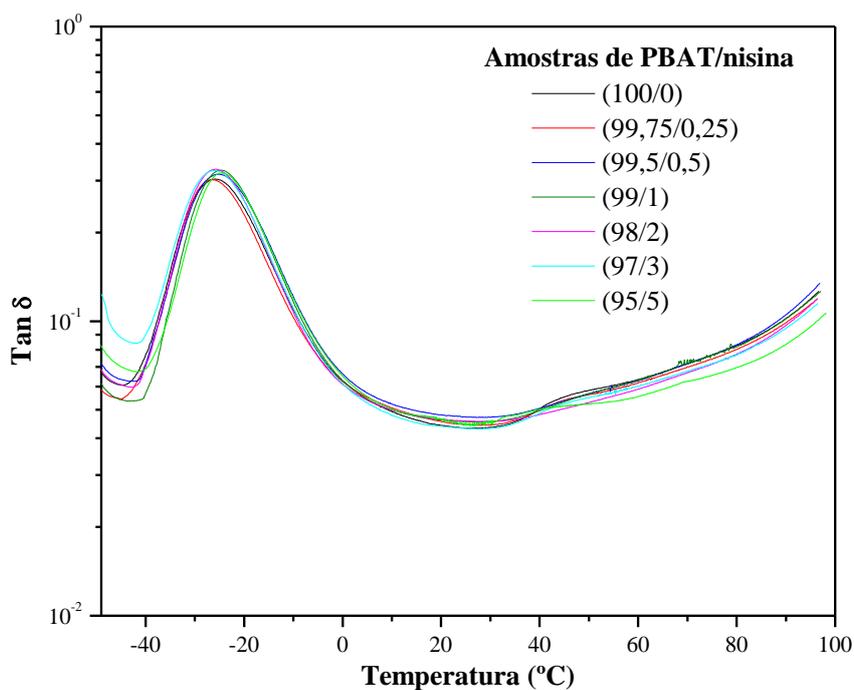


Figura 38. Curvas de $\tan \delta$ para as amostras de PBAT puro e PBAT/nisina em função da temperatura.

As propriedades mecânicas de amostras poliméricas podem ser influenciadas pelas condições de preparação e ensaio das amostras, o grau de cristalinidade deste material, massa molecular e especialmente o grau de interação da interface polímero-carga²¹³. Para determinar se a adição da nisina pode causar alterações nas propriedades mecânicas das amostras de PBAT e de PBAT/nisina, estas foram submetidas ao ensaio

de tração e o módulo elástico (MPa), resistência à tração (MPa) e a deformação na ruptura (%), foram determinados e estão apresentados na Tabela 9. Os valores destes resultados representam a média dos resultados obtidos com seus respectivos desvios padrão em função do número de amostras fornecidas, de acordo com a norma utilizada para a realização deste ensaio. O comportamento mecânico das amostras pode ser observado na Figura 39.

A adição da nisina não causou diferenças muito significativas nos valores de resistência à tração quando comparado com o filme de PBAT puro (sem nisina), foi observado redução nestes valores. O mesmo efeito pôde ser observado para a deformação na ruptura, a qual apresentou apenas variações nos valores quando comparado com o polímero puro. No entanto, este padrão não foi observado para o módulo elástico, este reduziu com a adição da nisina. O módulo elástico é um parâmetro mecânico que fornece informações sobre a rigidez do material sólido e tem influência da composição química, microestrutura e defeitos do material.

Tabela 9. Resultado das propriedades mecânicas sob tração para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

Amostras	Módulo Elástico (MPa)	Resistência à Tração (MPa)	Deformação na Ruptura (%)
(100/0)	66 ± 4	8,2 ± 0,3	126 ± 2,5
(99,75/0,25)	63 ± 7	7,5 ± 0,6	128 ± 2,6
(99,5/0,5)	58 ± 7	6,9 ± 0,3	129 ± 2,1
(99/1)	47 ± 4	6,4 ± 0,3	127 ± 7,5
(98/2)	56 ± 4	6,0 ± 0,3	132 ± 3,6
(97/3)	48 ± 1	5,8 ± 0,3	131 ± 1,5
(95/5)	46 ± 1	5,2 ± 0,1	129 ± 1,5

O módulo elástico diminuiu de 66 MPa nos filmes sem nisina para 46 MPa nos filmes com 5% de nisina (Tabela 9), indicando uma redução na rigidez destes materiais e além disso, redução na cristalinidade dos filmes. A resistência à tração diminuiu de 8,2 MPa no filme de PBAT puro para 5,2 MPa nos filmes com a maior concentração do aditivo. Neste sentido, foi possível verificar que a adição da nisina, em maiores concentrações, modifica algumas propriedades mecânicas dos filmes. Por outro lado, a deformação na ruptura permaneceu quase inalterada, apresentando somente pequenas variações. O filme de PBAT puro apresentou deformação na ruptura de 126% enquanto que, o filme com 5% de nisina apresentou deformação de 129%. Resultados similares

foram observados por Wang *et al.*⁴⁸ e verificaram que os filmes de PBAT puro apresentaram alongamento na ruptura de 137%, indicando que os filmes de PBAT são bastante resilientes e com elevada flexibilidade.

A adição de agentes antimicrobianos para polímeros tem sido relatada como uma razão potencial para a modificação no desempenho das propriedades mecânicas^{194, 214}. Guiga *et al.*¹⁴⁷ verificaram que as propriedades mecânicas apresentaram algumas alterações com a adição de nisina nos filmes. A resistência à tração ligeiramente reduziu com a presença da nisina e atribuem este efeito devido à presença de uma grande quantidade de sal na formulação comercial da Nisaplin[®], conhecido por modificar a robustez do filme.

Kim *et al.*³² relataram uma pobre interação interfacial entre o PBAT e amido. Estes autores afirmaram que a mobilidade molecular do PBAT poderia ser restringido pelos grânulos de amido, e isto pode ter sido a causa para a redução na resistência mecânica. Como previamente discutido, Bastarrachea *et al.*¹³ descreveu a formação de orifícios e poros nos filmes contendo nisina. Neste estudo, vazios e orifícios foram também observados nos filmes contendo nisina (Fig. 29e-g). Possivelmente, a falta de uniformidade na estrutura dos filmes também afetou as propriedades mecânicas de PBAT/nisina. Além disso, proteínas e sais (presentes na formulação comercial do aditivo) podem ter modificado as suas propriedades.

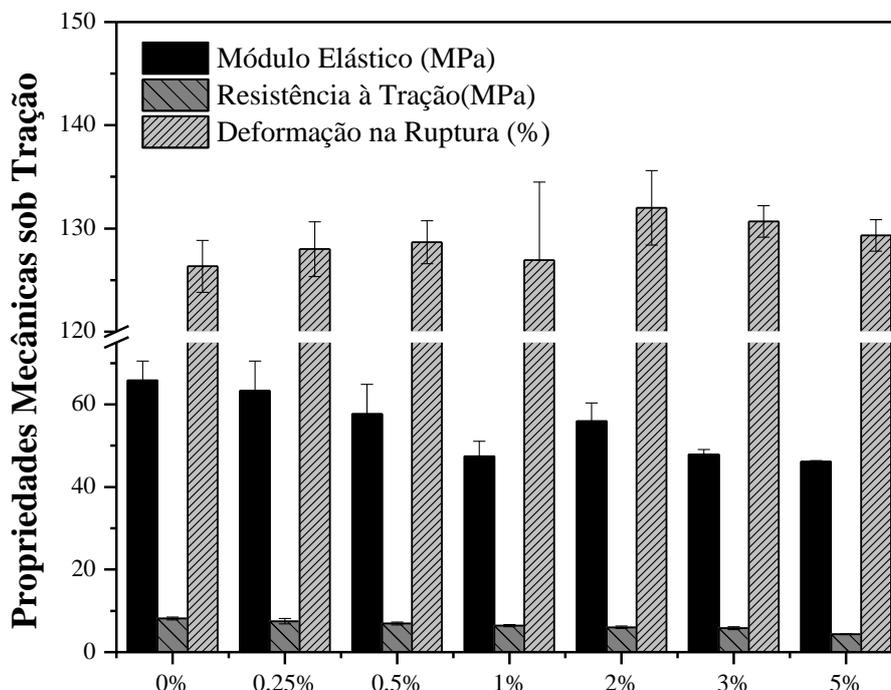


Figura 39. Propriedades mecânicas sob tração para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

Filmes poliméricos destinados à proteção de alimentos, ou seja, aplicados como embalagens para qualquer produto alimentício, além de boa resistência mecânica e flexibilidade, requerem a menor permeabilidade ao vapor de água possível, para manter a qualidade e a estabilidade do produto²¹⁵. As embalagens de alimentos devem impedir ou retardar todas as etapas envolvidas para aumentar a vida útil dos alimentos e a segurança para os consumidores. Neste sentido, qualquer substância adicionada na matriz do polímero (carga, reforço, aditivo) deve atuar como uma barreira física que retarda a passagem do oxigênio através da matriz polimérica. O atraso na velocidade de difusão permite a sustentação das propriedades organolépticas do alimento, aumentando assim a sua vida de prateleira²¹⁶⁻²¹⁸.

Foram realizadas análises de permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água nos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina, com o intuito de verificar se a nisina atua como barreira quando adicionada à matriz do poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) e os resultados estão listados na Tabela 10. O processo de permeação de vapores através do espaço intermolecular pode ocorrer em três etapas: (a) sorção e solubilização do permeante na superfície do material; (b) difusão do permeante através do material pela ação do gradiente de concentração; (c) dessorção e evaporação do permeante na outra face do material²¹⁷. O principal mecanismo para o fluxo de gases através do filme, na ausência de cavidades ou rachaduras, é a difusão molecular, a qual compreende a abertura de espaço vazio entre os segmentos das cadeias dos polímeros, em função das oscilações dos segmentos, seguido do deslocamento do permeante dentro do espaço vazio²¹⁹.

A redução na permeabilidade ao oxigênio dos filmes de PBAT/nisina comparados ao filme de PBAT puro indicaram que a nisina dificultou a permeação do oxigênio através da matriz do PBAT. Esse comportamento pode estar atribuído à morfologia da nisina (Fig. 27), uma vez que a estrutura irregular desta bacteriocina pode ter criado obstáculos para a passagem do gás. À medida que aumenta a concentração de nisina na matriz do polímero, a propriedade de barreira ao oxigênio das amostras dos filmes de PBAT/nisina é consideravelmente melhorada. O filme de PBAT puro apresentou permeabilidade ao oxigênio de $816 \text{ mm cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, enquanto que, a permeabilidade reduziu com a adição da nisina, o filme com 5% do aditivo apresentou permeabilidade ao oxigênio de $692,5 \text{ mm cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. A literatura reporta que, quanto maior a área interfacial carga e/ou aditivo-matriz, mais difícil será o caminho para a

passagem do gás e conseqüentemente, maior será o aumento na propriedade de barreira²²⁰.

Um aumento nas propriedades de barreira com um aumento na espessura dos filmes é um fenômeno bem conhecido. Geralmente, a taxa de permeação ao gás inicialmente diminui rapidamente e permanece quase constante além de uma espessura crítica²⁰⁶. Deve ser levado em consideração que, neste estudo, a espessura de todos os filmes se manteve constante, não foi observada uma diferença significativa entre as amostras, deste modo, este fenômeno não pode ter afetado os resultados.

No entanto, os filmes de PBAT/nisina apresentaram um pequeno aumento nos valores de permeabilidade ao vapor de água à medida que aumentava a concentração do aditivo na matriz. O filme de PBAT puro apresentou permeabilidade ao vapor de água de $447,4 \mu\text{m g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, enquanto que, os filmes com 3% e 5% de nisina apresentaram valores de $588,5$ e $571,4 \mu\text{m g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Isto pode estar relacionado à diferença de polaridade da molécula de água e ainda, ao tamanho (volume molar) entre as moléculas e a conseqüente interação da água com a superfície hidrofóbica da nisina. Além disso, a estrutura química do polímero, miscibilidade e compatibilidade devem ser consideradas, o PBAT é um polímero semicristalino e hidrofóbico^{48, 215}, apresenta regiões cristalinas e amorfas na sua organização estrutural. Em adição, as diferenças na matriz polimérica, tais como a concentração de aditivos, e o método de produção (neste caso, extrusão) podem explicar as diferenças nos valores de permeabilidade ao vapor de água e a redução como conseqüência destes parâmetros. Os filmes de PBAT/nisina não apresentaram uma estrutura completamente compacta e organizada, foi possível observar a formação de poros e fissuras (Fig. 29), que podem também ter sido a razão para a maior permeabilidade ao vapor de água destes materiais.

Garcia *et al.*²¹⁵ prepararam filmes de PBAT/amido utilizando glicerol como plastificante e ácido cítrico, verificaram que a permeabilidade ao vapor de água reduziu significativamente com a adição do plastificante, a partir de $6,72 \times 10^{-11} \text{ g(m s Pa)}^{-1}$ para $4,02 \times 10^{-11} \text{ g(m s Pa)}^{-1}$, além disso, atribuíram este resultado à formação da estrutura homogênea e compacta e ao aumento na compatibilidade do PBAT com o amido. Olivato *et al.*²²¹ também prepararam amostras de PBAT/amido investigando diferentes concentrações de ácidos orgânicos utilizados como aditivos, estes autores encontraram diferentes perfis de permeabilidade ao vapor de água variando os teores de ácido cítrico e tartárico.

Souza *et al.*¹⁶² apresentaram resultados com aumento nos valores de permeabilidade ao vapor de água para as amostras de PBAT, que variaram de 5,0 a 9,5 x 10⁻⁶ g (m dia Pa)⁻¹ e atribuíram este comportamento à estrutura dos filmes obtidos, os quais apresentaram poros que favoreceram a difusão da água. Filmes com maior mobilidade molecular são mais permeáveis à água.

Em adição, Wang *et al.*⁴⁸ prepararam filmes de PBAT/PLA e verificaram que a permeabilidade ao vapor de água para o filme de PBAT puro foi de 6,12 x 10⁻¹¹ g m m⁻² Pa s, e verificaram que a permeabilidade do PLA aumentou com a blenda com PBAT. Meira *et al.*⁸⁸ prepararam filmes de PP/MMT com nisina e observaram diferentes perfis de permeabilidade, a incorporação de 5% de nisina nos nanocompósitos de PP/MMT aumentou significativamente a permeabilidade ao oxigênio, no entanto, os resultados de permeabilidade ao vapor de água situaram-se entre 137 e 167 μm g m⁻² dia⁻¹ e atribuíram esse comportamento devido à modificação da estrutura do polímero na presença do aditivo.

Tabela 10. Resultados de permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água para o filme de PBAT puro e para os filmes de PBAT/nisina.

Amostras	Permeabilidade ao O₂ (mm cm ³ m ⁻² dia ⁻¹)	Permeabilidade ao vapor de água (μm g m ⁻² dia ⁻¹)
PBAT 0%	816,00 ± 14	447,40 ± 3
0,25%	749,50 ± 43	450,60 ± 7
0,5%	807,00 ± 6	465,80 ± 23
1%	732,00 ± 22	451,10 ± 7
2%	769,00 ± 7	404,70 ± 16
3%	756,50 ± 1	588,50 ± 47
5%	692,50 ± 16	571,40 ± 59

A incorporação de nisina em seis diferentes concentrações (0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 5%) na matriz de PBAT resultou em filmes de embalagens ativas com visíveis zonas de inibição contra a cultura indicadora *L. monocytogenes*. Estes resultados estão apresentados na Figura 40. O diâmetro das zonas de inibição também foram analisados e estão apresentados na Tabela 11. Maiores zonas de inibição foram verificadas à medida que foram adicionadas maiores quantidades de nisina. Como esperado, o filme

de PBAT puro (sem nisina) não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana. O filme de PBAT/nisina com 5% apresentou o maior diâmetro de inibição (11,7 mm), enquanto os filmes de PBAT com 2% e 3% de nisina apresentaram menores zonas de inibição (4,0 e 8,3 mm), respectivamente. Filmes com 0,5% de nisina podem ter apresentado alguma atividade antimicrobiana, mas esta inibição não pôde ser observada nas condições de ensaio. Neste sentido, filmes ativos de PBAT/nisina foram obtidos utilizando o processamento no estado fundido, evidenciando que o método de processamento utilizado não alterou a atividade da nisina, uma vez que foram utilizadas temperaturas durante o processo e o que não prejudicou a sua atividade antimicrobiana.

Testes preliminares contra os indicadores *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*, mostraram que os filmes de PBAT contendo 5% de nisina resultaram em zonas de inibição em torno de 10 mm contra estas bactérias (dados não apresentados). Estes resultados indicaram que a nisina pode ser liberada a partir dos filmes preparados pelo processamento no estado fundido a 140°C, e que estes materiais apresentaram propriedades antimicrobianas contra as bactérias Gram-positivas.

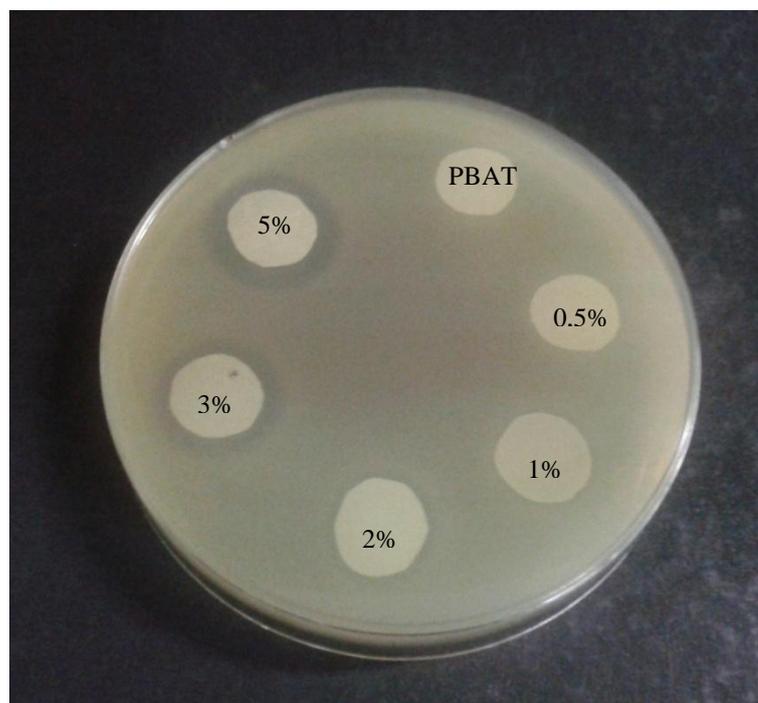


Figura 40. Atividade antimicrobiana do filme de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina testados contra *L. monocytogenes* em placas de ágar BHI.

Scaffaro *et al.*²¹⁴ investigaram filmes de polietileno-co-vinil acetato/nisina e observaram atividade antimicrobiana quando 3% de nisina foi adicionada, no entanto, a

maior zona de inibição foi observada também para amostras com 5% de nisina. Barbosa *et al.*⁶¹ investigaram a nisina em filmes de celulose e observaram que os filmes antimicrobianos inibiram linhagens indicadoras de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* utilizando o método de difusão em placas de ágar. A nisina é interessante para a incorporação em embalagens antimicrobianas devido à sua ampla atividade contra patógenos de origem alimentar^{88, 93}. Este agente antimicrobiano interage com a superfície externa do micro-organismo e não tem de ser internalizado para exibir algum efeito antibacteriano¹⁴⁸.

Tabela 11. Diâmetro das zonas de inibição e espessura dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina obtidos por extrusão.

Amostra	Diâmetro da zona de inibição (mm)	Espessura dos filmes (mm)
(100/0)	0 ± 0	0,10 ± 0,7
(99,75/0,25)	0 ± 0	0,08 ± 0,4
(99,5/0,5)	0 ± 0	0,06 ± 0,2
(99/1)	2,3 ± 0,6	0,08 ± 0,1
(98/2)	4,0 ± 0	0,07 ± 0,8
(97/3)	8,3 ± 1	0,06 ± 0,5
(95/5)	11,7 ± 0,6	0,07 ± 0,7

A migração da nisina a partir dos filmes ativos em soluções simulantes foi avaliada. Os resultados estão apresentados na Tabela 12, na qual, a atividade antimicrobiana foi expressa como atividade antimicrobiana unidades/mililitro, detectados em soluções contendo água destilada, Tween 20 e ácido acético após a imersão dos filmes até 48 h, uma vez que nenhuma liberação adicional ocorreu em um período mais longo.

Como esperado, nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para o filme de PBAT puro (sem a nisina), utilizado como controle. Da mesma forma, nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada durante as primeiras 4 h de imersão do filme de PBAT/nisina com 0,25%. Após este período, a atividade antimicrobiana foi observada em soluções simulantes contendo Tween 20 (denominadas como B) e também em soluções contendo ácido acético (denominadas como C) para 24 e 48 h. As amostras apresentaram a melhor migração em soluções contendo Tween 20. Surfactantes são comumente utilizados como emulsionantes alimentares, e podem ser capazes de aumentar a atividade da nisina²²².

Um aumento na atividade antimicrobiana foi observado durante a imersão dos filmes das amostras a partir de 1% de concentração de nisina. Os filmes contendo 3% de nisina, liberaram 400, 800 e 3200 UA mL⁻¹, após 4, 24 e 48 h em solução simulante B, respectivamente. No entanto, a amostra contendo 5% de nisina liberou na solução simulante B, 1600, 3200 e 3200 UA mL⁻¹ respectivamente, após 4, 24 e 48 h de imersão. Após 4 h de imersão dos filmes com a solução simulante B, já foi observada uma ótima liberação para as amostras a partir de 0,5% de concentração de nisina, e esta liberação aumentou à medida que aumentou a concentração de nisina nas amostras dos filmes.

Todas as amostras apresentaram pouca atividade liberada quando imersas em solução simulante de água destilada (denominada como A) durante todo o tempo testado, sugerindo que a nisina foi liberada de uma maneira bem mais lenta, ou migrando em concentrações bem menores. Em soluções simulantes de ácido acético (nomeada como C), a migração da nisina não ocorreu para a amostra com 0,25% de nisina, mesmo após 48 h, enquanto que para os filmes contendo 2 e 3 e 5% de nisina liberou até 400 – 1600 UA mL⁻¹. Como mencionado por Mauriello *et al.*¹⁴¹, o pH mais baixo pode beneficiar a migração da nisina a partir dos filmes. Sugerindo que a nisina é mais solúvel em pH ácido.

Meira *et al.*¹⁹⁵ também verificaram que a melhor migração ocorre para soluções simulantes de Tween 20. Observaram que após 3 h de contato com filmes contendo 5% de nisina, estes apresentaram 200 UA mL⁻¹, permanecendo este mesmo valor após 24 h. No entanto, após 48 h de contato, estes filmes apresentaram 400 UA mL⁻¹.

Neste sentido, a respeito do tempo de liberação da nisina, pôde-se afirmar que 48 h são necessárias para a completa migração do antimicrobiano para os filmes. Desta forma, os filmes preparados com PBAT e nisina, nas condições utilizadas e nas determinadas concentrações, são promissores para estudos posteriores sobre a liberação controlada deste antimicrobiano em embalagens de alimentos.

Tabela 12. Atividade antimicrobiana liberada a partir de filmes de PBAT puro e de PBAT/nisina após os períodos de tempo em soluções simulantes contendo: água destilada (A), Tween 20 (B) e ácido acético (C).

Amostras	Atividade Antimicrobiana (UA mL ⁻¹)								
	4 h			24 h			48 h		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
(100/0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(99,75/0,25)	0	0	0	0	100	0	0	100	0
(99,5/0,5)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
(99/1)	100	100	100	0	200	0	100	600	100
(98/2)	100	200	100	100	100	200	200	400	400
(97/3)	400	400	800	1200	800	400	1600	3200	800
(95/5)	400	1600	800	400	3200	1600	400	3200	1600

A biodegradação de polímeros depende de alguns fatores específicos para que ela ocorra de maneira mais acelerada, como por exemplo, da sua composição molecular, cristalinidade, massa molecular e da presença de micro-organismos específicos²²³. A morfologia do polímero, incluindo a ocorrência e frequência da fase cristalina, tamanho, forma e número de cristalitos, desempenha um papel importante na determinação da taxa de biodegradação do polímero. Isso porque as regiões amorfas presentes em polímeros são mais suscetíveis à hidrólise enzimática do que regiões cristalinas. O comportamento da biodegradação destas amostras é determinado não só pela sua composição, mas também por suas estruturas de fase e todas as alterações que ocorrem durante este processo²²⁴.

A biodegradação dos filmes ativos de PBAT puro e PBAT/nisina foi investigada por um período de seis meses e os resultados estão apresentados a seguir.

Os filmes passaram pelo processo de biodegradação em condições reais de compostagem por um período total de seis meses, as amostras foram coletadas em períodos de tempo estipulados (a cada 30 dias). Desta maneira, após a coleta das amostras no local do ensaio, estas foram lavadas com água em ultrassom por 1 minuto para a retirada do solo que poderia ter ficado aderido na amostra. Em seguida, as amostras foram secas em papel filtro para retirar o excesso de água e então secas em estufa à vácuo a 40°C por 12 horas para a retirada total da umidade. Posteriormente, as amostras foram analisadas.

Primeiramente, estes filmes foram fotografados de maneira que pudéssemos acompanhar visualmente a evolução da biodegradação. A Figura 41 apresenta as

imagens das amostras após o ensaio de biodegradação. Na (Fig. 41a) estão apresentadas as imagens dos sete filmes antes do ensaio de biodegradação: (100/0), (99,75/0,25), (99,5/0,5), (99/1), (98/2), (97/3) e (95/5) e na (Fig. 41b-g) podem ser visualizados os filmes que foram avaliados durante o período do ensaio. A amostra (99,75/0,25) não foi testada no ensaio de biodegradação.

Os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina apresentaram inicialmente coloração esbranquiçada, de aspecto liso e superfície brilhante, as amostras com 3% e 5% de nisina apresentaram uma coloração mais escura (amarelada), em função da concentração da nisina (Fig. 41a). No entanto, após 30 dias de compostagem, os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina já apresentaram mudança na coloração (Fig. 41b). Algumas amostras (a partir de 0,5% de nisina) apresentaram maior propensão à biodegradabilidade, a amostra de PBAT puro foi mais resistente à biodegradação.

Foi possível observar que já no primeiro mês de compostagem, o PBAT puro apresentou sinais de degradação, que é mais evidente para as amostras com 2, 3 e 5% de nisina após este período de contato com o solo. As amostras inicialmente claras e brilhantes tornaram-se opacas e os filmes começaram a apresentar manchas marrons, provavelmente provenientes da ação de micro-organismos em sua superfície. Além disso, sua textura passou a ficar mais rugosa e ressecada, indicando o início da degradação²²³. Após 60 dias de biodegradação, este efeito passou a ser bem mais evidente, as amostras apresentaram manchas marrons mais pronunciadas e estavam mais ressecadas e rugosas. A degradação para as amostras com maiores concentrações de nisina é mais evidente do que para o polímero puro, ou mesmo para amostras com 0,5% de nisina.

Os filmes de PBAT/nisina a partir da amostra contendo 0,5%, apresentaram incrustações de composto orgânico na sua superfície após 60 dias de compostagem (Fig. 41d-g) apontadas pelas setas. No decorrer de 90 dias de contato com o solo, as amostras apresentaram manchas marrons mais pronunciadas, estes pigmentos são tipicamente oriundos de fungos²²⁵ e tendem a difundir-se na matriz polimérica, sugerindo uma possível afinidade com o polímero.

Após 150 e 180 dias de biodegradação, os filmes apresentaram coloração muito mais intensa, e manchas marrons espalhadas por quase toda a extensão da amostra. Os filmes apresentaram aspecto opaco e extremamente ressecados, evidenciando grande fragilidade (Fig. 41f-g). Além disso, foi possível observar a ação dos micro-organismos pelo aparecimento de furos e/ou orifícios nos filmes de amostras mais concentradas (2,

3 e 5% de nisina). A adição de nisina parece não ter interferido na biodegradação destes filmes, evidenciando ainda que a presença de agrupamentos de nisina nos filmes mais concentrados parece ter favorecido o ataque dos micro-organismos do solo, uma vez que os orifícios são geralmente formados perto das partículas de nisina nos filmes. Este resultado pôde ser confirmado nas imagens de MEV. Este fenômeno pode estar associado à natureza peptídica da nisina, que ao não possuir atividade antimicrobiana contra os micro-organismos do solo, pode servir como fonte de aminoácidos para estes.

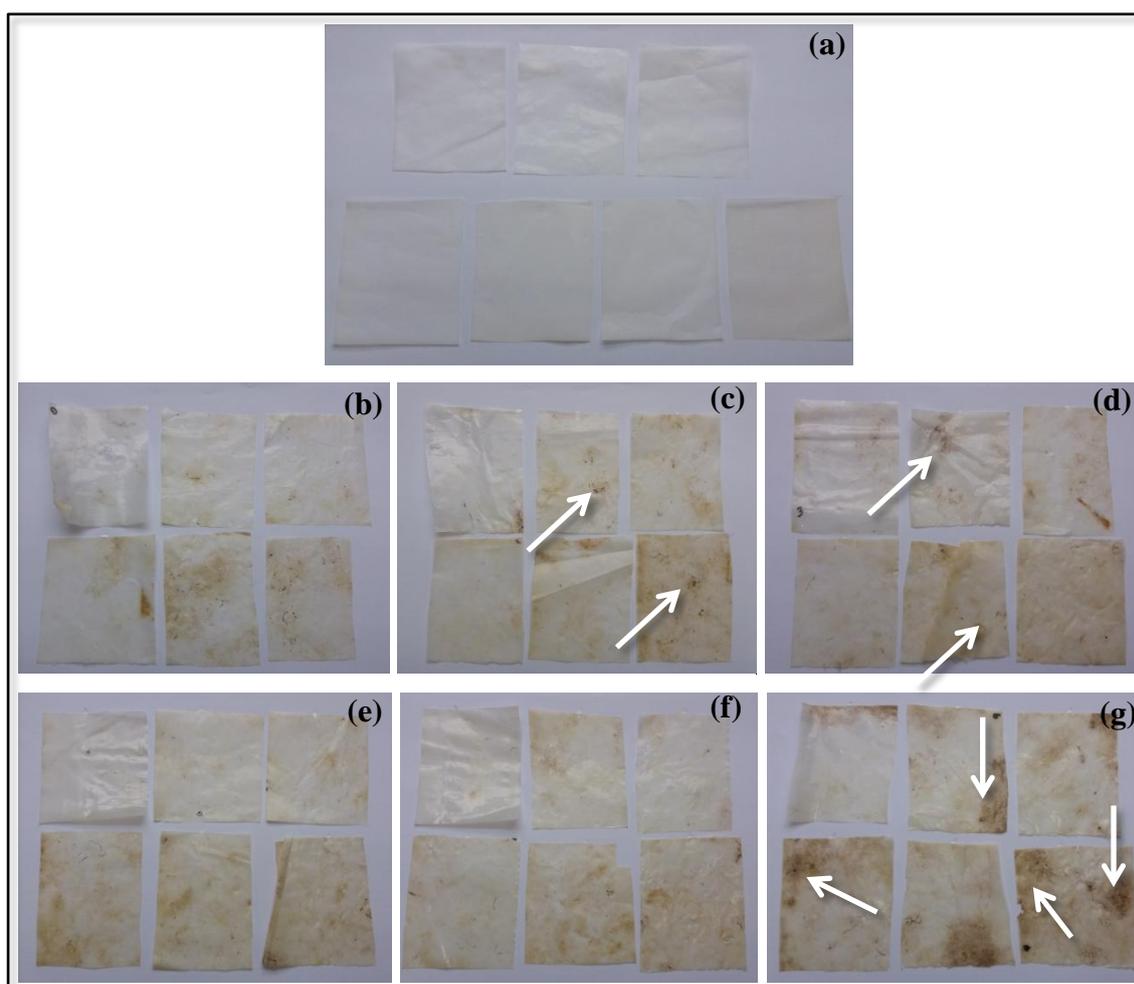


Figura 41. Fotografias das amostras dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (100/0) (99,5/0,5), (99/1), (98/2), (97/3) e (95/5): (a) amostras antes do ensaio de biodegradação, (b) 30 dias, (c) 60 dias, (d) 90 dias, (e) 120 dias, (f) 150 dias e (g) 180 dias de compostagem.

Para investigar a biodegradação dos filmes logo após 30 dias de compostagem, a superfície destas amostras foi analisada por MEV e as imagens estão apresentadas na Figura 42. As imagens de microscopia eletrônica de varredura para a superfície dos

filmes de PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina (Fig. 42) já evidenciaram a degradação do polímero no primeiro mês de compostagem, uma vez que podem ser observadas alterações superficiais nas micrografias após os primeiros 30 dias de contato com o solo. A ação dos fungos foi confirmada pela presença de hifas na superfície das amostras e também pela formação de orifícios (Fig. 42b-f), este efeito é mais pronunciado para as amostras mais concentradas (Fig. 42d-f), amostras contendo 2, 3 e 5% de nisina.

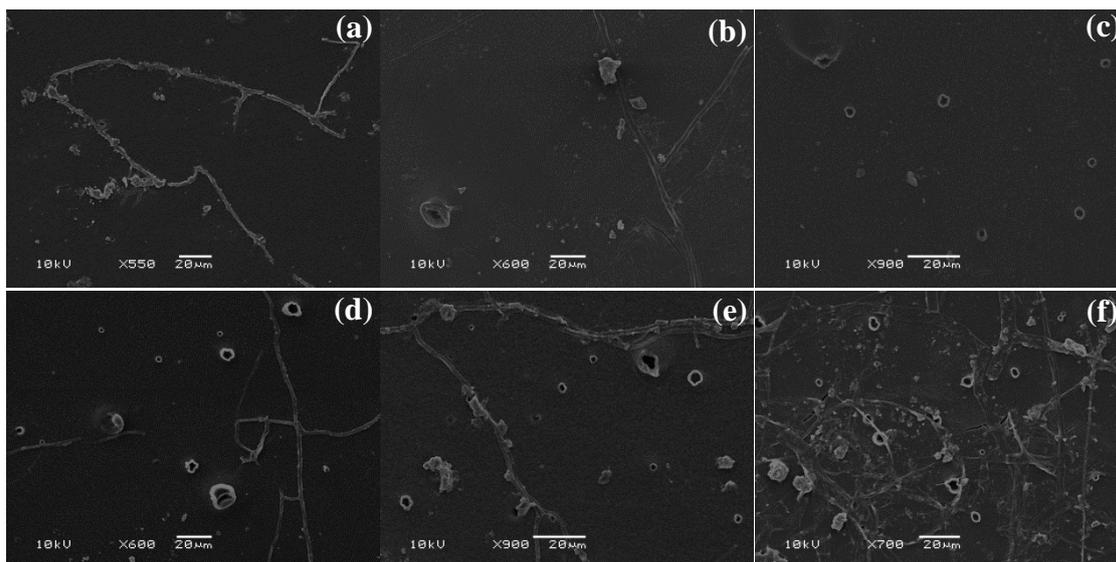


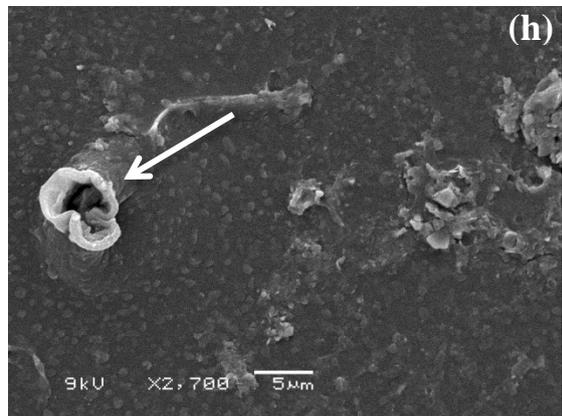
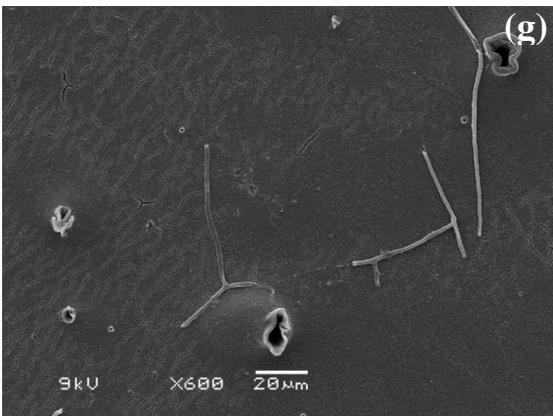
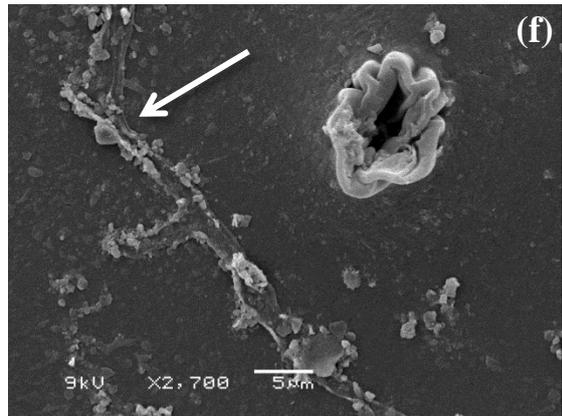
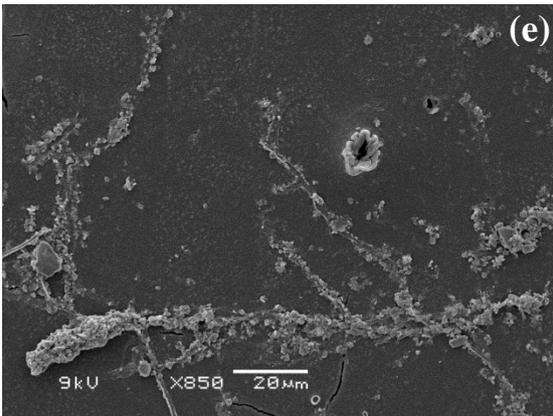
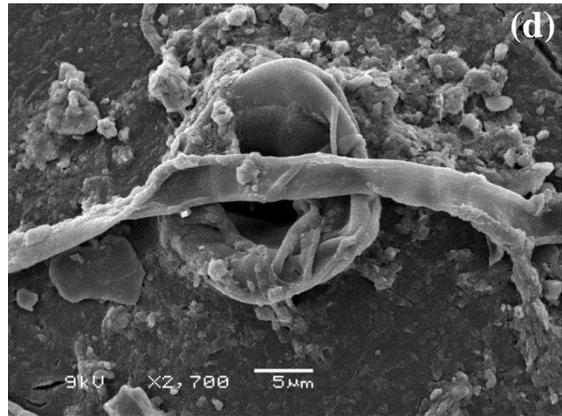
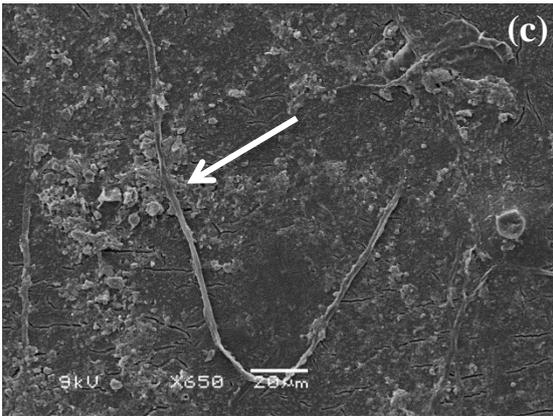
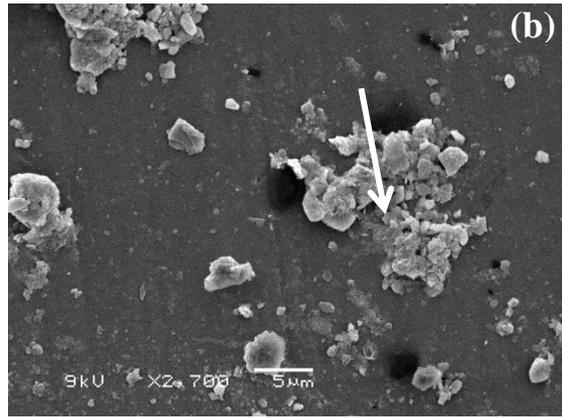
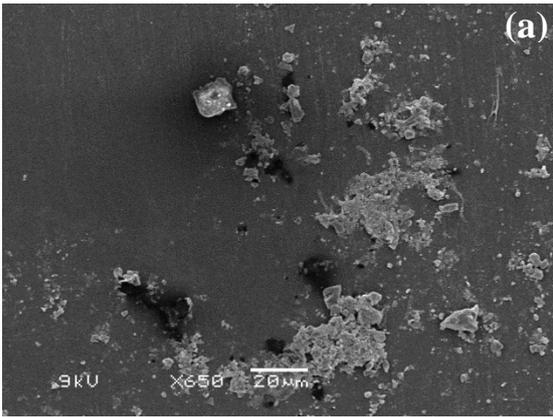
Figura 42. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina após 30 dias de compostagem: (a) PBAT puro, (b) (99,5/0,5), (c) (99/1), (d) (98/2), (e) (97/3) e (f) (95/5).

