

ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS

FLÁVIA ZUMIANI SANCHES

FILMES DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) – PLA, INCORPORADOS COM QUITOSANA E
NANOPARTÍCULAS DE ZnO, PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
ALIMENTÍCIAS: PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS E FUNCIONAIS

BAURU
2024

FLÁVIA ZUMIANI SANCHES

FILMES DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) – PLA, INCORPORADOS COM QUITOSANA E
NANOPARTÍCULAS DE ZnO, PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
ALIMENTÍCIAS: PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS E FUNCIONAIS

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Faculdade de Ciências, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Materiais.

Área de concentração: Química dos Materiais

Orientador: Dr. Aroldo Geraldo Magdalena

Coorientador: Dr. Kleper de Oliveira Rocha

BAURU

2024

S211f

Sanches, Flávia Zumiani

Filmes de poli (ácido láctico) - PLA, incorporados com quitosana e nanopartículas de ZnO, para aplicação em embalagens alimentícias: Propriedades microbiológicas e funcionais / Flávia Zumiani Sanches. -- Bauru, 2024

103 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Aroldo Geraldo Magdalena

Coorientador: Kleper de Oliveira Rocha

1. Nanopartículas de Óxido de Zinco. 2. Filmes de Poli (Ácido Láctico). 3. Quitosana. 4. Embalagem de Alimentos. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FLÁVIA ZUMIANI SANCHES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 06 dias do mês de novembro do ano de 2024, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FLÁVIA ZUMIANI SANCHES, intitulada **FILMES DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) - PLA, INCORPORADOS COM QUITOSANA E NANOPARTÍCULAS DE ZnO, PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS: PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS E FUNCIONAIS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. AROLDO GERALDO MAGDALENA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Profa. Dra. ANGELA MITIE OTTA KINOSHITA (Participação Virtual) do(a) Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / Universidade do Oeste Paulista, Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovado . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. AROLDO GERALDO MAGDALENA



Documento assinado digitalmente

AROLD GERALDO MAGDALENA

Data: 07/11/2024 09:32:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

A conclusão desse processo só foi possível pela ajuda de diversas pessoas que colaboraram significativamente, tanto com as análises e desenvolvimento da pesquisa, quanto com palavras de estímulo e confiança, dentre as quais destaco:

O meu orientador, Prof. Dr. Aroldo Geraldo Magdalena, por sua atuação presente e comprometimento ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Sua orientação foi essencial para todas as etapas do desenvolvimento desta pesquisa, agindo sempre com paciência, serenidade e uma postura solícita às diversas demandas que surgiram. Todo aprendizado que adquiri nesses anos derivam de seus direcionamentos e incentivo, os quais me possibilitaram crescer como pesquisadora.

O Prof. Dr. Kleper de Oliveira Rocha, meu coorientador, que me colaborou com a metodologia desenvolvida na síntese das nanopartículas, orientando as melhores rotas e correções necessárias para obtenção de bons resultados.

O Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, por sua disponibilidade de realizar as análises e testes microbiológicos, e por sua prestatividade em me ensinar e explicar pacientemente todos os detalhes do procedimento, para fosse possível chegar aos resultados e conclusões finais que deram sentido a este trabalho.

A minha mãe, Márcia Cecília Zumiani, a qual externo gratidão por todo apoio e pela liberdade que ofereceu a todas as minhas escolhas ao longo da vida, estando sempre a meu lado e oferecendo condições para que fosse possível cumprir com meus objetivos. Além de uma mãe presente, é um grande exemplo de força, disposição e dedicação, fatores que contribuíram na minha educação e formação como pessoa.

Por fim, agradeço à Unesp e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais (POSMAT) pela oportunidade em desenvolver esta pesquisa de forma totalmente gratuita e por oferecer um ambiente acadêmico de excelência, com professores comprometidos e dedicados, envolvidos com a promoção da ciência e do conhecimento. Também sou grata aos servidores da seção, por toda atenção despendida nas instruções para atendimento das exigências do programa, essenciais à conclusão dessa importante etapa.

RESUMO

Os biopolímeros têm se tornado cada vez mais relevantes na indústria de embalagens alimentícias devido às suas características funcionais e ao menor impacto ambiental em relação aos polímeros convencionais. Derivados de fontes renováveis, eles são biodegradáveis, o que contribui para a redução de resíduos plásticos. Além de apresentar atividades antimicrobianas e antioxidantes, esses materiais atuam como barreira contra umidade, oxigênio e agentes externos, auxiliando na preservação dos alimentos. As embalagens funcionais são desenvolvidas pela combinação de materiais a determinadas substâncias, com o intuito de aprimorar suas propriedades, destacando-se entre elas as nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos. O óxido de zinco (ZnO) possui atributos significativos para o uso em embalagens, pois apresenta aparência física uniforme, alta estabilidade química, ação antimicrobiana e poder de absorção das radiações UV e IV, além de ser atóxico. Quando associado a filmes plásticos, o ZnO contribui para a redução da entrada de oxigênio e umidade, retardando a deterioração dos alimentos. A síntese de ZnO NPs foi executada pelo método Pechini, o qual exhibe resultados com boa homogeneidade, permite o controle estequiométrico, opera a baixas temperaturas de calcinação, é de simples execução e possui custo reduzido. A quitosana, conhecida por sua atividade antimicrobiana, é extraída de subprodutos da pesca, tornando-se uma opção econômica e viável em aplicações biológicas. O ácido polilático (PLA), um biopolímero de origem biodegradável e biocompatível, proveniente de fontes vegetais, foi empregado como matriz polimérica no desenvolvimento dos filmes, combinado às ZnO NPs à quitosana. A caracterização foi realizada por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopias de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), UV-Vis e Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Potencial Zeta (PZ). Os resultados confirmaram a obtenção de ZnO NPs com alta cristalinidade. Os testes de atividade antimicrobiana, feitos pelo método de difusão em disco de ágar, para quatro diferentes cepas, demonstraram a eficácia dos filmes de PLA incorporados com ZnO., pela inibição às bactérias Gram-positivas, evidenciando seu potencial biocida.

Palavras-chave: Óxido de zinco, nanopartículas, quitosana, filmes de PLA, embalagens de alimentos, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Biopolymers have become increasingly important in the food packaging industry due to their functional characteristics and lower environmental impact compared to conventional polymers. Derived from renewable sources, they are biodegradable, which contributes to the reduction of plastic waste. In addition to presenting antimicrobial and antioxidant activities, these materials act as a barrier against moisture, oxygen and external agents, helping to preserve food. Functional packaging is developed by combining materials with certain substances, with the aim of improving their properties, among which are nanoparticles (NPs) of metal oxides. Zinc oxide (ZnO) has significant attributes for use in packaging, as it has a uniform physical appearance, high chemical stability, antimicrobial action and power to absorb UV and IR radiation, in addition to being non-toxic. When associated with plastic films, ZnO helps to reduce the entry of oxygen and moisture, delaying food spoilage. The synthesis of ZnO NPs was performed by the Pechini method, which shows results with good homogeneity, allows stoichiometric control, operates at low calcination temperatures, is simple to perform and has a reduced cost. Chitosan, known for its antimicrobial activity, is extracted from fishing by-products, making it an economical and viable option for biological applications. Polylactic acid (PLA), a biodegradable and biocompatible biopolymer from plant sources, was used as a polymeric matrix in the development of the films, combined with ZnO NPs and chitosan. The characterization was performed by X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared (FTIR), UV-Vis and Raman Spectroscopies, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Zeta Potential (ZP). The results confirmed the production of ZnO NPs with high crystallinity. Antimicrobial activity tests, performed using the agar disc diffusion method for four different strains, demonstrated the effectiveness of PLA films incorporated with ZnO, by inhibiting Gram-positive bacteria, demonstrating their potential potential.

Keywords: Zinc oxide, nanoparticles, chitosan, PLA films, food packaging, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas do ZnO: (a) wurtzita (b) sal de rocha e (c) blenda de zinco. ...	18
Figura 2 – Morfologias de NPs ZnO: ponto quântico, nanotubos, nanofios, nanocintos, nanoanel, nanopentes, tetrápode, nanoflores, esferas ocas, filme tipo esponja, nanoesferas e nanoplacas (esquerda para a direita e de cima para baixo). ...	20
Figura 3 – Mecanismo de ação antimicrobiano das ERO a partir de ZnO NPs.	25
Figura 4 - Hipóteses de mecanismos antibacterianos para ZnO NPs.	26
Figura 5 – Esquema da reação de desacetilação da quitina e obtenção de quitosana.	27
Figura 6 – Rotas de síntese de polimerização do PLA.	31
Figura 7 - Ciclo do PLA na natureza.	32
Figura 8 - Formas enantioméricas do ácido láctico.	33
Figura 9 - Esquema de Reação de Polimerização – Método Pechini.	37
Figura 10 - Etapas do método Pechini para formação da resina polimérica.	38
Figura 11 – Fluxograma da Metodologia de Síntese das ZnO NPs pelo método Pechini.	43
Figura 12 – Espalhamentos Rayleigh e Raman (Stokes e anti-Stokes).	50
Figura 13 – Método de difusão em disco Kirby Bauer para testes de suscetibilidade a antibióticos.	56
Figura 14 – Síntese de ZnO NPs por Pechini. (a) resina polimérica - poliéster; (b) puff de poliéster;	58
Figura 15 – Amostras de ZnO NPs, obtidas a partir de diferentes sais precursores e T de calcinação.	59
Figura 16 – Representação esquemática do Método Pechini para síntese de ZnO NPs.	59
Figura 17 – Difrátogramas de raios X das amostras de ZnO NPs.	60
Figura 18 – Espectros de FTIR das amostras de ZnO NPs.	63
Figura 19 – Espectros Raman das amostras de ZnO NPs.	64
Figura 20 – Espectros de absorção UV-Vis das amostras de ZnO NPs.	65
Figura 21 – Micrografias obtidas por MEV das amostras de ZnO NPs.	66
Figura 22 – Valores de Potencial Zeta, das ZnO NPs, em função do pH (25 °C).	68
Figura 23 – Filmes de PLA, PLA+ZnO (600°C e 800°C), PLA+CS, e PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).	70

Figura 24 – Micrografias obtidas por MEV dos filmes de PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, e PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).	72
Figura 25 – Padrão EDS para os filmes de PLA e PLA + ZnO (600°C e 800°C).....	74
Figura 26 – Padrão EDS para os filmes de PLA + CS e PLA + CS + ZnO (600°C e 800°C).	75
Figura 27 - Espectros de FTIR para os filmes: PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).....	76
Figura 28 - Espectros Raman para os filmes: PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados na síntese das ZnO NPs e Filmes a base de PLA.	41
Tabela 2 - Cristalinidade e tamanho médio do cristalito das ZnO NPs sintetizadas, a partir de diferentes sais precursores e T de calcinação, por Scherrer e Williamson-Hall (W-H).	61
Tabela 3 – Ponto isoelétrico para as ZnO NPs de acordo com o precursor.	69
Tabela 4 – Porcentagem em peso e desvio padrao dos elementos identificados na EDS para os filmes de PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, e PLA + CS + ZnO (600°C e 800°C).	74
Tabela 5 – Medidas de diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelo método de difusão em disco de ágar para biofilmes à base de PLA incorporados com CS e ZnO NPs.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Agar Muller Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflexão Total Atenuada
BDEC	Bases de Dados de Estruturas Cristalinas
BSE	Elétrons retroespalhados
CS	Quitosana
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
EBSD	Difração de elétrons retroespalhados
EDS	Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FEG	Field Emission Gun (Fonte de Emissão de Campo)
FIR	Infravermelho distante
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
FWHM	Full Width at Half Maximum (Largura a meia altura)
G+	Gram-positiva
G-	Gram-negativa
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GPa	Gigapascal
GRAS	Generally recognized as safe (Geralmente reconhecido como seguro)
HG	High Grade
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Infravermelho
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIR	Infravermelho médio
NIR	Infravermelho próximo
NPs	Nanopartículas

pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PDLA	Ácido Poli-D-Láctico
PDLLA	Ácido Poli (D,L-Láctico)
PF	Ponto de fusão
PLA	Poli (ácido láctico)
PLLA	Ácido Poli-L-Láctico
PVC	Policloreto de vinila
PZ	Potencial zeta
RNA	Ácido ribonucleico
SE	Elétrons secundários
SHG	Special High Grade
T	Temperatura
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
Vis	Visível
W-H	Williamson-Hall

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Embalagem de Alimentos	13
1.1.1 Regulamentação de Embalagem de Alimentos	15
1.2 Óxido de Zinco (ZnO)	17
1.2.1 Estruturas Cristalinas	18
1.2.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO NPs)	19
1.2.2.1 Morfologia de ZnO NPs	20
1.2.2.2 Métodos de Síntese de ZnO NPs	21
1.2.2.3 Toxicologia de ZnO NPs	21
1.2.2.4 Aplicações de ZnO NPs	22
1.2.2.5 Incorporação de ZnO NPs em Polímeros	22
1.2.2.6 Atividade Antimicrobiana de ZnO NPs	23
1.3 Quitina e Quitosana	27
1.4 Poli (Ácido Lático) – PLA	30
1.4.1 Incorporação de nanomateriais ao PLA	35
1.4.2 Incorporação de quitosana ao PLA	36
1.5 Método Pechini	37
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 EXPERIMENTAL	41
3.1 Materiais	41
3.2 Métodos	42
3.2.1 Síntese das ZnO NPs	42
3.2.2 Preparo de Filmes de PLA e PLA com incorporação de CS e ZnO NPs	43
3.2.2.1 Filmes de PLA	44
3.2.2.2 Filmes de PLA + ZnO NPs (600°C e 800°C)	44
3.2.2.3 Filmes de PLA + Quitosana	44
3.2.2.4 Filmes de PLA + Quitosana + ZnO NPs (600°C e 800°C)	44

3.3	Técnicas de Caracterização	45
3.3.1	Difração de Raios X (DRX)	45
3.3.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	48
3.3.3	Espectroscopia Raman	49
3.3.4	Espectroscopia UV-Vis	51
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)	53
3.3.6	Potencial Zeta (PZ)	54
3.4	Atividade Antimicrobiana: Método de Difusão em Disco de Ágar	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Síntese nas ZnO NPs	58
4.2	Caracterização das ZnO NPs	60
4.2.1	Difração de Raios X (DRX)	60
4.2.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	62
4.2.3	Espectroscopia Raman	63
4.2.4	Espectroscopia UV-Vis	64
4.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.2.6	Potencial Zeta (PZ)	67
4.3	Preparo de Filmes de PLA e PLA com incorporação de CS e ZnO NPs	70
4.4	Caracterização dos Filmes de PLA e PLA com incorporação de CS e ZnO NPs	71
4.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)	71
4.4.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	76
4.4.3	Espectroscopia Raman	78
4.5	Atividade Antimicrobiana: Método de Difusão em Disco de Ágar	79
5	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Embalagem de Alimentos

As embalagens de alimentos desempenham um papel essencial na preservação da qualidade e segurança dos produtos, protegendo-os contra contaminações e degradação causadas por agentes externos. Entretanto, alguns compostos tóxicos, derivados do petróleo, podem ser incorporados, causando danos ao meio ambiente e à saúde. O acondicionamento inadequado pode levar à degradação dos alimentos, favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos capazes de provocar patologias infecciosas graves e intoxicações alimentares (KRASNIEWSKA *et al.*, 2020; WROŃSKA *et al.*, 2021).

Os materiais mais utilizados na indústria de embalagens alimentícias são vidros, latas e plásticos, devido ao baixo custo de produção, à disponibilidade desses recursos e às propriedades desses materiais (PORTA *et al.*, 2020). Entre os polímeros mais empregados destacam-se o tereftalato de polietileno, o polipropileno, o polivinil cloreto e o poliestireno. No entanto, por não serem biodegradáveis, esses materiais podem levar centenas ou milhares de anos para se decompor, contribuindo de forma significativa para a poluição ambiental (KRASNIEWSKA *et al.*, 2020; PORTA *et al.*, 2020; GARBOR; TITA, 2012).

Visando à redução de impactos, diversas pesquisas têm surgido com o intuito de desenvolver e promover o uso de biopolímeros (GARBOR; TITA, 2012). Esses materiais biocompósitos, renováveis e biodegradáveis, destacam-se como soluções sustentáveis em aplicações variadas, como embalagens inteligentes para alimentos, distribuição biomédica e de medicamentos, biomembranas, setor automotivo e compostagem industrial (MOUSTAFA *et al.*, 2019).

Os biopolímeros podem ser classificados como materiais de “embalagens ativas” por sua capacidade de interagir com o alimento e com o ambiente a seu redor, alterando-os de forma controlada e ajudando a prolongar sua validade e qualidade (ESPITIA *et al.*, 2012; KRASNIEWSKA *et al.*, 2020).

As propriedades vantajosas dos biopolímeros, como estabilidade térmica, flexibilidade, barreira aos gases e à água, biodegradabilidade, resistência a produtos químicos e biocompatibilidade, decorrem da eficácia estrutural dos biomônômeros aplicados (GARBOR; TITA, 2012).

Em função de suas características antimicrobianas, capazes de prolongar a durabilidade de alimentos, as nanopartículas de prata têm se tornado um componente atrativo para incorporação em biopolímeros biodegradáveis (KRASNIEWSKA *et al.*, 2020). Embora existam compostos orgânicos com funções semelhantes, eles apresentam alta sensibilidade às condições de processamento, tornando-se mais instáveis que os nanocompostos (ESPITIA *et al.*, 2012).

Uma desvantagem dos biopolímeros em comparação aos plásticos convencionais está no fato de não oferecem o mesmo desempenho em termos de resistência, flexibilidade e propriedades de barreira. Como são derivados de recursos naturais, geralmente não se igualam aos materiais de origem petroquímica, já produzidos para suportar condições mais rigorosas. Para superar essa limitação, pesquisas têm explorado diferentes abordagens para melhorar as propriedades mecânicas e funcionais dos biopolímeros, como a incorporação de nanopartículas e outros materiais que atuem como reforço (GARBOR; TITA, 2012).

Além das questões de sustentabilidade, há uma preocupação da indústria de embalagem quanto à segurança dos materiais em contato com o alimento, buscando introduzir cada vez mais elementos naturais, com propriedades antimicrobianas, capazes de garantir a conservação sem causar danos à saúde dos consumidores (WRÓŃSKA *et al.*, 2021).

Os principais objetivos no desenvolvimento de embalagens incluem a melhoria das propriedades de barreira, a incorporação de componentes ativos que forneçam atributos adicionais, a detecção de informações relevantes e o aumento no prazo de validade dos alimentos. Esses objetivos podem ser alcançados pela associação de partículas específicas aos biopolímeros, conferindo ao material atributos físicos e químicos aprimorados (SEKHON *et al.*, 2010).

Nesse contexto, diversos compostos orgânicos, como celulose, amido, quitina, quitosana, carragenina, ácido polilático, entre outros, têm sido objeto de estudo pela indústria de alimentos, em função de suas aplicações como biopolímeros e por apresentar potencial biocida (PEREIRA; JAISEAL; JAISWAL, 2023). Além disso, a atividade antimicrobiana, essencial a esses materiais, pode ser ampliada pela adição de compostos inorgânicos, promovendo a redução de conservantes e a prolongação da vida útil dos alimentos em contato com a embalagem. As nanopartículas mais utilizadas para esse fim incluem metais e óxidos metálicos, como Ag, MgO, ZnO, TiO₂ e CaO (HOSEINNEJAD; JAFARI; KATOUZIAN, 2018).

1.1.1 Regulamentação de Embalagem de Alimentos

Em nível nacional, a regulamentação de embalagens de alimentos é conduzida principalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 843, de 22 de fevereiro de 2024, da ANVISA, que dispõe sobre a regularização de alimentos e embalagens sob competência do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) destinados à oferta no território nacional, em seu Art. 2º, inciso IV, define embalagem como: “artigo que está em contato direto com o alimento e que se destina a protegê-lo de alterações, contaminações e adulterações, desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor” (BRASIL, 2024).

As embalagens de alimentos, além de fornecer as informações acerca do produto, têm o objetivo de protegê-lo de contaminações por agentes externos e deterioração, oferecendo qualidade e segurança alimentar. Para a garantia da integridade desses alimentos, as normas e padrões de certificação, que dispõem sobre os critérios das embalagens, são cruciais. As especificações das embalagens variam de acordo com o tipo de alimento, e devem prevenir a ação de micro-organismos e de fatores como umidade, luz e oxigênio, além de manter suas características nutricionais (PADULA; ITO, 2006).

Outra condição relevante a ser avaliada é a migração de substâncias da embalagem para o alimento, pois em sua maioria, os materiais utilizados para fabricá-las não são inertes. Conforme dispõe o Regulamento Técnico da RDC Nº 91, de 11 de maio de 2001, da ANVISA, a migração pode ser: total/global, quando se referir à quantidade geral de elementos transportados dos materiais da embalagem para o alimento, sem diferenciá-los; ou específica, se tratando apenas da transferência quantitativa de uma dada substância, não polimérica, que apresenta interesse toxicológico, podendo ser nociva ao deslocar-se da embalagem para o alimento (BRASIL, 2001). Nos polímeros, essa transferência ocorre devido à presença de aditivos, resíduos e monômeros incorporados, os quais possuem a capacidade de se deslocarem em função de seu baixo peso molecular. Desta forma, é importante avaliar se os materiais aplicados são compatíveis aos alimentos que envolvem e garantir que não liberem elementos tóxicos ou alterem suas propriedades, aroma e sabor (PADULA; ITO, 2006).

De acordo com o inciso II, do §1º, do Art. 8º, da Lei n.9.782/1999, compete à ANVISA a regulamentação, o controle e a fiscalização de: “alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares, limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários” (BRASIL, 1999). Em sua Resolução - RDC Nº 91, de 11 de maio de 2001, são estabelecidos critérios gerais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos, em todos os processos, desde a produção ao consumo.

Cada tipo de embalagem possui uma regulamentação específica, de acordo com sua composição. A ANVISA classifica os materiais de embalagens em: plásticos, elastômeros e borrachas, celulose regenerada, vidro e cerâmica, metais e suas ligas, madeira, têxteis, ceras de parafina e microcristalinas, e outros (BRASIL, 2001).