As imagens da microscopia eletrônica de varredura para a superfície das amostras dos filmes de PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina após 150 dias de compostagem estão apresentadas na Figura 43. Para cada sistema são apresentadas duas imagens, com diferentes magnificações.

Os filmes de PBAT e PBAT/nisina confirmaram a sua biodegradabilidade após 30 dias de compostagem e a ação de micro-organismos pôde ser observada em todas as amostras (Fig. 41 e 42) e mais acentuadamente na (Fig. 43) através da adesão microbiana na superfície do polímero. Foi possível observar que após 30 dias de contato com o solo, a amostra mais concentrada PBAT/nisina (95/5) apresentou maior adesão de micro-organismos em sua superfície (Fig. 42f). Também puderam ser observadas perfurações nos filmes, no entanto, estas perfurações não ocorreram no filme do polímero puro, conforme apresentado na (Fig. 42a). No filme de PBAT puro após 150

dias de contato com o solo, pôde ser visualizado a ocorrência de degradação do filme, ocorrendo a desfragmentação em alguns locais da amostra (Fig. 43a). Como já mencionado anteriormente, pode-se sugerir que a adição da nisina não impede a biodegradação dos filmes, e fica evidente que as irregularidades causadas pelos agrupamentos da nisina facilitaram a ação dos micro-organismos, uma vez que, as amostras com a maior concentração, são as mais degradadas no período de compostagem e as perfurações ocorrem preferencialmente perto das partículas de nisina presentes nos filmes (Fig. 43i-k) apontado pelas setas.

Geralmente a aderência de micro-organismos na superfície de materiais plásticos, seguida pela colonização da superfície exposta é um dos principais mecanismos envolvidos na degradação microbiana de plásticos²²⁶. As propriedades de materiais poliméricos estão associadas com a sua biodegradabilidade. Tanto as propriedades químicas como as físicas dos polímeros influenciam o mecanismo de biodegradação. O processo de biodegradação dos polímeros pode ser afetado por diversos fatores, tais como, as condições de superfície do material (área superficial, propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas, rugosidade), propriedades de primeira ordem (estrutura química, massa molecular), propriedades de segunda ordem (temperatura de transição vítrea e de fusão do material, módulo de elasticidade, cristalinidade e estrutura cristalina)²²⁶. Aumentando a massa molecular do polímero diminui a sua biodegradabilidade. Cabe ressaltar que, o grau de cristalinidade é um fator crucial que afeta a degradabilidade, uma vez que, enzimas atacam principalmente os domínios amorfos do polímero. As moléculas na região amorfa são ligeiramente comprimidas, tornando-as mais susceptíveis à degradação^{28, 29}. A região cristalina do polímero é mais resistente que a região amorfa. A presença de rugosidades/irregularidades também facilita muito a adesão de microrganismos em superfícies.



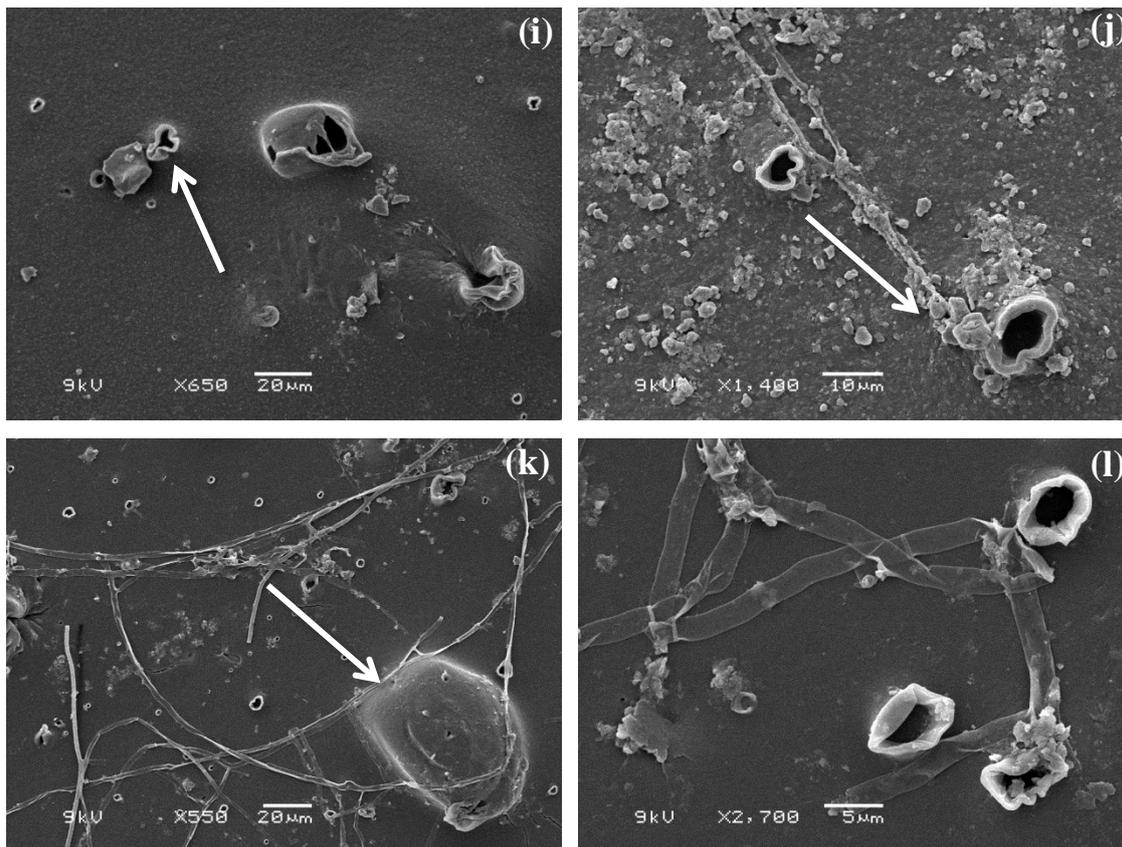


Figura 43. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para a superfície dos filmes de PBAT puro e filmes de PBAT/nisina após 150 dias de compostagem: (a,b) PBAT puro, (c,d) (99,5/0,5), (e,f) (99/1), (g,h) (98/2), (i,j) (97/3) e (k,l) (95/5).

A deterioração durante a compostagem, referente à biodegradação dos filmes, com uma consequente remoção da parte do material biodegradável, foi igualmente acompanhada por meio da massa residual dos mesmos, durante o período de compostagem e pode ser visualizada na Figura 44. Através dos resultados obtidos pôde-se comprovar que todas as amostras sofreram indícios de degradação com apenas 30 dias de contato com o solo. Todas as amostras perderam uma certa quantidade de massa após a biodegradação no solo, os filmes apresentaram em torno de 97% de massa residual, indicando 3% de perda de massa. Este comportamento também foi observado por Wang *et al.*²⁸ que investigaram a biodegradação em solo de filmes antimicrobianos de PBAT, e verificaram que a perda de massa do PBAT puro foi em torno de 2,3% nos primeiros meses do ensaio.

O filme de PBAT puro mostrou-se mais resistente à biodegradação, apresentando a menor perda de massa durante todo o período do ensaio. No entanto, as amostras de PBAT/nisina (97/3) e (95/5) foram as que apresentaram a maior perda de

massa, e assim, as mais susceptíveis à biodegradação neste intervalo de tempo, o que também pode ser observado através das imagens de MEV (Fig. 43).

Foi possível observar uma variação na massa dos filmes biodegradados a partir do segundo mês de contato como solo, ocorrendo um pequeno aumento de massa. Esse efeito é mais pronunciado para a amostra de PBAT/nisina (99,5/0,5) após 60 dias de compostagem. Segundo Gu²²⁷ este aumento de massa pode estar atribuído à presença de micro-organismos dentro da matriz polimérica, ou superficialmente, na busca de nutrientes para dar continuidade ao seu metabolismo.

Embora o processo de biodegradação do PBAT tenha sido significativamente lento em temperatura ambiente e condições reais de compostagem, é possível afirmar que o PBAT poderia degradar completamente num dado período de exposição aos micro-organismos²⁸. Uma vez que, durante o período de exposição no solo, por 180 dias (investigado neste estudo), os filmes já apresentaram indícios de degradação e desfragmentação do material. Além disso, a presença do aditivo antimicrobiano na matriz do PBAT não impediu a degradação do polímero.

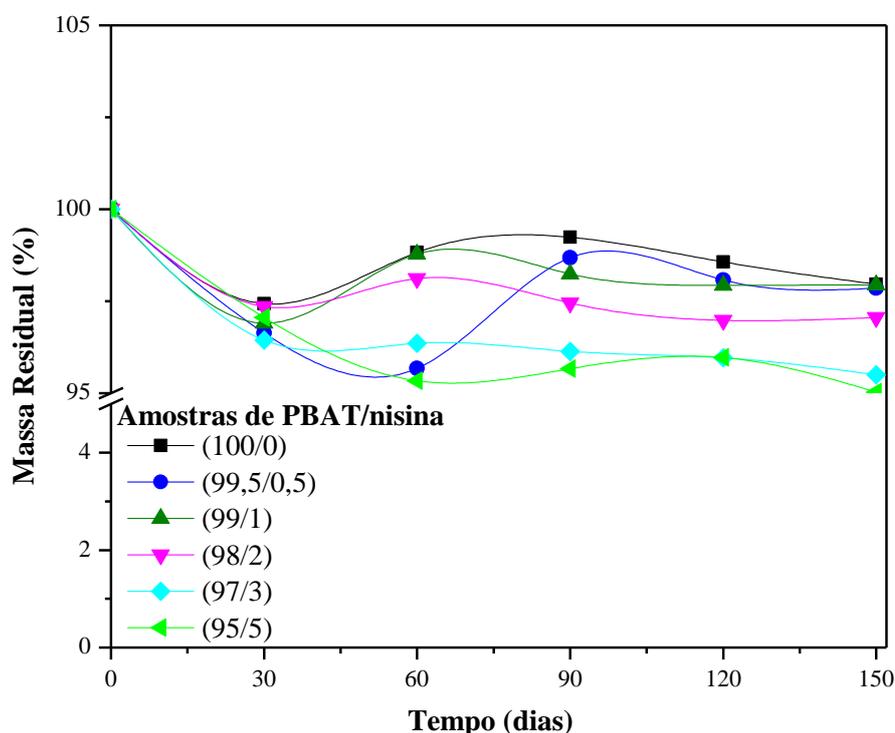


Figura 44. Massa residual dos filmes de PBAT puro e filmes de PBAT/nisina em função do tempo de exposição no solo durante 150 dias, no período de Maio a Setembro de 2014.

Os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina também foram analisados por GPC durante o ensaio de biodegradação para determinação da sua massa molar. A redução na massa molecular média do polímero seria um indicativo da biodegradação das amostras. Estes resultados estão apresentados na Tabela 13. Além disso, esta tabela apresenta o resultado do percentual de perda de massa dos filmes após 30 dias de biodegradação.

Foi possível verificar que, de maneira geral, todas as amostras apresentaram redução da sua massa molar. A redução mais acentuada pôde ser observada após 30 dias de compostagem. Estes resultados estão em concordância com as micrografias de MEV apresentadas na Figura 42 e Figura 43. Após 60 dias de contato com o solo, houve um pequeno aumento na massa das amostras quando comparadas com o mês de Maio, provavelmente devido ao aumento no volume máximo de precipitação observado para o mês de Junho (Fig. 21), totalizando 45,9 mm (Tabela 3). Neste período também foram observadas temperaturas mínimas relativamente baixas quando comparadas com o mês de início do ensaio de biodegradação, 10,7°C (Tabela 3), além disso, foi observada umidade relativa de 88,4%, maior do que no mês anterior. E em adição, no decorrer de 120 dias de compostagem (mês de Agosto), foi observada novamente a redução na massa dos filmes, sendo que foi o período no qual observou-se a temperatura mínima durante o período do ensaio (Fig. 20). No entanto, pôde-se observar que de modo geral, todas as amostras apresentaram redução na massa durante todo o período do ensaio, quando comparadas com as amostras do dia 0 (sem degradação). Umare *et al.*²²⁸ caracterizaram poliésteres biodegradáveis e observaram resultados semelhantes na biodegradação das amostras, inicialmente todas as amostras apresentaram súbitas perdas de massa e, em seguida, a perda continua mais lenta ou até aumento da massa. Atribuem este resultado à fácil degradação da massa amorfa durante as primeiras horas de degradação. Afirmam ainda que a hidrólise enzimática é um processo heterogêneo, enzimas atacam a superfície de um substrato insolúvel e a hidrólise ocorre por meio da erosão da superfície. Desta forma, a taxa de hidrólise diminui após o consumo do material amorfo da superfície. E então, uma camada de domínio cristalino permanece, onde pode ocorrer apenas a degradação lenta. Isto inibe a penetração de água no corpo do filme, resultando na diminuição da taxa de hidrólise.

Tabela 13. Massas molares médias (M_n) obtidas por GPC antes e após o período de biodegradação do filme de PBAT puro e filmes de PBAT/nisina e o percentual de perda de massa dos filmes após 30 dias de biodegradação.

Amostra	M_n (g mol ⁻¹)							% de massa
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	30 dias
(100/0)	15.692	9.204	13.097	13.108	11.043	11.023	11.012	2,57
(99,5/0,5)	16.251	9.399	15.583	14.713	11.545	11.553	11.541	3,36
(99/1)	17.470	14.482	17.081	23.556	14.297	15.540	15.247	3,09
(98/2)	18.831	10.984	16.939	22.595	14.318	14.567	14.113	2,64
(97/3)	18.826	10.541	14.187	16.157	12.064	11.744	11.622	3,56
(95/5)	16.710	11.191	13.614	16.101	13.491	12.023	11.448	2,94

Os filmes submetidos ao ensaio de biodegradação foram também analisados por espectroscopia de infravermelho, antes e após o processo de compostagem. A Figura 45 apresenta os espectros para a amostra de filme de PBAT/nisina (95/5) antes da degradação e após 180 dias de contato com o solo.

Uma forma geralmente empregada para quantificar a degradação de misturas poliméricas é a determinação da presença de grupos carbonílicos no espectro, uma vez que se entende que a formação destes grupos é decorrente dos processos de degradação do material pela ação da degradação e/ou de micro-organismos^{38, 167}.

As amostras dos filmes de PBAT apresentam em seu espectro, antes de serem compostados, a presença de grupos carbonila, devido aos grupamentos carbonílicos da estrutura deste polímero. A sobreposição dos espectros de infravermelho do filme de PBAT/nisina (95/5) antes e após a degradação durante o período de 180 dias não mostrou alterações significativas, deslocamentos ou surgimentos de bandas adicionais. No entanto, foi observado apenas uma leve redução na intensidade da banda em 1710 cm⁻¹ para a amostra com 150 e 180 dias de compostagem, quando comparada com a amostra de PBAT puro.

Weng *et al.*³⁸ que investigaram o comportamento da degradação do PBAT e blendas de PLA, verificaram que após 4 meses de degradação, o PBAT apresentou a posição do estiramento C-O que migrou de 1717 cm⁻¹ para 1716 cm⁻¹, e afirmam que a degradação ocorreu devido ao deslocamento observado para estas bandas.

O mecanismo de biodegradação de poliésteres alifáticos-aromáticos pode geralmente ocorrer de duas formas, tanto enzimático quanto hidrolítico, dos quais o primeiro é dominante quando o polímero é enterrado em um composto. A clivagem primária na cadeia principal do poliéster ocorre na presença de enzimas específicas que

são excretadas por micro-organismos tais como fungos e bactérias e os fragmentos residuais podem ser utilizados pelos micro-organismos como fonte de energia²⁸. A biodegradação de polímeros envolve várias etapas, que podem ser relacionadas como um ataque inicial dos micro-organismos na superfície dos polímeros, seguido pelo crescimento do micro-organismo, utilizando o polímero como fonte de carbono. Então ocorre a degradação primária do polímero, seguida pela degradação final. Na degradação primária, a clivagem da cadeia principal leva à formação de fragmentos de baixa massa molecular, dímeros e/ou monômeros¹⁸⁰.

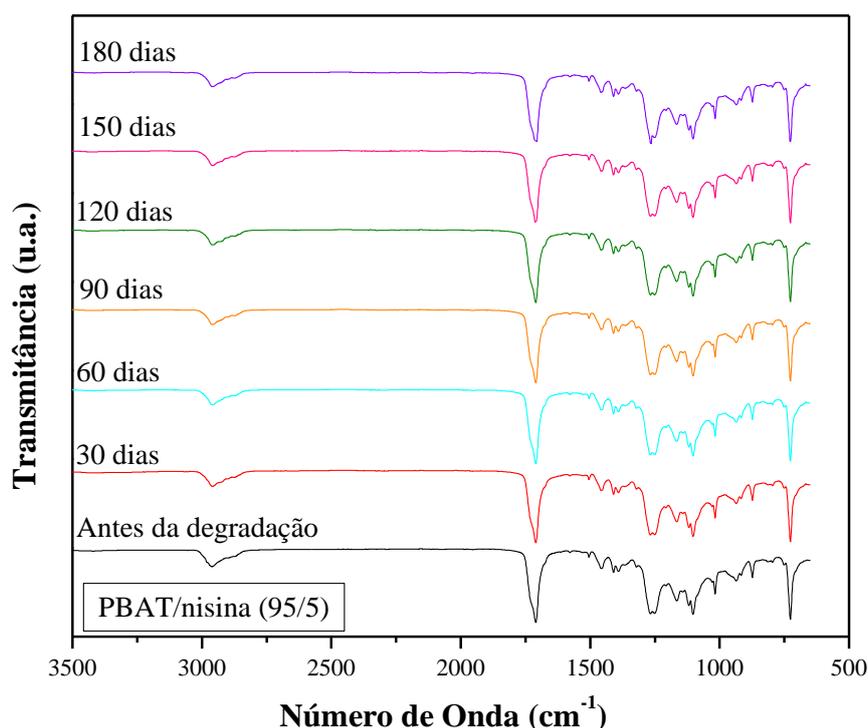


Figura 45. Espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina (95/5) antes do ensaio de degradação e após o período de 180 dias de compostagem.

O comportamento de degradação hidrolítica foi analisado para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina. A degradação hidrolítica em meio ácido foi realizada em solução de HCl 5%, com pH de 1,12. As amostras permaneceram imersas nesta solução durante o período total de 30 dias e a cada 5 dias eram coletados os frascos contendo as amostras a serem analisadas nos tempos pré-determinados. Após a coleta, as amostras foram lavadas várias vezes com água destilada e secas em estufa à vácuo para a remoção da umidade e então analisadas. O comportamento de degradação hidrolítica do filme de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina foram estudados por meio da quantificação da massa residual, análises morfológicas e estruturais. A Figura 46 ilustra

o aspecto das amostras antes e após a degradação em meio ácido. Geralmente, a taxa de degradação hidrolítica de poliésteres (tais como o PBAT, PLA, etc.), é afetada pelo meio hidrolítico, temperatura e estrutura molecular¹⁹⁸. A hidrólise tem influência substancial na biodegradação e conseqüentemente nas taxas de biodegradação de poliésteres tais como o PBAT, uma vez que a hidrólise é um dos processos iniciais de biodegradação. A cisão hidrolítica das cadeias aleatórias das ligações éster reduz o tamanho das cadeias de poliéster em uma faixa de tamanho que os micro-organismos podem bioassimilar²⁷.

Polímeros biodegradáveis são sensíveis à hidrólise sob temperatura e umidade elevada e assim limitam a sua durabilidade bem como o seu desempenho a longo prazo, em função destas condições²⁹.

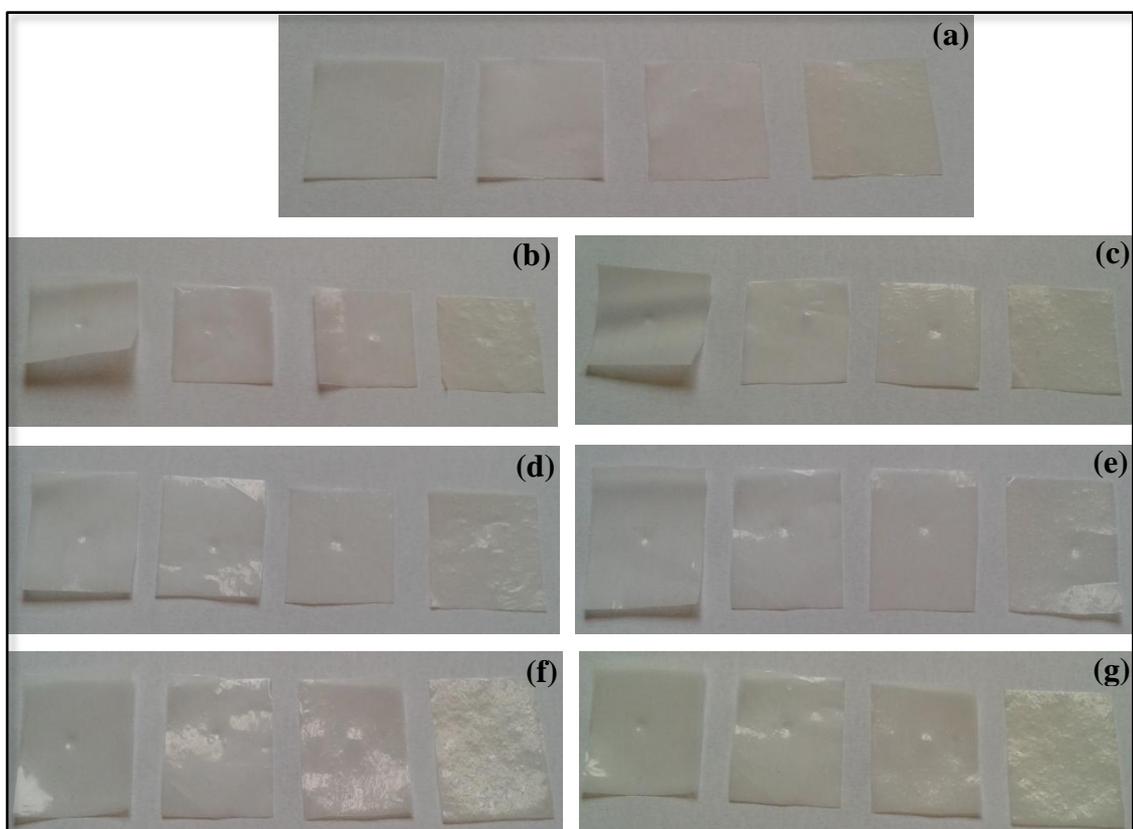


Figura 46. Filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina) antes e após a degradação em meio ácido: (a) filmes antes da degradação, (b) 5 dias, (c) 10 dias, (d) 15 dias, (e) 20 dias, (f) 25 dias e (g) 30 dias de imersão em solução de HCl.

Os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina após a degradação em meio ácido durante 30 dias, não alteraram o seu aspecto visual (Fig. 46) em termos de coloração ou alguma modificação na sua superfície (perda de brilho, fissuras e/ou desfragmentação).

Para melhor investigação de possíveis alterações morfológicas, durante este período de degradação, estes filmes foram investigados por microscopia eletrônica de varredura e a sua superfície foi analisada. A Figura 47 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície destes filmes antes da degradação. As (Figuras 48 e 49) apresentam as imagens de MEV para os filmes após 5 dias de degradação em meio ácido e após 30 dias de degradação, respectivamente.

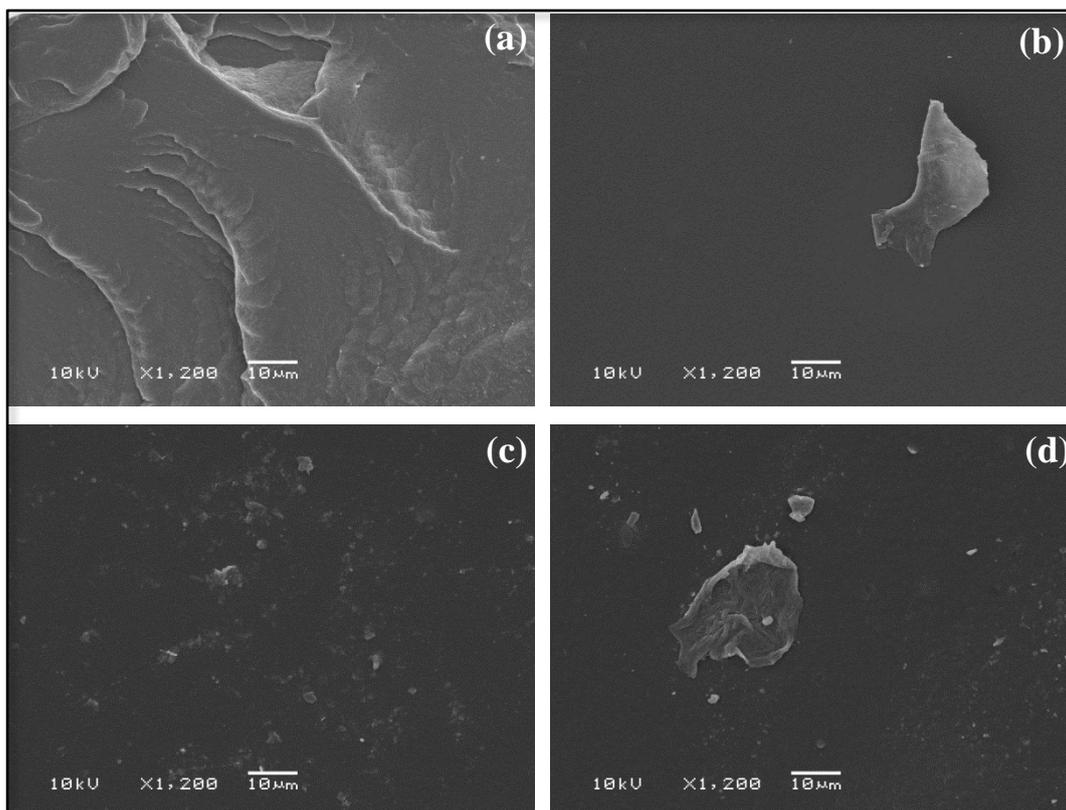


Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina antes da degradação: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

O filme de PBAT puro apresenta superfície lisa e sem a presença de aglomerados (Fig. 47a) no entanto, foi possível observar a presença de aglomerados nos filmes de PBAT/nisina, e estes aumentam à medida que aumenta a concentração de nisina na matriz de PBAT (Fig. 47b-d), em adição, além dos aglomerados de nisina, também foi possível verificar que o aditivo encontra-se disperso em partículas menores ao longo de toda a superfície do filme (Fig. 47c).

Após a degradação em meio ácido com os filmes em contato com a solução durante 5 dias, já foi possível identificar mudanças na sua superfície (Fig. 48). Estes filmes apresentaram morfologia mais rugosa e não mais superfície lisa e homogênea

como visto anteriormente na (Fig. 47). Filmes de PBAT/nisina com 0,5% e 5% de aditivo apresentaram desfragmentações em alguns locais (Fig. 48b, d). No entanto, filmes com 2% de nisina (Fig. 48c) apresentaram superfície rugosa e alguns poros e/ou orifícios.

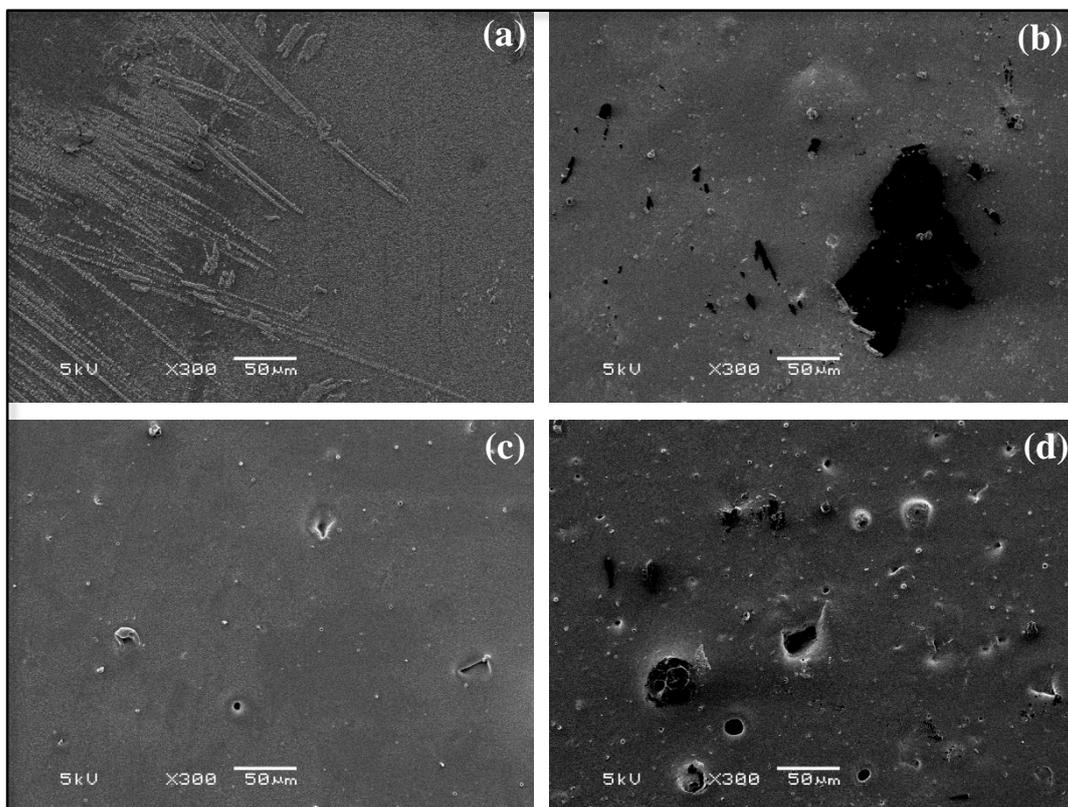


Figura 48. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina após 5 dias de degradação: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

Após 30 dias de contato em meio ácido, os filmes apresentaram superfície ainda mais rugosa (Fig. 49a, b) e desfragmentações maiores puderam ser observadas ao longo da superfície do filme. Filmes de PBAT/nisina com 0,5, 2 e 5% apresentaram cavidades, bem como regiões com erosão em grande parte da sua superfície (Fig. 49 b-d), evidenciando que a degradação da matriz polimérica ocorreu.

Resultados semelhantes foram relatados por Muthuraj *et al.*²⁹ que também investigaram a degradação hidrolítica em poliésteres biodegradáveis. Dong *et al.*¹⁹⁸ investigaram a degradação hidrolítica em blendas de PLA/PBAT e também identificaram cavidades na superfície dos filmes, e atribuíram este efeito à dissolução dos oligômeros que são formados durante o processo de hidrólise.

Fukushima *et al.*³¹ investigaram a degradação hidrolítica de nanocompósitos à base de PBAT e verificaram que após 8 semanas de degradação, algumas amostras apresentaram regiões claras na sua superfície. Atribuíram este clareamento da superfície à dispersão de luz devido à presença de água e/ou à degradação de produtos formados durante o processo de hidrólise ou ainda à formação de buracos na matriz durante a degradação, ou então, à evolução na cristalinidade da matriz do polímero. Neste estudo também puderam ser observadas estas zonas claras na superfície do filme (Anexo 7, Fig. 85).

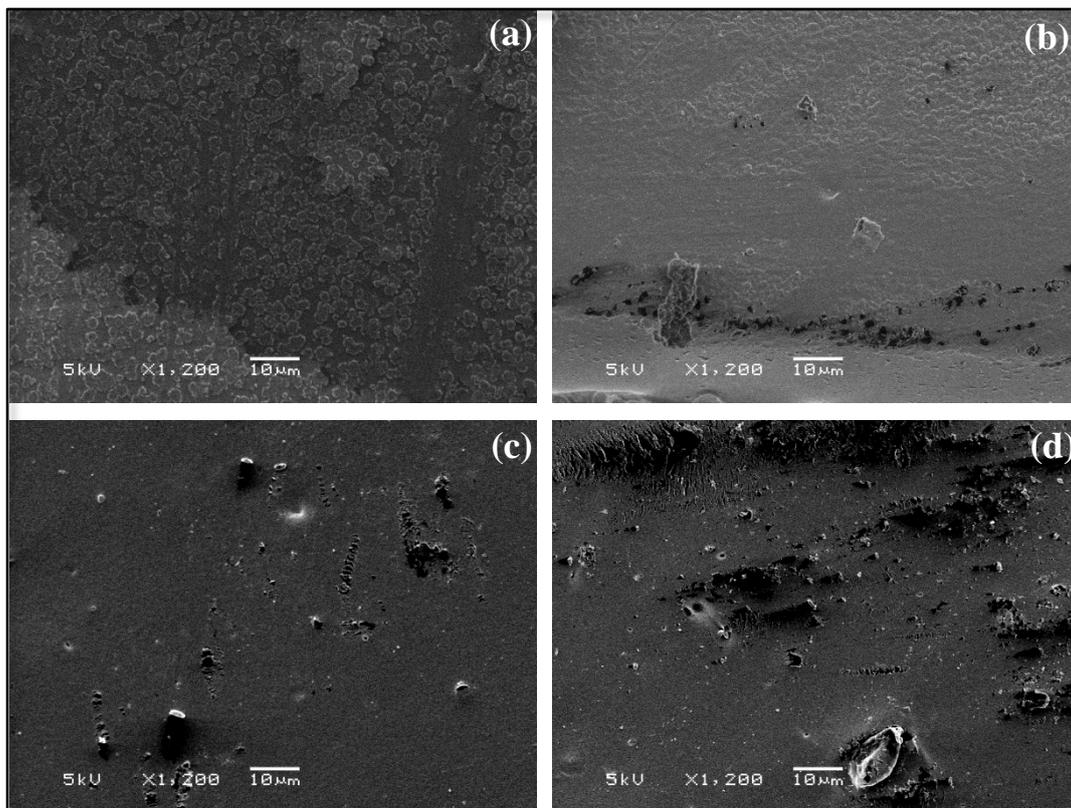


Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina após 30 dias de degradação: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

A velocidade da reação de degradação hidrolítica é afetada pela forma e natureza da amostra, tais como a estrutura química do polímero, massa molar e distribuição, pureza e morfologia, bem como as condições em que a hidrólise é conduzida, incluindo o pH e a temperatura²²⁹. Cabe ressaltar que temperaturas mais elevadas do meio aceleram o processo de degradação. O mecanismo de hidrólise é iniciado pela quebra da ligação éster da cadeia do polímero quando reage com a água. A degradação inicia

principalmente na região amorfa do material, onde os segmentos das macromoléculas são mais flexíveis e facilmente atacados pela água. A degradação destes segmentos na região amorfa reduz o emaranhamento molecular e aumenta a mobilidade da cadeia, que pode então ser reorganizada²³⁰. Uma vez que a região amorfa tenha sido afetada, a degradação inicia-se na região cristalina do material, um pouco menos susceptível ao ataque devido a sua estrutura ordenada.