As normas sobre materiais de embalagem foram criadas para garantir o controle de substâncias que podem ser transmitidas ao alimento, apresentando riscos à saúde, restringindo-as através de listas positivas, nas quais constam informações quanto às substâncias e quantidades permitidas na composição das embalagens, além de estipular limites de migração, de acordo com a classe do produto alimentício que estão preservando. Quando a segurança de uma substância já é reconhecida e comprovada cientificamente, ela é inserida em uma Lista Positiva, a qual é publicada por meio de RDCs (Resoluções da Diretoria Colegiada) da ANVISA, de acordo com o material da embalagem em contato com o alimento. Caso não esteja prevista nesta relação, seu uso é proibido (PADULA; ITO, 2006).

A Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 326 de 2019 é o documento mais recente que estabelece a lista positiva de aditivos destinados à elaboração de materiais plásticos e revestimentos poliméricos em contato com alimentos. Essa lista inclui a designação das substâncias, a aplicabilidade do fator de correção de gordura (FCG) para substâncias lipofílicas, e as restrições/especificações, geralmente como limites de migração específica de grupo - LME (T). Em consulta à relação de aditivos da lista positiva, temos por exemplo, para o óxido de zinco (ZnO), tanto para partículas como para nanopartículas, um LME (T) de 5 mg/kg (expresso como Zinco). Entretanto, em sua forma nano, há uma restrição que limita sua aplicação exclusivamente a polímeros não plastificados (BRASIL, 2019).

Após a constituição do MERCOSUL, do qual faziam parte Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, em 1994, surgiu a necessidade de conciliar algumas legislações

nacionais, entre as quais, a de embalagem de alimentos. Essa ação passou a ser coordenada pelo executivo da organização, por meio do Grupo Mercado Comum (GMC), o qual também utiliza como base outras regulamentações internacionais, a exemplo do *FDA (Food and Drug Administration)* e do *BfR (German Federal Institute for Risk Assessment)*. Desta forma, quaisquer mudanças devem ser discutidas e aprovadas nesta esfera e, posteriormente, incluídas nas legislações nacionais, geralmente através dos Ministérios da Saúde. No Brasil, é a ANVISA a agência responsável pela publicação e regulação desses regramentos (PADULA; CUERVO, 2004; BRASIL, 2020).

O estado de São Paulo conta com o Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA), uma instituição vinculada ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) do Governo do Estado de São Paulo, que atua na pesquisa, desenvolvimento e inovação em embalagens, oferecendo serviços de análise, consultoria e desenvolvimento de soluções tecnológicas para a indústria de embalagens e alimentos. Seu trabalho abrange diversas áreas, incluindo a segurança de embalagens, sustentabilidade, legislação e o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias de embalagem (ITAL, 2024).

1.2 Óxido de Zinco (ZnO)

O óxido de zinco (ZnO) é um composto inorgânico cristalino, de coloração branca a amarelada, com alta estabilidade química e uma ampla faixa de absorção de radiação, incluindo a ultravioleta. Ele apresenta baixa solubilidade em água e na maioria dos álcoois, mas é solúvel em ácidos e bases fortes, como HCl, H₂SO₄, NaOH e KOH. Devido às suas propriedades ópticas, elétricas, térmicas e à sua capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos, o ZnO é considerado um composto multifuncional. Por essas características, ele é amplamente empregado nas indústrias de: tintas, borrachas, plásticos, vidros, cerâmicas, pisos, sensores, têxteis, cosméticos, automóveis, medicamentos e alimentos (DJURIŠIĆ; LEUNG, 2006; ESPITIA *et al.*, 2012; MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

Uma particularidade interessante do ZnO, diferente da maioria dos óxidos, é seu efeito de confinamento quântico, que o torna um excelente semicondutor com alto poder oxidante. Ele apresenta um *band gap* direto e largo (3,37 eV à temperatura ambiente), alta energia de ligação de *excíton* (60 meV) e transições eletrônicas

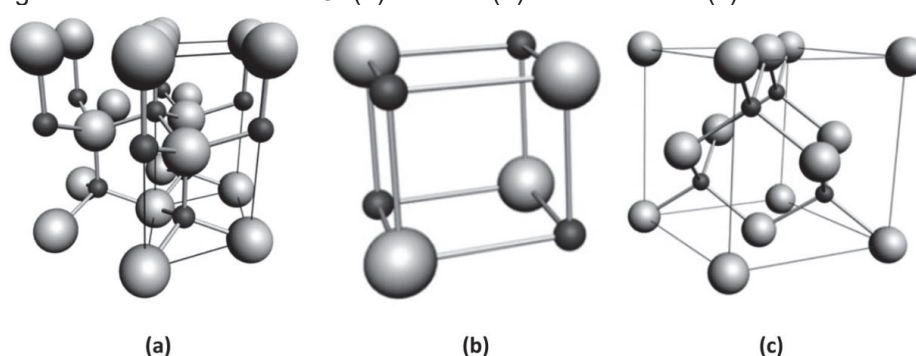
facilitadas. Esses fatores conferem ao ZnO grande importância nas novas tecnologias ópticas, optoeletrônicas e eletrônicas (BA-ABBAD *et al.*, 2013; MANZOOR *et al.*, 2009; MEULENKAMO, 1998).

A maior parte destas propriedades do ZnO têm eficácia inversamente proporcional ao tamanho de suas partículas; ou seja, quanto menores os cristalitos, mais intensas são as propriedades, devido ao aumento da área superficial específica (AYOUB *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2010).

1.2.1 Estruturas Cristalinas

O ZnO é um composto iônico formado pela ligação entre o zinco (Zn), que perde dois elétrons e se torna um cátion Zn^{2+} e o oxigênio (O), que ganha esses elétrons e se torna um ânion O^{2-} . Devido ao seu polimorfismo, o ZnO pode se apresentar em três diferentes estruturas: wurtzita hexagonal, sal de rocha cúbica e mistura de zinco cúbica (blenda de zinco). A wurzita é a estrutura mais estável termodinamicamente, sendo a forma em que o ZnO se apresenta naturalmente, em condições ambientais. A estrutura sal de rocha cúbica requer altíssimas pressões para sua formação, em níveis de GPa, e a blenda de zinco é metaestável, sendo apenas possível sua efetivação por meio de deposição em substratos cúbicos (KLINGSHIRN, 2007; MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

Figura 1 – Estruturas do ZnO: (a) wurtzita (b) sal de rocha e (c) blenda de zinco.



Fonte: Ayoub *et al.* (2022).

Célula unitária é a menor unidade estrutural repetida periodicamente que define a simetria e a organização dos átomos em um cristal. A estrutura wurzita, tem as células unitárias na forma de um prisma hexagonal, que corresponde ao grupo espacial $P6_3mc$, e apresenta dois parâmetros de rede, $a=3,249\text{\AA}$, que se refere ao comprimento da lateral do hexágono, e $c=5,207\text{\AA}$, que corresponde à distância entre

as camadas no eixo c. A coordenação tetraédrica, que se dá como uma sequência de planos alternados compostos por O^{2-} e Zn^{2+} , presente nas estruturas do ZnO, é característica de ligações covalentes com hibridização sp^3 . Os átomos de zinco formam uma estrutura tetraédrica ao se coordenarem a quatro átomos de oxigênio, enquanto os átomos de oxigênio formam uma estrutura octaédrica coordenada a quatro átomos de zinco. Essa coordenação gera uma estrutura assimétrica, responsável pelas propriedades piezoelétricas e piroelétricas. As superfícies polares, especialmente o plano basal (0001), influenciam essas características. Devido ao arranjo deste plano são geradas superfícies de carga positiva (Zn) e negativa (O), por íons de carga oposta, tendo como consequências a formação de momento dipolar, a polarização pelo eixo c e a divergência da energia superficial. No ZnO wurzita também estão presentes as facetas (2110) e (0110), porém são apolares e estáveis, apresentando menor energia superficial (ABUBAKAR *et al.*, 2023 KUMAR *et al.*, 2015; WANG, 2004).

As propriedades físicas e químicas do ZnO se devem à sua excelente simetria em relação ao eixo hexagonal, à polarização natural e à ausência de centro de inversão, o que também faz deste composto um semicondutor de largo *band gap* (BARUAH; DUTTA, 2009; KLINGSHIRN, 2007; NAHHAS, 2018).

Na síntese do ZnO, o cristal cresce de forma anisotrópica, conforme a energia superficial e a quantidade de sítios ativos, e os íons das substâncias precursoras se aderem preferencialmente à fase polar, o que leva à formação de diversas orientações cristalinas. A tendência de formação dos cristais de ZnO ocorre nas faces polares, com orientações $\pm[0001]$ e $\pm[\bar{1}010]$, o que faz com que eles cresçam de forma vertical e inclinada. Assim, a morfologia e a estabilidade das partículas de ZnO serão definidas em relação à energia superficial de cada plano cristalográfico, a qual pode ser variável (ABUBAKAR *et al.*, 2023).

1.2.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO NPs)

A nanotecnologia atua na melhoria das propriedades de materiais e produtos. O óxido de zinco é um material que se cristaliza facilmente e, em sua forma nanoestruturada, apresenta variações em suas propriedades, seja modificando-as ou intensificando-as, pois sua área superficial e estrutural é alterada, podendo assumir diversas morfologias. Essa variedade de nanoestruturas está associada a parâmetros definidos para síntese, sendo os mais relevantes para a estruturação da forma: a

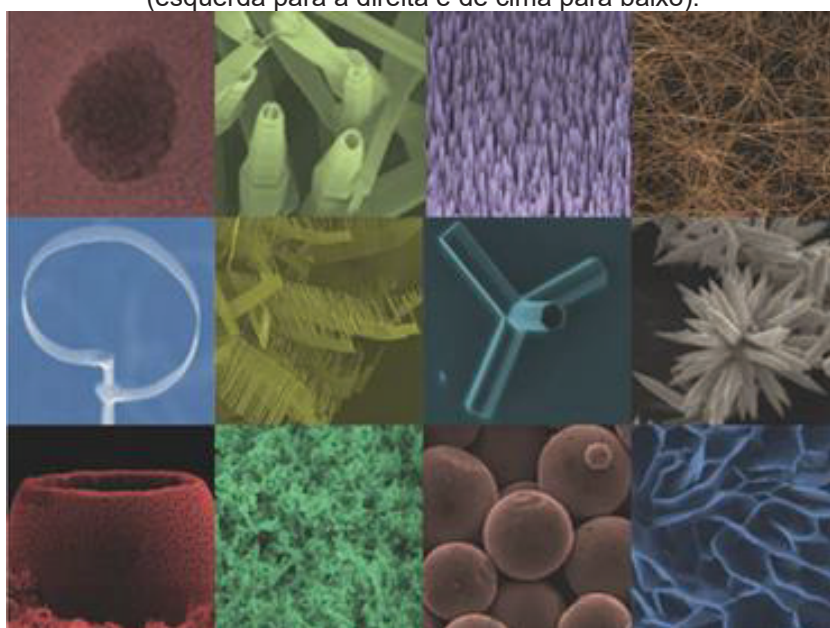
concentração, a pressão, o pH e a temperatura. Outros fatores também capazes de influenciar no produto são os gases de arraste, os catalisadores, os compostos dopantes, a natureza dos precursores de partida e o tempo (reação, condensação, calcinação etc.) (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010; MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012; ZHAO; LI, LOU, 2013).

Os compostos químicos de partida definirão a qualidade do ZnO. Algumas áreas, como as médicas, farmacêuticas e alimentícias, exigem um produto com maior pureza, sendo recomendado o uso de zinco metálico especial de alto grau (SHG), com 99,995% de Zn, chamado de selo de ouro. Para a indústria em geral, é utilizado o zinco genuíno ou comum (HG), com 99,95% de Zn (MAPELLI; MALFATTI; OLIVEIRA, 2014; MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

1.2.2.1 Morfologia de ZnO NPs

Em função do método, dos precursores e dos parâmetros definidos para síntese do ZnO, a reação pode tomar caminhos distintos, que definirão os processos de nucleação e como se dará a formação dos cristais em cada estrutura (ZHANG *et al.*, 2022). As diferentes formas das ZnO NPs podem ser induzidas por suas superfícies polares estáveis (SUN *et al.*, 2016; ZHAO, 2013).

Figura 2 – Morfologias de NPs ZnO: ponto quântico, nanotubos, nanofios, nanocintos, nanoanel, nanopentes, tetrápode, nanoflores, esferas ocas, filme tipo esponja, nanoesferas e nanoplacas (esquerda para a direita e de cima para baixo).



Fonte: Laurenti *et al.* (2017).

Devido à possibilidade de ajuste, o ZnO permite uma síntese com controle da morfologia, podendo ser gerado na forma de nanorods, nanoesferas, nanofios, nanoflores, nanoplacas, nanofolhas, nanotubos, nanoespirais, anelões, tetrápodes, formatos irregulares, prismas hexagonais etc., conforme alguns exemplos ilustrados na Figura 2, com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

1.2.2.2 Métodos de Síntese de ZnO NPs

As nanopartículas de óxido de zinco podem ser obtidas por meio de diversos processos de síntese, tais como coprecipitação, sol-gel, congelamento, hidrotérmico, deposição química e física, combustão, biológico, moagem, precursores poliméricos (Pechini), entre outros (ABBAS, 2019; ZHAO; LI; LOU, 2013).

O método de síntese escolhido para produzir as ZnO NPs é crucial na determinação de suas propriedades. No entanto, devido à variedade de opções, defini-lo pode gerar confusão. Como os diferentes processos podem oferecer características específicas, com vantagens e desvantagens, resultando em produtos distintos, as adequações devem ser estabelecidas de acordo com a aplicação de interesse e as condições de produção (MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

Na síntese de nanopartículas, busca-se obter um produto uniforme, com alta pureza, utilizando uma metodologia simples, acessível e que proporcione bom rendimento (ZHAO; LI; LOU, 2013).

1.2.2.3 Toxicologia de ZnO NPs

O óxido de zinco é amplamente utilizado em atividades cotidianas e possui classificação de material não tóxico, uma vez que não causa irritações nos olhos ou na pele, além de não haver indícios de sua carcinogenicidade ou de que possa causar quaisquer alterações no material genético. Entretanto, deve-se evitar sua inalação ou ingestão, o que pode levar à febre do zinco, patologia capaz de provocar tosse, calafrios e febre (MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

Alguns estudos indicam que, em contato com a pele, mesmo as nanopartículas, permanecem na camada externa, não conseguindo penetrar nas camadas subcutâneas (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010).

Na indústria alimentícia, o óxido de zinco (ZnO) é reconhecido como um material seguro, classificado como *GRAS* (*generally recognized as safe*) pela *Food*

and Drug Administration (FDA), sendo empregado como aditivo alimentar. O avanço da nanotecnologia tem impulsionado a criação de materiais dotados de propriedades singulares, especialmente no que se refere à sua eficácia como agentes antimicrobianos. Nesse contexto, a utilização do ZnO em escala nanométrica tem demonstrado significativas propriedades antimicrobianas, apresentando potencialidades promissoras para aplicação na preservação de alimentos (ESPITIA *et al.*, 2012).

1.2.2.4 Aplicações de ZnO NPs

Com a diminuição do tamanho das partículas a níveis nanométricos, os efeitos de confinamento quântico e de superfície conferem características diferenciadas, promovendo o aprimoramento de seus perfis mecânicos, elétricos e ópticos, o que tem levado ao crescimento do interesse no ZnO devido ao seu bom desempenho nos mais diversos tipos de indústria (BARUAH; DUTTA, 2009).

Por se tratar de um composto estável e com propriedades físicas e químicas relevantes, o óxido de zinco possui uma vasta aplicação industrial e científica. Em sua forma nanoestruturada, ele vem sendo utilizado em áreas de inovação da alta tecnologia, como composição de dispositivos opto-eletrônicos e pizeletrônicos, diodos emissores de luz, sensores de gás, filtros de onda acústicas, fotodiodos, fotodetectores, cristais fotoônicos, células solares, varistores, moduladores ópticos etc. (BARUAH; DUTTA, 2009; DJURISIC; XING; CHEN, 2010).

Em função de sua capacidade de absorver e dispersar radiação ultravioleta (UV) e de sua fotoestabilidade, o óxido de zinco também é amplamente empregado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, por meio de sua incorporação aos produtos, como por exemplo em protetores solares (ZHANG *et al.*, 2012).

1.2.2.5 Incorporação de ZnO NPs em Polímeros

Nanopartículas de óxido de zinco vêm sendo utilizadas na produção de nanocompósitos. Para produzi-las, são aplicados alguns métodos, tais como fundição de solvente e de solução, volatilização de solvente, extrusão de dupla rosca, composição por fusão e moldagem por sopro de extrusão (ABBAS *et al.*, 2019).

Ao ser incorporado a polímeros plásticos, borrachas, fibras e resinas, o óxido de zinco traz vantagens significativas, conferindo um aumento nas resistências: física,

mecânica, térmica, à água e ao fogo. Além disso, atua como estabilizador em matrizes de resinas poliolefinicas, como polipropileno, poetileno, poliésteres, PVC, entre outros, proporcionando absorção de radiação UV, bem como estabilidade térmica e mecânica, tornando-os materiais mais robustos. Na indústria, essas macromoléculas incorporadas com ZnO têm aplicação prática na confecção de objetos que precisam ser resistentes, tais como capacetes, tapetes, sacolas, filamentos, assentos, fibras, equipamentos de segurança, entre os mais diversos usos (ESPITIA *et al.*, 2012; MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

Esses compósitos possuem características multifuncionais aprimoradas, com destaque para suas propriedades mecânicas, de barreira e antimicrobianas, especialmente nas áreas de embalagens e próteses. Essas melhorias tornam os materiais mais seguros e duráveis, despertando um grande interesse em sua aplicação na pesquisa de materiais para embalagens de alimentos (ABBAS, 2019; ESPITIA *et al.*, 2012).

1.2.2.6 Atividade Antimicrobiana de ZnO NPs

De acordo com um estudo científico publicado na revista *The Lancet* em 2022, referente a um levantamento de 2019, uma em cada oito mortes está relacionada a infecções bacterianas, associadas a 33 patógenos bacterianos em 11 diferentes síndromes infecciosas, sendo a segunda principal causa de morte, atrás apenas para as doenças cardíacas. Os dados indicam que a resistência aos antibióticos foi a grande responsável por esse alto índice (IKUTA *et al.*, 2022). A nanotecnologia pode auxiliar no combate a essas bactérias multirresistentes, por meio de nanocompósitos com atividade antimicrobiana, que agem nos receptores da bactéria, através de uma reação de complexação, barrando seu crescimento ou divisão, prevenindo assim o contágio por esses patógenos (AGARWAL, 2018).

O ZnO é um composto inorgânico, termicamente estável, biocompatível e seguro, com aplicações promissoras nas áreas biológicas, alimentícias e farmacêuticas (AGARWAL, 2018; ESPITIA *et al.*, 2012).

A nanotecnologia tem se dedicado ao desenvolvimento de substâncias com funções antimicrobianas, o que confere às nanopartículas de ZnO um notável interesse, pois apresentam essa característica, atribuindo-lhes um elevado potencial de conservação. Desta forma, para melhoria na qualidade dos polímeros utilizados em embalagem de alimentos, a associação do óxido de zinco nanoestruturado a essas

matrizes é uma alternativa substancial, sendo um poderoso antibactericida contra diversos tipos de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (ESPITIA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2022).

A atividade antimicrobiana do ZnO se intensifica à medida que a concentração de nanopartículas aumenta e que o tamanho das partículas diminui, sendo a concentração sendo um fator mais relevante do que o tamanho das partículas (HIROTA *et al.*, 2010).

Os mecanismos mais comuns da ação biocida das nanopartículas incluem o rompimento da dupla camada fosfolipídica, levando à desintegração da membrana celular, e o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), extremamente instáveis e capazes de transformar outras moléculas com as quais se choca, como proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e RNA, levando à morte da célula ou à inibição de processos de replicação e de ciclos essenciais (AGARWAL, 2018).

As ERO são moléculas iônicas nas formas reduzidas do oxigênio, mais reativas que o oxigênio molecular, como ânions radicais e moléculas de oxigênio, com potencial de destruição de células, geradas durante o estresse oxidativo. Nas células, as ERO mais presentes são os radicais superóxido (O_2^-), a hidroxila (OH^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (HUANG *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2017).

Quando expostas à luz visível e ultravioleta (UV), em meio aquoso, pela interação com íons hidroxila (OH^-), as ZnO NPs são ativadas e sofrem reações de oxidação e redução, formando pares elétron-buraco. Esse processo ocorre devido à migração dos elétrons da camada de valência para a banda de condução, resultando em elétrons livres na camada de condução vazia (e^-_{CB}) e em uma área positiva relativa ao buraco do elétron na banda de valência (h^+_{VB}) (HUANG *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2017).

As moléculas de água, presentes na suspensão do ZnO, serão ionizadas ao reagirem com o buraco do elétron, gerando os radicais livres $^{\bullet}OH$ e H^+ . Também são formados intermediários, na superfície das ZnO NPs durante a redução, por meio da reação do oxigênio dissolvido (O_2) com o elétron da banda de condução. Estes serão convertidos a superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), que em seguida resultarão em ($HO_2^{\bullet}$), ao reagirem com o (H^+), e formarão os ânions de peróxido de hidrogênio (HO_2^-). Por fim, esses íons em contato com (H^+), produzirão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma molécula

capaz de penetrar nas células e atuar como agente antimicrobiano (HUANG *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2017).