O mecanismo associado à hidrólise do grupo éster em um meio neutro ou ácido é diferente daquele em meio alcalino. Em meios neutros ou ácidos, a hidrólise inicia pela protonação e é seguida pela adição de água e a quebra da ligação éster²³⁰. No caso dos poliésteres, vários mecanismos de degradação podem ocorrer dependendo das condições de processamento do material. No caso do PBAT, a degradação hidrolítica ocorre principalmente devido a cisão da cadeia principal nas ligações éster, como já mencionado anteriormente, e além disso, a reação também pode ocorrer nas ligações da carbonila perto do anel benzênico¹⁶⁷.

Para avaliar a degradação hidrolítica dos filmes de PBAT e PBAT/nisina após o período de 30 dias, a massa residual dos filmes foi analisada e apresentada na Figura 50. Além disso, a perda de massa dos filmes também foi acompanhada por GPC e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Os pontos de transição das curvas de perda de massa para todas as amostras ocorre já após os primeiros 5 dias de degradação. No entanto, no primeiro estágio de degradação (5 dias), a perda de massa para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina com 0,5% e 2% de nisina foi pequena e menor que 2%. Por outro lado, a amostra com 5% de nisina apresentou uma considerável perda de massa já nos primeiros 5 dias, em torno de 5%.

Após 10 dias a perda de massa das amostras de PBAT puro e PBAT/nisina com 0,5% e 2% de nisina aumentou com o tempo de degradação e após 20 dias tornou a diminuir novamente. A amostra mais concentrada (95/5) manteve sua massa quase constante no intervalo de 10 a 20 dias e após 30 dias aumentou sua perda de massa em torno de 7,5%. A amostra contendo 2% de nisina perdeu em torno de 5,4% de massa após 30 dias de degradação, e as amostras contendo 0,5% e PBAT puro, perderam em torno de (3,4% e 1,7%), respectivamente. Foi possível perceber que a amostra mais concentrada foi mais susceptível à degradação em meio ácido quando comparada com as demais amostras.

Lai *et al.*²³¹ investigaram a degradação hidrolítica do poli(butileno succinato) e também verificaram um aumento linear na perda de massa após 3 dias e então as amostras tornavam a diminuir. Atribuíram esta característica de degradação do PBS com o tipo de reação autocatalítica ocorrida durante o processo de degradação.

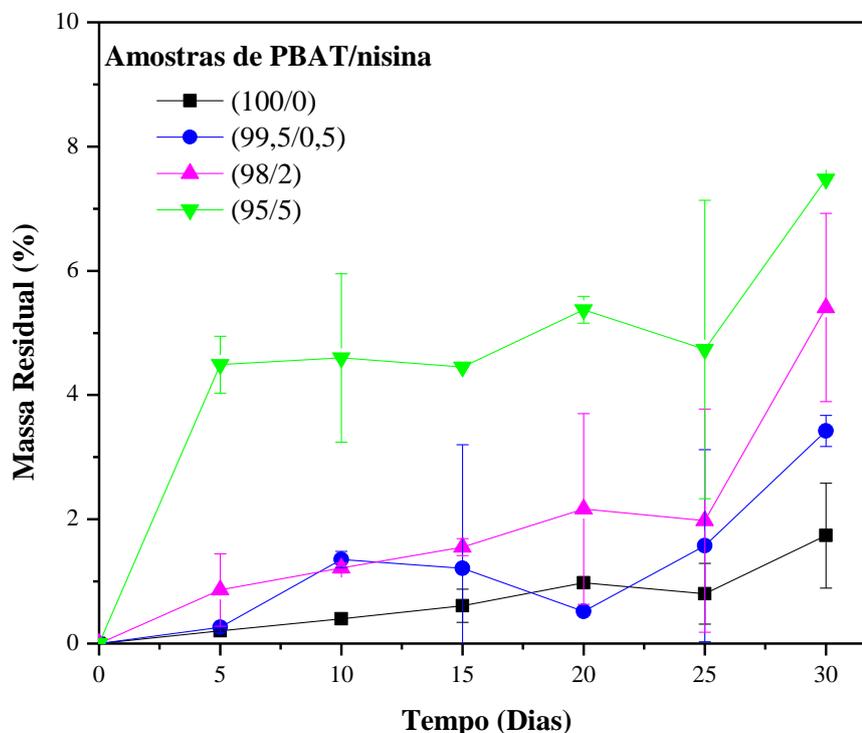


Figura 50. Massa residual para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina em função do tempo de degradação ácida.

A massa molecular ponderal média (M_w) é utilizada para avaliar o processo de degradação hidrolítica uma vez que é menos afetada pela composição M_w do que o número de massa molecular média¹⁹⁸. Os resultados apresentados na Tabela 14 mostraram que a massa molecular M_w para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina reduziram significativamente após 30 dias de degradação, indicando que a degradação hidrolítica ocorreu para todas as amostras neste período. Dong *et al.*¹⁹⁸ avaliaram o comportamento de degradação hidrolítica de blendas de PLA/PBAT e verificaram que após 56 dias o PBAT puro apresentou M_w de 27 (kDa).

Para confirmar a degradação das amostras, a técnica de FTIR tem sido geralmente utilizada para este fim, os espectros dos filmes de PBAT/nisina após 30 dias imersos em meio ácido estão apresentados na Figura 51.

Tabela 14. Resultados da massa molecular do filme de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina após a degradação hidrolítica em meio ácido por 30 dias.

Amostra	M_w (g mol ⁻¹)						
	0 dia	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias
(100/0)	40.625	39.894	37.772	31.760	28.227	24.512	20.827
(99,5/0,5)	47.373	46.161	43.851	40.272	35.373	30.374	25.372
(98/2)	70.735	69.666	65.648	58.532	52.532	45.188	41.332
(95/5)	74.098	72.624	68.573	62.395	56.125	44.398	40.988

Os espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina com 5% de nisina apresentaram espectros muito similares, mesmo após 30 dias de degradação ácida. Não foram observadas alterações na intensidade, bem como, deslocamentos da banda da carbonila em 1710 cm⁻¹, característica do processo de degradação, conforme mencionado anteriormente. No entanto, foi possível identificar uma leve redução na banda da hidroxila, e além disso, um pequeno deslocamento foi observado para o filme após 30 dias de degradação (2950 cm⁻¹), sendo que, antes da degradação esta banda foi identificada em (2962 cm⁻¹). Por fim, os espectros de FTIR não apresentaram diferenças significativas quando comparado com o espectro da amostra antes da degradação, isto é possivelmente devido à estrutura parcial aromática do PBAT²⁹.

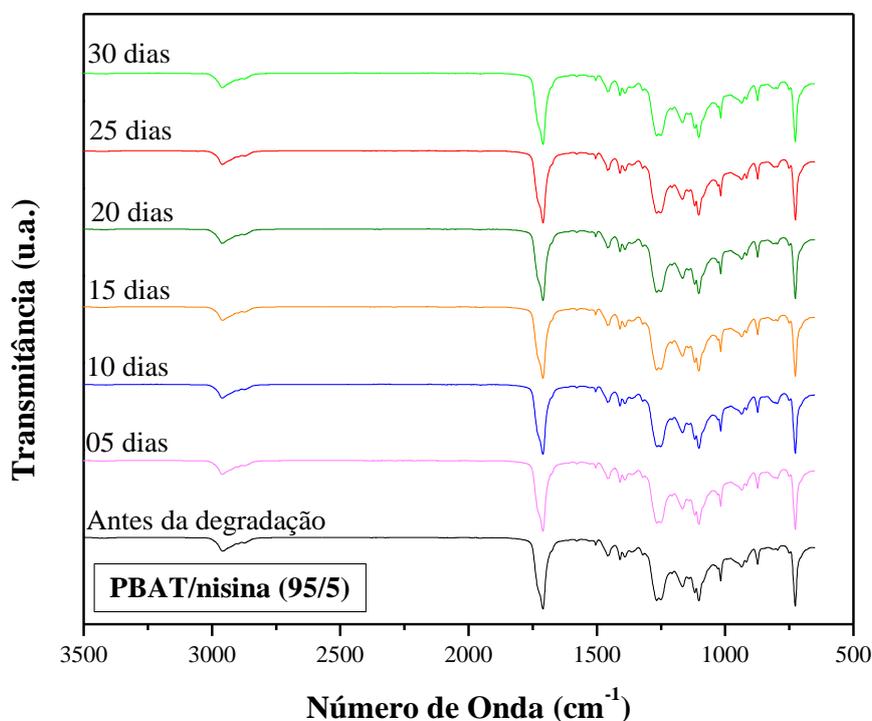


Figura 51. Espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina com 5% de nisina antes e após a degradação hidrolítica em meio ácido por 30 dias.

Comparativamente, o comportamento de degradação hidrolítica em meio básico foi analisado para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina. As amostras ficaram imersas em solução padrão de NaOH 0,01 mol/L com pH de 13,13 durante o período total de 30 dias, e a cada 5 dias eram coletados os frascos contendo as amostras a serem analisadas nos tempos pré-determinados. A Figura 52 ilustra o aspecto das amostras antes e após a degradação em meio básico.

Foi possível observar que a degradação hidrolítica em meio básico foi bem mais agressiva para os filmes, tanto para o filme de PBAT puro quanto para os filmes de PBAT/nisina. Após 5 dias de degradação, já foi possível observar a desfragmentação total dos filmes na solução (Fig. 52c). As soluções foram filtradas em papel filtro e pequenas porções de amostra restaram a cada coleta (Fig. 52d). Portanto, não foi possível realizar a quantificação da perda de massa, tampouco análise de GPC e MEV, em função da pouca quantidade de amostra que restou após 5 dias de degradação. No entanto, foi possível investigar a degradação destas amostras por FTIR, e os espectros estão apresentados na Figura 53.

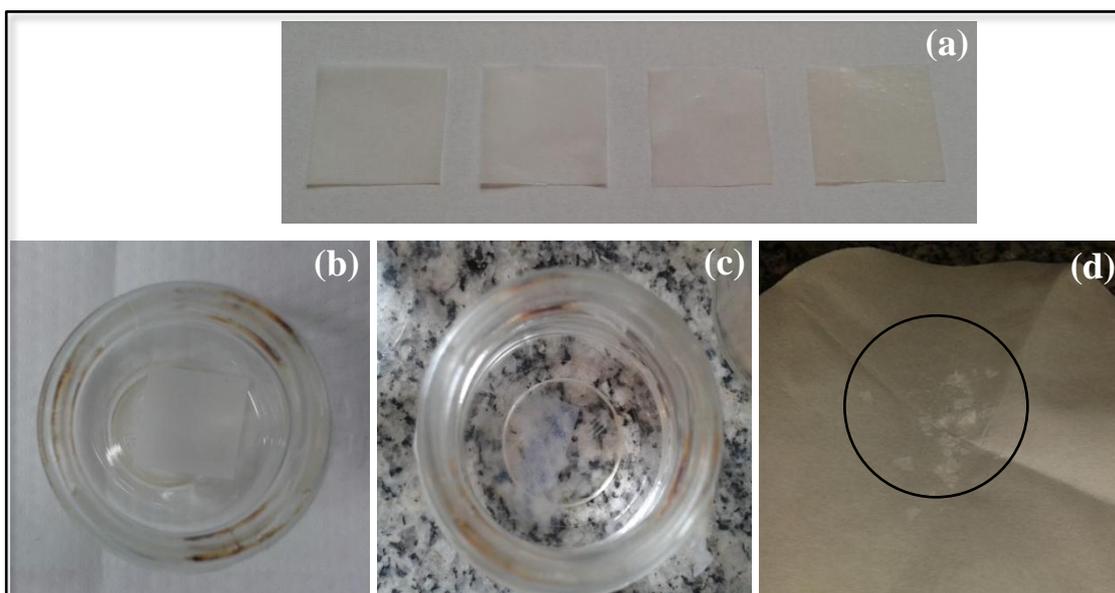


Figura 52. Filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina) antes e após a degradação em meio básico: (a) filmes antes da degradação, (b) amostra no frasco de vidro antes da imersão na solução, (c) amostra imersa na solução após 5 dias de degradação, (d) quantidade de amostra para análise após degradação de 5 dias (identificada na Figura).

Para investigar a degradação dos filmes de PBAT/nisina, estes, foram analisados por FTIR, técnica bastante utilizada para investigação de mudanças estruturais e confirmar degradação em materiais sólidos, uma vez que, levando-se em consideração a estrutura do PBAT, é possível identificar vários grupos funcionais, tais como, grupos hidroxila (OH) e carbonila (C=O) que podem ser utilizados como ferramentas para estudar a degradação. Como um resultado da cisão da cadeia principal da hidrólise da ligação éster, álcool terminal e grupos de ácido carboxílico são produzidos, e com o progresso da hidrólise, um aumento nos grupos OH deveriam ser observados nos espectros de FTIR²⁷. A cisão hidrolítica da cadeia principal em vários locais da cadeia do polímero produz moléculas menores ou oligômeros, que podem facilmente permear para fora da matriz do polímero. E, portanto, reduzir a absorbância dos grupos carbonila (1710 cm^{-1}) também resultado da hidrólise²⁷.

Portanto, foi possível confirmar a degradação dos filmes de PBAT/nisina em meio básico (Figura 53), uma vez que foram identificadas reduções significativas nas bandas da carbonila (1710 cm^{-1}) a partir do quinto dia de degradação. A partir do décimo dia de degradação hidrolítica, esta banda não pôde mais ser visualizada. Além disso, a partir do quinto dia de análise a banda correspondente ao estiramento OH, que aparece na região de 3000 cm^{-1} , não foi mais identificada.

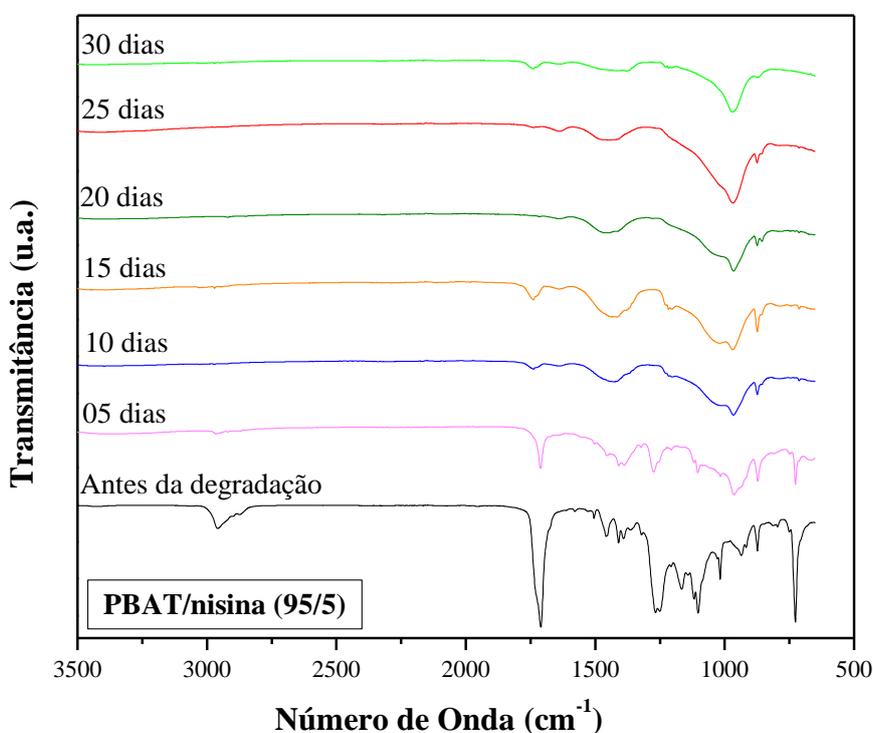


Figura 53. Espectros de FTIR para os filmes de PBAT/nisina com 5% de nisina antes e após a degradação hidrolítica em meio básico por 30 dias.

Desta forma, comparando os resultados das degradações em meio ácido e em meio básico, foi possível observar que as amostras degradaram mais rapidamente em meio básico. Esta condição foi mais agressiva para os filmes de PBAT/nisina, possivelmente devido ao fato de que compostos com grupos terminais OH podem dissolver mais rapidamente em meio básico devido à grande polaridade desta solução comparada com a matriz de PBAT^{27, 198}. A influência do pH nos perfis de degradação tem sido relatada pela destruição das interações da ligação de hidrogênio com um meio básico²³². Além disso, temperaturas diferenciadas podem ter aumentado a taxa de degradação dos filmes, uma vez que maiores temperaturas aumentam a taxa de difusão da água e ainda, a água pode solubilizar oligômeros²³². As moléculas de água são capazes de acessar as regiões amorfas mais facilmente, iniciando mais rápido a cisão da cadeia hidrolítica²²⁹. Em adição, a água penetra o polímero e atinge um nível de saturação muito mais rapidamente em comparação com degradação de polímeros²³³. As moléculas de água atacam as ligações éster na cadeia do polímero através das reações de hidrólise e a clivagem da cadeia produz cadeias mais curtas como álcool (-OH) e grupos carboxílicos (-COOH) de maneira que as amostras tornam-se mais hidrofílicas e mais susceptíveis à degradação²³⁰. Os grupos terminais carboxílicos podem atuar como um catalisador para acelerar a reação de hidrólise. Além disso, a difusão restrita dos produtos de degradação podem resultar em uma elevada concentração de grupos terminais carboxila no interior do material e produzir degradação heterogênea, na qual o centro do material é degradado mais rapidamente do que a sua superfície²³³.

Hidrólise de copoliéster alifático-aromático, como o PBAT, implicam que as ligações éster envolvendo ácido adípico são degradadas muito mais rapidamente que aquelas com ácido tereftálico. Presumivelmente, após suficientes ligações éster dos componentes ácido adípico terem sido hidrolisadas, existem fragmentos pequenos o suficiente contendo ácido tereftálico que podem ser hidrolisados¹⁷⁸. De fato, a clivagem dos grupos éster em meio ácido é reportado por ser reversível em contraste com a hidrólise alcalina que é irreversível²³².

A fim de avaliar a degradação dos filmes de PBAT e PBAT/nisina quanto à ação de fungos, foi realizada a degradação dos filmes através da incubação em meio sólido (PDA e ágar) e líquido (PDB e salina).

A Figura 54 apresenta a imagem das amostras imersas em solução salina, PDB, incubadas em placas de ágar e PDA. O grau de degradação dos filmes do polímero foi quantificado em termos de perda de massa, uma vez que foram submetidos à

degradação na presença de micro-organismos, analisado através de GPC. A degradação destas amostras foi qualitativamente avaliada em termos de evidências visíveis de degradação dos filmes. A degradação visual foi definida em termos de alteração na coloração dos filmes, alterações superficiais, tais como opacidade e fragilidade, sendo facilmente rasgados e mais finos do que o filme antes da exposição. Os filmes podem ter enfraquecido e/ou ficado mais finos devido ao crescimento de biofilme na sua superfície¹⁷⁸. Além disso, para confirmar a degradação destas amostras, a superfície foi também analisada por MEV e os filmes investigados por FTIR.

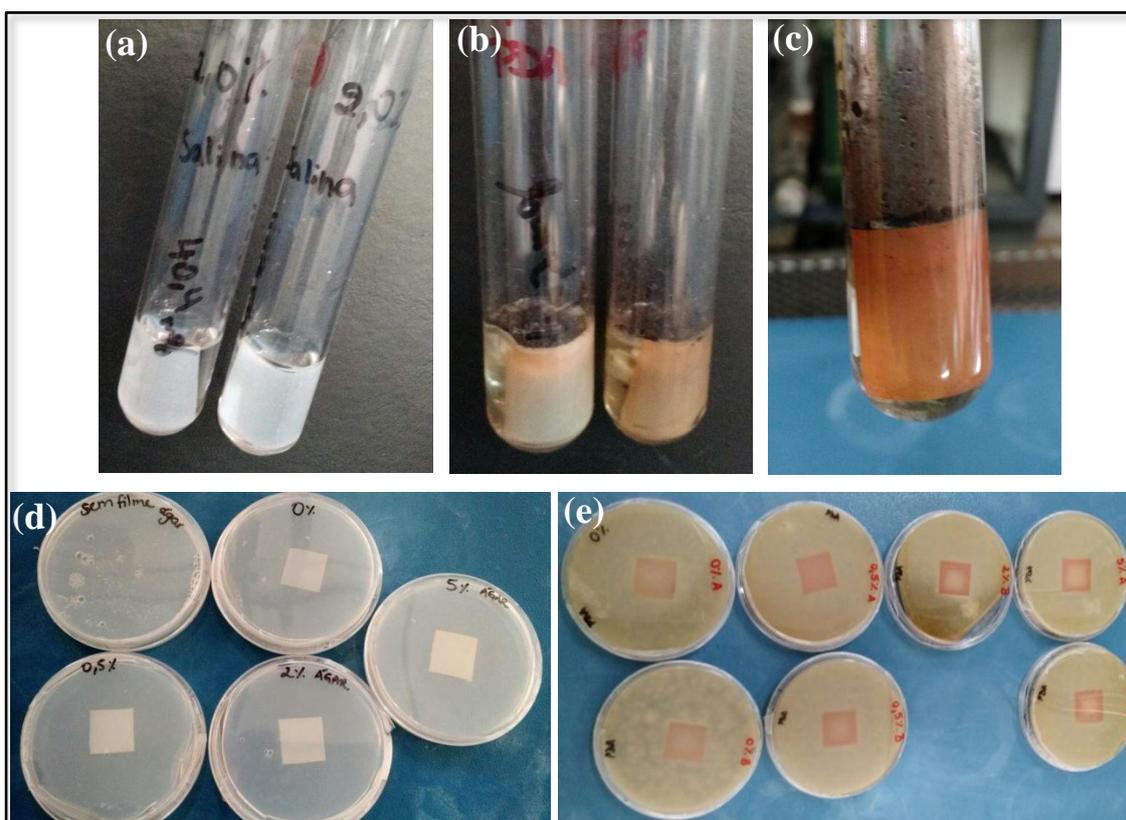


Figura 54. Degradação dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina): (a) incubação em meio líquido em solução salina, (b) incubação em meio líquido em solução de PDB, (c) incubação em meio líquido em solução de PDA, (d) incubação em meio sólido com ágar e (e) incubação em meio sólido em PDA.

Os aspectos dos filmes após a degradação em meio líquido e sólido durante o período de 30 dias, estão apresentados na Figura 55. Com os filmes ainda nos sistemas de incubação (Fig. 54), foi possível perceber que o fungo *A. niger* ficou parcialmente aderido sobre os filmes, e houve alteração na coloração das bordas dos filmes vistos no fundo das placas com PDA (Fig. 54e). Os filmes incubados em solução salina (Fig. 55a)

apresentaram leve variação na coloração, antes esbranquiçada e após 30 dias apresentaram coloração mais rosada e a presença de esporos visíveis. No entanto, foi o meio menos agressivo para os filmes de PBAT. Em PDB (Fig. 55b) foi possível perceber uma grande alteração na coloração dos filmes, filme de PBAT puro apresentou coloração mais amarelada, enquanto o filme com 5% de nisina apresentou coloração bem avermelhada. Em ágar (Fig. 55c) os filmes apresentaram indícios de alteração na coloração, as bordas ficaram mais avermelhadas. Filmes com 5% de nisina apresentaram aspecto mais opaco e ressecado. E, quando os filmes foram incubados em PDA (Fig. 55d), foi possível observar que a degradação foi mais intensa, uma vez que os filmes apresentaram maior alteração na coloração, efeito observado para todas as amostras e além disso, os filmes apresentaram-se mais ressecados, frágeis e opacos.

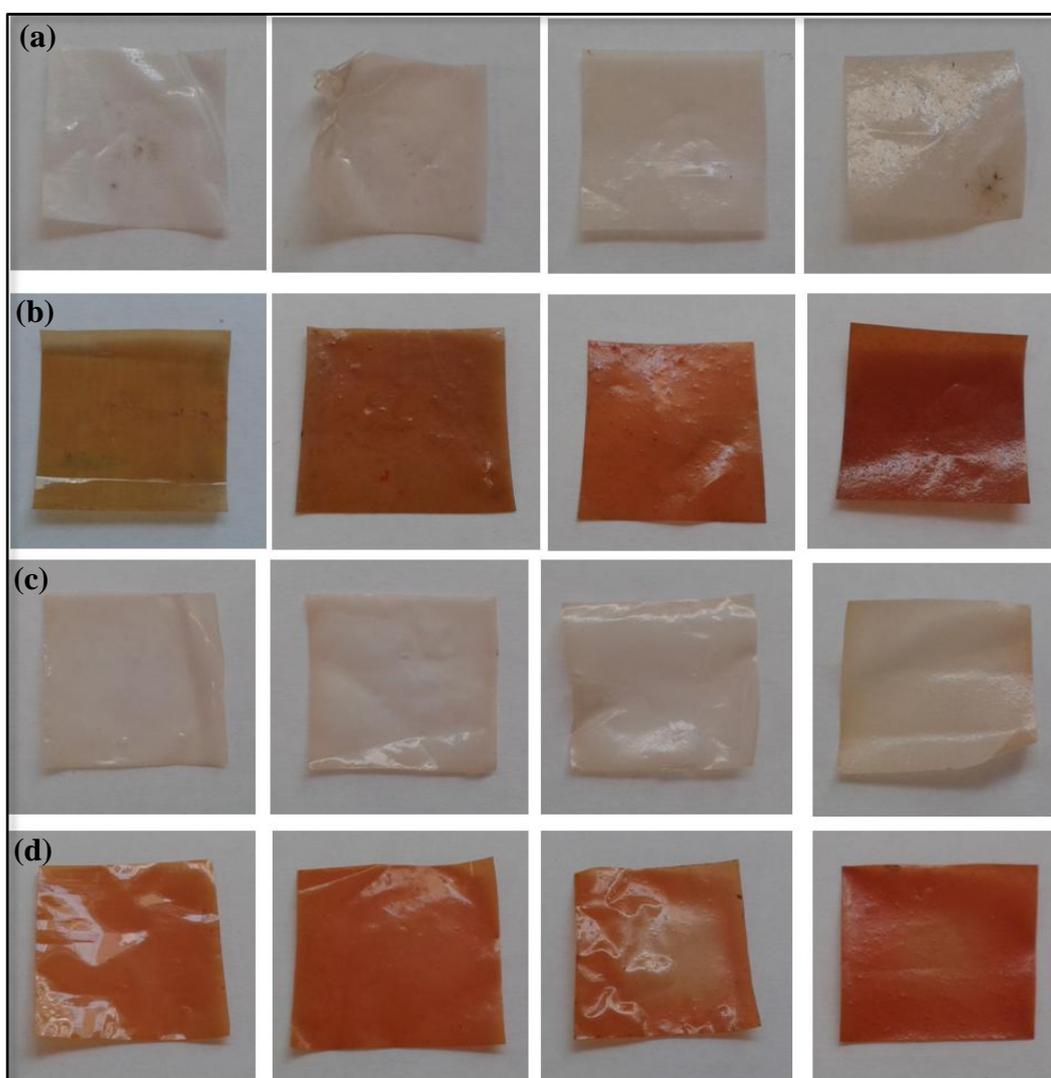


Figura 55. Filmes de PBAT puro e PBAT/nisina (0,5%, 2% e 5% de nisina) após 30 dias de degradação: (a) Solução salina, (b) solução PDB, (c) ágar e (d) PDA.

A superfície dos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina submetidos à degradação durante o período de 30 dias em diferentes meios (líquido e sólido, e em diferentes culturas, salina, PDB, ágar e PDA) foram analisadas por MEV. As imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmaram que os meios utilizados para degradação dos filmes de PBAT foram capazes de causar, ao menos, alguma degradação nos filmes (Fig.56-59).

Os fungos formaram aglomerados de biomassa relativamente espessos na superfície dos filmes, mais evidentes em filmes degradados em solução salina (Fig. 56b,d) e em PDB (Fig. 57a-c). Em alguns filmes, houve degradação visível com formação de orifícios, este efeito pode ser observado após degradação em solução salina (Fig.56c) e em PDA (Fig. 59c), já em ágar foi possível observar a formação de cavidades (Fig. 58c,d).

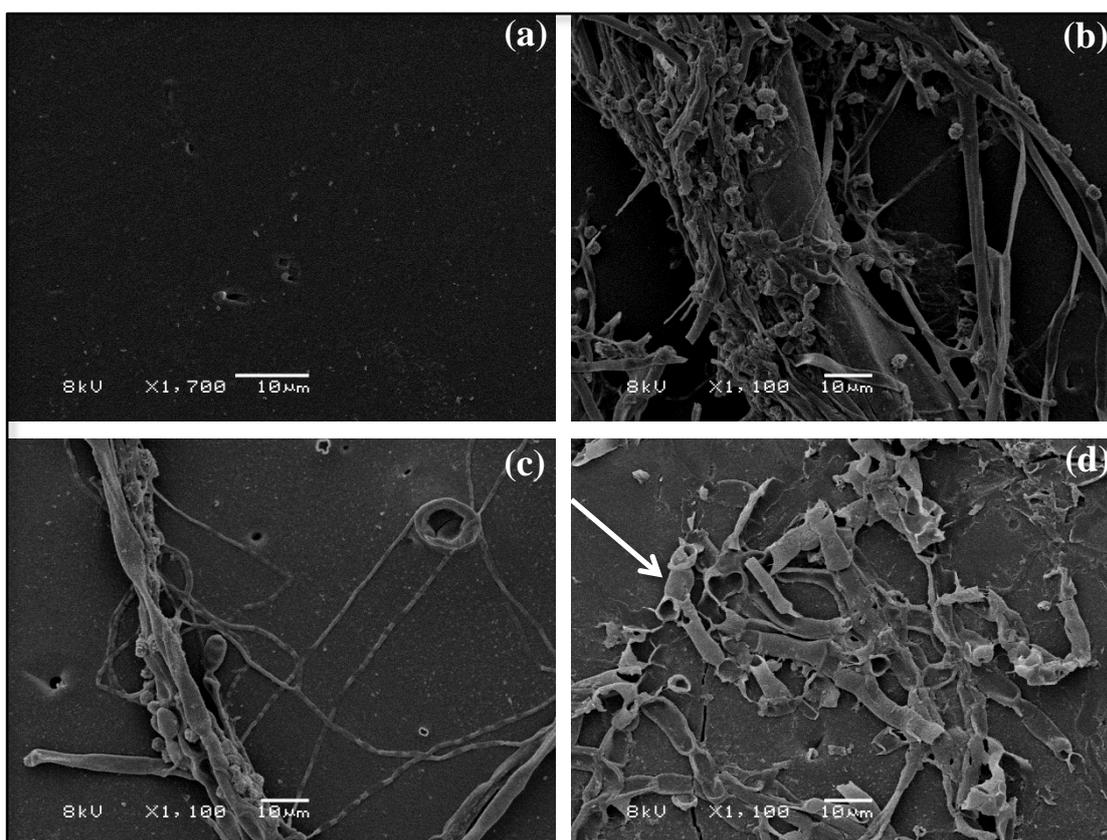


Figura 56. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em solução salina por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

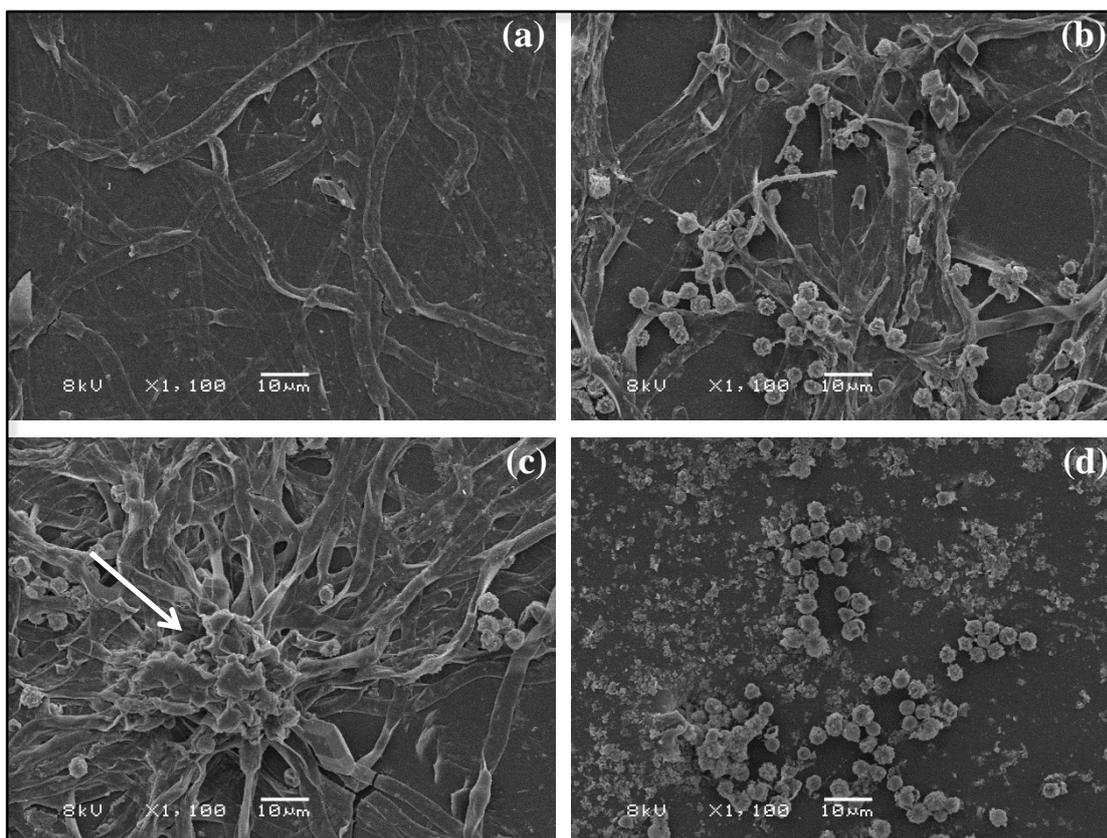


Figura 57. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em PDB por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

Após 30 dias de incubação, o crescimento do fungo foi claramente visível em filmes de PBAT/nisina com 0,5%, 2% e 5%. O crescimento da colônia do fungo foi maior à medida que a concentração de nisina aumentou na matriz do PBAT (Fig. 59b,d). As partículas de nisina presentes nas superfícies dos filmes de PBAT facilitaram a adesão do fungo (Fig. 56d, Fig. 57c, Fig. 59d), apontadas pelas setas. Isto enfraquece a matriz do polímero e aumenta a proporção da área de contato, hidroflicidade e a permeabilidade do filme. Sunilkumar *et al.*¹⁸⁰ reportaram o mesmo efeito para os filmes de polietileno de baixa densidade e quitosana, observaram que a medida que aumentou a concentração de quitosana no matriz de LDPE, o ataque do fungo *A. niger* foi bem mais evidente.

A presença de esporos em proporções bastante significativas pôde ser observada na superfície dos filmes, tanto do polímero puro, quanto nos filmes de PBAT/nisina. Este comportamento foi mais evidente quando os filmes foram incubados em PDA por

30 dias (Fig. 59), no entanto, também foi visível a presença de esporos em filmes incubados em PDB (Fig. 57) e ágar (Fig. 58).

Filmes de PBAT/nisina incubados em solução salina (Fig. 56b-d) apresentaram alguns esporos na sua superfície, porém em quantidade inferior. No filme de PBAT puro este comportamento não foi observado. Geralmente, a deterioração dos polímeros resulta na redução da transparência e/ou brilho da amostra, alteração na coloração e a presença de esporos de fungos e hifas²³⁴.

Tan *et al.*¹⁷⁸ investigaram a biodegradação de Ecoflex[®] exposto à diferentes fungos, entre eles, o *Aspergillus niger* e também observaram visíveis zonas de degradação e a formação de espessa biomassa na superfície dos filmes. Os autores sugerem que poliésteres alifáticos-aromáticos tais como o Ecoflex[®] podem degradar no ambiente e em condições moderadas.

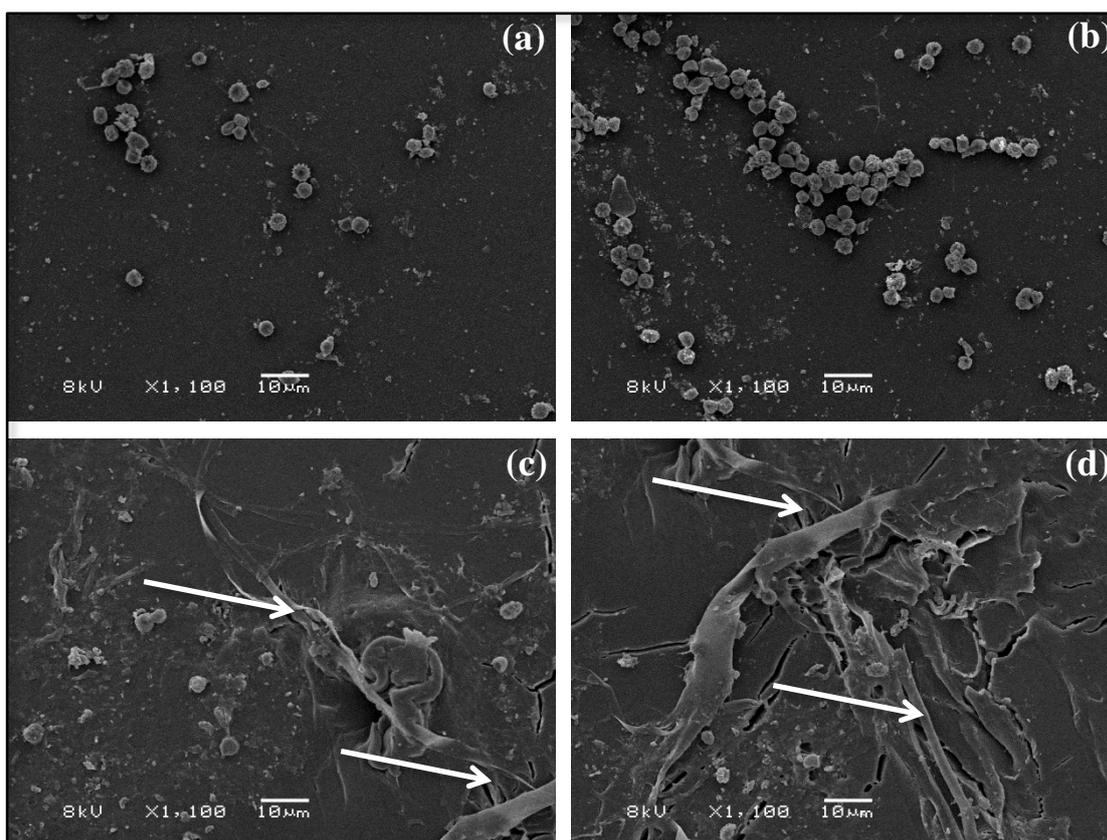


Figura 58. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em ágar por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

Corti *et al.*²³⁵ investigaram a biodegradação por fungos em filmes de polietileno contendo aditivos e verificaram um grande crescimento de fungos e micélio sobre a superfície do filme envelhecido indicando uma atividade metabólica fúngica bastante robusta. O crescimento de micélio na superfície do filme mostrou fissuras desenvolvidas próximas ao micélio. Este comportamento também foi observado neste estudo, onde fissuras puderam ser identificadas próximas ao micélio (Figura 58c-d) apontadas pelas setas. Além disso, ficou evidenciado que a superfície dos filmes foi intensamente colonizada por fungos, confirmado por MEV (Fig. 56-59), e esse aumento da presença de fungos na superfície foi acompanhada pela redução na massa molecular dos filmes (Tabela 15). Fornecendo uma forte evidência de bioacumulação fúngica nas regiões amorfas dos filmes degradados²³⁵.