As equações que descrevem as reações supracitadas são:

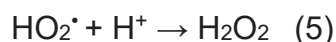
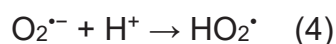
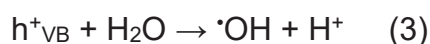
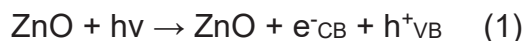
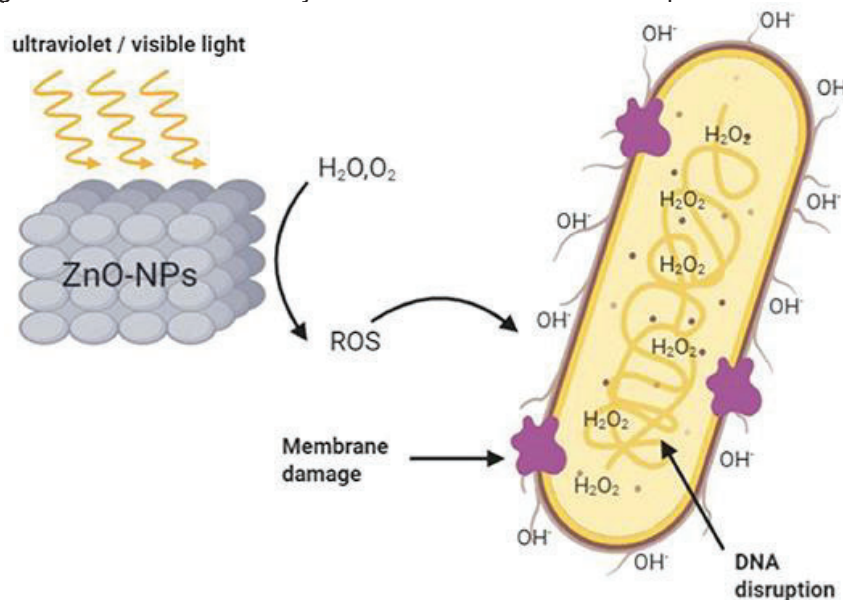


Figura 3 – Mecanismo de ação antimicrobiano das ERO a partir de ZnO NPs.



Fonte: Jiang *et al.* (2020).

Dois fatores cruciais na ação das ZnO NPs são a concentração, pois esta é proporcional à quantidade de ERO, e o tempo de exposição à radiação UV, o qual demonstrou ser mais eficiente a períodos mais longos (KUMAR *et al.*, 2017).

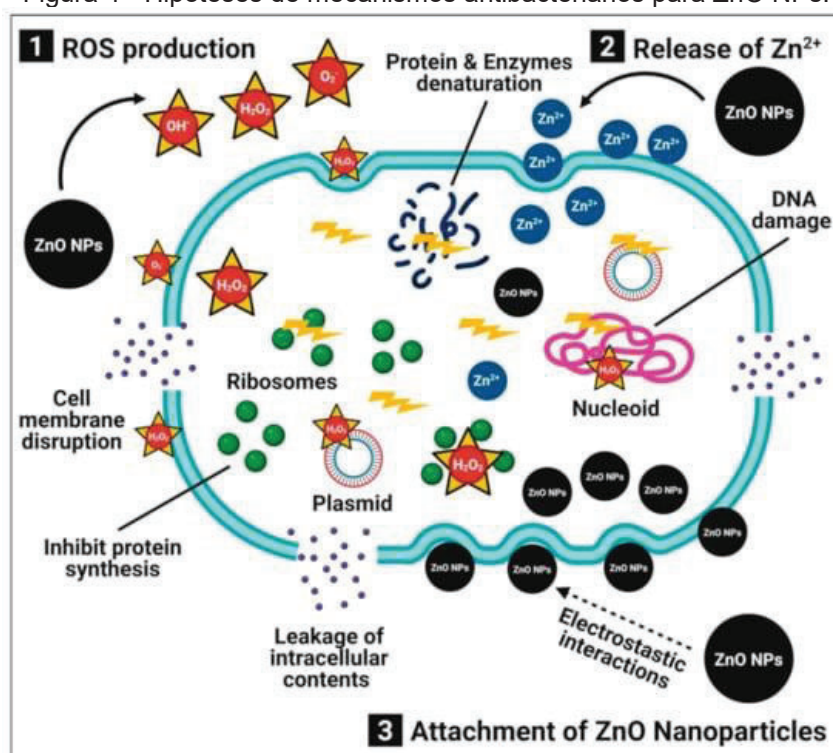
A ação bactericida das ZnO NPs na ausência de luz tem sido objeto de diversas pesquisas, pois ainda não se tem uma compreensão clara de como se dá seu mecanismo (JOE *et al.*, 2017). Alguns estudos indicam outras possibilidades para a ação da atividade biocida das ZnO NPs, uma vez que demonstraram eficácia mesmo no escuro. Os autores sugerem que a produção de ânions superóxido seja responsável por essa atividade quando as nanopartículas são aplicadas na ausência de luz (HIROTA *et al.*, 2010).

De acordo com o trabalho de Xu *et al.* (2013), referente aos efeitos que colaboram para a atividade antimicrobiana do ZnO sem incidência luminosa, o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), responsável pela ação biocida, é produzido devido à presença de vacâncias de oxigênio na camada superficial dos cristais de ZnO. Os materiais que apresentaram cristais com maior número de vacâncias de oxigênio também mostraram uma maior produção de H_2O_2 e, conseqüentemente, uma maior inibição bacteriana.

Um estudo demonstrou que as espécies reativas de oxigênio (ERO), como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 , também podem ser geradas por meio de suspensão aquosa de ZnO, mesmo sem irradiação de luz, sendo os defeitos de superfície fundamentais para sua formação (PRASANNA; VIJAYARAGHAVAN, 2015).

Figura 4 - Hipóteses de mecanismos antibacterianos para ZnO NPs.



Fonte: Murali *et al.* (2021).

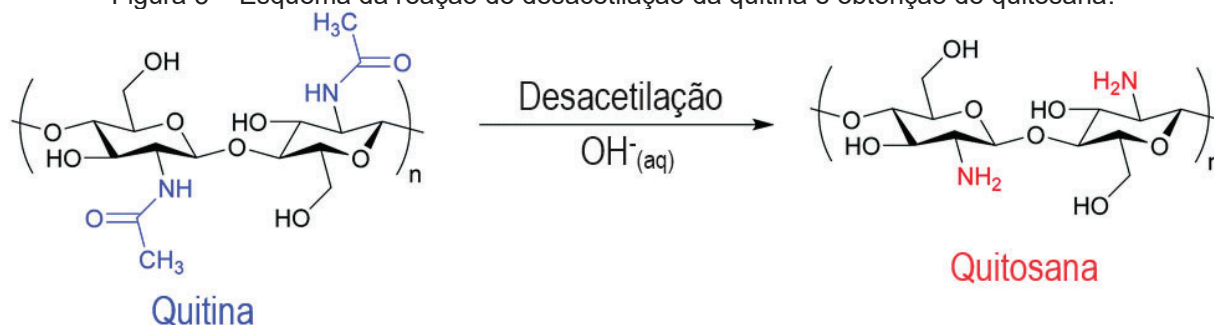
A liberação de íons de zinco (Zn^{2+}) pela superfície das nanopartículas de ZnO (ZnO NPs) é apontada como um dos mecanismos do seu efeito antibacteriano. Em meio aquoso, esses íons ficam disponíveis e podem atravessar a membrana celular dos micro-organismos, provocando alterações estruturais que aumentam sua permeabilidade e desestabilizam suas funções. Além disso, os íons Zn^{2+} interagem com moléculas essenciais, como proteínas e aminoácidos, prejudicando a homeostase celular, o que pode resultar na desintegração da célula (ESPITIA *et al.*, 2012; SING *et al.*, 2018; VITASOVIC *et al.*, 2024).

Além destas, há também uma linha que relaciona a ação bactericida do ZnO à capacidade de internalização celular dos óxidos metálicos. Nessa proposta, as nanopartículas de ZnO interagem com a membrana celular das bactérias, por meio de forças eletrostáticas, e penetram no citoplasma, provocando reações que levam à inibição ou à morte celular (ESPITIA *et al.*, 2021; TAM *et al.*, 2008).

1.3 Quitina e Quitosana

A quitina é um composto de coloração branca e consistência rígida, considerada um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. As principais fontes de quitina são os exoesqueletos de artrópodes, como crustáceos, moluscos e insetos, além de constituir a parede celular de fungos e leveduras. A molécula da quitina é constituída por unidades monoméricas de β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose (GlcN) e β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (GlcNAc), resultando em uma rede cristalina organizada e de elevado peso molecular. Por meio do processo de desacetilação parcial da quitina, que envolve a remoção do grupo acetil (-COCH₃), obtém-se a quitosana (ARANAZ *et al.*, 2021; MACEDO *et al.*, 2022; POZNANSKI; HAMEED; ORCZYK, 2023; ZUBER; ZIA; BARIKANI, 2012).

Figura 5 – Esquema da reação de desacetilação da quitina e obtenção de quitosana.



Fonte: Jim *et al.* (2021).

Para o preparo da quitosana, partindo-se dos crustáceos de origem, inicialmente é realizada a desmineralização, geralmente com ácido clorídrico (HCl) e, em seguida, promove-se a remoção das proteínas e a desacetilação, pela aplicação de hidróxido de sódio (NaOH), sob temperatura de 65 a 100°C, por até 72 horas. A descoloração pode ser feita com permanganato de potássio (KMnO₄) e ácido oxálico (HO₂CCO₂H). As etapas citadas também podem ser executadas por processos biológicos, mediados por enzimas e micro-organismos (KE *et al.*, 2021; MACEDO *et al.*, 2022; YONES; RINAUDO, 2015). Esses parâmetros, bem como a hidrólise parcial,

decorrente da desacetilação, influenciarão nas propriedades físicas, químicas e biológicas do material final, em fatores como massa molar média, índice de polidispersão e grau médio de acetilação, resultando em uma variedade de quitosanas, dificultando sua padronização e, conseqüentemente, a comparação entre esses polímeros após a síntese (AZEVEDO *et al.*, 2007; KE *et al.*, 2021; MACEDO *et al.*, 2022; POZNANSKI; HAMEED; ORCZYK, 2023).

A apresentação da quitosana é versátil, sendo geralmente encontrada na forma de pó branco ou amarelado, com variações entre formas mais finas ou granuladas. Além disso, pode ser processada em membranas, filmes, géis, nanopartículas, fibras, grãos, fios, entre outros (HIRANO, 1996).

Embora haja uma relação entre o material de origem e o método de síntese dos polímeros na distribuição de massa, a quitina apresenta massa molar superior a 10^6 Daltons, enquanto a quitosana costuma apresentar valores na faixa de $1,0 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^6$ Daltons (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Pelo fato de possuir diversos grupos acetilamina ($-\text{NHCOCH}_3$) e apresentar alto grau de empacotamento das cadeias poliméricas lineares, a quitina apresenta baixa reatividade química, inelasticidade e caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e na maior parte dos solventes orgânicos, o que acaba por limitar seu uso. Já a quitosana, na qual as acetamidas ($-\text{CH}_3\text{CONH}_2$) são convertidas em aminas ($-\text{NH}_2$), apresenta solubilidade em meio aquoso de ácidos orgânicos e inorgânicos, devido à formação do íon amônio ($-\text{NH}_3^+$), gerado pela protonação da amina primária. Quanto mais grupos amino protonados estiverem presentes, maior a repulsão eletrostática e o potencial de dissolução em água (ARANAZ *et al.*, 2021; BARIKANI *et al.*, 2014; MACEDO *et al.*, 2022). Esses grupos também conferem propriedades de quelação de metais, atividade catalítica e ação antimicrobiana (WROŃSKA *et al.*, 2021).