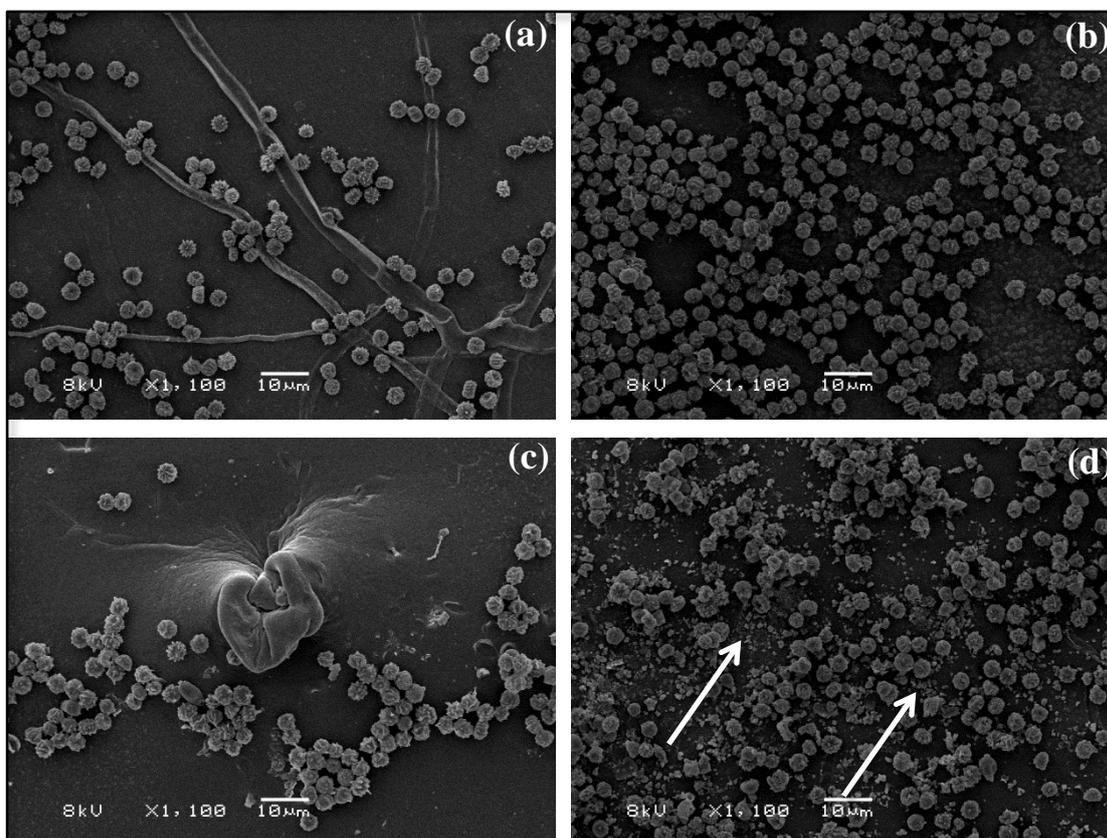


Figura 59. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT após degradação em PDA por 30 dias: (a) PBAT puro, (b) 0,5%, (c) 2% e (d) 5% de nisina.

A análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica que tem sido amplamente utilizada para determinar a distribuição de massa molecular de

materiais poliméricos, logo, é uma medida para determinar a natureza de quaisquer subprodutos esperados em qualquer forma polimérica ou oligômero¹⁷⁸. Como os filmes de PBAT foram degradados, espera-se que a distribuição de massa molecular dos filmes tenha alterado em função da formação de subprodutos de menor massa molecular. A Tabela 15 apresenta os resultados das amostras de PBAT degradadas durante 30 dias em diferentes meios, e como esperado, houve redução na massa molecular de todos os filmes. As amostras que indicaram visíveis sinais de degradação (Figuras 55-59) apresentaram redução na massa molar após o período de degradação. Tanto o filme de PBAT puro como os filmes de PBAT/nisina degradaram de maneira mais acelerada em ágar e PDA (Tabela 15). No entanto, também foi possível identificar que a degradação ocorreu em solução salina e PDB, mas de maneira menos intensa.

Tabela 15. Resultados da massa molecular dos filmes de PBAT puro e dos filmes de PBAT/nisina após a degradação por 30 dias.

Amostra	M_w (g mol ⁻¹)				
	Padrão	Salina	PDB	Ágar	PDA
(100/0)	40.625	40.622	40.610	39.755	39.054
(99,5/0,5)	47.373	47.372	47.370	46.743	41.275
(98/2)	70.735	68.932	67.009	65.402	60.358
(95/5)	74.098	74.040	70.068	63.296	62.108

Os espectros de FTIR dos filmes de PBAT/nisina com 5% de concentração de nisina incubados em solução salina, PDB, PDA e ágar durante 30 dias para verificar o comportamento de degradação destes filmes, não apresentaram mudanças químicas estruturais, quando comparados com o espectro do filme antes da degradação (Fig. 60). O que sugere que a degradação pode estar ocorrendo superficialmente, e ainda não afetou a estrutura química do polímero.

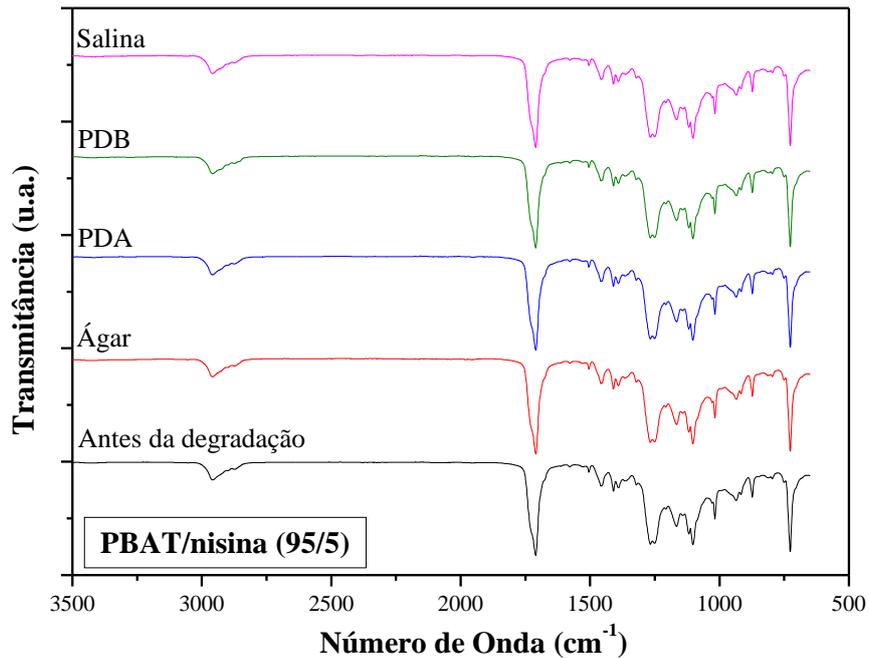


Figura 60. Espectros de FTIR dos filmes de PBAT/nisina (95/5) após degradação em diferentes meios durante o período de 30 dias.

A cor dos filmes, quando destinados a embalagens de alimentos é uma característica muito importante, pelo fato de que os consumidores são atraídos pela aparência externa do produto embalado, tanto no momento da compra como no momento da ingestão²³⁶. A cor do filme e/ou da embalagem pode influenciar o consumidor na aceitabilidade do produto²³⁷. A Tabela 16 apresenta os valores da variação de cor obtidos através das medidas nos filmes de PBAT puro e PBAT/nisina após a degradação em meio sólido (Ágar e PDA) e em meio líquido (salina e PDB). A Figura 61 apresenta o espectro da variação de cor para os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina antes da degradação. As coordenadas representam: L^* (luminosidade na escala a partir de 0 para preto a 100 para branco), sendo, (branco/preto e/ou mais opaco/menos opaco), a^* (razão entre o verde e vermelho) e b^* (razão entre amarelo e azul). A Figura 62 apresenta o espectro da variação de cor para o PBAT puro e os filmes de PBAT/nisina após a degradação.

Foi possível observar que a adição da nisina aos filmes alterou um pouco os parâmetros de cor nos filmes: os filmes de PBAT puro e PBAT/nisina com 0,5 e 2% de nisina apareceram todos quase sobrepostos no espectro de variação de cor (Fig. 61) na escala L^* , a qual indica a coloração mais escura ou clara do material, já o filme com 5% de nisina apareceu um pouco mais abaixo na escala L^* indicando uma coloração um

pouco mais escura. Os valores dos parâmetros a^* e L^* diminuíram com a adição da nisina na matriz do polímero (0,36 a 0,16) e (92,52 a 91,25) respectivamente, para o filme de PBAT e PBAT/nisina até 5% de concentração de nisina, já o parâmetro b^* aumentou os valores com a adição da nisina (Tabela 16), indicando que as amostras apresentaram uma coloração um pouco mais amarelada. Mas esta diferença não foi muito significativa.

Os filmes ficaram mais opacos após o período de degradação, as amostras incubadas em PDA e PDB apresentaram menor valor de L^* . Filmes contendo 2% e 5% de nisina na sua composição, apresentaram valores reduzidos para o parâmetro L^* apresentando 55,19 e 39,94, respectivamente (Tabela 16).

As análises visuais (Fig. 55), MEV (Fig. 56-59) e GPC (Tabela 15) realizadas nos filmes após a degradação mostraram que as amostras dos filmes, tanto do PBAT puro como PBAT/nisina apresentaram maior degradação após incubação em PDA e PDB, apresentando evidente variação de coloração. Os filmes incubados em PDA mudaram a coloração e tornaram-se avermelhados. Já os filmes incubados em PDB alteraram a coloração para um tom mais escuro, variando do amarelo para o marrom.

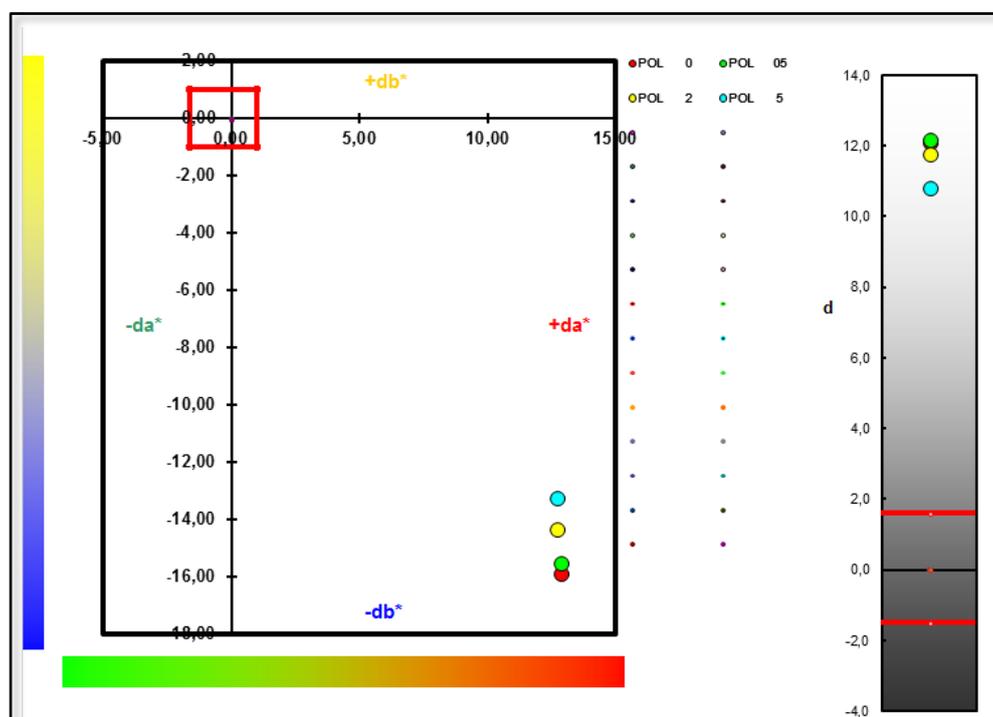


Figura 61. Espectros da variação de cor relacionados aos parâmetros L^* , a^* , b^* para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina até 5% de concentração, antes da degradação.

Isto pôde ser confirmado através do colorímetro Guide, os filmes incubados em PDA apresentaram valores elevados para o parâmetro a^* , variando de 29,93 a 31,00 para o PBAT puro e PBAT/nisina 5%, respectivamente (Tabela 16). Quando são observados maiores valores para $+a^*$, mais avermelhadas são as amostras. Para as amostras incubadas em PDB foram observados maiores valores para o parâmetro b^* , indicando maior amarelecimento das amostras. PBAT puro apresentou valor de b^* de 47,28 e 39,90 para o filme com 0,5% de nisina, e os filmes com 2 e 5% de nisina apresentaram valores de b^* de 38,28 e 37,27, respectivamente. Neste caso, foram observados maiores valores de b^* para o PBAT puro e o filme com 0,5% de nisina, porque estes filmes apresentaram coloração mais amarelada e as outras duas amostras, coloração bem mais avermelhada. Filmes incubados em ágar e salina apresentaram a menor variação de coloração, apresentando resultados bem menores para os parâmetros a^* e b^* , indicando a menor degradação.

Tabela 16. Parâmetros da variação de cor para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina após degradação em meio sólido (Ágar e PDA) e em meio líquido (salina e PDB), após 45 dias de incubação.

Amostras	L*	a*	b*
(100/0)	92,52	0,36	-3,10
(99,5/0,5)	92,60	0,32	-2,77
(98/2)	92,19	0,20	-1,55
(95/5)	91,25	0,16	-0,49
(100/0) Ágar	87,89	1,25	5,72
(99,5/0,5) Ágar	87,48	0,98	6,32
(98/2) Ágar	87,42	1,52	7,05
(95/5) Ágar	83,07	2,56	15,20
(100/0) PDA	61,32	29,93	36,89
(99,5/0,5) PDA	60,55	28,06	38,24
(98/2) PDA	66,52	20,20	31,14
(95/5) PDA	55,19	31,00	35,44
(100/0) PDB	53,18	11,82	47,28
(99,5/0,5) PDB	52,29	19,37	39,90
(98/2) PDB	53,90	27,53	38,28
(95/5) PDB	39,94	25,97	37,37
(100/0) Salina	86,09	3,44	6,93
(99,5/0,5) Salina	86,59	3,01	6,36
(98/2) Salina	82,98	5,53	10,00
(95/5) Salina	80,70	5,37	13,18

O aumento de coloração tijolo/marrom ou marrom-amarelado pode ser associada a atividade de fenol oxidases produzidas pelos fungos que oxidam polifenóis em presença de oxigênio. As quinonas formadas podem condensar, inclusive com proteínas, formando pigmentos complexos tipo melanina.

O espectro da variação de cor para os filmes degradados, incubados em diferentes meios (Figura 62), evidencia claramente que os filmes incubados em PDA apresentaram a maior variação de coloração, uma vez que este efeito está associado à degradação dos materiais, indicando o maior indício de degradação. Os filmes apresentaram espectro mais próximos na região do vermelho a^* . Já os filmes incubados em PDB apresentaram coloração mais amarelada e apresentaram-se distribuídos no espectro da variação de cor mais próximos da região do amarelo. Foi possível verificar que o filme de PBAT/nisina com 5% de nisina incubado em PDB apresentou a maior variação de coloração e/ou também foi o mais opaco após o período de degradação, uma vez que apareceu muito próximo de zero na escala L^* que indica (luminosidade na escala a partir de 0 para preto a 100 para branco), sendo, (branco/preto e/ou mais opaco/menos opaco). Os filmes com 2 e 0,5% de nisina, bem como o PBAT puro incubados em PDB também surgiram próximo de zero na escala L^* . Em adição, os filmes incubados em PDA também apareceram na região mais escura da escala L^* , indicando que apresentaram uma coloração bem intensa e escura quando comparados com as outras amostras.

Sivarooban *et al.*²³⁷ também investigaram a variação de coloração nos filmes contendo nisina, e verificaram que a adição da nisina (10,000IU/g) não teve influência significativa nas propriedades de cor. Por outro lado, Ollé Resa *et al.*²³⁶ observou que a adição da nisina aos filmes aumentou os parâmetros b^* e o Yellow Index (YI) e o L^* diminuiu. Este fenômeno ocorreu em maiores proporções pela adição de uma maior quantidade de nisina às amostras. Pattanayaiying *et al.*²³⁸ também verificaram redução no parâmetro L^* e alterações nos parâmetros a^* e b^* e atribuíram a presença da nisina nos filmes. Este efeito de diminuição do L^* com a adição da nisina na matriz do polímero também foi observado neste estudo, e pode estar relacionado à opacidade do material. Um comportamento similar em relação à opacidade foi observado por Duran *et al.*²³⁹ que investigaram propriedades de cor nas embalagens ativas e antimicrobianas contendo nisina.

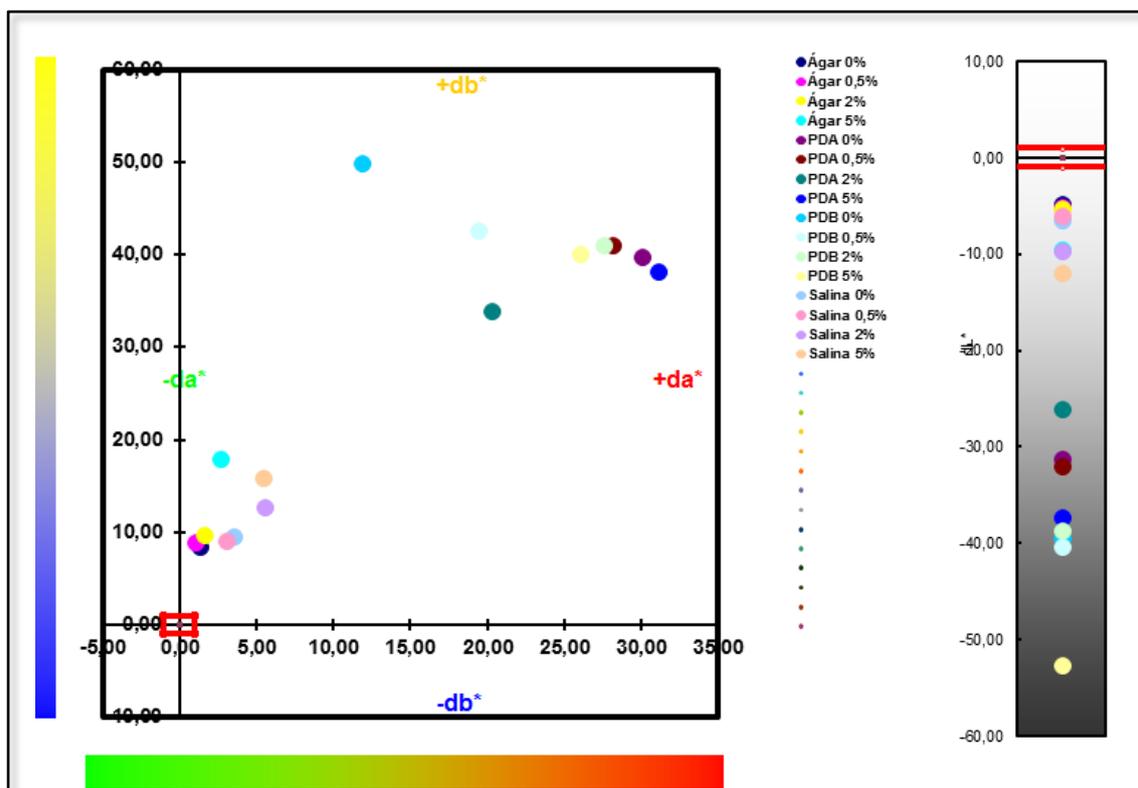


Figura 62. Espectros da variação de cor relacionados aos parâmetros L^* , a^* , b^* para o filme de PBAT puro e PBAT/nisina após degradação em diferentes meios: sólido (Ágar e PDA) e em meio líquido (salina e PDB).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PBAT E PBAT/NISINA OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO

As propriedades da solução polimérica tem um significado muito importante no processo de eletrofiação. Os parâmetros da solução, tais como, pH, viscosidade e condutividade influenciam diretamente na morfologia e na geometria das nanofibras²⁴⁰. Os valores destas propriedades para as soluções poliméricas preparadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 17.

Geralmente a viscosidade da solução está relacionada com a extensão do emaranhamento das cadeias das moléculas do polímero. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode ocorrer electrospraying e partículas de polímero são formadas ao invés de fibras¹³⁰. A viscosidade das soluções variou de 2015 cP para 1227 cP, para o PBAT puro e PBAT/nisina 5%, respectivamente. A solução de PBAT puro

apresentou a maior viscosidade, no entanto, esta propriedade diminuiu nas amostras com maiores concentrações de nisina.

Por outro lado, foi observada uma condutividade de 21,0 μS para a solução de PBAT puro, passando para 77,6 μS para a solução com 1% de nisina e para a solução com 5% de nisina a condutividade foi de 136,5 μS . Este efeito pode estar relacionado ao fato de que a adição de ácidos, bases ou sais à solução faz com que a condutividade elétrica aumente, resultando em uma maior mobilidade dos íons em solução¹³⁰. E quando um campo elétrico externo é aplicado, estas cargas se orientam permitindo que a gota sofra um maior alongamento, resultando em segmentos menos espessos e numa diminuição no diâmetro das fibras^{114, 124, 241}.

Tabela 17. Caracterização das soluções poliméricas.

Amostra	pH	Viscosidade (cP)	Condutividade (μS)
(100/0)	7,0	2015	21,0
(99,75/0,25)	7,0	1810	48,5
(99,5/0,5)	7,0	1851	58,4
(99/1)	7,0	1581	77,6
(98/2)	7,0	1442	89,5
(97/3)	7,0	1335	118,2
(95/5)	7,0	1227	136,5

À medida que aumentou a concentração de nisina na solução, a viscosidade destas soluções diminuiu e o efeito contrário ocorreu para a condutividade, que aumentou nas soluções mais concentradas. Pode-se sugerir que, nas soluções com a maior concentração de nisina (que é um peptídeo, com presença de sais na sua formulação), esta pode ter aumentado a condutividade elétrica da solução quando dissolvida no solvente, resultando numa maior mobilidade dos íons em solução e reduzindo o diâmetro da nanofibra (Fig. 64f e 64g). Isto pode ter ocorrido provavelmente porque a maioria das drogas e proteínas formam íons quando dissolvidas em solventes específicos¹³⁰.

O espectro de FTIR das nanofibras de PBAT puro e as seis composições de PBAT/nisina estão apresentados na Figura 63. As nanofibras de PBAT/nisina exibiram bandas características de espectro do PBAT puro, apresentando uma banda aguda em 726 cm^{-1} , que está associada com as vibrações dos grupos metileno adjacentes ($-\text{CH}_2$) da estrutura principal do polímero. Uma banda na região de 1268 cm^{-1} atribuída ao

estiramento dos grupos C-O da ligação éster. A mais intensa de todas as bandas apareceu na região de 1710 ou 1714 cm^{-1} e está associada aos grupos carbonila (C=O) na ligação éster.

Uma banda na região de 3000 cm^{-1} que corresponde ao estiramento C-H das porções aromáticas e alifáticas também foi observada. Espectros similares de FTIR foram observados após a incorporação da nisina (2,5 a 50 mg g^{-1}) à matriz do polímero, indicando a ausência de alterações químicas na estrutura do PBAT ou interações químicas com a nisina. O espectro de FTIR do solvente utilizado no preparo das soluções de electrospinning está apresentado em anexo (Anexo 8, Fig. 86).

Comparativamente, os resultados de FTIR para o filme do polímero puro e para os filmes de PBAT/nisina obtidos pela técnica de extrusão (Fig. 28) e os filmes obtidos por eletrofiação (Fig. 63) estão muito semelhantes. Observou-se que nem a adição da nisina à matriz do polímero e nem as diferentes técnicas utilizadas para a obtenção dos filmes, causaram qualquer alteração química na estrutura do polímero.

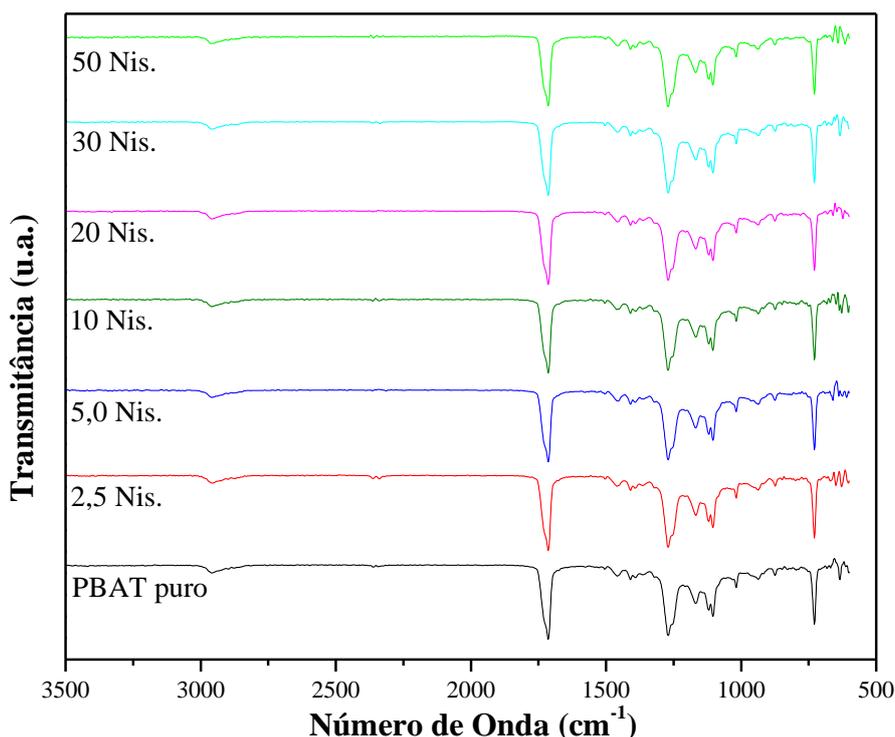


Figura 63. Espectros de FTIR para as nanofibras de PBAT puro e nanofibras de PBAT/nisina.

A morfologia das nanofibras do PBAT puro e PBAT/nisina e as suas respectivas distribuições de frequência em função do diâmetro da nanofibra estão apresentadas na Figura 64. Em geral, fibras aleatórias com ausência de beads foram obtidas pelo

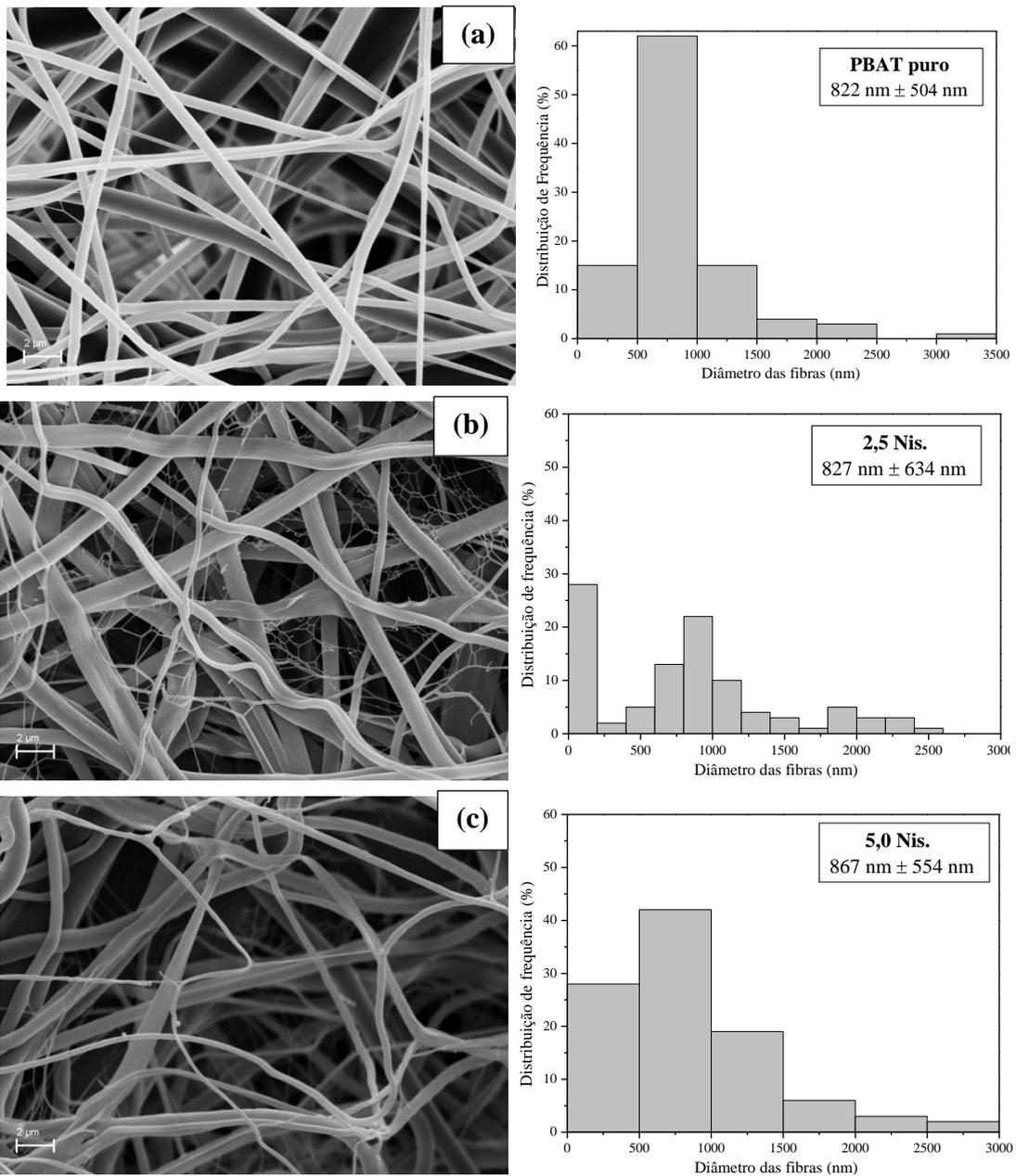
processo de eletrofiação. O diâmetro da fibra desempenha um papel muito importante nas propriedades finais da rede eletrofiada¹²³, por exemplo, nanofibras poliméricas com 100 nm de diâmetro tem uma área superficial de aproximadamente 1000 m² g⁻¹. Aumentando a área superficial do filme algumas propriedades podem ser melhoradas, tais como a eficiência da liberação do aditivo, e esta aplicação é vista, por exemplo, quando aditivos alimentares são liberados a partir dos filmes das embalagens²⁴².

A imagem de microscopia eletrônica de varredura das nanofibras do PBAT puro (Fig. 64a) apresentou uma distribuição bem organizada e diâmetro médio de 822 nm ± 504 nm. Quando a nisina foi adicionada na solução a uma concentração de 2,5 mg g⁻¹ (Fig. 64b) o diâmetro médio das nanofibras foi de 827 nm ± 634 nm, não alterando significativamente quando comparada com o polímero puro. No entanto, fibras com 10 mg g⁻¹ de nisina (Fig. 64d) tornaram-se mais irregulares com um diâmetro médio de 518 nm ± 417 nm. Este efeito pode estar relacionado com a instabilidade do jato ejetado durante o electrospinning²⁴³⁻²⁴⁵, uma vez que jatos múltiplos podem contribuir para uma distribuição heterogênea de tamanho, além de afetar a morfologia das fibras poliméricas. Jatos múltiplos podem resultar a partir de um aumento na concentração de nisina na solução do polímero, ou podem ser influenciados pelos parâmetros do ambiente, no momento do preparo e obtenção das nanofibras, tais como umidade e temperatura, os quais também desempenham um papel importante na determinação da morfologia das nanofibras eletrofiadas^{123, 127}.

A morfologia das nanofibras variou com quantidades maiores de nisina, 30 e 50 mg g⁻¹ de nisina (Fig. 64f-g), respectivamente. Estas fibras foram menos aleatórias, lisas e uniformes, com diâmetro médio de 979 ± 224 nm e 969 ± 304 nm, respectivamente. Isto sugere que a incorporação da nisina, um peptídeo catiônico, altera a força iônica da solução e além disso, a viscosidade e a condutividade (Tabela 17), podem também ter sido responsáveis por estas alterações.

Os parâmetros da solução, tais como a viscosidade e condutividade elétrica influenciam diretamente na morfologia e na geometria da nanofibra. Para obter nanofibras menos aleatórias, ou seja, mais regulares e/ou organizadas, é necessário ter um grau de emaranhamento entre as cadeias do polímero na solução, o que corresponde a um valor de concentração mínimo (viscosidade). Aumentando a viscosidade e mantendo os outros parâmetros do processo fixos, existe uma tendência de aumento no diâmetro da fibra^{119, 124}. No que diz respeito à condutividade, a literatura²⁴² reporta redução no diâmetro da fibra com o aumento da condutividade, e a adição de sais

aumenta a densidade de carga no jato ejetado. Forças de alongamento mais fortes são impostas sobre as nanofibras, devido à autrepulsão das cargas em excesso sob o campo elétrico, resultando em fibras eletrofiadas com formas substancialmente retas e diâmetro menor²⁴⁶.



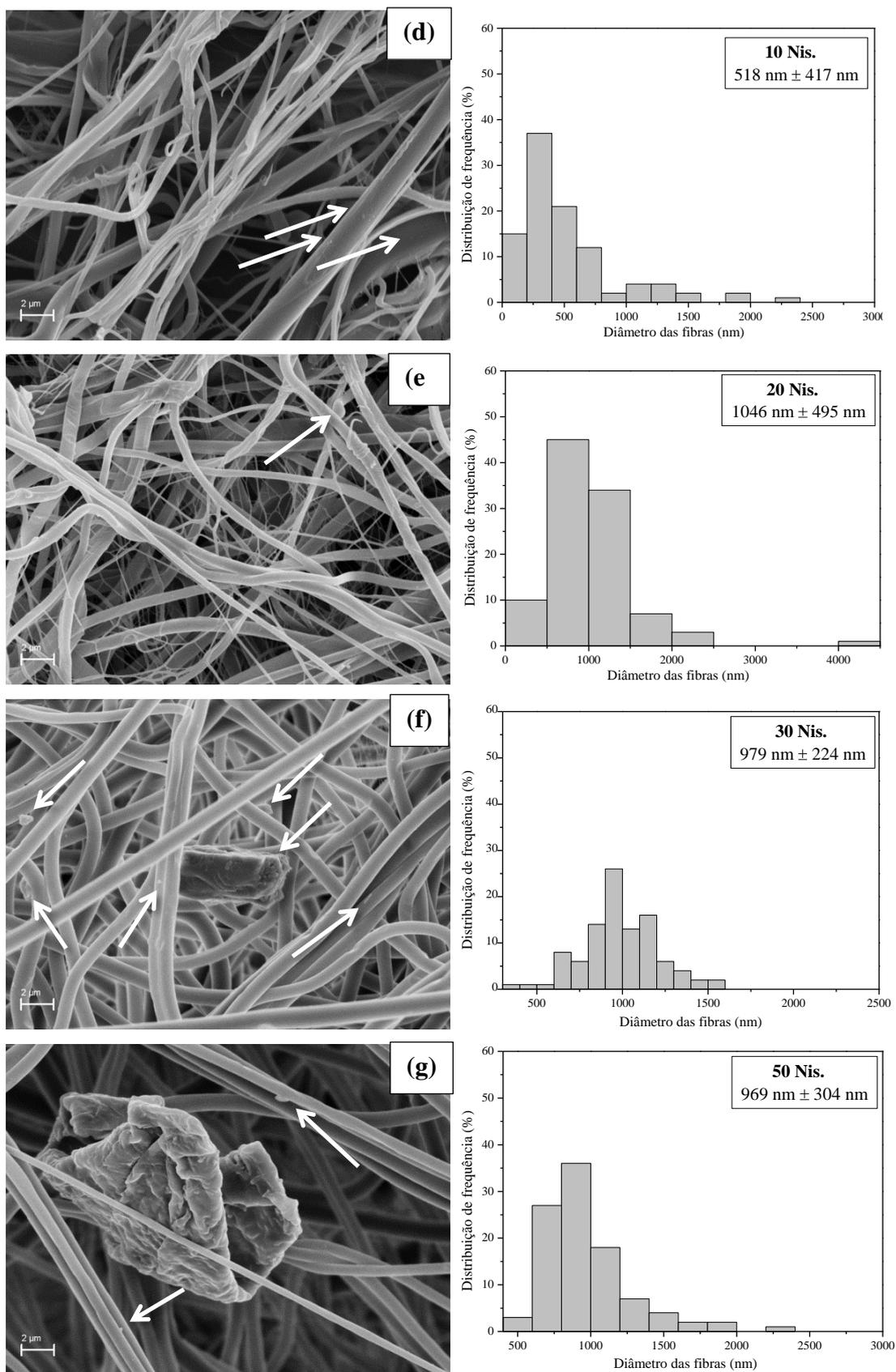


Figura 64. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina e as respectivas distribuições de frequência em função do diâmetro

das nanofibras: (a) PBAT puro, (b) 2,5 mg g⁻¹, (c) 5,0 mg g⁻¹, (d) 10 mg g⁻¹, (e) 20 mg g⁻¹, (f) 30 mg g⁻¹ e (g) 50 mg g⁻¹.

Verificou-se que a bacteriocina apresentou boa dispersão ao longo da fibra, com pequenas partículas uniformemente distribuídas (Fig. 64d-g), apontadas pelas setas. Além disso, uma maior quantidade de nisina possivelmente provocou a interação nisina-nisina (Fig. 64f-g) e o resultado foram agregados depositados sobre a nanofibra e também entre elas, estas partículas podem ser oriundas da formulação da nisina, sugere-se que podem estar associados aos cristais de NaCl. Outros autores¹¹⁹ desenvolveram nanofibras de pleurocidin/poli(álcool vinílico) e também observaram uma ligeira redução no diâmetro da fibra com a adição do agente antimicrobiano. Os autores relataram que este fenômeno é provavelmente devido ao aumento da condutividade da solução, que pode levar à redução do diâmetro da fibra.

As propriedades térmicas das nanofibras de PBAT puro e das nanofibras de PBAT/nisina foram analisadas por TGA para investigar o comportamento destas amostras durante o aquecimento e analisar se a adição da nisina tem algum efeito na estabilidade térmica das nanofibras, os resultados da degradação térmica estão apresentadas na Figura 65. As temperaturas de decomposição características $T_{10\%}$ e $T_{50\%}$ estão apresentadas na Tabela 18. Um importante parâmetro é a temperatura de decomposição inicial, que exhibe a perda de massa inicial (10%) em temperatura de degradação $T_{90\%}$. Outras duas medidas relacionadas a estabilidade térmica são a taxa de degradação máxima, temperatura $T_{50\%}$ onde ocorre a principal perda de massa (em torno de 50%), ocorre devido a degradação no intervalo de 320 a 350°C, e a fração de resíduos não voláteis em 600°C.

As nanofibras de PBAT puro apresentaram degradação a partir de 310°C até 470°C, apresentando aproximadamente 90% de perda de massa. O PBAT apresenta maior estabilidade que outros polímeros biodegradáveis devido a presença do anel aromático na sua estrutura^{164, 247}. As nanofibras de PBAT/nisina apresentaram temperaturas de degradação muito semelhantes para todas as amostras. A amostra com a maior concentração de nisina 50 mg g⁻¹ apresentou temperatura de decomposição a partir de 309°C.

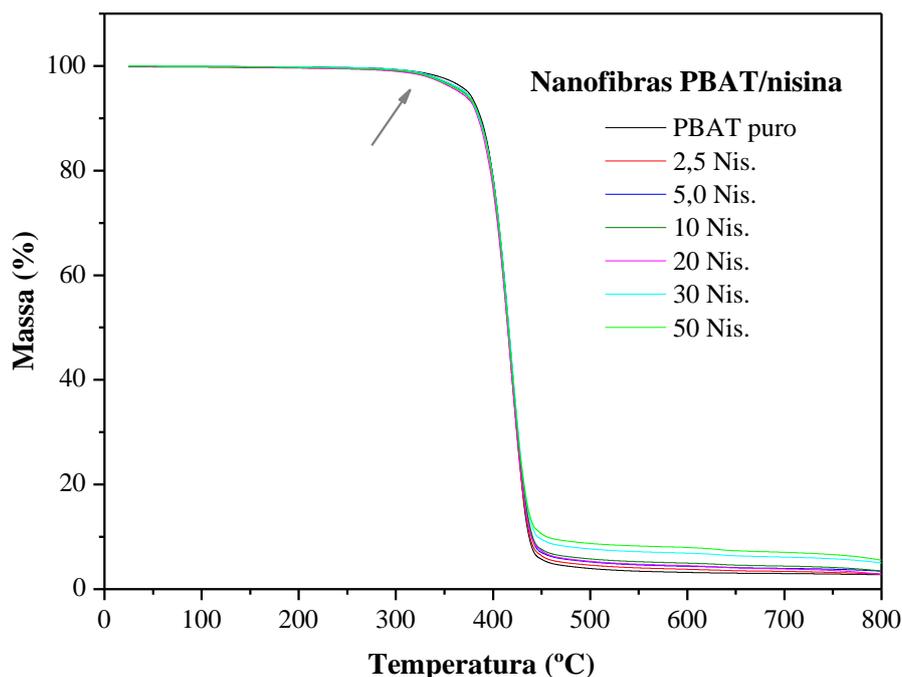


Figura 65. Termogramas de TGA para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Os resultados mostraram que a temperatura de decomposição máxima do PBAT, obtida através das curvas de DTG (Anexo 9, Fig. 87), foi de 417°C. A degradação do PBAT ocorre através da quebra e/ou separação dos grupos éster e cisão da cadeia principal das ligações (C-O) e (C-C) da estrutura do polímero²⁴⁸. A adição da nisina não afetou a estabilidade térmica das nanofibras de PBAT/nisina, e a perda de massa em 50% ($T_{50\%}$) ocorreu na mesma temperatura, independente da composição da nanofibra (415°C) (Tabela 18). As nanofibras de PBAT/nisina apresentaram boa estabilidade térmica até 300°C, e os resultados corroboram com a literatura^{248, 249}. Em temperaturas acima de 600°C, apenas a fração inorgânica pode ser observada como uma massa residual. O valor de massa residual variou de 2,73%, para o material puro, a 6,17% para o material com maior concentração de carga, o que indica um aumento de resíduo inorgânico nestas amostras. A estabilidade térmica destas amostras apresentou um comportamento muito similar com a dos filmes obtidos por extrusão (Tabela 5), os quais também não apresentaram alterações significativas entre as diferentes concentrações de aditivo nas temperaturas de degradação.

Tabela 18. Resultados de TGA e DSC para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Amostras	$T_{10\%}$ (°C)	$T_{50\%}$ (°C)	T_g (°C)	T_m (°C)	T_c (°C)	X_c (%)	Resíduo
PBAT puro	388	415	-26,0	124,0	62,1	8,5	2,73
2,5	386	415	-25,5	125,5	79,3	7,5	3,31
5,0	386	416	-25,1	126,3	82,1	7,6	3,58
10	385	416	-24,7	126,4	80,8	7,2	3,74
20	385	415	-24,5	125,5	80,9	7,7	3,88
30	385	415	-24,7	125,3	80,3	7,4	5,33
50	386	415	-25,1	125,4	78,9	7,1	6,17

O efeito da adição da nisina na matriz do PBAT e o comportamento de cristalização das nanofibras de PBAT/nisina foram investigados por DSC. Os resultados estão apresentados na Tabela 18 e as curvas típicas de DSC estão apresentadas na Figura 66. A adição da nisina às soluções de PBAT resultou em uma diferença nos picos de cristalização das nanofibras de PBAT/nisina (Fig. 66a). As nanofibras de PBAT puro apresentaram temperatura de cristalização (T_c) de 62,1°C, enquanto as nanofibras de PBAT/nisina apresentaram temperaturas de cristalização em torno de 80,0°C. As curvas do 1º ciclo de aquecimento estão apresentadas em anexo (Anexo 10, Figura 88) bem como os resultados dos picos de fusão e o percentual de cristalinidade (Anexo 11, Tabela 24).

Esta diferença no pico de cristalização também foi observado em biocompósitos de grafite a base de PBAT³⁹. Os autores sugerem que a presença das nanofolhas de grafite provocaram sítios adicionais de nucleação na superfície, promovendo a cristalização da matriz de PBAT. Resultados similares foram observados quando argilas foram utilizadas como cargas e/ou enchimento na matriz de PBAT^{3, 168}. Outros autores²⁵⁰ estudaram blendas de PLA/PBAT e relataram que a adição de PBAT à matriz de PLA resultou em um pico de cristalização menos intenso e mais largo (em torno de 110°C), que apareceu em temperaturas menores. O PBAT é um polímero com uma estrutura semicristalina⁵¹ que geralmente cristaliza acima da temperatura de transição vítrea, uma vez que abaixo da temperatura de transição vítrea não há mobilidade molecular suficiente para ocorrer a interação das cadeias do polímero¹³.

A temperatura de transição vítrea (T_g) das nanofibras de PBAT permaneceu inalterada após a adição da nisina. O PBAT puro apresentou T_g em -26°C, e os valores para as nanofibras de PBAT/nisina permaneceu entre -25,5°C e -25,1°C. A temperatura

de fusão (T_m) do PBAT puro foi de 124°C (Figura 66b), e este valor permaneceu constante para todas as formulações das nanofibras (Tabela 18). Resultados semelhantes foram encontrados por Shi *et al.*⁴⁰ que reportaram temperatura de fusão para o PBAT de 121°C.

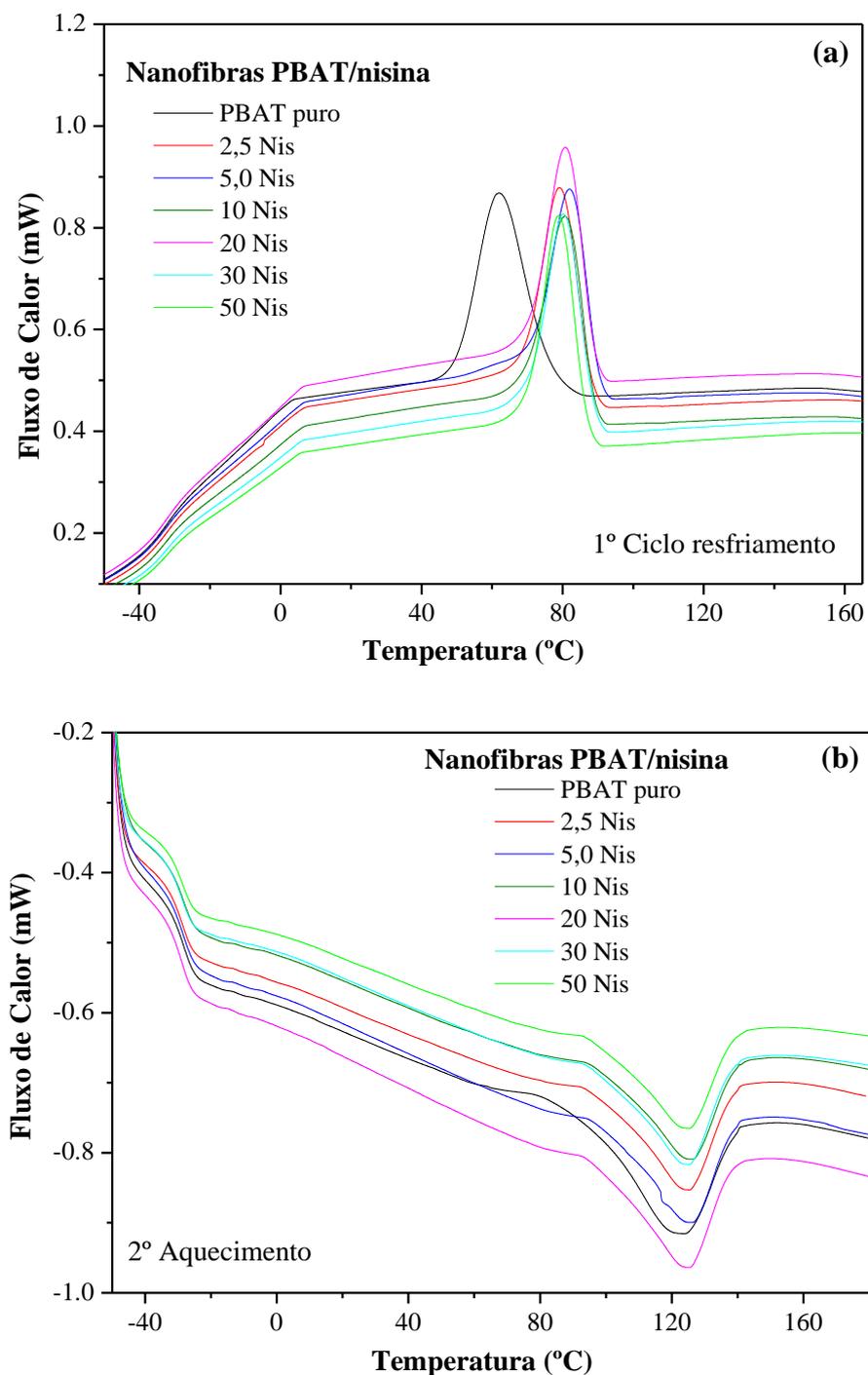


Figura 66. Termogramas de DSC para as nanofibras de PBAT puro e para as nanofibras de PBAT/nisina: (a) ciclo do 1º resfriamento e (b) ciclo do 2º aquecimento.

O percentual de cristalinidade (X_c) para as nanofibras de PBAT puro foi de 8,5%, enquanto que as nanofibras com 50 mg g⁻¹ de nisina apresentaram X_c de 7,1% (Tabela 18). O percentual de cristalinidade também variou nas filmes extrudados de PBT/nisina (Tabela 5), para o PBAT puro foi de 10,7% e para o filme de PBAT/nisina com 3% de nisina foi de 7,9%. A presença de alguns aditivos, tais como antimicrobianos, podem reduzir o espaço disponível para o crescimento do cristal, reduzindo assim a cristalinidade¹³. Em outras palavras, a nisina possivelmente impediu a difusão das cadeias do PBAT e contribuiu para as mudanças na cristalinidade do polímero. Um outro fator que deve ser levado em consideração é a voltagem aplicada para a obtenção das nanofibras, uma vez que a cristalinidade pode diminuir à medida que a tensão aumenta. Como a distância entre a agulha e o coletor é curta, as cadeias poliméricas não tem tempo suficiente para se organizar, reduzindo a cristalinidade. O efeito do processo de eletrofiação na estrutura da nanofibra tem sido reportado em estudos anteriores²⁵¹, e esse fenômeno está provavelmente relacionado com as modificações estruturais que resultam a partir da alta voltagem utilizada durante o processo de eletrofiação. A cristalinidade da nanofibra é também afetada pelo campo eletrostático e o tempo de cristalização durante o percurso do jato^{111, 130}.

As propriedades de cristalinidade de nanofibras eletrofiadas pode ser um parâmetro de grande importância que definem as suas aplicações comerciais^{114, 252}. Para investigar a estrutura cristalina das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina, as amostras foram analisadas por DRX e os difratogramas estão apresentados na Figura 67. O PBAT apresentou picos de difração característicos da estrutura do cristal em 17,6° e 23° em ângulos 2θ . Estes picos característicos do PBAT puro foram também identificados para as nanofibras de PBAT/nisina nos mesmos valores em ângulos 2θ . Além disso, outro pico notável foi observado em 31,7°, que pertence ao padrão de difração característico do cloreto de sódio (NaCl), um componente presente na formulação comercial da nisina¹⁴. Este pico começa a ser visualizado nas amostras com 20 mg g⁻¹ de nisina e a intensidade deste pico de difração aumenta com o aumento da concentração de nisina nas formulações.

Os filmes de PBAT/nisina obtidos por extrusão também apresentaram o pico de difração em 31,7° (pertencente à nisina), no entanto, para estas amostras, este pico pôde ser visualizado a partir das amostras com 0,25% de nisina (Fig. 33). A intensidade deste pico também aumentou à medida que maior concentração de nisina foi adicionada

à matriz do polímero. Este padrão de difração apresentado para a nisina está de acordo com a literatura, que reportou este pico característico nos mesmos valores em ângulos 2θ , em filmes de polipropileno/montmorilonita contendo nisina em concentrações que variaram de 1 a 5% de nisina⁸⁸.

Foi possível verificar que os filmes das nanofibras de PBAT/nisina (Fig. 67) apresentaram diferença na cristalinidade quando comparados com os filmes extrudados (Fig. 33), isto pode estar relacionado com o tipo de processo utilizado para obtenção dos filmes. Quando se utiliza a técnica de extrusão, a temperatura diminui mais lentamente e faz com que as cadeias do polímero tenham mais tempo para se organizar, de forma ordenada tendo mais tempo para cristalizar. Quando se utiliza a técnica de eletrofiação, um campo elétrico é aplicado, e além disso, a distância entre a agulha e o coletor é pequena, o que faz com que o polímero não tenha tempo suficiente para completar a cristalização.

Deste modo, a diferença na cristalinidade das nanofibras está associada ao processo de eletrofiação. E conforme mencionado anteriormente, o efeito da alta voltagem não afeta somente a morfologia das nanofibras mas também afeta a cristalinidade. A elevada carga elétrica que move o polímero durante o jato no electrospinning provavelmente afeta a formação cristalina em comparação com processos de eletrofiação utilizando tensões mínimas¹³⁰. Aumentando a voltagem, a aceleração da fibra aumenta e isto reduz o tempo durante o jato no electrospinning, visto que a orientação das moléculas do polímero leva algum tempo e, com o tempo do jato reduzido, estas nanofibras serão depositadas antes das moléculas do polímero terem tempo suficiente para se alinhar. Deste modo, dando tempo suficiente para o jato, a cristalinidade da nanofibra pode melhorar com o aumento da voltagem¹¹¹.

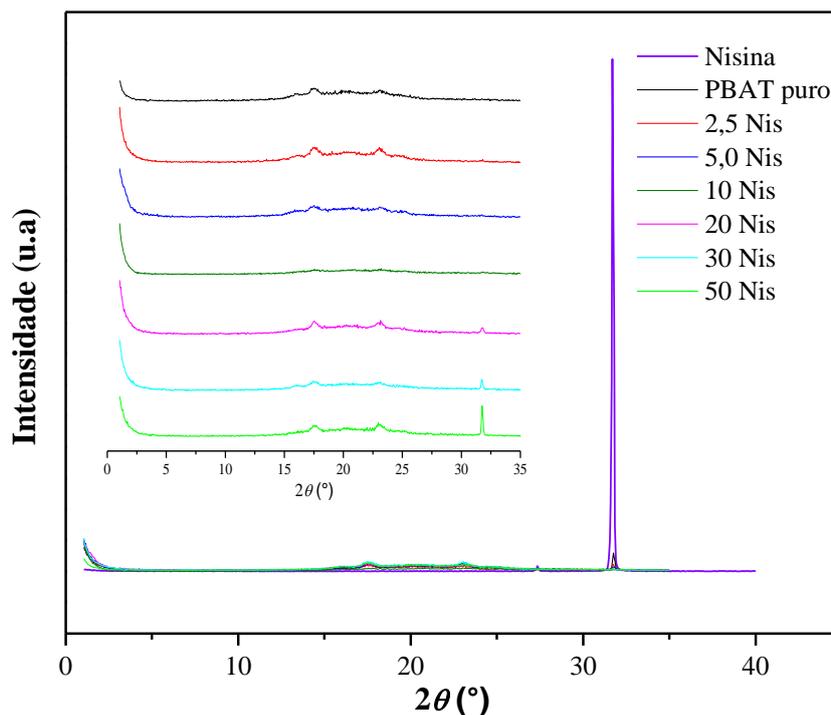


Figura 67. Difratomogramas de DRX para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

As propriedades químicas da matriz da nanofibra podem ser avaliadas através da medida da hidrofobicidade das diferentes formulações das nanofibras¹²⁰, e além disso, a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do substrato tem um impacto direto na forma de como ele é utilizado¹³⁰. A molhabilidade da superfície que inclui as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, é considerado como um fator crucial para a determinação das respostas biológicas, tais como adsorção das proteínas, adesão/ativação de plaquetas, adesão bacteriana e células, e a adesão ou liberação de aditivos antimicrobianos²⁵³. Ao considerar aplicações em embalagens, tais como embalagens de alimentos, boas propriedades de molhabilidade são desejáveis no material. Por conseguinte, o PBAT é um polímero adequado para este tipo de aplicação, visto que, apresenta baixa permeabilidade ao vapor de água¹⁵. Assim, a fim de avaliar os efeitos das propriedades de superfície das nanofibras eletrofiadas, medidas de ângulo de contato da água (WCA) foram realizadas, e a imagem da gota de água na superfície das nanofibras de PBAT puro pode ser visualizada na Figura 68.

A superfície de fibras que são mais ou menos hidrofóbicas podem estar atribuídas ao efeito combinado da morfologia nanoestrutural e enrugada, e as quais formam redes tridimensionais²⁵⁴. Materiais hidrofílicos apresentam pequeno ângulo de contato (espalhamento de água em toda a superfície) enquanto materiais hidrofóbicos

apresentam um alto ângulo de contato (contato mínimo entre a gota de água e a superfície)^{130, 253, 255}. As nanofibras de PBAT puro apresentaram ângulo de contato com a gota de água de $131,9^\circ \pm 2,2$ indicando uma superfície hidrofóbica. O presente resultado, como apresentado na Figura 68, pode também corresponder aproximadamente aos resultados experimentais encontrados na literatura⁵⁰, no qual o ângulo de contato da água para o PBAT eletrofiado e os nanocompósitos de PBAT apresentaram valores de 113° e 137° , respectivamente. No entanto, neste estudo, não foi possível determinar o valor do ângulo de contato da água para as nanofibras de PBAT/nisina. Nestas amostras, a gota de água foi rapidamente absorvida pela superfície. A formulação comercial da nisina tem um elevado percentual de sólidos de leite, proteínas e NaCl. A presença de NaCl higroscópico e dos outros componentes presentes na formulação comercial da nisina podem contribuir para a rápida absorção da água pela superfície PBAT/nisina, e assim, a rápida absorção de água na superfície das nanofibras.

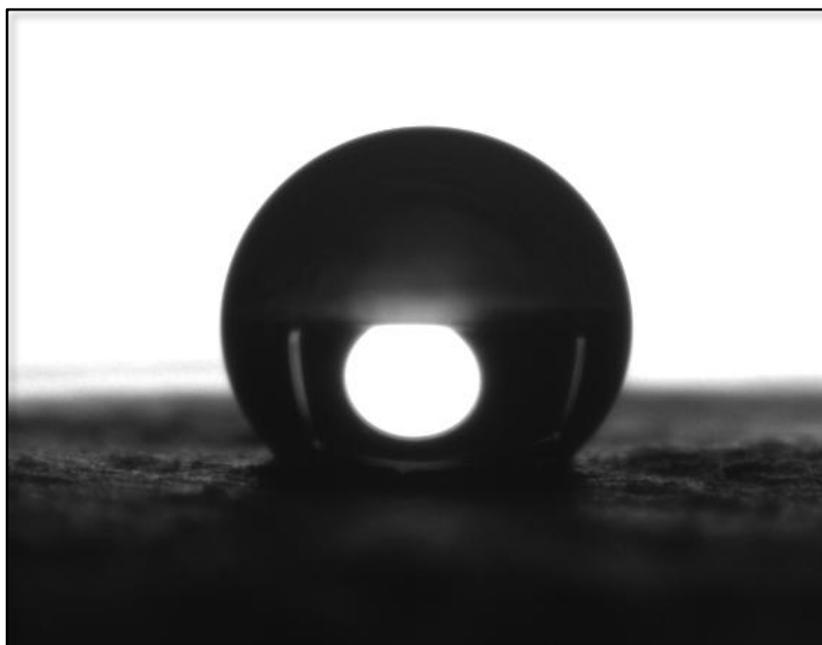


Figura 68. Fotografia da gota de água na superfície das nanofibras de PBAT puro para determinação do WCA.

Com o intuito de investigar a rápida absorção de água na superfície das nanofibras de PBAT/nisina, foram preparadas formulações de PBAT e NaCl com 2 e 5% deste sal, uma vez que a formulação comercial da nisina contém um elevado percentual de NaCl na sua formulação. Estas soluções foram preparadas da mesma forma que as demais soluções de electrospinning (descritas no item 4.2.3.), e

eletrofiadas conforme descrito no (item 4.2.4.) e a superfície das nanofibras de PBAT/NaCl foram analisadas por WCA. No entanto, estas nanofibras apresentaram superfície ainda mais hidrofílica, no momento em que a gota de água tocava a superfície das nanofibras de PBAT contendo somente NaCl, a gota era imediatamente absorvida, não tendo tempo suficiente para registrar a imagem, tampouco realizar a medida do ângulo de contato da água. Desta forma, para justificar o que havíamos sugerido anteriormente, as partículas de sal (presentes na formulação comercial da nisina), são responsáveis pela rápida absorção de água das nanofibras.

A distribuição da nisina nas nanofibras de PBAT foi investigada utilizando nisina marcada com sonda fluorescente em concentrações de 50 e 100 mg g⁻¹. A técnica de microscopia eletrônica confocal foi utilizada para avaliar a dispersão da nisina ao longo da nanofibra e também para confirmar que a nisina marcada com 2-(5'-isotiocianato-2'-hidroxifenil)benzoxazol pode ser incorporada nas nanofibras de PBAT. Os derivados de 2-(5'-isotiocianato-2'-hidroxifenil)benzoxazol são moléculas fluorescentes particularmente interessantes que apresentam alto deslocamento Stokes e apresentam grande estabilidade térmica e fotofísica devido a um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT)^{256, 257}. É interessante notar que, quando uma sonda fluorescente orgânica é ligada covalentemente com uma biomolécula, a interação entre as duas moléculas aumenta significativamente o espectro de emissão fluorescente, bem como uma extrema sensibilidade em concentrações muito baixas de sonda orgânica (detectabilidade no intervalo de 10⁻¹² a 10⁻¹³M)¹⁷⁰.

A Figura 69 apresenta a imagem da nisina marcada ao longo das nanofibras de PBAT e são apresentadas duas imagens para cada amostra. Deste modo, a imagem à esquerda (Fig. 69c) apresenta a morfologia da nanofibra e a localização da nisina, e a imagem à direita (Fig. 69d) indica a localização do sinal fluorescente (sinal azul) nas imagens digitalizadas. Por outro lado, a (Fig. 69a) apresenta a morfologia das nanofibras do PBAT puro e ilustra que as nanofibras de PBAT puro (sem nisina) não apresentam sinal de fluorescência (Fig. 69b). Em geral, nanofibras sem beads e/ou ramificações puderam ser identificadas nestas amostras.

Os resultados de microscopia eletrônica confocal indicaram duas propriedades importantes nas nanofibras de PBAT/nisina. Em primeiro lugar, o sinal de fluorescência aparece ao longo da fibra individual, sugerindo que a nisina foi incorporada dentro da nanofibra. E em segundo lugar, a nisina ficou dispersa ao longo da nanofibra

eletrofiada, como pode ser visualizado na (Fig. 69c, e), e quanto maior a concentração de nisina, mais partículas fluorescentes são visíveis ao longo da nanofibra (Fig. 69d, f).

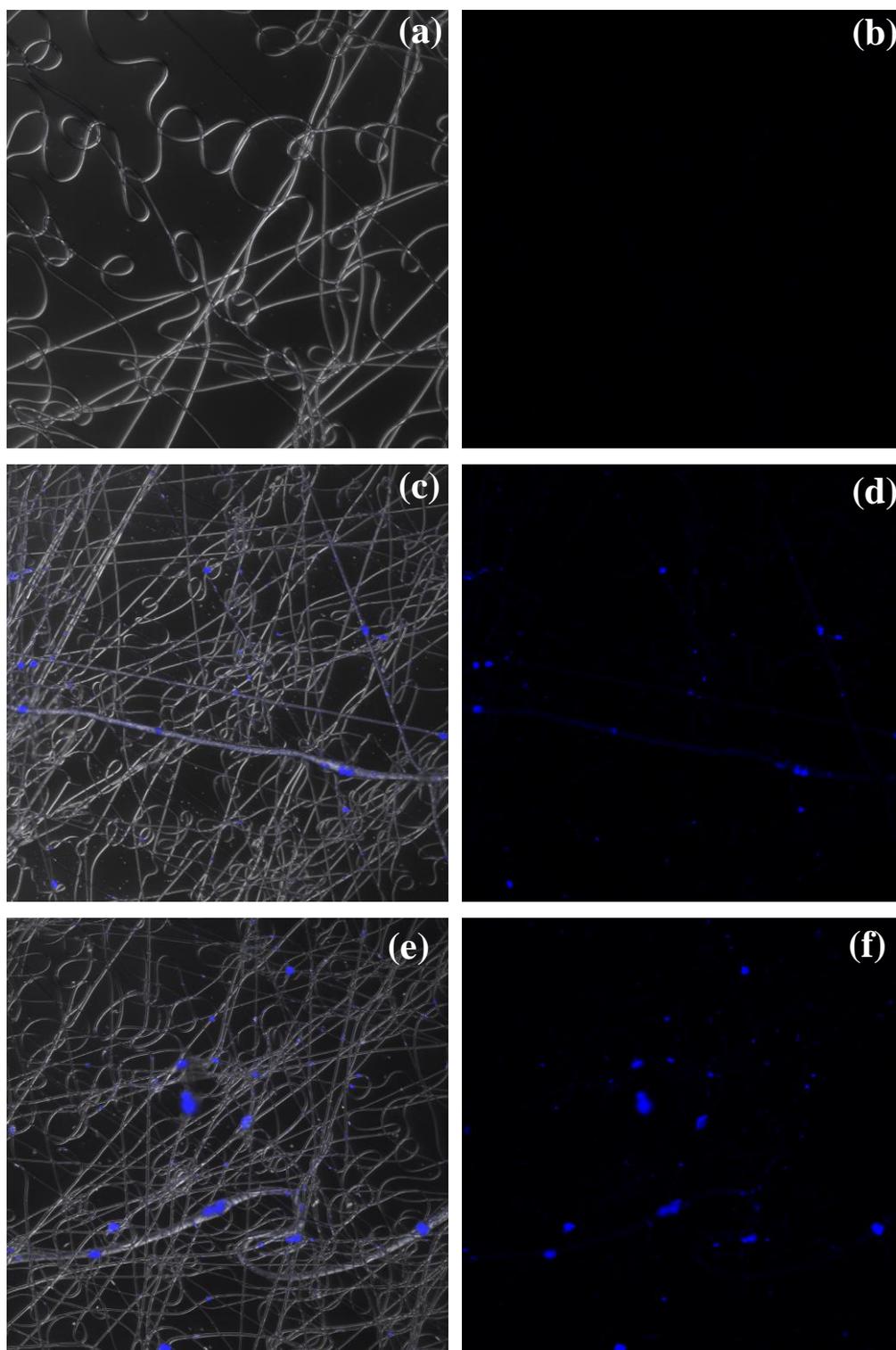
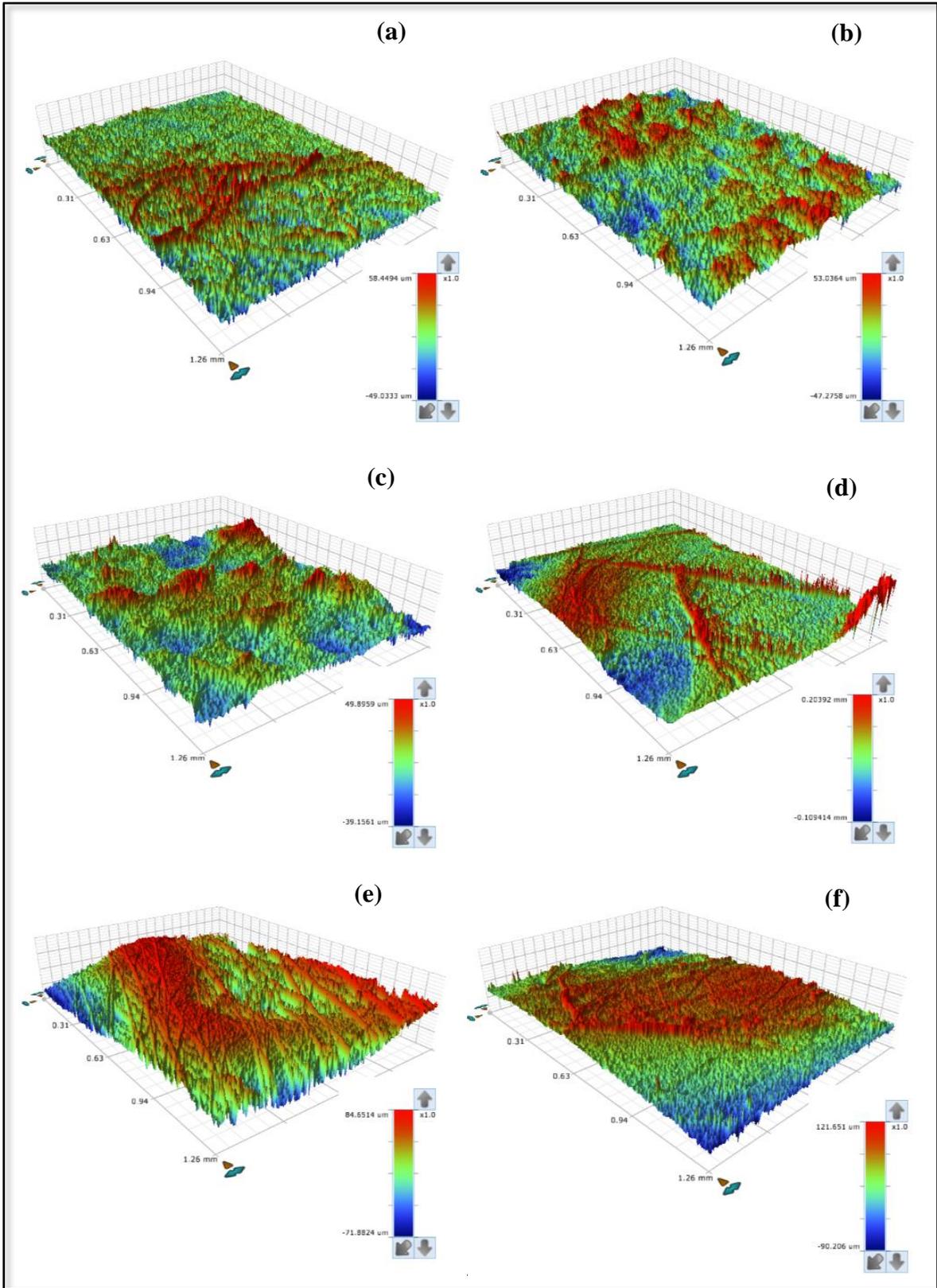


Figura 69. Imagens de microscopia eletrônica confocal das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina: (a, b) PBAT puro, (c, d) 50 mg g⁻¹ e (e, f) 100 mg g⁻¹ de nisina.

Estudos prévios^{97, 258} também investigaram a incorporação da nisina utilizando microscopia eletrônica confocal e reportaram as propriedades de fluorescência de polímeros conjugados e nanofibras de óxido de polietileno, e afirmaram que a emissão de fluorescência é fortemente dependente do seu estado de agregação. A emissão em cadeias poliméricas (tais como aquelas existentes em soluções extremamente diluídas e/ou nanopartículas com dimensões de alguns nanômetros) originam principalmente a partir das transições ópticas de estados excitados nos segmentos separados da cadeia conjugada. Os comprimentos e as estruturas destes segmentos são determinados por ambas as estruturas e/ou defeitos químicos nas conformações de cada cadeia individual²⁵⁹.

A fim de analisar e quantificar a rugosidade da superfície, as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina foram medidas e os valores da rugosidade estão apresentados na Tabela 19. Os resultados da rugosidade da superfície das nanofibras variou de 6,17 μm a 17,70 μm , para o PBAT puro e PBAT/nisina 50 mg g^{-1} de nisina, respectivamente. À medida que a concentração de nisina aumentou, maiores foram os valores da rugosidade para as nanofibras de PBAT/nisina. Este comportamento pode também ser observado nos perfis de superfície nas imagens 3-D (Figura 70), a superfície do PBAT puro (Fig. 70a) apresentou a menor rugosidade quando comparado com as amostras contendo nisina (Fig. 70b-d). Nanofibras com 20 mg g^{-1} de nisina apresentaram a rugosidade média mais elevada 26,04 μm (Tabela 19), e a maior rugosidade (Fig. 70b). Nanofibras compostas de PBAT puro apresentaram a menor rugosidade (Tabela 19) e apresentaram o maior valor de ângulo de contato da água (Fig. 68). A adição da nisina alterou a rugosidade das nanofibras, visto que a presença da nisina inclui a presença de sais nas amostras, e conseqüentemente neste sentido, alterou a molhabilidade, tornando as nanofibras mais hidrofílicas.