Os principais fatores que influenciam na solubilidade da quitosana são peso molecular, o grau de acetilação, o pH, a temperatura e a cristalinidade do polímero. Sob pHs básicos e neutro, mesmo com alto grau de acetilação, a quitosana é insolúvel, limitando seu uso em meios fisiológicos e promovendo um interesse pela síntese de seus derivados com maior solubilidade (ARANAZ *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2022).

A constituição de grupos reativos (amino primário e as hidroxilas primárias e secundárias) e funcionais (acetamidas e ligações glicosídicas), presentes na quitosana, favorece as modificações químicas capazes de aprimorar as propriedades

do biopolímero. Os seus derivados podem ser gerados por métodos como quaternização, desacetilação, carboxilação, sulfonação, depolimerização, amidação etc., tornando-os mais solúveis, biodegradáveis, resistentes e agregando demais funções desejadas que visem facilitar sua aplicação (ARANAZ *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2007).

A quitosana é considerada segura e sustentável pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos devido às vantagens que apresenta em ser atóxica, biodegradável, biocompatível, antioxidante e de produção e regeneração natural, diferentemente dos derivados de petróleo e carvão. Por se tratar de um subproduto abundante do descarte da pesca e ser renovável, possui baixo custo, apresentando relevância econômica e ambiental (AZEVEDO *et al.*, 2007; POZNANSKI; HAMEED; ORCZYK, 2023; LI *et al.*, 1996). Ademais, esse biopolímero possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (G+), Gram-negativas (G-), fungos e leveduras, tornando-se atrativo às mais diversas aplicações e em distintas áreas (alimentícia, médica, farmacêutica, cosmética, biotecnológica etc.), tanto em sua forma isolada quanto incorporada a outros polímeros (KONG *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2022; MENG *et al.*, 2023; POZNANSKI; HAMEED; ORCZYK, 2023). Essas propriedades também tornam a quitosana útil em tratamentos médicos, pois pode ser aplicada como mucoadesivo para a liberação de fármacos, é eficaz na cicatrização de ferida e possui atividades antitumoral e anti-hiperglicêmica (ARANAZ *et al.*, 2021).

A massa molecular da quitosana influencia sua ação antimicrobiana, variando conforme o tipo de bactéria. Nas bactérias Gram-positivas, a atividade bactericida da quitosana é mais eficiente à medida que sua massa molecular aumenta. Em contraste, nas bactérias Gram-negativas, a quitosana apresenta maior eficácia quanto menor sua massa molecular. Essas diferenças estão relacionadas à estrutura distinta das paredes celulares de cada tipo de bactéria. A principal hipótese do mecanismo de ação que leva à morte celular nas bactérias Gram-positivas, que possuem paredes simples, é a de que uma maior massa molecular seja capaz de formar películas ao redor destas, dificultando a absorção dos nutrientes que as mantêm. Já nas Gram-negativas, compostas por paredes mais complexas, é a de que uma menor massa molecular consiga entrar nessa célula, alterando seu metabolismo. A quitosana também atua como antifúngico, pois é capaz de modificar a membrana dos fungos, por interagir com sua superfície eletronegativa, provocando distúrbios metabólicos (VILLADIEGO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2009).

As principais desvantagens dos filmes à base de quitosana, em comparação a outros polímeros, são a alta permeabilidade ao vapor de água e a média proteção de barreira ao oxigênio. No intuito de melhorar a atividade antimicrobiana, as propriedades mecânicas e de barreira, além de aumentar a estabilidade térmica da quitosana, são aplicadas técnicas de modificação química ou combinação a outras substâncias, tais como metais e seus óxidos ou substâncias hidrófobas, capazes de reduzir sua hidrofiliabilidade, gerando um compósito mais resistente (LI *et al.*, 1996; LI; ZHUANG, 2020).

A quelação é uma das interações químicas mais relevantes da quitosana, pois propicia uma ligação seletiva a moléculas de interesse, como colesterol, gorduras, proteínas, íons metálicos e células tumorais, conferindo as propriedades já citadas e apresentando funções descontaminante, filtrante e clarificante. Em virtude dessas características versáteis, a quitosana encontra aplicação em uma variedade de processos industriais, abrangendo setores como agricultura, tratamento de água, cosmetologia, farmácia, biomedicina, indústria alimentícia, têxtil, papel e outros (LI *et al.*, 1996).

1.4 Poli (Ácido Láctico) – PLA

O poli (ácido láctico), PLA, é um poliéster alifático termoplástico, biodegradável e biocompatível, de origem natural, constituído de moléculas de ácido láctico (ácido orgânico biológico) e gerado por meio de fontes renováveis, como o milho, a mandioca, a cana-de-açúcar, a beterraba, a batata, entre outros vegetais com alto teor de amido. Esse biopolímero pode ser amorfo, semicristalino ou cristalino, dependendo de como ele é sintetizado e processado. Em geral, o PLA é semicristalino, o que significa que ele possui regiões tanto cristalinas quanto amorfas (BRITO *et al.*, 2011; GARLOTTA, 2001; HOSSEIN, 2022).

O amido presente nas biomassas dessas matérias-primas vegetais é convertido em glicose, que é fermentada por bactérias específicas, como *Lactobacillus sp.*, produzindo ácido láctico. Este, por sua vez, é polimerizado para formar o PLA. A polimerização é um processo químico pelo qual moléculas menores (monômeros) se unem para formar macromoléculas de cadeias longas (polímeros) (HAMAD *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2016).

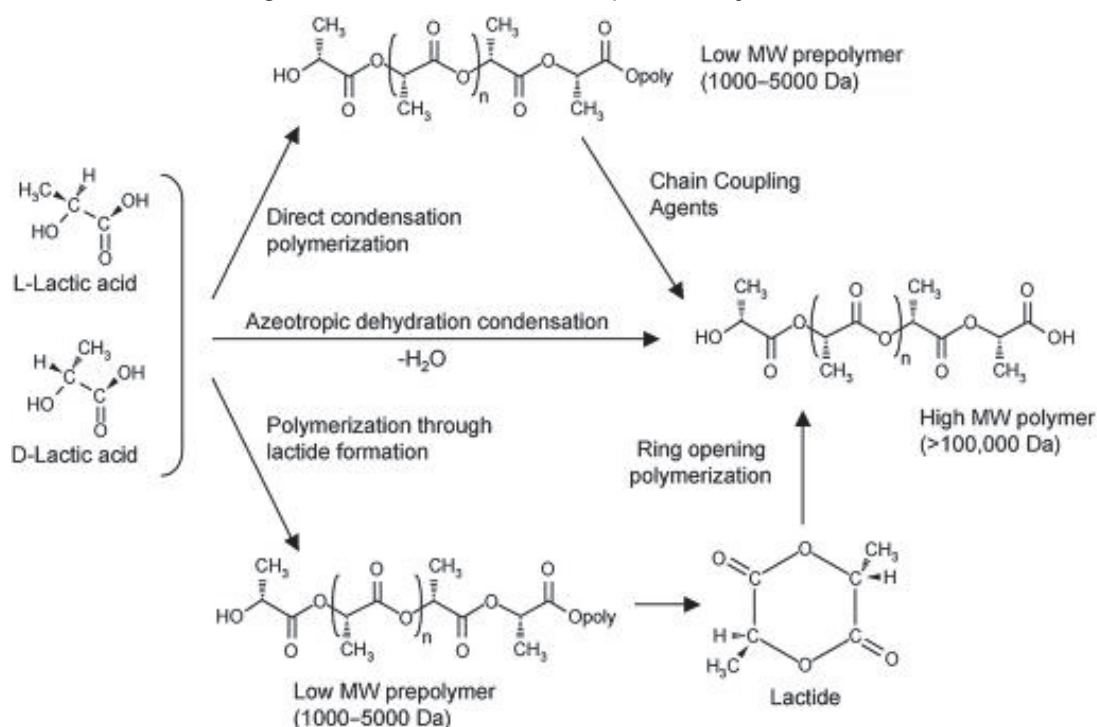
O PLA pode ser gerado, principalmente, por duas rotas de síntese de polimerização: por condensação direta, o que inclui os métodos de estado sólido (SSP

- *solid state polymerisation*) e azeotrópica, ou por abertura de anel (*ROP - ring opening polymerisation*), sendo este último o método mais comumente utilizado na produção industrial do biopolímero (GUPTA; KUMAR, 2007).

Na polimerização por condensação direta, o ácido láctico é desidratado para formar oligômeros, os quais são posteriormente convertidos em PLA, na presença de um catalisador e sob pressão reduzida. O polímero resultante apresenta baixo peso molecular, e sua estereorregularidade não pode ser controlada, o que compromete as propriedades mecânicas, tornando-as inferiores em comparação às aquelas de polímeros de alto peso molecular (BALLA *et al.*, 2021; GUPTA; KUMAR, 2007).

Para realizar o processo de polimerização por abertura de anel (ROP) do PLA, o ácido láctico é inicialmente convertido em lactídeo, um intermediário cíclico obtido por meio do craqueamento térmico do oligômero de PLA. Em seguida, um catalisador é adicionado sob pressão reduzida, promovendo a abertura do anel e permitindo que as unidades monoméricas se liguem de forma repetitiva, resultando na formação de longas cadeias poliméricas. Esse método permite a obtenção de um polímero de alto peso molecular e maior qualidade, devido à possibilidade de controle estereoquímico e à melhor distribuição de massa molar (HU *et al.*, 2016; KAN *et al.*, 2018; VAKATI *et al.*, 2024).

Figura 6 – Rotas de síntese de polimerização do PLA.



Fonte: Jain, Khan, Kyzioł (2019).

Os métodos mais comuns utilizados na indústria para a produção de materiais poliméricos incluem extrusão, moldagem por injeção e termoformagem, a ser definido conforme objetivo da aplicação e propriedades requeridas ao produto (TRIVEDI; GUPTA; SINGH, 2023).

Devido à presença do grupo alquil, impedindo a hidrólise do PLA, e à sua resistência ao ataque de bactérias, a etapa de biodegradação deve oferecer condições específicas de solo, luz, temperatura e umidade, para que seja efetiva. Em geral, o PLA é submetido à hidrólise sob altas temperaturas, processo que pode ser acelerado pela adição de ácidos ou bases, até que sua massa seja reduzida a um ponto que permita a digestão por micro-organismos, levando à produção de água e gás carbônico (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016). A compostagem representa a etapa final do ciclo do PLA, conforme Figura 6, promovendo a renovação do solo para o cultivo de novos produtos agrícolas.

Figura 7 - Ciclo do PLA na natureza.