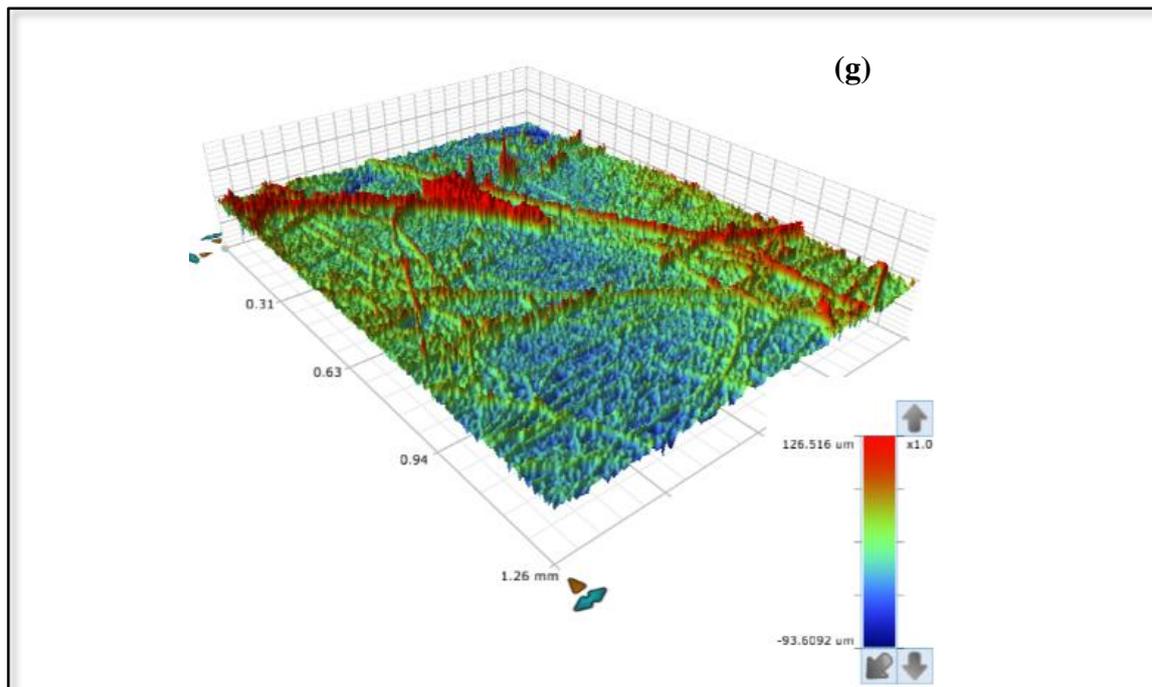


Figura 70. Imagens de perfilometria das superfícies das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina: a) PBAT puro, b) $2,5 \text{ mg g}^{-1}$, c) $5,0 \text{ mg g}^{-1}$, d) 10 mg g^{-1} , e) 20 mg g^{-1} , f) 30 mg g^{-1} e g) 50 mg g^{-1} de nisina.

Para obter nanofibras lisas e homogêneas, as condições ambientais do local de trabalho devem ser cuidadosamente monitoradas. Outrossim, a solução da amostra para o electrospinning deve ser cuidadosamente monitorada também, visto que, a alteração de algumas propriedades tais como a viscosidade, concentração, condutividade e tensão superficial podem ter um efeito direto nas propriedades finais da nanofibra^{115, 127}. Um estudo prévio¹¹⁸ relacionou a diferença na rugosidade com a umidade e verificou que quando a umidade foi menor, a nanofibra apresentou superfície lisa. Com o aumento da umidade, a rugosidade e beads aumentaram na superfície. Quando a umidade ambiente é superior a um certo valor, nanofibras eletrofiadas apresentaram estruturas secundárias. A rugosidade das nanofibras está diretamente relacionada a estes fatores, e em adição, pode variar na presença de cargas na solução e pode também ser alterada dependendo da porosidade da nanofibra.

Tabela 19. Valores de rugosidade expressas como RMS (μm) das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Amostras	RMS (μm)
PBAT puro	$6,17 \pm 2$
2,5	$7,06 \pm 0,3$
5,0	$7,98 \pm 0,3$
10	$23,73 \pm 7$
20	$26,04 \pm 17$
30	$11,69 \pm 4$
50	$17,70 \pm 6$

As características viscoelásticas dos filmes das nanofibras foram investigadas através de análise dinâmico-mecânica (DMA). A dependência do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan \delta$ em função da temperatura para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina estão apresentadas nas Figuras 71 e 72. Para temperaturas abaixo da região de transição vítrea, a matriz do polímero está no estado vítreo e o módulo de armazenamento diminui ligeiramente com o aumento da temperatura. Este efeito foi observado para todas as amostras de PBAT/nisina, e foi mais pronunciado para a amostra contendo 30 mg g^{-1} de nisina (Fig. 71a). Esta diferença é provavelmente devido a dispersão da nisina na amostra, ou talvez, seja o resultado da alta voltagem aplicada durante o processo de eletrofiação. Estes fatores afetaram a estrutura do polímero e foram apresentados nas análises estruturais das nanofibras (Fig. 67). O fenômeno de relaxação correspondente na T_g produziu uma redução no módulo de armazenamento para todas as amostras. O módulo de armazenamento para as nanofibras de PBAT puro começou a diminuir em aproximadamente -25°C , que corresponde a T_g do polímero confirmado por DSC (Tabela 18). O módulo de armazenamento é menor para o PBAT puro devido a rápida transição da fase amorfa do polímero para o estado elastomérico e/ou borrachoso²⁰⁹. Acima da sua T_g , as amostras de PBAT começam a mudar a sua transição de vítreo para borrachoso, perdendo sua integridade mecânica e alterando a sua rigidez¹⁹¹. A redução total no módulo de armazenamento indica a maior mobilidade das cadeias poliméricas, que é atribuído à degradação da cadeia²¹⁰. As nanofibras também apresentaram uma redução no módulo de perda (E'') (Fig. 71b). Este módulo (E'') está associado ao comportamento viscoso do material, que deforma sob tensão mas não retorna ao seu estado inicial, e por esta razão, o material gasta energia que foi aplicada para esta tensão. Pode ser sugerido que

o módulo de perda diminui em função da dissipação de energia no sistema que pode não ter ocorrido, reduzindo assim a componente viscosa do material.

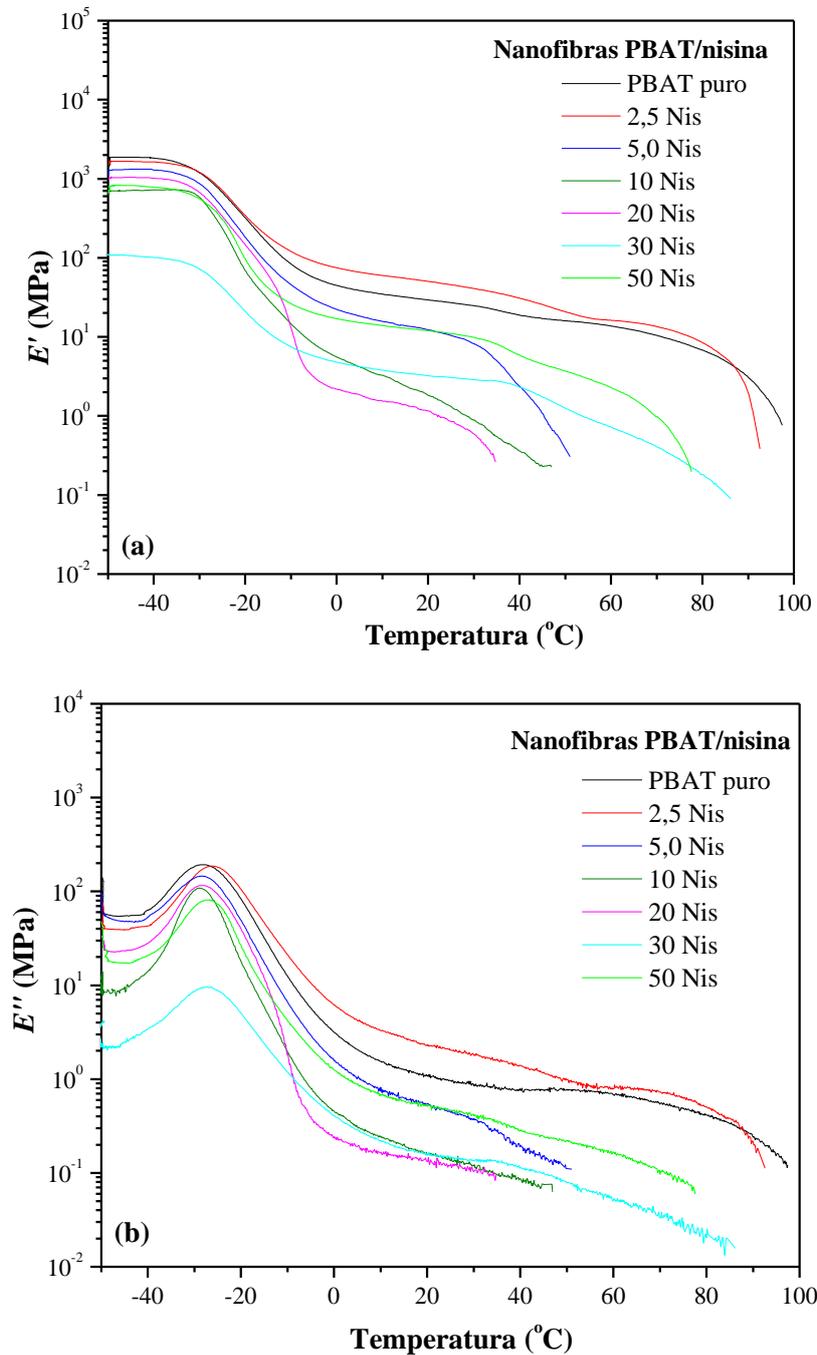


Figura 71. Efeito da adição da nisina nas soluções de PBAT nas propriedades dinâmico-mecânicas das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina: (a) módulo de armazenamento (E') e (b) módulo de perda (E'') em função da temperatura.

Foi possível detectar uma maior transição durante as análises de DMA (para todas as nanofibras eletrofiadas). Esta transição pôde ser observada nas curvas de $\tan \delta$ (Fig. 72), em -22°C (para o PBAT puro) ou no intervalo de -21°C a $-24,5^\circ\text{C}$ (para o

PBAT contendo 2,5 a 50 mg g⁻¹, respectivamente), correspondendo a T_g destes materiais. Esta transição é atribuída ao movimento das unidades do poli(butileno adipato), de domínio alifático flexível. Estes valores corroboram com os valores de T_g encontrados para os filmes extrudados (Fig. 38) e também com os valores observados pelas análises térmicas neste estudo (Tabela 18).

Para os filmes extrudados, foi possível identificar ainda uma transição de segunda ordem (Fig. 37), que ocorreu na região de 50°C ou 60°C nos filmes de PBAT. Esta transição é associada ao movimento das unidades do poli(butileno tereftalato) de domínio aromático rígido²¹¹. A mesma não foi observada durante o experimento de DMA para as nanofibras de PBAT.

Li *et al.*¹⁵⁷ prepararam blendas de poliéster com nisina e verificaram que as blendas de PBAT apresentaram uma transição larga em -18°C, estes autores afirmaram que este efeito é devido ao diferente método adotado para obter as amostras, uma vez que o PBAT é um poliéster amorfo aleatório. Os autores concluíram que os filmes das blendas de PBAT revestidos com quitosana apresentaram pequenas mudanças nas curvas de DMA, embora a transição vítrea pareceu diminuir em -21°C. Outros autores²⁶⁰ observaram que o PBAT apresentou um maior pico em -15,5°C associado com E' . Curiosamente, os autores também observaram um menor pico em 61°C associado com uma ligeira diminuição no E' .

Embora o PBAT vem sendo considerado um copoliéster alifático aromático aleatório, este polímero apresenta duas regiões de transições. E este comportamento é confirmado pela literatura²⁵¹. Além disso, o relaxamento devido à transição vítrea, que apresenta o segundo fenômeno de relaxação, pode ser associado ao movimento das sequências do metileno na cadeia principal do poliéster²⁶¹.

Em geral, a incorporação da nisina tende a reduzir os valores do E' e o E'' para as nanofibras de PBAT/nisina, por outro lado, as curvas de DMA mostraram claramente que a incorporação da nisina não afetou a temperatura de transição vítrea (T_g) destas amostras, uma vez que, as temperaturas de transição ocorreram entre -20°C a -24,5°C.

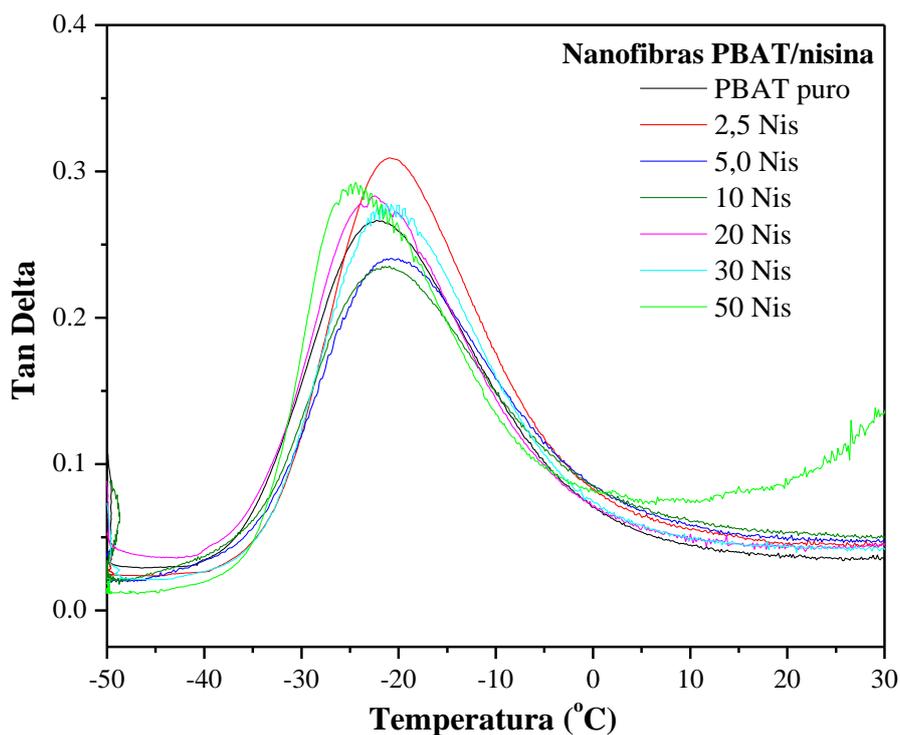


Figura 72. Curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

A fim de investigar o efeito da adição da nisina nas propriedades mecânicas das nanofibras eletrofiadas de PBAT, a resistência à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e o módulo elástico (MPa) foram determinados e estão apresentados na Tabela 20. O comportamento mecânico das nanofibras do PBAT puro e PBAT/nisina pode ser observado na Figura 73.

Os valores de alongamento na ruptura foram muito semelhantes entre as nanofibras de PBAT puro e nanofibras contendo 5,0 e 50 mg g^{-1} de nisina (132%, 141% e 133%, respectivamente). No entanto, o módulo elástico diminuiu de 7,67 MPa nas nanofibras sem nisina para 5,65 MPa para as nanofibras com 50 mg g^{-1} de nisina, indicando uma diminuição da rigidez no filme das nanofibras²⁶². Tal decréscimo no módulo elástico e esta variação no alongamento na ruptura para as nanofibras de PBAT/nisina é provavelmente devido a presença de agregados e a pobre dispersão das partículas maiores de nisina (Fig. 64 e 69), que podem causar a ruptura prematura do filme das nanofibras²⁶³.

Tabela 20. Resultado das propriedades mecânicas para o filme das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Amostras	Módulo Elástico (MPa)	Resistência à Tração (MPa)	Alongamento na Ruptura (%)
PBAT puro	7,67 ± 0,7	2,03 ± 0,3	132 ± 11
2,5	8,12 ± 0,8	3,62 ± 0,3	143 ± 4
5,0	8,20 ± 0,6	3,58 ± 0,2	141 ± 4
10	7,25 ± 1	3,58 ± 0,8	129 ± 7
20	6,81 ± 0,8	3,59 ± 0,6	135 ± 7
30	6,87 ± 0,9	3,60 ± 0,6	135 ± 8
50	5,65 ± 0,6	2,86 ± 0,7	133 ± 26

A resistência à tração apresentou apenas variações nos resultados para as nanofibras de PBAT. Nanofibras de PBAT puro apresentaram resistência à tração de 2,03 MPa e este valor aumentou para 3,60 MPa para as nanofibras com 30 mg g⁻¹ de nisina, e então diminuiu novamente para 2,86 MPa para as nanofibras contendo 50 mg g⁻¹ de nisina. Deste modo, a adição da nisina aumenta a resistência das fibras, causando uma restrição nos movimentos dos segmentos vizinhos na cadeia polimérica⁵⁰. A redução desta propriedade observada para a amostra contendo 50 mg g⁻¹ de nisina pode estar relacionada à dispersão do aditivo, visto que aglomerados podem ser formados e/ou a maior interação nisina-nisina, afetando deste modo as propriedades mecânicas quando testadas. Além disso, a orientação das nanofibras no momento da deposição sobre a placa coletora podem ter sido diferentes para as amostras, resultando em uma diferente conformação e alterando os resultados das propriedades mecânicas para esta amostra.

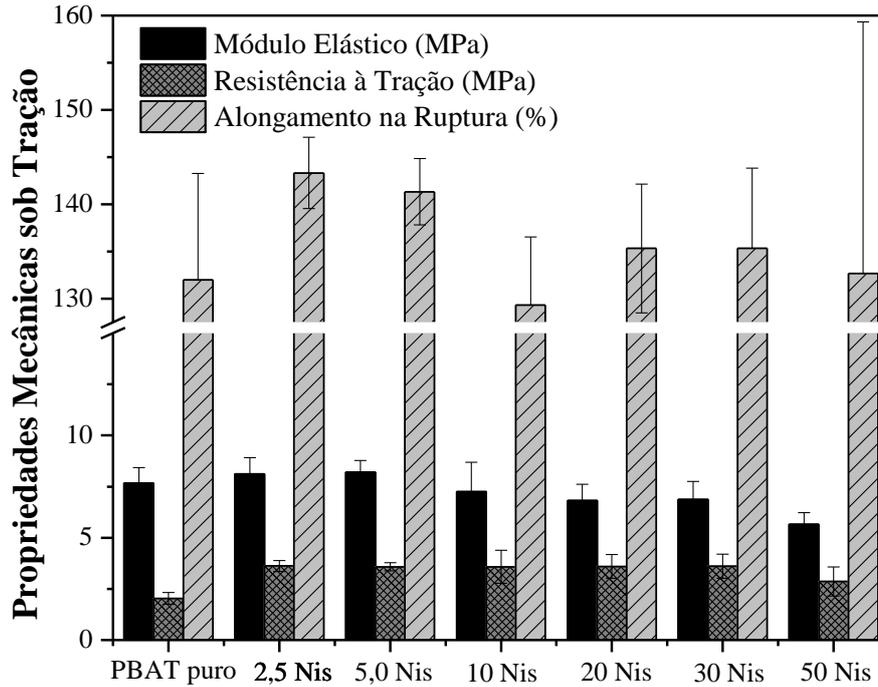


Figura 73. Propriedades mecânicas sob tração para os filmes das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

A incorporação da nisina em diferentes concentrações nas soluções de PBAT resultou em nanofibras ativas e antimicrobianas com visíveis zonas de inibição contra a bactéria indicadora *L. monocytogenes*. Os resultados representativos da atividade antimicrobiana das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina estão apresentados na Figura 74 e o diâmetro médio das zonas de inibição também foi calculado e apresentado na Figura 75. A espessura dos filmes está apresentada em anexo (Anexo 12, Tabela 25).

Maiores zonas de inibição foram observadas nas nanofibras à medida que a concentração de nisina aumentou na matriz de PBAT. Como esperado, as nanofibras de PBAT puro (sem nisina) não apresentaram atividade antimicrobiana, ou seja, nenhum halo de inibição ao redor do filme pôde ser identificado, sugerindo que a *L. monocytogenes* cresceu em toda a região e ao redor deste filme. As amostras contendo 2,5 mg g⁻¹ de nisina podem apresentar alguma atividade antimicrobiana, mas esta inibição não pôde ser quantificada de acordo com as condições de ensaio (Fig. 74). A atividade antimicrobiana nas nanofibras de PBAT/nisina começou a ser observada na amostra contendo 5,0 mg g⁻¹ de nisina, a qual apresentou o menor diâmetro de inibição (3,0 mm), enquanto as nanofibras contendo 50 mg g⁻¹ de nisina apresentaram o maior diâmetro de inibição (12,7 mm). Estes resultados indicaram que a nisina foi

eficientemente liberada a partir das nanofibras de PBAT/nisina e apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva em concentrações crescentes.

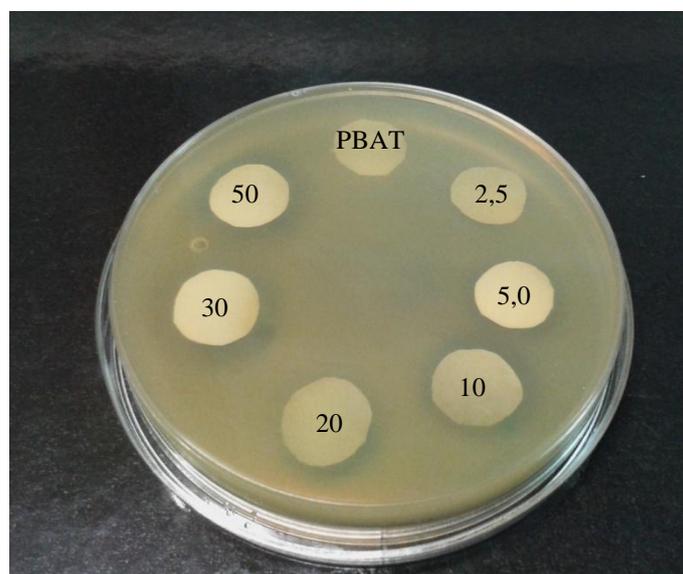


Figura 74. Atividade antimicrobiana do filme das nanofibras de PBAT puro e das nanofibras de PBAT/nisina testados contra *L. monocytogenes* em placas de ágar BHI.

A atividade antimicrobiana para os filmes de PBAT/nisina obtidos por extrusão (Fig. 40) apresentaram diâmetros de inibição de 11,7 mm para a amostra com 5% de concentração de nisina¹². Os filmes das nanofibras (Fig. 75) apresentaram halos de inibição muito maiores que os filmes obtidos por extrusão (Tabela 11), possivelmente porque as nanofibras possuem uma área superficial muito maior facilitando a liberação da nisina a partir dos filmes de PBAT. Além disso, foi possível visualizar halos de inibição nas amostras a partir de 5,0 mg g⁻¹ de concentração de nisina. Nos filmes extrudados a medida do halo só pôde ser feita nas amostras a partir de 1% de nisina, uma vez que, o halo da amostra de PBAT/nisina (99,75/0,25) foi muito pequeno e não pôde ser medido. Estes resultados demonstraram que foi possível obter nanofibras de PBAT/nisina utilizando a técnica de eletrofição e que apresentassem uma considerável atividade antimicrobiana.

Outros autores⁸⁸ investigaram as propriedades antimicrobianas da nisina até 5% de concentração em filmes de polipropileno/montmorilonita e também verificaram visíveis zonas de inibição contra a *L. monocytogenes* aumentando à medida que aumentou a concentração de nisina nas amostras. Hanusová *et al.*¹⁵⁸ investigaram a eficiência da nisina em filmes de polietileno e verificaram que os filmes inibiram os

micro-organismos indicadores e apresentaram diâmetros com visíveis zonas de inibição. Os níveis de migração bem como as propriedades antimicrobianas dos filmes estão relacionados com a espessura das amostras.

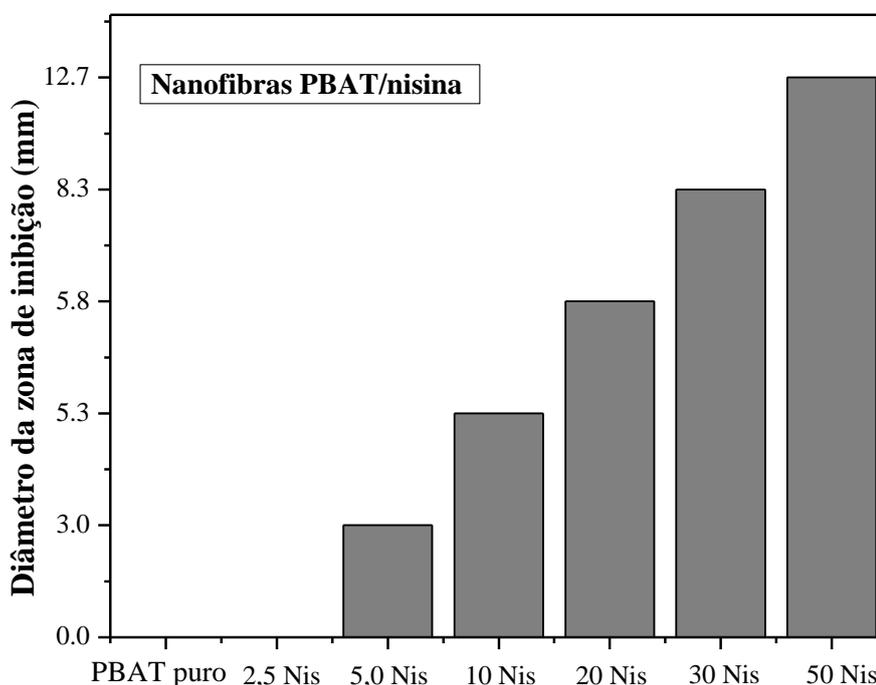


Figura 75. Valores do diâmetro das zonas de inibição das nanofibras do PBAT puro e PBAT/nisina.

A migração da nisina a partir das sete formulações de nanofibras em soluções simulantes foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 21. A atividade antimicrobiana foi detectada em soluções fisiológicas contendo Tween 20 e soluções de ácido acético após imersão das nanofibras durante um período de 48 h; foi observado que nenhuma liberação adicional ocorreu em um período de tempo mais longo.

Atividade antimicrobiana não foi observada para as nanofibras de PBAT puro, utilizado como controle. Além disso, nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada durante as primeiras 4 h de imersão dos filmes contendo 2,5 mg g⁻¹ de nisina. Foi observada uma atividade antimicrobiana de 100 UA/mL em soluções simulantes contendo Tween 20 após 24 h e em ácido acético após 48 h de imersão.

As amostras exibiram a melhor migração em soluções contendo Tween 20: um aumento na atividade antimicrobiana foi observada durante a imersão dos filmes contendo 10, 20 and 30 mg g⁻¹ de nisina, enquanto as nanofibras contendo 50 mg g⁻¹ liberaram 3200 UA/mL após 24 h. Todas as amostras apresentaram uma pequena

atividade e/ou migração quando imersas em água destilada durante o período do ensaio, enquanto que a atividade atingiu até 1600 UA/mL em soluções de ácido acético. O pH mais baixo pode ter sido favorável para aumentar a migração da nisina a partir dos filmes das nanofibras, visto que a nisina é mais solúvel em pH ácido¹⁴¹.

Um estudo comparativo em filmes de polipropileno/montmorilonita contendo nisina reportou que as amostras contendo 5% de concentração apresentaram migração de nisina a partir dos filmes de 400 UA/mL após 24 h de imersão em soluções de Tween 20, mas os filmes contendo 2,5% de nisina apresentaram liberação de 100 UA/mL após 48 h⁸⁸.

Foi possível observar que solução simulante contendo Tween 20 utilizada neste estudo, favoreceu a difusão da nisina incorporada na matriz de PBAT, e causou a maior migração. Neste sentido, a liberação da nisina a partir das nanofibras de PBAT é melhorada quando soluções simulantes favoráveis são utilizadas. No que diz respeito ao tempo de liberação da nisina, foi possível observar que 48 h são necessárias para atingir a migração máxima da bacteriocina a partir das nanofibras. Além disso, reforçando a análise da atividade antimicrobiana (Fig. 74), foi possível verificar que as nanofibras de PBAT/nisina apresentaram uma maior migração nas soluções simulantes (Tabela 21), quando comparamos com os resultados da atividade antimicrobiana dos filmes extrudados de PBAT/nisina (Tabela 12). Em adição, as nanofibras contendo 2,5 mg g⁻¹ apresentaram migração já após as primeiras 24 h nas soluções simulantes B e C, enquanto nos filmes extrudados a liberação ocorreu somente na solução B. E após 48 h de imersão as nanofibras contendo 5,0 mg g⁻¹ apresentaram migração em todas as soluções simulantes, sendo observado valores de 200 e 400 UA/mL enquanto nas filmes extrudados esta amostras liberou apenas 100 UA/mL. Isto sugere que a nisina é mais facilmente liberada a partir das nanofibras, devido à maior área superficial das fibras.

Tabela 21. Atividade antimicrobiana liberada a partir dos filmes das nanofibras de PBAT puro e de PBAT/nisina após os períodos de tempo em soluções simulantes contendo: água destilada (A), Tween 20 (B) e ácido acético (C).

Amostras	Atividade antimicrobiana (UA mL ⁻¹)								
	4 h			24 h			48 h		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
PBAT puro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	100	0	0	100	100
5,0	100	100	100	100	200	100	100	400	200
10	100	100	100	0	200	100	100	600	200
20	100	200	200	100	400	200	400	600	400
30	800	1200	800	800	1600	800	1600	3200	800
50	1000	1600	1000	800	3200	1600	1000	3200	1600

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BICAMADA DE PBAT PURO E PBAT/NISINA

Para verificar as características viscoelásticas dos filmes bicamada desenvolvidos neste trabalho, experimentos de análise dinâmico-mecânica (DMA) foram realizados. As Figuras 76 e 77 mostram a dependência do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e $\tan \delta$ em função da temperatura. Os filmes bicamada apresentaram comportamento dinâmico-mecânico muito semelhante com as filmes extrudados e os filmes das nanofibras, apresentados anteriormente.

Foi possível observar uma redução no módulo de armazenamento para o filme bicamada de PBAT puro em função do aumento da temperatura (Fig. 76a). Este comportamento pode ser atribuído ao aumento da mobilidade da cadeia do polímero em maiores temperaturas. Os filmes bicamada contendo nisina apresentaram pequenas alterações quando comparado com o polímero puro. No entanto, o filme com a maior concentração de nisina (5-50) apresentou um comportamento diferenciado, o módulo de armazenamento diminuiu ligeiramente com o aumento da temperatura. Esta diferença é provavelmente devido a dispersão da nisina na amostra, ou talvez, seja o resultado da alta voltagem aplicada durante o processo de eletrofiação. A amostra contendo 2% de concentração de nisina (2-20) pode ter apresentado algum tipo de conformação diferente

na estrutura da amostra, diferenciando o seu comportamento dinâmico das demais. Os filmes bicamada também apresentaram uma redução no módulo de perda (Fig. 76b).

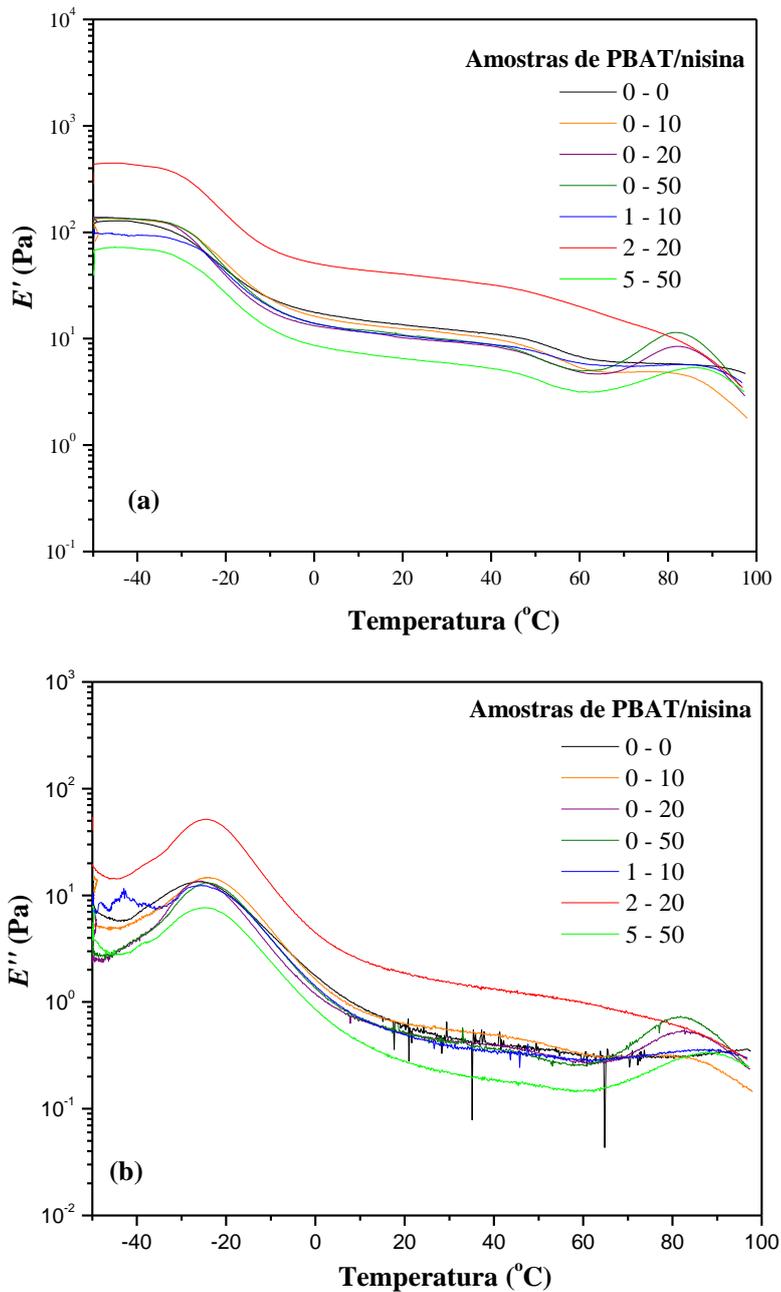


Figura 76. Propriedades dinâmico-mecânicas para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina: (a) módulo de armazenamento (E') e (b) módulo de perda (E'') em função da temperatura.

Foi possível detectar duas maiores transições durante as análises de DMA (para todos os filmes bicamada). Esta primeira transição pôde ser observada nas curvas de $\tan \delta$ (Fig. 77), em torno de $-19,2^\circ\text{C}$ (para o PBAT puro) ou no intervalo de -20°C a $-18,5^\circ\text{C}$ (para o PBAT contendo 10 a 50 mg g^{-1} , respectivamente), que pode ser atribuída a T_g

destes materiais. Esta maior transição é atribuída ao movimento das unidades de domínio alifático flexível. A segunda transição ocorre em torno de 80°C e é atribuída ao movimento das unidades de domínio aromático rígido^{211, 212}. Esta segunda transição pode ser melhor visualizada na Figura 76, neste estudo, uma vez que, estas amostras referem-se à junção de filmes extrudados e eletrofiados. Este comportamento foi visível nos filmes extrudados (Fig. 38), porém não pôde ser visualizado no filmes das nanofibras (Fig. 72).

Em adição, a incorporação da nisina não causou alterações significativas nas propriedades dinâmico-mecânicas dos filmes bicamada, uma vez que a T_g das amostras permaneceu quase inalterada com a presença do aditivo antimicrobiano (Fig. 77).

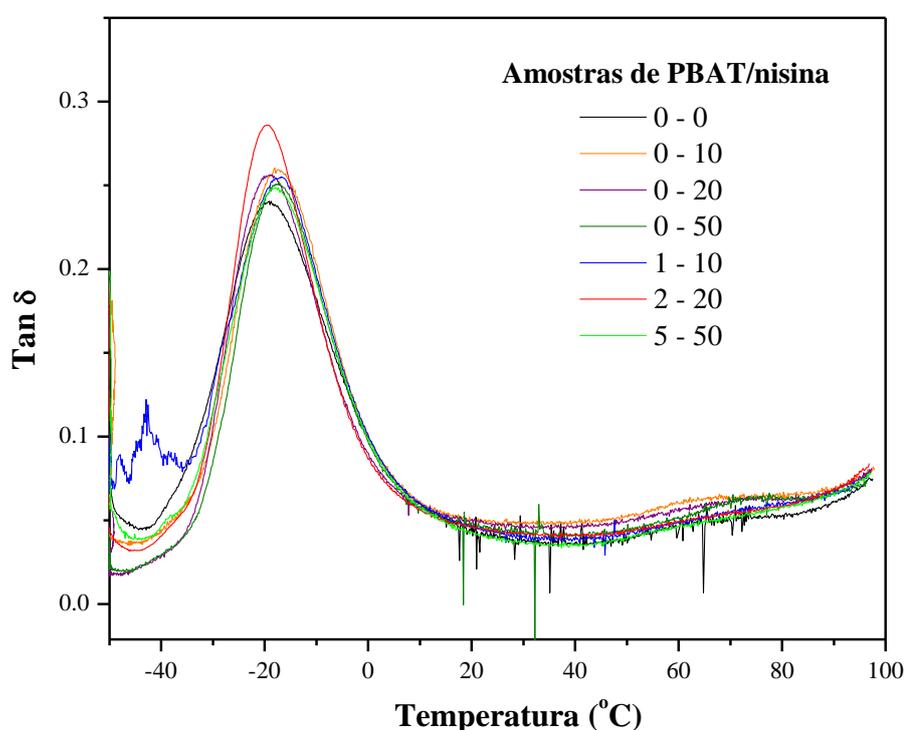


Figura 77. Curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.

A fim de investigar o efeito da adição da nisina nas propriedades mecânicas dos filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina, bem como, avaliar se o método utilizado para a obtenção das amostras pode causar alguma alteração nas propriedades mecânicas destes filmes, a resistência à tração (MPa), deformação na ruptura (%) e o módulo elástico (MPa) foram determinados através de ensaios mecânicos sob tração e estão apresentados na Tabela 22. O comportamento mecânico dos filmes bicamada do

PBAT puro e PBAT/nisina pode ser observado na Figura 78. A espessura dos filmes bicamada estão apresentadas em anexo (Anexo 12, Tabela 25).

Os valores de deformação na ruptura foram muito semelhantes entre os filmes bicamada de PBAT puro e os filmes (0-50 e 5-50) apresentando valores de (128, 129 e 131%), respectivamente (Tabela 22). No entanto, o módulo elástico diminuiu de 69,85 MPa para o filme de PBAT puro para 51,40 MPa para o filme contendo 5% de concentração de nisina, indicando uma diminuição da rigidez nos filmes bicamada. A resistência à tração apresentou alterações nos valores com a incorporação de nisina, diminuindo de 10,0 MPa para o filmes bicamada sem nisina, passando para 6,37 MPa no filme com 5% de nisina.

Tabela 22. Resultado das propriedades mecânicas sob tração para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.

Amostras	Módulo Elástico (MPa)	Resistência à Tração (MPa)	Deformação na Ruptura (%)
0 - 0	69,85 ± 3	10,0 ± 0,2	128 ± 1
0 - 10	67,28 ± 4	9,98 ± 0,4	131 ± 2
0 - 20	63,32 ± 3	10,9 ± 0,4	131 ± 2
0 - 50	61,53 ± 1	8,03 ± 0,2	130 ± 5
1 - 10	59,80 ± 2	7,63 ± 0,2	134 ± 3
2 - 20	52,54 ± 1	6,81 ± 0,5	135 ± 2
5 - 50	51,40 ± 0	6,37 ± 0,2	131 ± 1

O comportamento mecânico dos filmes bicamada pode ser visualizado na Figura 78. Foi possível verificar que a presença da nisina provocou algumas pequenas alterações nas propriedades mecânicas dos filmes bicamada, este efeito é mais pronunciado para as amostras contendo a maior concentração do aditivo. Este comportamento pode ser atribuído ao nível de dispersão da carga na matriz do polímero, além da interação do aditivo com a matriz.

Como esperado, os filmes bicamada (Tabela 22) apresentaram propriedades mecânicas elevadas em comparação com os filmes extrudados (Tabela 9), e os filmes das nanofibras (Tabela 20). No entanto, apresentaram a mesma tendência de comportamento mecânico, o módulo elástico (Fig. 78), por exemplo, também apresentou uma leve redução para as amostras com maior teor de nisina, reduzindo assim, a rigidez dos filmes. Mas levando-se em comparação os erros experimentais, estas diferenças não foram muito significativas.

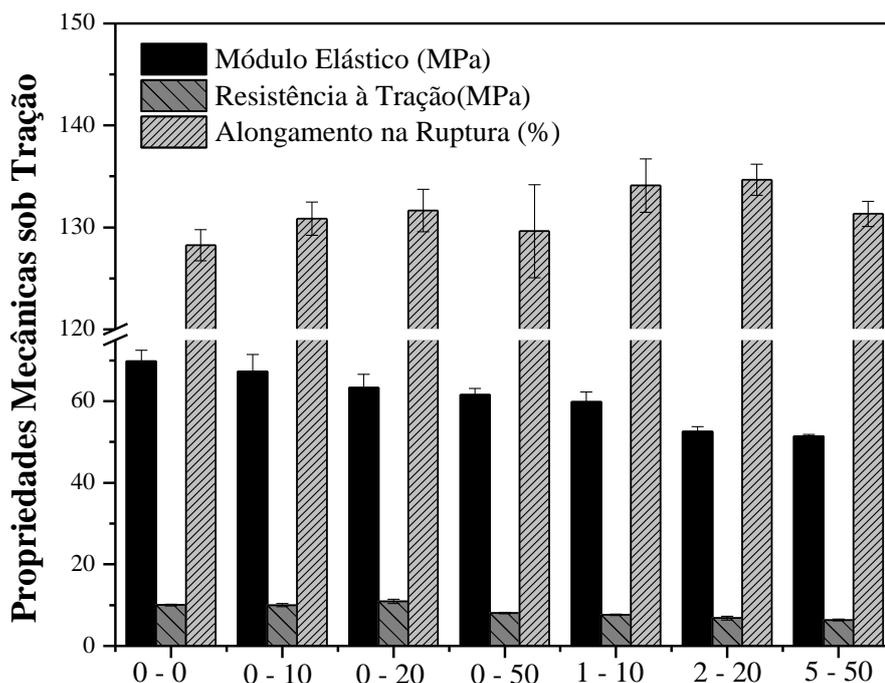


Figura 78. Propriedades mecânicas sob tração para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.

Os filmes bicamada foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana utilizando a *L. monocytogenes* como cultura indicadora para avaliar a inibição dos halos evidenciando a sua atividade. O resultado representativo da atividade antimicrobiana para os filmes bicamada estão apresentados na Figura 79.

As amostras dos filmes bicamada apresentaram inibição contra bactérias Gram-positivas e foi possível perceber halos de inibição contra a *L. monocytogenes* em todas as amostras de filmes contendo nisina. Halos maiores foram observados para amostras com maiores concentrações de bacteriocina (2-20 e 5-50). O filme bicamada de PBAT puro (0-0) não apresentou atividade antimicrobiana, como esperado.

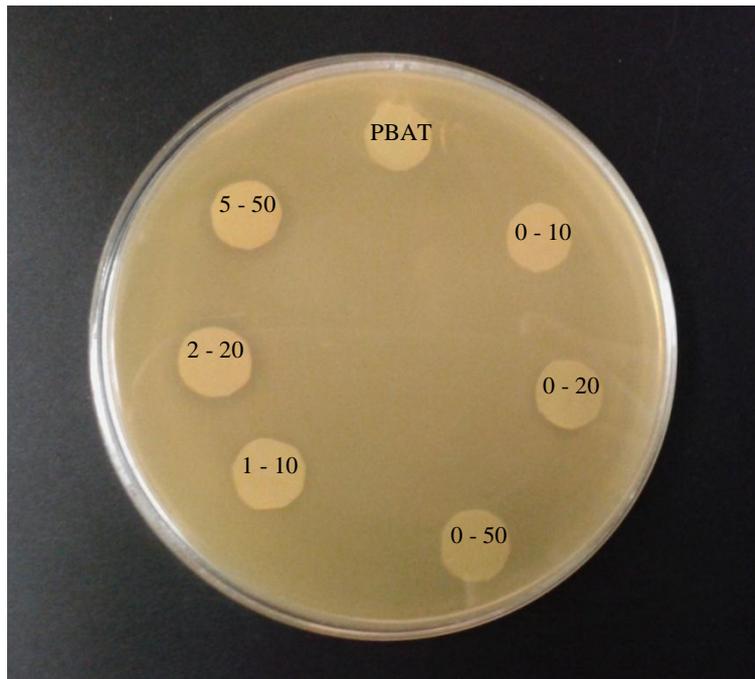


Figura 79. Atividade antimicrobiana para os filmes bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina testados contra a *L. monocytogenes* em placas de ágar BHI.

6 CONCLUSÕES

Foi possível obter filmes ativos e biodegradáveis de PBAT/nisina desenvolvidos através do processamento no estado fundido utilizando temperatura de 140°C. O método de processamento não alterou a estrutura química do polímero. As micrografias revelaram que a nisina está bem dispersa na matriz do polímero, e além disso, a presença da nisina não afetou a estabilidade térmica das amostras e nem causou alterações na temperatura de fusão e transição vítrea dos filmes. Em adição, a biodegradabilidade destes filmes foi confirmada com apenas 30 dias de compostagem e a degradação hidrolítica em meio básico foi mais acelerada. A presença da nisina aumentou as propriedades de barreira ao oxigênio nos filmes de PBAT contendo nisina.

Foi possível realizar a eletrofição do PBAT com a incorporação de nisina. As nanofibras de PBAT/nisina demonstraram atividade antimicrobiana contra a *L. monocytogenes*. A presença da nisina modificou a morfologia das amostras diminuindo o diâmetro das fibras, no entanto a estabilidade térmica não foi alterada, tampouco houve alteração na estrutura química do polímero.

Os filmes bicamada inibiram bactérias Gram-positivas em placas de ágar BHI, e apresentaram boas propriedades mecânicas.

Portanto, estes resultados apontaram pela primeira vez, o desenvolvimento de filmes ativos utilizando o processamento no estado fundido, utilizando o PBAT como matriz polimérica e contendo nisina como agente antimicrobiano. Além disso, este estudo demonstra o uso inovador da técnica de electrospinning para criar materiais de embalagem ativos para alimentos. Por fim, a junção destas duas técnicas para a obtenção de filmes bicamada com propriedades diferenciadas. Por conseguinte, os filmes obtidos apresentaram resultados promissores, indicando que estes novos materiais podem ser possivelmente empregados como filmes ativos na indústria de alimentos, protegendo e prolongando a vida de prateleira do produto embalado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASTM; Standard Terminology Relating to Plastics. *American Society for Testing and Materials*. **2000**, D 883-00.
2. ASTM; Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities. *American Society for Testing and Materials*. **2012**, D 6400-12.
3. Yang, F.; Qiu, Z.; Preparation, crystallization, and properties of biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate)/organomodified montmorillonite nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *119*(3), 1426.
4. Harada, J.; *Sustentabilidade Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis, Compostáveis e suas Normas*. 2011. Disponível em: https://www.google.com.br/?gws_rd=ssl#q=palestra+julio+harada+ecoflex Acesso em Fevereiro de 2016.
5. Paoli, M.-A.; Degradação e Estabilização de Polímeros. *Chemkeys*. **2008**, 2 on-line, 197.
6. ABIPLAST; Indústria Brasileira de Transformação do Material Plástico. Perfil 2014. *Associação Brasileira da Indústria do Plástico*. **2014**.
7. Storia, A.; Mauriello, G.; Villani, F.; Ercolini, D.; Coating-Activation and Antimicrobial Efficacy of Different Polyethylene Films with a Nisin-Based Solution. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*(10), 2770.
8. Jin, T.; Zhang, H.; Biodegradable Polylactic Acid Polymer with Nisin for Use in Antimicrobial Food Packaging. *J. Food Sci.* **2008**, *73*(3), 127.
9. EU. *Commission regulation (EC) N° 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food*. *OJ L135*, 30.05.2009 (p. 3) **2009**.
10. Baughan, J. S.; Global legislation of food contact materials. *Cambridge, UK: Woodhead Publishers*. **2015**.
11. Brasil.; *In Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 51, de 26 de Novembro de 2010*. **2010**.
12. Zehetmeyer, G.; Meira, S. M. M.; Scheibel, J. M.; de Oliveira, R. V. B.; Brandelli, A.; Soares, R. M. D.; Influence of melt processing on biodegradable nisin-PBAT films intended for active food packaging applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133*(13), 1.
13. Bastarrachea, L.; Dhawan, S.; Sablani, S. S.; Mah, J.-H.; Kang, D.-H.; Zhang, J.; Tang, J.; Biodegradable Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. *J. Food Sci.* **2010**, *75*(4), 215.
14. Bastarrachea, L.; Dhawan, S.; Sablani, S. S.; Powers, J.; Release kinetics of nisin from biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *J. Food Eng.* **2010**, *100*(1), 93.
15. Li, G.; Shankar, S.; Rhim, J.-W.; Oh, B.-Y.; Effects of preparation method on properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*(5), 1679.
16. Silva, M. F. O.; Costa, L. M.; Pereira, F. S.; Costa, M. A.; A indústria de transformação de plásticos e seu desempenho recente. *Química, BNDES Setorial*. **38**, 131.
17. _____; An analysis of European plastics production, demand and waste data. *Plastics Europe - The Facts*. **2014/2015**.

18. Freire, M. T. d. A.; Bottoli, C. B. G.; Fabris, S.; Reyes, F. G. R.; Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. *Quím. Nova.* **2008**, *31*, 1522.
19. Jorge, N.; Embalagens para alimentos. *São Paulo : Cultura Acadêmica : Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação.* **2013**.
20. Rhim, J.-W.; Park, H.-M.; Ha, C.-S.; Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progr. Polym. Sci.* **2013**, *38(10)*, 1629.
21. Brito, G. F.; Agrawal, P.; Araújo, E. M.; Mélo, T. J. A.; Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Rev. Elet. Mat. Proc.* **2011**, *6.2*, 127.
22. Chandra, R.; Rustgi, R.; Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 1273.
23. ASTM; Standard Guide for Exposing and Testing Plastics that Degrade in the Environment by a Combination of Oxidation and Biodegradation. *American Society for Testing and Materials.* **2013**, ASTM D6954.
24. Bastioli, C.; Handbook of biodegradable polymers. *Rapra Technology Limited. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR, UK* **2005**, *1*, 1.
25. Avérous, L.; Pollet, E.; Environmental silicate nano-biocomposites. *Green Energy and Technology. Springer-Verlag, London* **2012**, *12*.
26. Sharma, S. K.; Mudhoo, A.; A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications. *RSC Green Chemistry* **2011**, *12*, 149.
27. Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S.; Ngouajio, M.; Fernandez, T.; Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95*, 2641.
28. Wang, H.; Wei, D.; Zheng, A.; Xiao, H.; Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *116*, 14.
29. Muthuraj, R.; Misra, M.; Mohanty, A. K.; Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132(27)*, 1.
30. Yu, T.; Li, Y.; Influence of poly(butylenes adipate-co-terephthalate) on the properties of the biodegradable composites based on ramie/poly(lactic acid). *Composites: Part A* **2014**, *58(0)*, 24.
31. Fukushima, K.; Rasyida, A.; Yang, M.-C.; Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* **2013**, *80-81*, 291.
32. Kim, J.-H.; Lee, J. C.; Kim, G.-H.; Study on poly(butylene adipate-co-terephthalate)/starch composites with polymeric methylenediphenyl diisocyanate. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132(16)*, 1.
33. Guo, G.; Zhang, C.; Du, Z.; Zou, W.; Tian, H.; Xiang, A.; Li, H.; Structure and property of biodegradable soy protein isolate/PBAT blends. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *74*, 731.
34. Yeh, J.-T.; Tsou, C.-H.; Huang, C.-Y.; Chen, K.-N.; Wu, C.-S.; Chai, W.-L.; Compatible and crystallization properties of poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116(2)*, 680.
35. Pollet, E.; Delcourt, C.; Alexandre, M.; Dubois, P.; Transesterification catalysts to improve clay exfoliation in synthetic biodegradable polyester nanocomposites. *Eur. Polym. J.* **2006**, *42(6)*, 1330.
36. Fukushima, K.; Wu, M.-H.; Bocchini, S.; Rasyida, A.; Yang, M.-C.; PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Mat. Sci. Eng. C* **2012**, *32(6)*, 1331.

37. Touchaleaume, F.; Martin-Closas, L.; Angellier-Coussy, H.; Chevillard, A.; Cesar, G.; Gontard, N.; Gastaldi, E.; Performance and environmental impact of biodegradable polymers as agricultural mulching films. *Chemosphere* **2016**, *144*, 433.
38. Weng, Y.-X.; Jin, Y.-J.; Meng, Q.-Y.; Wang, L.; Zhang, M.; Wang, Y.-Z.; Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polym. Test.* **2013**, *32(5)*, 918.
39. Feng, S.; Wu, D.; Liu, H.; Chen, C.; Liu, J.; Yao, Z.; Xu, J.; Zhang, M.; Crystallization and creep of the graphite nanosheets based poly(butylene adipate-co-terephthalate) biocomposites. *Therm. Acta* **2014**, *587*, 72.
40. Shi, X. Q.; Ito, H.; Kikutani, T.; Characterization on mixed-crystal structure and properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) biodegradable fibers. *Polymer* **2005**, *46(25)*, 11442.
41. Al-Itiry, R.; Lamnawar, K.; Maazouz, A.; Reactive extrusion of PLA, PBAT with a multi-functional epoxide: Physico-chemical and rheological properties. *Eur. Polym. J.* **2014**, *58*, 90.
42. Zhou, X.; Mohanty, A.; Misra, M.; A New Biodegradable Injection Moulded Bioplastic from Modified Soy Meal and Poly (butylene adipate-co-terephthalate): Effect of Plasticizer and Denaturant. *J Polym Environ* **2013**, *21(3)*, 615.
43. Bikiaris, D. N.; Nanocomposites of aliphatic polyesters: An overview of the effect of different nanofillers on enzymatic hydrolysis and biodegradation of polyesters. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, *98(9)*, 1908.
44. Ojeda, T. F. M.; Biodegradabilidade de materiais poliméricos. *Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia. Departamento de Ciência do Solo* **2008**.
45. Diez-Pascual, A. M.; Diez-Vicente, A. L.; Antimicrobial and sustainable food packaging based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) and electrospun chitosan nanofibers. *RSC Adv.* **2015**, *5(113)*, 93095.
46. Lins, L. C.; Livi, S.; Duchet-Rumeau, J.; Gerard, J.-F.; Phosphonium ionic liquids as new compatibilizing agents of biopolymer blends composed of poly(butylene-adipate-co-terephthalate)/poly(lactic acid) (PBAT/PLA). *RSC Adv.* **2015**, *5(73)*, 59082.
47. Zhang, N.; Wang, Q.; Ren, J.; Wang, L.; Preparation and properties of biodegradable poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend with glycidyl methacrylate as reactive processing agent. *J. Mat. Sci.* **2008**, *44(1)*, 250.
48. Wang, L.-F.; Rhim, J.-W.; Hong, S.-I.; Preparation of poly(lactide)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *68*, 454.
49. Wei, D.; Wang, H.; Xiao, H.; Zheng, A.; Yang, Y.; Morphology and mechanical properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate)/potato starch blends in the presence of synthesized reactive compatibilizer or modified poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Carb. Polym.* **2015**, *123*, 275.
50. Rodrigues, B. V. M.; Silva, A. S.; Melo, G. F. S.; Vasconcellos, L. M. R.; Marciano, F. R.; Lobo, A. O.; Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers. *Mat. Sci. Eng.: C* **2016**, *59*, 782.
51. BASF, C.; <https://www.basf.com/br/> Acesso em: Dezembro de 2015.
52. Harada, J.; Linha de Plásticos Biodegradáveis, Compostáveis e de Fontes Renováveis, Normas. *Instituto de Energia Nuclear, IPEN USP* **2011**.
53. Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P.; Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Micro* **2005**, *3(10)*, 777.

54. Espitia, P. J. P.; Soares, N. F. F.; Coimbra, J. S. R.; Andrade, N. J.; Cruz, R. S.; Medeiros, E. A. A.; Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 187.
55. Rosa, C. M.; Franco, B.; Bacteriocinas de bactérias lácticas. *ConSCIENTIAE SAÚDE. Rev. Cient., UNINOVE - São Paulo.* **1**, 09.
56. Rodríguez, J. M.; Review: Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Food Sci. Tech. Int.* **1996**, *2*, 61.
57. Schulz, D.; Pereira, M. A.; Bonelli, R. R.; Nunes, M. M.; Batista, C. R. V.; Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alim. Nutr., Araraquara* **2003**, *14(2)*, 229.
58. da Silva Malheiros, P.; Micheletto, Y. M. S.; Silveira, N. P. d.; Brandelli, A.; Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Res. Int.* **2010**, *43(4)*, 1198.
59. Nascimento, M. S.; Moreno, I.; Kuaye, A. Y.; Bacteriocins in food: a review. *Braz. J. Food Technol.* **2008**, *11(2)*, 120.
60. Muñoz-Bonilla, A.; Cerrada, M. L.; Fernández-García, M.; Polymeric materials with antimicrobial activity. From synthesis to applications. *RSC Publishing. Royal Society of Chemistry* **2014**, *10*, 310.
61. Barbosa, A. A. T.; Silva de Araújo, H. G.; Matos, P. N.; Carnellosi, M. A. G.; Almeida de Castro, A.; Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. *Int. J. Food Microb.* **2013**, *164(2-3)*, 135.
62. Zhou, H.; Fang, J.; Tian, Y.; Lu, X.; Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Ann. Microbiol.* **2013**, *1*.
63. Siroli, L.; Patrignani, F.; Serrazanetti, D. I.; Vannini, L.; Salvetti, E.; Torriani, S.; Gardini, F.; Lanciotti, R.; Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food Microb.* **2016**, *54*, 11.
64. Zacharof, M. P.; Lovitt, R. W.; Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Proc.* **2012**, *2*, 50.
65. Klaenhammer, T. R.; Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews* **1993**, *12(1)*, 39.
66. Van Kraaij, C.; Vos, W. M.; Siezen, R. J.; Kuipers, O. P.; Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 575.
68. Krivorotova, T.; Cirkovas, A.; Maciulyte, S.; Staneviciene, R.; Budriene, S.; Serviene, E.; Sereikaite, J.; Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hyd.* **2016**, *54*, Part A, 49.
69. Cotter, P.; Hill, C.; Field, D., Nisin derivatives and the use thereof. In US20110269671 A1. Patent Application Publication: **2011**; pp 1-7.
70. Miyamoto, K. N.; Monteiro, K. M.; da Silva Caumo, K.; Lorenzatto, K. R.; Ferreira, H. B.; Brandelli, A.; Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin. *J. Prot.* **2015**, *119*, 230.
71. Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L.; Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microb.* **2001**, *71*, 1.
72. Van Belkum, M. J.; Stiles, M. E.; Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17(4)*, 323.

73. Kim, Y.-M.; An, D.-S.; Park, H.-J.; Park, J.-M.; Lee, D. S.; Properties of nisin-incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. *Packag. Technol. Sci.* **2002**, *15*(5), 247.
74. Liu, H.; Pei, H.; Han, Z.; Feng, G.; Li, D.; The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis*. *Food Control* **2015**, *47*(0), 444.
75. Pongtharangkul, T.; Demirci, A.; Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Appl. Microb. Biotechnol.* **2004**, *65*(3), 268.
76. Gross, E.; Morell, J. L.; Structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*(18), 4634.
77. R. Scaffaro; L. Botta; S. Marineo; A. M. Puglia. Incorporation of Nisin in Poly(Ethylene-Co-Vinyl Acetate) Films by melt processing: A study on the antimicrobial properties. *J. Food Protect.* **2011**, *74*(7), 1137.
78. de Arauz, L. J.; Jozala, A. F.; Mazzola, P. G.; Vessoni Penna, T. C.; Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **2009**, *20*(3-4), 146.
79. Şimşek, Ö.; Nisin production in a chitin-including continuous fermentation system with *Lactococcus lactis* displaying a cell wall chitin-binding domain. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2014**, *41*(3), 535.
80. Khaksar, R.; Hosseini, S. M.; Hosseini, H.; Shojaee-Aliabadi, S.; Mohammadifar, M. A.; Mortazavian, A. M.; khosravi-Darani, K.; Haji Seyed Javadi, N.; Komeily, R.; Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterisation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2014**, *49*(9), 2076.
81. Guo, T.; Hu, S.; Kong, J.; Functional Analysis and Randomization of the Nisin-Inducible Promoter for Tuning Gene Expression in *Lactococcus lactis*. *Curr Microbiol* **2013**, *66*(6), 548.
82. Chen, H.; Davidson, P. M.; Zhong, Q.; Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. *Int.J. Food Microb.* **2014**, *191*, 75.
83. Jin, T.; Liu, L.; Zhang, H.; Hicks, K.; Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*(2), 322.
84. BRASIL.; Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg. *Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Diário Oficial, Brasília, 23 jan. 1996, Seção 1.* **1996**.
85. Lequeux, I.; Ducasse, E.; Jouenne, T.; Thebault, P.; Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. *Eur. Polym. J.* **2014**, *51*(0), 182.
86. Meira, S.; Zehetmeyer, G.; Jardim, A.; Scheibel, J.; de Oliveira, R.; Brandelli, A.; Polypropylene/Montmorillonite Nanocomposites Containing Nisin as Antimicrobial Food Packaging. *Food Bioprocess. Technol.* **2014**, *7*(11), 3349.
87. de Vuyst, L. D.; Vandamme, E. J.; Bacteriocins of lactic-acid bacteria: Microbiology, genetics and applications. *London: Blackie Academic & Profisional* **1994**, 540.
88. Disponível: <http://it.wikipedia.org/wiki/Nisina>. Acesso em Fevereiro de 2016.
89. Jin, T.; Zhang, H.; Biodegradable Polylactic Acid Polymer with Nisin for Use in Antimicrobial Food Packaging. *J.Food Sci.* **2008**, *73*(3), 127.

90. Meira, S. M. M.; Zehetmeyer, G.; Scheibel, J. M.; Werner, J. O.; Brandelli, A.; Starch-halloysite nanocomposites containing nisin: Characterization and inhibition of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *LWT - Food Sci. Tech.* **2016**, *68*, 226.
91. Sobrino-López, A.; Martín-Belloso, O.; Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.* **2008**, *18(4)*, 329.
92. Zhou, H.; Fang, J.; Tian, Y.; Lu, X.; Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Ann Microbiol* **2014**, *64(2)*, 413.
93. Chopra, M.; Kaur, P.; Bernela, M.; Thakur, R.; Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. *Food Control* **2014**, *37*, 158.
94. Snyder, A. B.; Worobo, R. W.; Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94(1)*, 28.
95. Tong, Z.; Ni, L.; Ling, J.; Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides* **2014**, *60*, 32.
96. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R. L.; Omar, N. B.; Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microb.* **2007**, *120(1-2)*, 51.
97. Adhikari, M. D.; Das, G.; Ramesh, A.; Retention of nisin activity at elevated pH in an organic acid complex and gold nanoparticle composite. *Chem. Comm.* **2012**, *48(71)*, 8928.
98. Tang, X. Z.; Alavi, S.; Sandeep, K. P.; Kumar, P. Processing and Industrial Applications of Natural Polymer Nanocomposites. In *Natural Polymers: Volume 2: Nanocomposites*, (Edt); The Royal Society of Chemistry: **2012**; 234.
99. Emin, M. A.; Teumer, T.; Schmitt, W.; Rädle, M.; Schuchmann, H. P.; Measurement of the true melt temperature in a twin-screw extrusion processing of starch based matrices via infrared sensor. *J. Food Eng.* **2016**, *170*, 119.
100. Morales, P.; Berrios, J. J.; Varela, A.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Muzquiz, M.; Pedrosa, M. M.; Novel fiber-rich lentil flours as snack-type functional foods: an extrusion cooking effect on bioactive compounds. *Food Funct.* **2015**, *6*, 3135.
101. Utracki, L. A.; Polymer blends handbook. *Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.* **2002**, *1*, 1.
102. Callister Jr, W. D.; Materials Science and Engineering: An Introduction; *Wiley: New York*, **2007**.
103. Otterbach, J. C. M.; Processo de transformação de plásticos por extrusão de filmes tubulares. *SENAI Nilo Bettanin* **2011**.
104. Callister Jr, W. D.; Ciência e Engenharia de Materiais; *LTC S.A.: Rio de Janeiro*, **2002**.
105. SIQUIM/EQ/UFRJ. Sistema de informações sobre a indústria química da escola de química, *Universidade Federal do Rio de Janeiro* **2003**, 5.
106. ABIPLAST.; Associação Brasileira das Indústrias de Plásticos. Disponível em: www.abiplast.org.br Acesso em Fevereiro de **2016**.
107. Ojijo, V.; Sinha Ray, S.; Processing strategies in bionanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38(10-11)*, 1543.
108. Unalan, I. U.; Cerri, G.; Marcuzzo, E.; Cozzolino, C. A.; Farris, S.; Nanocomposite films and coatings using inorganic nanobuilding blocks (NBB): current applications and future opportunities in the food packaging sector. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 29393.
109. Luzio, A.; Canesi, E. V.; Bertarelli, C.; Caironi, M.; Electrospun polymer fibers for electronic applications. *Materials* **2014**, *7*, 906.
110. Thavasi, V.; Singh, G.; Ramakrishna, S.; Electrospun nanofibers in energy and environmental applications. *Energ. Environ. Sci.* **2008**, *1(2)*, 205.

111. Ghorani, B.; Tucker, N.; Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* **2015**, *51*, 227.
112. Goes, A. M.; Carvalho, S.; Oréface, R. L.; Avérous, L.; Custódio, T. A.; Pimenta, J. G.; Souza, M. d. B.; Branciforti, M. C.; Bretas, R. E. S.; Viabilidade Celular de Nanofibras de Polímeros Biodegradáveis e seus Nanocompósitos com Argila Montmorilonita. *Polímeros* **2012**, *22(1)*, 34.
113. Guerrini, L. M.; Branciforti, M. C.; Bretas, R. E. S.; Eletrofiação do Poli(álcool vinílico) Via Solução Aquosa. *Polímeros* **2006**, *16(4)*, 286.
114. Prasanna, J.; Monisha, T.; Ranjithabala, V.; Gupta, R.; Vijayakumar, E.; Sangeetha, D.; Effect of Process Parameters on Poly (butylene adipate coterephthalate) Nanofibers Development by Electrospinning Technique. *Adv. Mat. Research* **2014**, *894*, 360.
115. Agarwal, S.; Greiner, A.; Wendorff, J. H.; Functional materials by electrospinning of polymers. *Progr. Polym. Sci.* **2013**, *38(6)*, 963.
116. Shin, H. U.; Li, Y.; Paynter, A.; Nartetamrongsutt, K.; Chase, G. G.; Vertical rod method for electrospinning polymer fibers. *Polymer* **2015**, *65*, 26.
117. Zheng, J.; Zhang, H.; Zhao, Z.; Han, C. C.; Construction of hierarchical structures by electrospinning or electrospaying. *Polymer* **2012**, *53(2)*, 546.
118. Wang, C.; Fang, C.-Y.; Wang, C.-Y.; Electrospun poly(butylene terephthalate) fibers: Entanglement density effect on fiber diameter and fiber nucleating ability towards isotactic polypropylene. *Polymer* **2015**, *72*, 21.
119. Huang, Z.-M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S.; A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Comp. Sci. Tech.* **2003**, *63(15)*, 2223.
120. Luo, C. J.; Stoyanov, S. D.; Stride, E.; Pelan, E.; Edirisinghe, M.; Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. *Chem. Soc. Reviews* **2012**, *41(13)*, 4708.
121. Tao, D.; Higaki, Y.; Ma, W.; Wu, H.; Shinohara, T.; Yano, T.; Takahara, A.; Chain orientation in poly(glycolic acid)/halloysite nanotube hybrid electrospun fibers. *Polymer* **2015**, *60*, 284.
122. Torres-Giner, S.; Gimenez, E.; Lagaron, J. M.; Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hyd.* **2008**, *22(4)*, 601.
123. Costa, R. G. F.; Oliveira, J. E.; Paula, G. F.; Picciani, P. H. S.; Medeiros, E. S.; Ribeiro, C.; Mattoso, L. H. C.; Electrospinning of Polymers in Solution. Part I: Theoretical Foundation. *Polímeros* **2012**, *22(2)*, 170.
124. Frenot, A.; Chronakis, I. S.; Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr. Opinion Colloid Interface Sci.* **2003**, *8(1)*, 64.
125. Baqeri, M.; Abolhasani, M. M.; Mozdianfard, M. R.; Guo, Q.; Oroumei, A.; Naebe, M.; Influence of processing conditions on polymorphic behavior, crystallinity, and morphology of electrospun poly(VInylidene fluoride) nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132(30)*, 1.
126. Q. Wei. Functional nanofibers and their applications. *Woodhead Publishing, Oxford*, **2012**, 3.
127. A. Brandelli; T.M. Taylor. Nanostructured and nanoencapsulated natural antimicrobials for use in food products. in: *T.M. Taylor (Ed.), Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality, Elsevier, Oxford*, **2015**.

128. Wang, X.; Yue, T.; Lee, T.-c.; Development of Pleurocidin-poly(vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. *Food Control* **2015**, *54*, 150.
129. Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; An introduction to electrospinning and nanofibers. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Danvers, USA*. **2005**, 22.
130. Frenot, A.; Chronakis, I. S.; Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interf Sci* **2003**, *8(1)*, 64.
131. Rutledge, G. C.; Fridrikh, S. V.; Formation of fibers by electrospinning. *Adv. Drug Deliv. Reviews* **2007**, *59(14)*, 1384.
132. Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D. H.; Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* **1999**, *40(16)*, 4585.
133. Zander, N. E.; Hierarchically structured electrospun fibers. *Polymers* **2013**, *5*, 19.
134. Han, J. H.; Innovations in Food Packaging. *Copyright, Elsevier Ltda. California USA* **2005**, 82.
135. Puligundla, P.; Jung, J.; Ko, S.; Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. *Food Control* **2012**, *25(1)*, 328.
136. Realini, C. E.; Marcos, B.; Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Sci.* **2014**, *98(3)*, 404.
137. Marcos, B.; Aymerich, T.; Garriga, M.; Arnau, J.; Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control* **2013**, *30(1)*, 325.
138. Rooney, M. L.; Introduction to active food packaging technologies. *Copyright Elsevier Ltd.* **2005**, 63.
139. Lagarón, J. M.; Ocio, M. J.; López-Rubio, A.; Antimicrobial Polymers. *Copyright John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey* **2012**, 12.
140. Mauriello, G.; De Luca, E.; La Storia, A.; Villani, F.; Ercolini, D.; Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Lett. Appl. Microb.* **2005**, *41(6)*, 464.
141. Moraes, A. R. F.; Gouveia, L. E. R.; Soares, N. F. F.; Santos, M. M. S.; Gonçalves, M. P. C.; Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 33.
142. Brody, A. L.; Bugusu, B.; Han, J. H.; Sand, C. K.; McHugh, T. H.; Innovative food packaging solutions. *J. Food Sci.* **2008**, *73(8)*, 107.
143. Appendini, P.; Hotchkiss, J. H.; Review of antimicrobial food packaging. *Inn. Food Sci. Emerging Tech.* **2002**, *3(2)*, 113.
144. Van Long, N. N.; Joly, C.; Dantigny, P.; Active packaging with antifungal activities. *Int. J. Food Microb.* **2016**, *2(220)*, 73.
145. Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; van Beest, M.; de Kruijf, N.; Debevere, J.; Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10(3)*, 77.
146. Guiga, W.; Swesi, Y.; Galland, S.; Peyrol, E.; Degraeve, P.; Sebti, I.; Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11(2)*, 352.
147. Quintavalla, S.; Vicini, L.; Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **2002**, *62(3)*, 373.
148. Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *J. Food Sci.* **2003**, *68(2)*, 408.

149. Day, B. P. F.; Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods. *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods. John Wiley & Sons, Ltd* **2008**, *19*, 1.
150. Mills, A.; Lawrie, K.; Bardin, J.; Apedaile, A.; Skinner, G. A.; O'Rourke, C.; An O2 smart plastic film for packaging. *Analyst* **2012**, *137(1)*, 106.
151. Miltz, J.; Perry, M.; Evaluation of the performance of iron-based oxygen scavengers, with comments on their optimal applications. *Pac. Technol. Sci.* **2005**, *18(1)*, 21.
152. Charles, F.; Sanchez, J.; Gontard, N.; Absorption kinetics of oxygen and carbon dioxide scavengers as part of active modified atmosphere packaging. *J. Food Eng.* **2006**, *72(1)*, 1.
153. Lee, D. S.; Shin, D. H.; Lee, D. U.; Kim, J. C.; Cheigh, H. S.; The use of physical carbon dioxide absorbents to control pressure buildup and volume expansion of kimchi packages. *J. Food Eng.* **2001**, *48(2)*, 183.
154. Silvestre, C.; Duraccio, D.; Cimmino, S.; Food packaging based on polymer nanomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36(12)*, 1766.
155. de Moura, M. R.; Mattoso, L. H. C.; Zucolotto, V.; Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *J. Food Eng.* **2012**, *109(3)*, 520.
156. Li, W.; Coffin, D. R.; Jin, T. Z.; Latona, N.; Liu, C.-K.; Liu, B.; Zhang, J.; Liu, L.; Biodegradable composites from polyester and sugar beet pulp with antimicrobial coating for food packaging. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *126(S1)*, 362.
157. Hanušová, K.; Šťastná, M.; Votavová, L.; Klaudivová, K.; Dobiáš, J.; Voldřich, M.; Marek, M.; Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidenechloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *J. Food Eng.* **2010**, *99(4)*, 491.
158. Mills, S.; Stanton, C.; Hill, C.; Ross, R. P.; New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Food Sci. Tech.* **2011**, *2*, 299.
159. Restuccia, D.; Spizzirri, U. G.; Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Iemma, F.; Puoci, F.; Vinci, G.; Picci, N.; New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* **2010**, *21(11)*, 1425.
160. Busolo, M. A.; Lagaron, J. M.; Oxygen Scavenging Polyolefin Nanocomposite Films Containing an Iron Modified Kaolinite of Interest in Active Food Packaging Applications. *Inn. Food Sci. Emerging Tech.* **2012**.
161. Sousa, G. M.; Soares Júnior, M. S.; Yamashita, F.; Active biodegradable films produced with blends of rice flour and poly(butylene adipate co-terephthalate): Effect of potassium sorbate on film characteristics. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33(6)*, 3153.
162. Bhatia, S.; Bharti, A.; Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *J. Food Sci. Tech.* **2014**, 1.
163. Liu, L.; Jin, T. Z.; Coffin, D. R.; Hicks, K. B.; Preparation of Antimicrobial Membranes: Coextrusion of Poly(lactic acid) and Nisaplin in the Presence of Plasticizers. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57(18)*, 8392.
164. Abdelwahab, M. A.; Taylor, S.; Misra, M.; Mohanty, A. K.; Thermo-mechanical characterization of bioblends from polylactide and poly(butylene adipate-co-terephthalate) and lignin. *Macrom. Mat. Eng.* **2015**, *300(3)*, 299.
165. Zehetmeyer, G.; Soares, R.; Brandelli, A.; Mauler, R.; Oliveira, R.; Evaluation of polypropylene/montmorillonite nanocomposites as food packaging material. *Polym. Bull.* **2012**, *68(8)*, 2199.