Fonte: Página da Shenzhen Zhenghao Plastic & Mold Co., Ltd.¹

Na fase de compostagem, a taxa de degradação do PLA é influenciada por diversos fatores relacionados ao biopolímero, como peso molecular, cristalinidade e

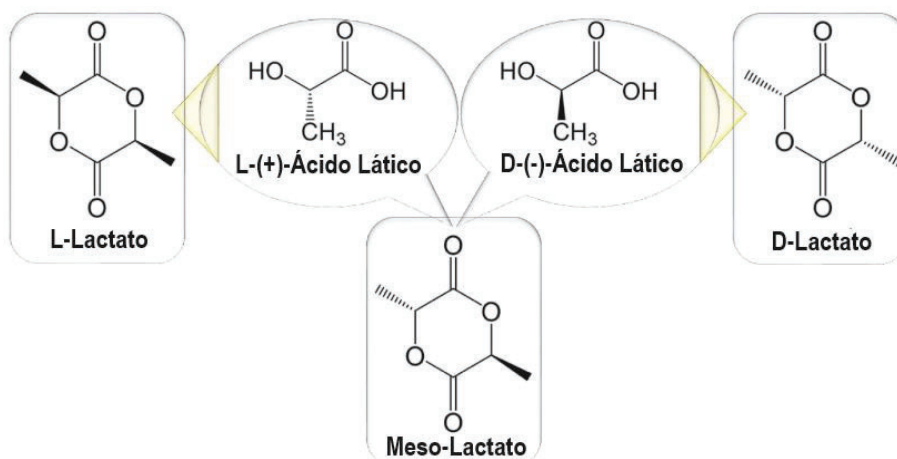
¹ Disponível em: <<https://www.plasticbottlesupplier.com/news/pla.html>>. Acesso em: 14 dez. 2023.

atividade microbiana. Além disso, o tempo necessário para a decomposição do PLA também é condicionado às características do solo, como temperatura, pH, umidade e a presença de micro-organismos. Em ambientes naturais, o processo de degradação pode levar mais de um ano. Em contrapartida, sob condições ideais, como nas operações de compostagem industrial, esse período pode ser reduzido para poucos meses (GOTO *et al.*, 2020; VAID *et al.*, 2021; WILFRED *et al.*, 2018).

Como o ácido láctico é uma molécula quiral, a estrutura química do PLA pode variar entre os estereoisômeros, L-(+)-ácido láctico e D-(-)-ácido láctico, dependendo do tipo de síntese, biológica ou química. Ambos os métodos são empregados na indústria, resultando em materiais com características diferenciadas de acordo com a estereoquímica (BRITO *et al.*, 2011; CASALINI *et al.*, 2019).

Quando a síntese é biológica, há predominância na formação do L-(+)-ácido láctico (PLLA), semicristalino e de baixo peso molecular. Devido à sua relação com o metabolismo celular, o PLLA é amplamente aplicado na biomedicina, pois *in vivo* pode ser eliminado pelo corpo humano sob a forma de água e/ou gás carbônico dos pulmões, evitando riscos à saúde ou rejeições. Já no procedimento químico, é gerada uma mistura de ambos enantiômeros, resultando no copolímero poli-D,L-láctico (PDLLA), amorfo e de maior peso molecular, com o benefício da possibilidade de ajuste entre as proporções de cada forma. Na etapa intermediária, ocorre a formação do lactato, o qual é polimerizado por abertura de anel, levando à formação das duas formas estereoisoméricas do ácido láctico (BRITO *et al.*, 2011; TEMANE; ORASUGH; RAY, 2023).

Figura 8 - Formas enantioméricas do ácido láctico.



Fonte: Temani *et al.* (2023).

Como a síntese de produção do PLA pode ser feita por diferentes rotas (condensação direta, azeotrópica ou abertura do anel) já vistas, a sua escolha influenciará na cristalinidade, no peso molecular e nas proporções de PDLLA e PLLA, gerando uma extensa variedade de polímeros e copolímeros (OLIVEIRA; BORGES, 2020).

As principais características que tornam vantajoso o PLA são: a biodegradabilidade, pois em condições adequadas de compostagem pode ser decomposto por micro-organismos; a biocompatibilidade e a absorção biológica, que o torna seguro para aplicações nas indústrias médicas, odontológicas, farmacêuticas e alimentícias; boas propriedades mecânicas, como rigidez e resistência, permitindo uma ampla gama de aplicações; técnicas simples de processamento, podendo ser fabricado por métodos de extrusão, injeção e moldagem térmica; estabilidade térmica e transparência, o que o torna útil para embalagens que necessitam dar visibilidade a um produto, como as de alimentos, podendo ainda ser tingido para garantir maior proteção contra raios UV; consumo de CO₂ na síntese; e baixo gasto energético para produção. Essas propriedades tornam o PLA um bom substituto dos polímeros convencionais, derivados do petróleo, oferecendo menor impacto ambiental. A principal desvantagem ainda reside em seu alto custo em comparação aos demais plásticos comerciais (FATHIMA *et al.*, 2018; LU; SHUAI; YANHUA, 2019).

Devido à versatilidade proporcionada ao PLA, há uma gama de aplicações industriais que o utiliza como insumo, tais como: fábricas de embalagens de descartáveis e de alimentos, por formar filmes que apresentam barreira ao vapor d'água e ao oxigênio, aumentando a durabilidade do que reveste; medicina e farmacologia, por ser maleável e biocompatível, capaz de formar fios de sutura, e sendo útil para implantes, substitutos de pele, dispositivos médicos e liberação de fármacos; tecidos, podendo ser combinado a outras fibras têxteis; entre outros bens de consumo (OLIVEIRA; BORGES, 2020).

Na aplicação do PLA em embalagem de alimentos, pesquisas apontam que a migração do ácido láctico para o alimento é considerada reduzida e segura, pois ocorre em concentrações inferiores às já presentes em muitos alimentos, o que torna o PLA uma opção viável. Ele também já vem sendo utilizado em embalagens ativas, em combinação com aditivos, e possui certificação *GRAS* (*generally recognized as safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (CASTRO-AGUIRRE *et al.*, 2016; FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; XIAO *et al.*, 2012). A principal

aplicação comercial do PLA nessa área é na confecção de descartáveis, como copos, garrafas, bandejas, filmes para revestimento e demais embalagens em geral (OLIVEIRA; BORGES, 2020).

Os principais pontos negativos do PLA são o restrito desempenho mecânico e as baixas tenacidade e resistência às altas temperaturas e aos raios UV. Para a melhoria dessas propriedades e redução do custo, são adotadas estratégias como a criação de blendas do PLA com outros materiais, incluindo polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis, fibras, micro e nanopartículas, plastificantes (como glicerol e sorbitol), entre outros, capazes de oferecer um produto mais flexível e resistente. Além disso, o PLA poder ter algumas características, como cristalinidade e PF, ajustadas pelo controle da isomeria de seus monômeros durante a síntese (CASTRO-AGUIRRE *et al.*, 2016; OLIVEIRA; BORGES, 2020).

1.4.1 Incorporação de nanomateriais ao PLA

A combinação de nanopartículas inorgânicas ao PLA tem demonstrado melhorias significativas em suas características físicas e químicas, ampliando o seu potencial para diversas aplicações ao atuar como reforço ao biopolímero, especialmente no setor de embalagens alimentícias. A incorporação desses nanomateriais, como nanopartículas de argila, sílica, óxidos metálicos e óxido de grafeno, melhora substancialmente as propriedades antimicrobianas, mecânicas e de barreira do PLA. Esses nanocompósitos colaboram para o aumento da resistência à tração, do módulo elástico e da estabilidade térmica do PLA, além de reduzirem a permeabilidade a gases, como oxigênio e vapor de água, fatores cruciais para prolongar a vida útil dos alimentos embalados. A dispersão adequada das nanopartículas cria uma rede que dificulta a difusão de moléculas, tornando o material mais eficiente em termos de proteção, ao mesmo tempo em que mantém sua biodegradabilidade (MULLA *et al.*, 2021; RAY; OKAMOTO, 2003).

O PLA é amplamente empregado em impressões 3D, em virtude de sua facilidade de processamento e de suas propriedades favoráveis como a baixa emissão de vapores quando aquecido e ao excelente acabamento superficial. No entanto, sua resistência térmica é relativamente baixa, com uma temperatura de transição vítrea em torno de 60°C. A adição de nanomateriais é capaz de melhorar a fluidez do PLA, auxiliando nos processos de extrusão e de deposição durante a impressão. Os nanocompósitos ampliam os atributos mecânicos do PLA, levando à criação de peças

mais robustas e duráveis, além de promover melhor adesão entre as camadas impressas, resultando em produtos com melhor integridade estrutural. (BIKIARIS *et al.*, 2023).

Outra vantagem da integração de nanomateriais à matriz polimérica é a melhora significativa da resistência térmica, pois há uma elevação da temperatura de transição vítrea, o que torna possível a aplicação do PLA em ambientes de altas temperaturas, superando as limitações da forma pura do material (BIKIARIS *et al.*, 2023; MULLA *et al.*, 2021).

Na área biológica, a adição de ZnO NPs ao PLA resulta em um material com considerável atividade antimicrobiana, sendo altamente eficaz contra bactérias patogênicas. Esse fator contribui para aplicações em dispositivos biomédicos e na engenharia de tecidos. Por se tratar de um biopolímero combinado com um óxido atóxico, ZnO, componente natural do organismo, essa combinação é segura, biocompatível e colabora para o crescimento celular, o que torna esse material ideal para aplicações de regeneração tecidual. Essas melhorias tornam os nanocompósitos PLA-ZnO uma escolha promissora para o desenvolvimento de biomateriais avançados (CHONG *et al.*, 2023).

1.4.2 Incorporação de quitosana ao PLA

Conforme explorado no item 1.3, a quitosana é um dos polímeros mais abundantes na natureza, sendo especialmente conhecida por suas propriedades antimicrobianas naturais (GRANDE; CARVALHO, 2011).

A incorporação da quitosana ao PLA potencializa sua atividade antibacteriana, tornando-o mais eficaz contra patógenos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essa combinação também aumenta a biocompatibilidade, a bioatividade e a capacidade de retenção de umidade do material, criando um ambiente favorável para adesão e proliferação celular, essencial em processos de regeneração para aplicações em engenharia de tecidos e de dispositivos médicos. Outro benefício desta combinação é a capacidade de acelerar o processo de biodegradação do material, tornando-o mais adequado para aplicações sustentáveis e biomédicas (NAZEER *et al.*, 2020; SURYANI *et al.*, 2020).

As propriedades mecânicas do PLA também são aprimoradas pela quitosana, resultando em *scaffolds* mais robustos que suportam a carga mecânica durante o processo de cicatrização (NAZEER *et al.*, 2020).

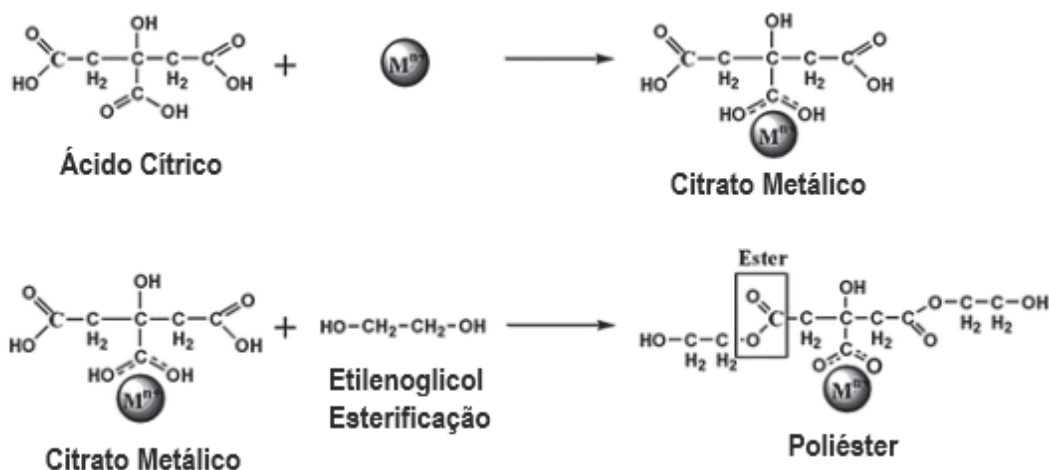
A natureza hidrofóbica do PLA limita suas interações com a água, mas a adição de quitosana no desenvolvimento de filmes compósitos reduz essa característica, ampliando as propriedades de barreira à umidade do material (SÉBASTIEN *et al.*, 2006). Essa modificação não apenas aprimora o desempenho mecânico e a estabilidade térmica do PLA, como também aumenta sua durabilidade, tornando-o adequado para uso em embalagens (SURYANI *et al.*, 2020).