166. Handbook of analytical methods for materials. Materials Evaluation and Engineering: *Plymouth* **2001**.
167. Al-Itry, R.; Lamnawar, K.; Maazouz, A.; Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97(10)*, 1898.
168. Chivrac, F.; Kadlecová, Z.; Pollet, E.; Avérous, L.; Aromatic Copolyester-based Nano-biocomposites: Elaboration, Structural Characterization and Properties. *J. Polym. Environ.* **2006**, *14(4)*, 393.
169. Arruda, L. C.; Magaton, M.; Bretas, R. E. S.; Ueki, M. M.; Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/PBAT blends. *Polym. Test.* **2015**, *43*, 27.
170. Holler, M. G.; Campo, L. F.; Brandelli, A.; Stefani, V.; Synthesis and spectroscopic characterisation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2002**, *149(1-3)*, 217.
171. Menard, K. P.; Dynamic Mechanical Analysis; *CRC Press: New York*, **1999**.
172. Zehetmeyer, G.; Nanocompósitos de Polipropileno/Montmorilonita: Avaliação das propriedades e sua aplicação em embalagens de alimentos. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS*. **2012**.
173. Motta, A. S.; Brandelli, A.; Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92(1)*, 63.
174. ANVISA. RDC nº 51, Regulamento técnico Mercosul sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com o alimento. *Diário Oficial da União*, **2010**, *75*, 244.
175. ASTM; Terminology Relating to biological deterioration. *American Society for Testing and Materials. Annual Book of ASTM Standards*. **2009**, ASTM G160-03.
176. Tabasi, R. Y.; Ajji, A.; Selective degradation of biodegradable blends in simulated laboratory composting. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *120*, 435.
177. Kasuya, K.-i.; Ishii, N.; Inoue, Y.; Yazawa, K.; Tagaya, T.; Yotsumoto, T.; Kazahaya, J.-i.; Nagai, D.; Characterization of a mesophilic aliphatic–aromatic copolyester-degrading fungus. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94(8)*, 1190.
178. Trinh Tan, F.; Cooper, D. G.; Marić, M.; Nicell, J. A.; Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. *Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93(8)*, 1479.
179. Amaral, J. S.; Sepúlveda, M.; Cateto, C. A.; Fernandes, I. P.; Rodrigues, A. E.; Belgacem, M. N.; Barreiro, M. F.; Fungal degradation of lignin-based rigid polyurethane foams. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97(10)*, 2069.
180. Sunilkumar, M.; Francis, T.; Thachil, E. T.; Sujith, A.; Low density polyethylene–chitosan composites: A study based on biodegradation. *Chem. Eng. J.* **2012**, *204–206*, 114.
181. ASTM; Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates. *American society for Testing and Materials. Copyright © ASTM International* **2015**, D-2244.
182. ASTM; Standard Practice for Calculating Yellowness and Whiteness Indices from Instrumentally Measured Color Coordinates. *American Society for Testing and Materials. Copyright © ASTM International* **2015**, E-313.
183. Signori, F.; Coltelli, M.-B.; Bronco, S.; Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94(1)*, 74.

184. Kopinke, F. D.; Mackenzie, K.; Mechanistic aspects of the thermal degradation of poly(lactic acid) and poly(β -hydroxybutyric acid). *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1997**, *40–41(0)*, 43.
185. Brandelero, R. P. H.; Grossmann, M. V.; Yamashita, F.; Films of starch and poly(butylene adipate co-terephthalate) added of soybean oil (SO) and Tween 80. *Carb. Polymers* **2012**, *90(4)*, 1452.
186. Canevarolo Jr, S. V.; Técnicas de caracterização de polímeros; *Artliber: São Paulo*, **2007**.
187. Meira, S. M. M.; Jardim, A. I.; Brandelli, A.; Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays. *Food Chem.* **2015**, *188*, 161.
188. Bernela, M.; Kaur, P.; Chopra, M.; Thakur, R.; Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *59(2)*, 1093.
189. Kong, J.; Yu, S.; Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Bioch. Bioph. Sin.* **2007**, *39*, 549.
190. Scaffaro, R.; Botta, L.; Gallo, G.; Photo-oxidative degradation of poly(ethylene-co-vinyl acetate)/nisin antimicrobial films. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97(4)*, 653.
191. Ibrahim, N.; Rahim, N.; Wan Yunus, W.; Sharif, J.; A study of poly vinyl chloride / poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. *J. Polym. Res.* **2011**, *18(5)*, 891.
192. Chen, J.-H.; Yang, M.-C.; Preparation and characterization of nanocomposite of maleated poly(butylene adipate-co-terephthalate) with organoclay. *Mat. Sci. Eng.: C* **2015**, *46(0)*, 301.
193. Schelegueda, L. I.; Zalazar, A. L.; Gliemmo, M. F.; Campos, C. A.; Inhibitory effect and cell damage on bacterial flora of fish caused by chitosan, nisin and sodium lactate. *Int. J. Biolog. Macrom.* **2016**, *83*, 396.
194. Ramos, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; Garrigós, M. C.; Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng.* **2012**, *109(3)*, 513.
195. Meira, S.; Zehetmeyer, G.; Jardim, A.; Scheibel, J.; de Oliveira, R.; Brandelli, A.; Polypropylene/Montmorillonite Nanocomposites Containing Nisin as Antimicrobial Food Packaging. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7(11)*, 3349.
196. Livi, S.; Bugatti, V.; Soares, B. G.; Duchet-Rumeau, J.; Structuration of ionic liquids in a poly(butylene-adipate-co-terephthalate) matrix: its influence on the water vapour permeability and mechanical properties. *Green Chem.* **2014**, *16(8)*, 3758.
197. Knappe, S.; Sauseng, B.; *Plástico Industrial* **2010**, *140*, 96.
198. Dong, W.; Zou, B.; Yan, Y.; Ma, P.; Chen, M.; Effect of Chain-Extenders on the Properties and Hydrolytic Degradation Behavior of the Poly(lactide)/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14(10)*, 20189.
199. Herrera, R.; Franco, L.; Rodríguez-Galán, A.; Puiggali, J.; Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)s. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40(23)*, 4141.
200. Ataefard, M.; Moradian, S.; Surface properties of polypropylene/organoclay nanocomposites. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257(6)*, 2320.
201. Hosseini, S. M.; Hosseini, H.; Mohammadifar, M. A.; German, J. B.; Mortazavian, A. M.; Mohammadi, A.; khosravi-Darani, K.; Shojaee-Aliabadi, S.; Khaksar, R.; Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103(0)*, 573.

202. Wanke, C. H.; Tratamento superficial do polipropileno visando controle da molhabilidade. *Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais. Instituto de Química* **2012**.
203. Li, X.-M.; Reinhoudt, D.; Crego-Calama, M.; What do we need for a superhydrophobic surface? A review on the recent progress in the preparation of superhydrophobic surfaces. *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*(8), 1350.
204. Nuraje, N.; Khan, W. S.; Lei, Y.; Ceylan, M.; Asmatulu, R.; Superhydrophobic electrospun nanofibers. *J. Mat. Chem. A* **2013**, *1*(6), 1929.
205. Vendemiatti, C.; Hosokawa, R. S.; Rangel, R. C. C.; Bortoleto, J. R. R.; Cruz, N. C.; Rangel, E. C.; Wettability and surface microstructure of polyamide 6 coated with SiO₂ films. *Surf. Coat. Technol.* **2015**, *275*, 32.
206. Bélard, L.; Poncin-Epaillard, F.; Dole, P.; Avérous, L.; Plasma-polymer coatings onto different biodegradable polyesters surfaces. *Europ. Polym. J.* **2013**, *49*(4), 882.
207. Li, G.; Wei, X.; Wang, W.; He, T.; Li, X.; Modification of unsaturated polyester resins (UP) and reinforced UP resins via plasma treatment. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *257*(1), 290.
208. Cassu, S. N.; Felisberti, M. I.; Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. *Quím. Nova* **2005**, *28*(2), 255.
210. Touati, N.; Kaci, M.; Bruzard, S.; Grohens, Y.; The effects of reprocessing cycles on the structure and properties of isotactic polypropylene/cloisite 15A nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*(6), 1064.
211. Bittmann, B.; Bouza, R.; Barral, L.; González-Rodríguez, M. V.; Abad, M.-J.; Nanoclay-reinforced poly(butylene adipate-co-terephthalate) biocomposites for packaging applications. *Polym. Comp.* **2012**, *33*(11), 2022.
212. Liu, B.; Bhaladhare, S.; Zhan, P.; Jiang, L.; Zhang, J.; Liu, L.; Hotchkiss, A. T.; Morphology and Properties of Thermoplastic Sugar Beet Pulp and Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*(24), 13859.
213. Persico, P.; Ambrogi, V.; Carfagna, C.; Cerruti, P.; Ferrocino, I.; Mauriello, G.; Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polym. Eng. Sci.* **2009**, *49*(7), 1447.
214. Scaffaro, R.; Botta, L.; Marineo, S.; Puglia, A. M.; Incorporation of Nisin in Poly (Ethylene-Co-Vinyl Acetate) Films by Melt Processing: A Study on the Antimicrobial Properties. *J. Food Protect.* **2011**, *74*(7), 1137.
215. Garcia, P. S.; Grossmann, M. V. E.; Shirai, M. A.; Lazaretti, M. M.; Yamashita, F.; Muller, C. M. O.; Mali, S.; Improving action of citric acid as compatibiliser in starch/polyester blown films. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 305.
216. Pereira, D.; Losada, P. P.; Angulo, I.; Greaves, W.; Cruz, J. M.; Development of a polyamide nanocomposite for food industry: Morphological structure, processing, and properties. *Polym. Comp.* **2009**, *30*(4), 436.
217. Kester, J. J.; Fennema, O.; *Food Technol.* **1986**, *40*, 47.
218. Duncan, T. V.; Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *J. Colloid Interf. Sci.* **2011**, *363*(1), 1.
219. Mali, S.; Grossmann, M. V. E.; Yamashita, F.; Starch films: production, properties and potential of utilization. *Semina* **2010**, *31*, 137.
220. Vassiliou, A.; Bikiaris, D.; Chrissafis, K.; Paraskevopoulos, K. M.; Stavrev, S. Y.; Docoslis, A.; Nanocomposites of isotactic polypropylene with carbon nanoparticles exhibiting enhanced stiffness, thermal stability and gas barrier properties. *Compos. Sci. Technol.* **2008**, *68*(3-4), 933.

221. Olivato, J. B.; Grossmann, M. V. E.; Bilck, A. P.; Yamashita, F.; Effect of organic acids as additives on the performance of thermoplastic starch/polyester blown films. *Carbohyd. Polym.* **2012**, *90(1)*, 159.
222. Jung, D.-S.; Bodyfelt, F. W.; Daeschel, M. A.; Influence of Fat and Emulsifiers on the Efficacy of Nisin in Inhibiting *Listeria monocytogenes* in Fluid Milk¹. *J. Dairy Sci.* **1992**, *75(2)*, 387.
223. Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S.; Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotech. Adv.* **2008**, *26(3)*, 246.
224. Costa, C. Z.; Albuquerque, M. C. C.; Brum, M. C.; Castro, A. M.; Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. *Quím. Nova* **2015**, *38(2)*, 259.
225. Späth, R.; Flemming, H. C.; Wuertz, S.; Sorption properties of biofilms. *Water Sci. Technol.* **1998**, *37(4-5)*, 207.
226. Tokiwa, Y.; Calabia, B. P.; Ugwu, C. U.; Aiba, S.; Biodegradability of Plastics. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3722.
227. Gu, J.-D.; Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **2003**, *52(2)*, 69.
228. Umare, S. S.; Chandure, A. S.; Pandey, R. A.; Synthesis, characterization and biodegradable studies of 1,3-propanediol based polyesters. *Polym. Degrad. Stab.* **2007**, *92(3)*, 464.
229. Zhou, Q.; Xanthos, M.; Nanoclay and crystallinity effects on the hydrolytic degradation of polylactides. *Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93(8)*, 1450.
230. Araque-Monrós, M. C.; Vidaurre, A.; Gil-Santos, L.; Gironés Bernabé, S.; Monleón-Pradas, M.; Más-Estellés, J.; Study of the degradation of a new PLA braided biomaterial in buffer phosphate saline, basic and acid media, intended for the regeneration of tendons and ligaments. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, *98(9)*, 1563.
231. Lai, S.; Gao, Y.; Yue, L.; Heterogeneous catalytic synthesis of poly(butylene succinate) by attapulgite-supported Sn catalyst. *J. App. Polym. Sci.* **2015**, *132(13)*, 1.
232. Márquez, Y.; Franco, L.; Turon, P.; Rodríguez-Galán, A.; Puiggalí, J.; Study on the hydrolytic degradation of the segmented GL-b-[GL-co-TMC-co-CL]-b-GL copolymer with application as monofilament surgical suture. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, *98(12)*, 2709.
233. Busatto, C.; Berkenwald, E.; Mariano, N.; Casis, N.; Luna, J.; Estenoz, D.; Homogeneous hydrolytic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Mathematical modeling. *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *125*, 12.
234. Lugauskas, A.; Levinskaitė, L.; Pečiulytė, D.; Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *Int. Biodet. Biodeg.* **2003**, *52(4)*, 233.
235. Corti, A.; Muniyasamy, S.; Vitali, M.; Imam, S. H.; Chiellini, E.; Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95(6)*, 1106.
236. Ollé Resa, C. P.; Jagus, R. J.; Gerschenson, L. N.; Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Mat. Sci. Eng.: C* **2014**, *40*, 281.
237. Sivarooban, T.; Hettiarachchy, N. S.; Johnson, M. G.; Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res. Int.* **2008**, *41(8)*, 781.
238. Pattanayaiying, R.; H-Kittikun, A.; Cutter, C. N.; Optimization of formulations for pullulan films containing lauric arginate and nisin Z. *LWT - Food Sci. Tech.* **2015**, *63(2)*, 1110.

239. Duran, M.; Aday, M. S.; Zorba, N. N. D.; Temizkan, R.; Büyükcan, M. B.; Caner, C.; Potential of antimicrobial active packaging ‘containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating’ to extend shelf life of fresh strawberry. *Food Biop. Proc.*
240. Subbiah, T.; Bhat, G. S.; Tock, R. W.; Parameswaran, S.; Ramkumar, S. S.; Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96*(2), 557.
241. Beachley, V.; Wen, X.; Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Mat. Sci. Eng.: C* **2009**, *29*(3), 663.
242. Jin, W.-J.; Jeon, H. J.; Kim, J. H.; Youk, J. H.; A study on the preparation of poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Synth. Met.* **2007**, *157*(10-12), 454.
243. Sencadas, V.; Correia, D. M.; Areias, A.; Botelho, G.; Fonseca, A. M.; Neves, I. C.; Gomez Ribelles, J. L.; Lanceros Mendez, S.; Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*(2), 1295.
244. Thompson, C. J.; Chase, G. G.; Yarin, A. L.; Reneker, D. H.; Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* **2007**, *48*(23), 6913.
245. Ye, P.; Xu, Z.-K.; Wu, J.; Innocent, C.; Seta, P.; Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. *Biomaterials* **2006**, *27*(22), 4169.
246. Nguyen, T.-H.; Lee, K.-H.; Lee, B.-T.; Fabrication of Ag nanoparticles dispersed in PVA nanowire mats by microwave irradiation and electro-spinning. *Mat. Sci. Eng.: C* **2010**, *30*(7), 944.
247. Ko, S. W.; Hong, M. K.; Park, B. J.; Gupta, R. K.; Choi, H. J.; Bhattacharya, S. N.; Morphological and rheological characterization of multi-walled carbon nanotube/PLA/PBAT blend nanocomposites. *Polym. Bull.* **2009**, *63*(1), 125.
248. Muthuraj, R.; Misra, M.; Mohanty, A.; Biodegradable Poly(butylene succinate) and Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends: Reactive Extrusion and Performance Evaluation. *J Polym Environ* **2014**, *22*(3), 336.
249. Marques, M. V.; Lunz, J.; Aguiar, V.; Grafova, I.; Kemell, M.; Visentin, F.; Sartori, A.; Grafov, A.; Thermal and Mechanical Properties of Sustainable Composites Reinforced with Natural Fibers. *J. Polym. Environ.* **2015**, *23*(2), 251.
250. Zhao, P.; Liu, W.; Wu, Q.; Ren, J.; Preparation, Mechanical, and Thermal Properties of Biodegradable Polyesters/Poly(Lactic Acid) Blends. *J Nanomaterials* **2010**, *2010*(4), 1.
251. Rojas, O. J.; Montero, G. A.; Habibi, Y.; Electrospun nanocomposites from polystyrene loaded with cellulose nanowhiskers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *113*(2), 927.
252. Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N. C.; The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* **2001**, *42*(1), 261.
253. Tan, L.; Gan, L.; Hu, J.; Zhu, Y.; Han, J.; Functional shape memory composite nanofibers with graphene oxide filler. *Comp. Part A: Appl. Sci. Manuf.* **2015**, *76*, 115.
254. Ke, P.; Jiao, X.-N.; Ge, X.-H.; Xiao, W.-M.; Yu, B.; From macro to micro: structural biomimetic materials by electrospinning. *RSC Advances* **2014**, *4*(75), 39704.
255. Jing, X.; Mi, H.-Y.; Cordie, T. M.; Salick, M. R.; Peng, X.-F.; Turng, L.-S.; Fabrication of shish-kebab structured poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers that mimic collagen fibrils: Effect of solvents and matrigel functionalization. *Polymer* **2014**, *55*(21), 5396.

256. Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; Campo, L. F.; Stefani, V.; Excited state intramolecular proton transfer in amino 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole derivatives: Effects of the solvent and the amino group position. *J. Lumin.* **2007**, *126*(2), 728.
257. Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; Medina, L. F. C.; Brandelli, A.; Stefani, V.; Synthesis and spectroscopic characterization of new ESIPT fluorescent protein probes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 254.
258. Zhu, Z.; Zhang, L.; Smith, S.; Fong, H.; Sun, Y.; Gosztola, D.; Fluorescence studies of electrospun MEH-PPV/PEO nanofibers. *Synt. Metals* **2009**, *159*(14), 1454.
259. Su, C.; Li, Y.; Dai, Y.; Gao, F.; Tang, K.; Cao, H.; Fabrication of three-dimensional superhydrophobic membranes with high porosity via simultaneous electrospinning and electrospinning. *Mat. Letters* **2016**, *170*, 67.
260. Chen, F.; Zhang, J.; In-situ poly(butylene adipate-co-terephthalate)/soy protein concentrate composites: Effects of compatibilization and composition on properties. *Polymer* **2010**, *51*(8), 1812.
261. Florian Stempfle; Benjamin S. Ritter; Rolf Mülhaupt; Mecking, S.; Long-chain aliphatic polyesters from plant oils for injection molding, film extrusion and electrospinning. *Green Chemistry* **2014**, *16*, 2008.
262. Katančić, Z.; Travaš-Sejdić, J.; Hrnjak-Murgić, Z.; Study of flammability and thermal properties of high-impact polystyrene nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*(12), 2104.
263. Zhu, L.; Xanthos, M.; Effects of process conditions and mixing protocols on structure of extruded polypropylene nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*(4), 1891.
264. Hanušová, K.; Šťastná, M.; Votavová, L.; Klaudivová, K.; Dobiáš, J.; Voldřich, M.; Marek, M.; Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *J. Food Eng.* **2010**, *99*(4), 491.

8 ANEXOS

Anexo 1:

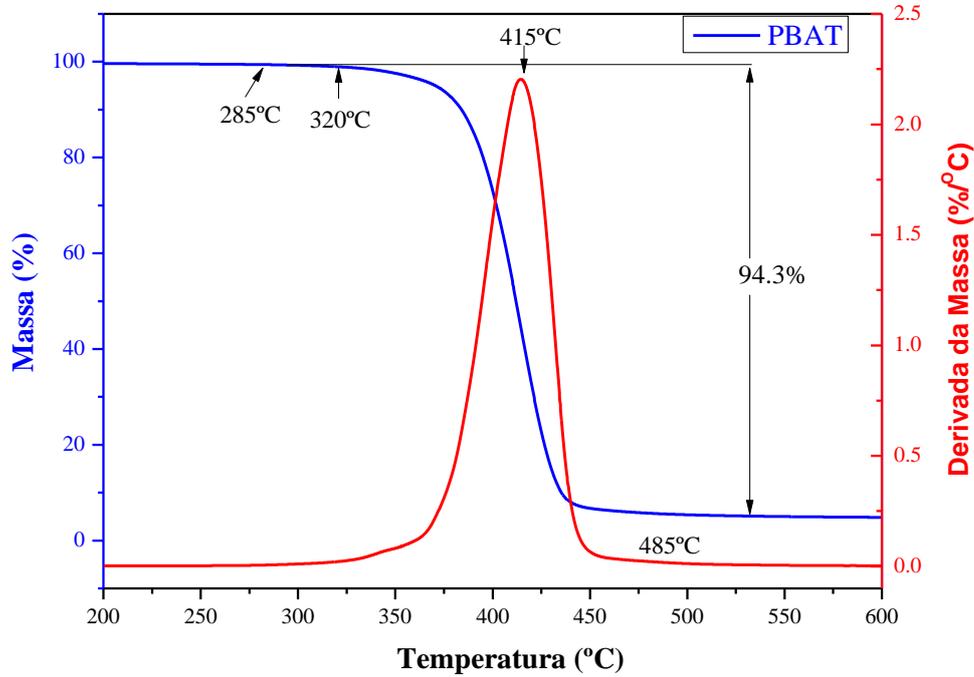


Figura 80. Termograma de TGA do PBAT puro.

Anexo 2:

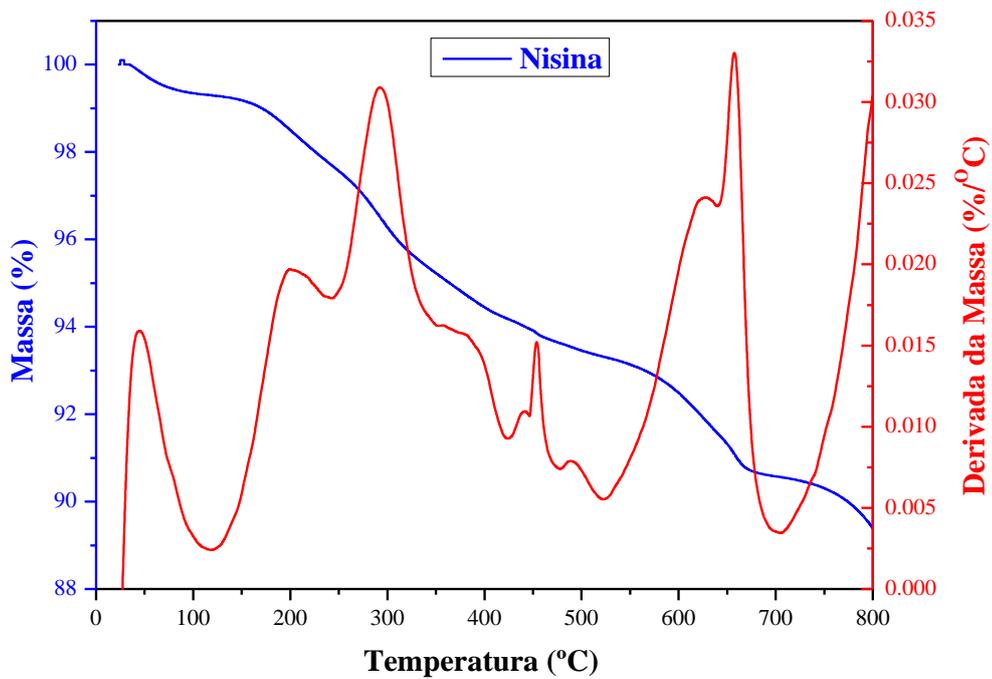


Figura 81. Termograma de TGA da nisina.

Anexo 3:

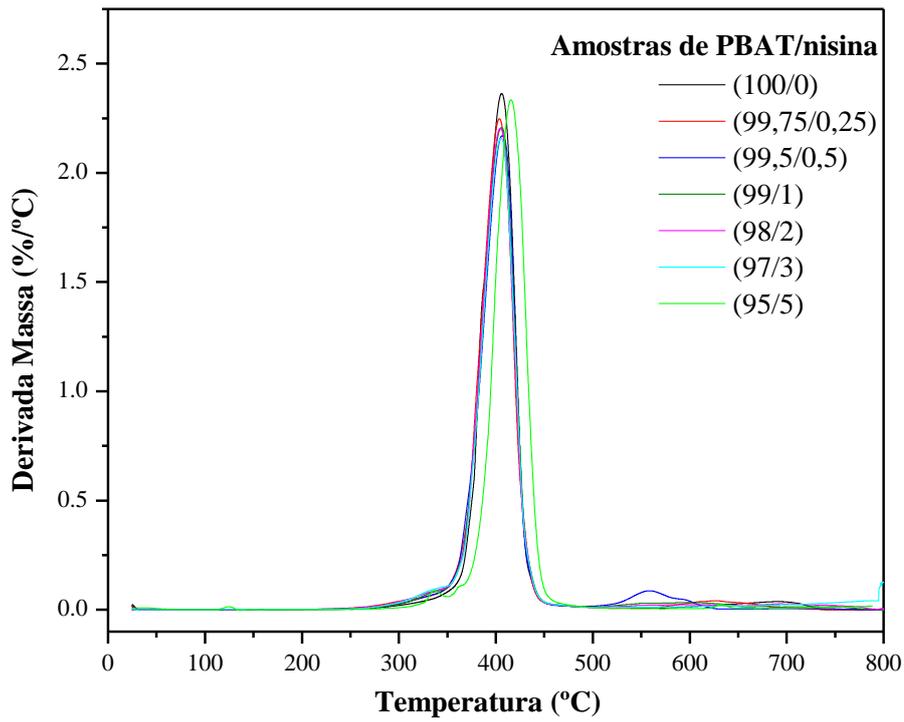


Figura 82. Termogramas de DTG para os filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina.

Anexo 4:

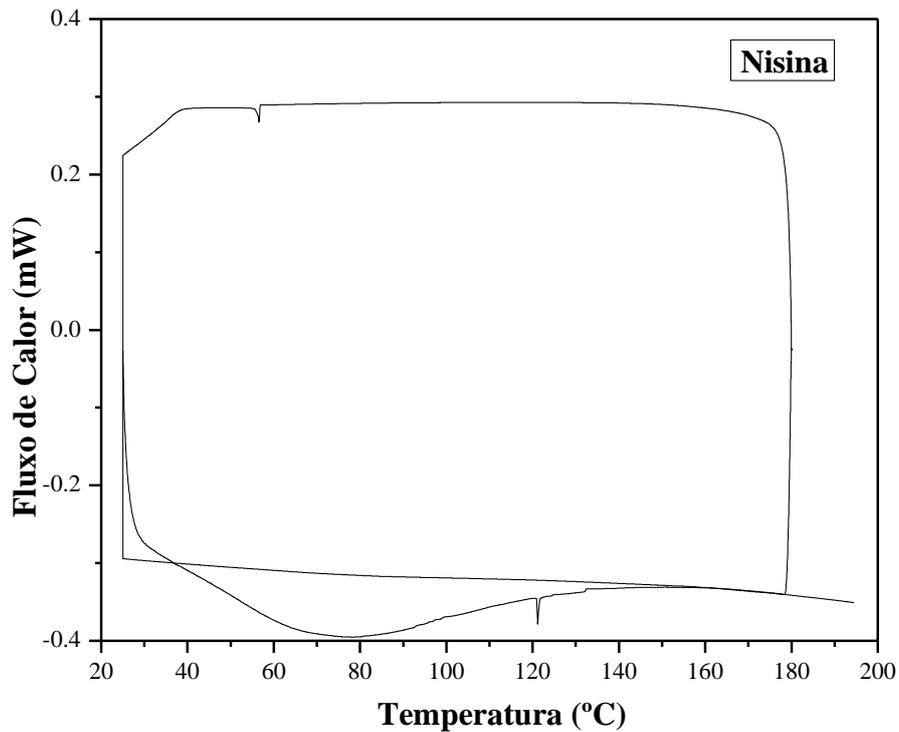


Figura 83. Curva de DSC para a nisina.

Anexo 5:

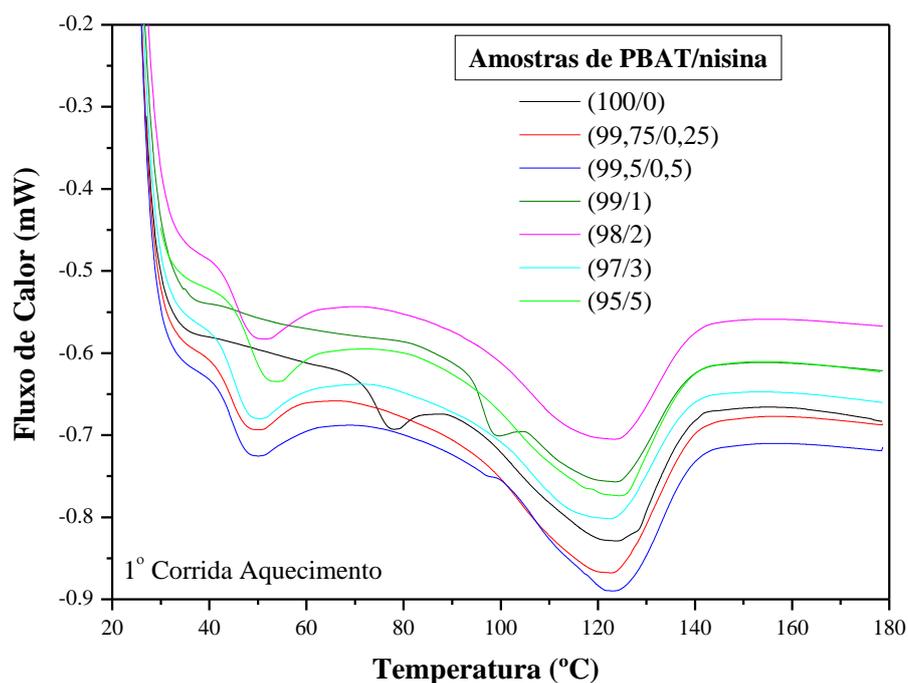


Figura 84. Curvas de DSC do 1° ciclo de aquecimento para os filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina.

Anexo 6:

Tabela 23. Resultados de DSC do 1° ciclo de aquecimento para os filmes extrudados de PBAT puro e PBAT/nisina.

AMOSTRA	T_m (°C) pico 1	T_m (°C) pico 2	X_c (%)
(100/0)	77,30	124,6	9,02
(99,75/0,25)	48,48	123,3	8,77
(99,5/0,50)	48,34	124,1	8,84
(99/1)	98,36	123,0	6,51
(98/2)	49,82	124,0	6,95
(97/3)	48,71	123,0	5,48
(95/5)	52,20	125,0	5,78

Anexo 7:

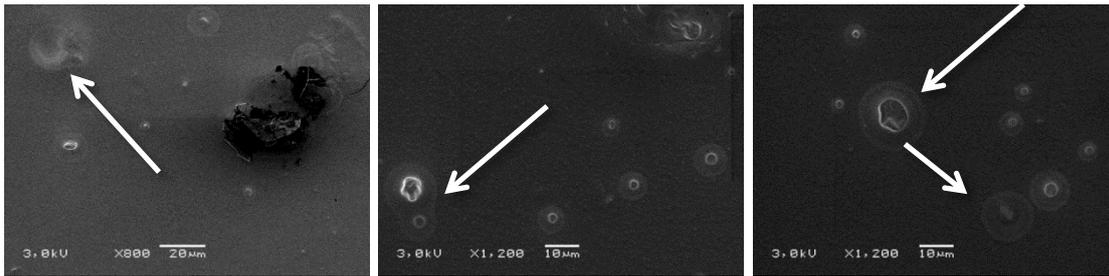


Figura 85. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os filmes de PBAT/nisina após 30 dias de degradação, apresentando regiões esbranquiçadas, indicando a degradação dos filmes.

Anexo 8:

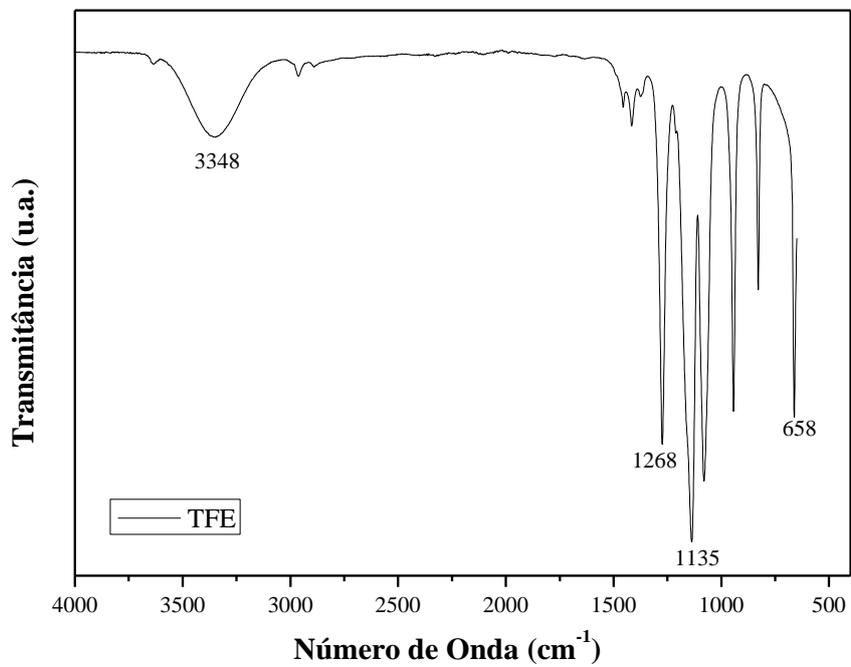


Figura 86. Espectros de FTIR para o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE).

Anexo 9:

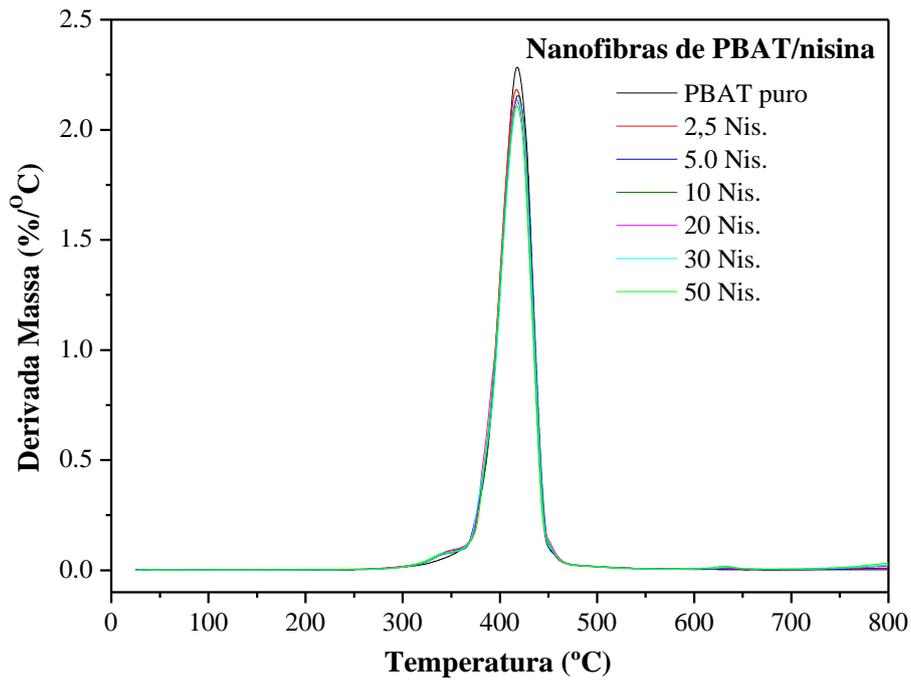


Figura 87. Termogramas de DTG para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Anexo 10:

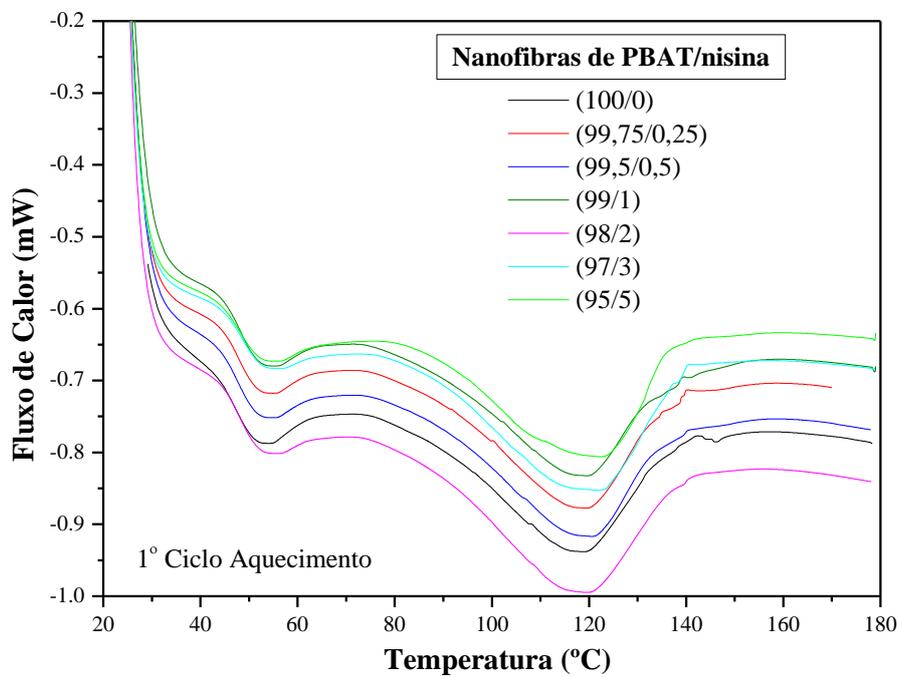


Figura 88. Curvas de DSC do 1° ciclo de aquecimento para as nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

Anexo 11:**Tabela 24.** Resultados de DSC do 1º ciclo de aquecimento das nanofibras de PBAT puro e PBAT/nisina.

AMOSTRA	T_m (°C) pico 1	T_m (°C) pico 2	X_c (%)
PBAT	51,8	119,5	6,73
2,5 Nis	52,5	119,6	6,15
5,0 Nis	52,5	120,9	5,74
10 Nis	52,7	119,6	4,78
20 Nis	52,7	119,5	4,27
30 Nis	53,2	122,7	6,55
50 Nis	53,0	123,3	6,50

Anexo 12:**Tabela 25.** Espessura dos filmes extrudados, eletrofiados e bicamada de PBAT puro e PBAT/nisina.

Amostra	Espessura dos filmes extrudados (mm)	Espessura dos filmes eletrofiados (mm)	Espessura dos filmes bicamada (mm)
(100/0)	0,10 ± 0,7	0,09 ± 0,3	0,19 ± 0,6
(99,75/0,25)	0,08 ± 0	0,07 ± 0,1	0,17 ± 0,1
(99,5/0,5)	0,06 ± 0,2	0,07 ± 0	0,14 ± 0,3
(99/1)	0,08 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,18 ± 0,8
(98/2)	0,07 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,17 ± 0,1
(97/3)	0,06 ± 0	0,11 ± 0	0,20 ± 0,1
(95/5)	0,07 ± 0,2	0,10 ± 0,2	0,21 ± 0,1