Por fim, o uso da quitosana em biopolímeros para embalagens bioativas e biodegradáveis é de grande interesse, pois atende à crescente demanda por alternativas que minimizem os prejuízos causados pelos poluentes plásticos (CHEN; DONG; CHEUNG, 2005; SÉBASTIEN *et al.*, 2006).

1.5 Método Pechini

O método dos precursores poliméricos ou Pechini, desenvolvido em 1967 pelo americano Maggio P. Pechini, consiste na formação de citratos metálicos, por meio da interação entre um ácido hidrocarboxílico e um cátion metálico. Em seguida, acrescenta-se um poliálcool ao quelato, como o etilenoglicol, o que, junto ao aumento da temperatura, promove as reações de esterificação e poliesterificação culminando na formação de uma resina polimérica. Esse gel é submetido à calcinação, para eliminação da matéria orgânica e obtenção do óxido metálico de interesse. Nesse processo, forma-se um poliéster homogêneo com os cátions distribuídos uniformemente em sua estrutura (COSTA *et al.*, 2018; DIMESSO, 2016; PECHINI, 1967).

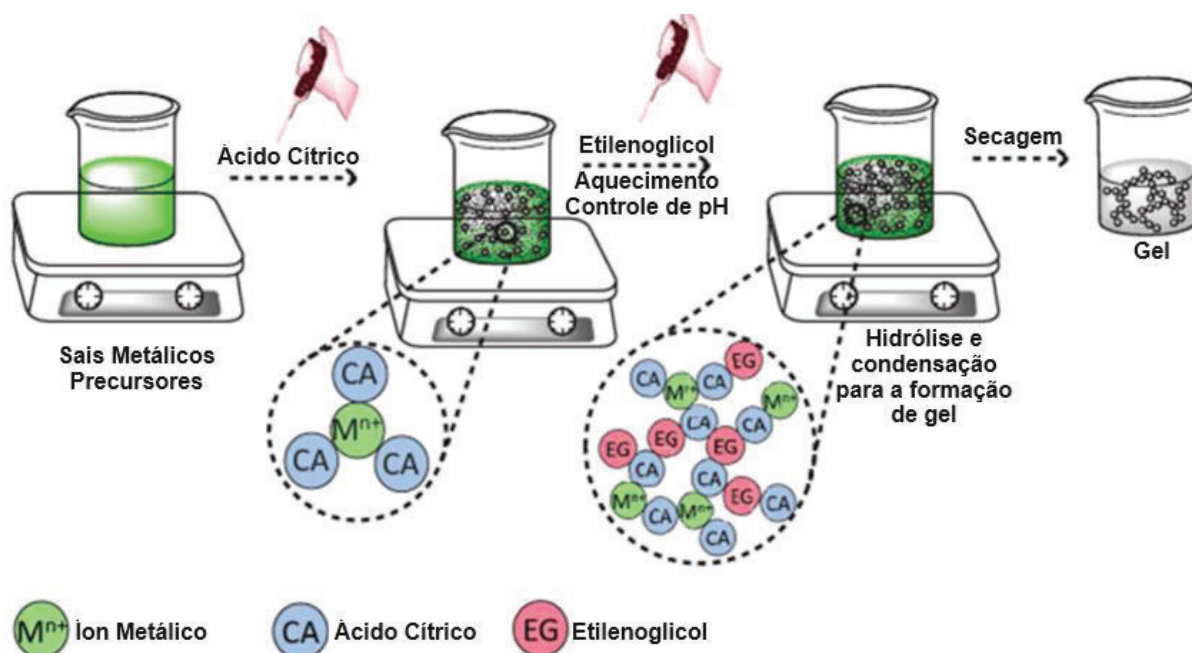
Figura 9 - Esquema de Reação de Polimerização – Método Pechini.



Fonte: Dimesso (2016).

Em relação a outros tipos de síntese, o método Pechini apresenta vantagens significativas, tais como: produtos com alto grau de homogeneidade e pureza, devido à distribuição uniforme dos componentes em todo o material e à presença mínima ou inexistente de resíduos orgânicos.; operação a baixas temperaturas, o que resulta em economia energética e possibilita o processamento de materiais termossensíveis; controle preciso do tamanho e da estequiometria das nanopartículas, pelos ajustes das proporções entre os reagentes e variando-se a temperatura de calcinação; simplicidade de execução, facilitando adaptações conforme as necessidades de cada material; capacidade de criar substâncias complexas a partir de diferentes precursores metálicos em uma mesma solução; e o baixo custo do processo (COSTA *et al.*, 2008; PECHINI, 1967).

Figura 10 - Etapas do método Pechini para formação da resina polimérica.



Fonte: Plataforma de livros digitais Ebrary.net²

Apesar das inúmeras vantagens, o método Pechini também apresenta algumas limitações. Como ele é constituído de várias etapas e requer horas de forno, tem um processamento lento. As proporções estequiométricas devem estar cuidadosamente ajustadas, sendo necessário um controle rigoroso das temperaturas para evitar a

² Disponível em: <https://ebrary.net/191957/engineering/sol_gel_processing>. Acesso em: 20 dez. 2023.

presença de impurezas no produto. Nesta situação, a maior dificuldade é que, para a eliminação completa da matéria orgânica, são requeridas altas temperaturas, o que, contudo, pode levar à formação de aglomerados, comprometendo as propriedades das nanopartículas. Outro fator negativo é a necessidade do uso de grandes volumes de reagentes orgânicos e a toxicidade do etilenoglicol. Embora o método proporcione controle do tamanho e da estequiometria, não é possível o controle morfológico, como ocorre, por exemplo, na rota sol-gel, por ajustes do pH. Apesar do controle do tamanho e estequiometria proporcionados, essa síntese não permite o controle morfológico, como ocorre, por exemplo, na rota sol-gel, por meio do ajuste do pH. Devido a estes fatores, a produção por essa metodologia fica restringida, sendo mais adequada para aplicação em menores escalas (PECHINI, 1967; ROCHA; MUCCILLO, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar as propriedades antimicrobianas de filmes finos à base de poli (ácido láctico), PLA, incorporados com nanopartículas de ZnO e quitosana, visando aprimorar suas propriedades para aplicação como material de embalagem para alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

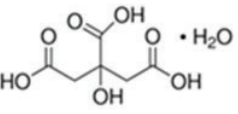
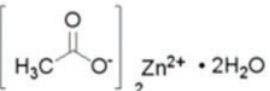
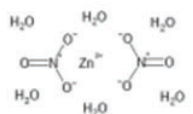
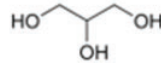
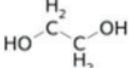
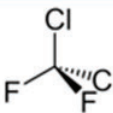
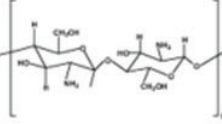
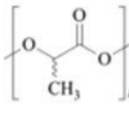
- Sintetizar nanopartículas de ZnO utilizando o método Pechini, variando-se os precursores (acetato, cloreto e nitrato de zinco) e a temperatura de calcinação (600°C e 800°C);
- Desenvolver filmes de PLA e incorporar ZnO NPs e quitosana a estes;
- Aplicar técnicas de caracterização às ZnO NPs para confirmar a formação do óxido e identificar a forma, o tamanho, a pureza, a cristalinidade e a estabilidade coloidal; e, aos filmes de PLA para verificar a dispersão das nanopartículas de ZnO e quitosana no material, a interação entre os componentes e as características morfológicas presentes.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes de PLA incorporados com ZnO NPs e quitosana contra patógenos alimentares, por meio de cultura de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Comparar os resultados obtidos com um padrão de referência e com dados da literatura.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Os reagentes aplicados na síntese das ZnO NPs e no desenvolvimento dos biofilmes à base de PLA, com suas respectivas marcas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na síntese das ZnO NPs e Filmes a base de PLA.

REAGENTES	COMPOSIÇÃO	REPRESENTAÇÃO	MARCA	PUREZA
Ácido Cítrico Mono-hidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$		Dinâmica	99,0 - 102%
Acetato de Zinco Di-hidratado	$(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$		Sigma-Aldrich	99,999%
Cloreto de Zinco	$ZnCl_2$		Dinâmica	Mín. 99%
Nitrato de Zinco Hexa-hidratado	$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$		Dinâmica	96 - 103%
Glicerina Bi-destilada	$C_3H_8O_3$		Dinâmica	Mín. 99,5%
Etilenoglicol	$C_2H_6O_2$		Dinâmica	Mín. 96%
Diclorometano	CH_2Cl_2		ECIBRA	≥ 99,8%
Quitosana	$(C_6H_{11}O_4N)_n$		Sigma-Aldrich	99,999%
Ácido Polilático (PLA)	$(C_3H_4O_2)_n$		Esun	—

Fonte: Elaboração própria.

O PLA, da marca Esun, utilizado como polímero de base, foi obtido na forma de filamento para impressora 3D, na cor natural (transparente). Não foi aplicado nenhum tratamento prévio ao material, apenas realizada sua limpeza com álcool.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese das ZnO NPs

As nanopartículas de ZnO foram sintetizadas pelo método dos precursores poliméricos (Pechini), a partir da mistura de soluções de ácido cítrico mono-hidratado e sal de zinco (cloreto de zinco, nitrato de zinco hexa-hidratado e acetato de zinco di-hidratado) na proporção molar de 3:1 (ácido cítrico: cátion metálico). A solução foi mantida sob agitação constante por aproximadamente 2 horas, a uma temperatura de 80°C. Posteriormente, etilenoglicol foi adicionado em uma razão de 40/60 (%m/m) em relação ao ácido cítrico. A temperatura foi então elevada a 120°C, para a completa evaporação da água e formação da resina polimérica.

Para o processo de pirólise, o material foi submetido a aquecimento em mufla a 400°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, por 3 horas. Esse processo resultou na formação de um poliéster com aspecto de espuma escura e brilhante, conhecido como "puff". A pirólise é uma etapa importante, pois promove a remoção da matéria orgânica, previne a aglomeração dos precursores metálicos e oferece uma distribuição mais homogênea na morfologia e no tamanho das nanopartículas. A calcinação direta poderia causar a fusão ou sinterização das partículas, resultando em uma maior perda de controle sobre a morfologia e o tamanho das partículas (PECHINI, 1967; WANG; LIU; ZHANG, 2003).

O poliéster resultante passou por processo de desaglomeração manual em almofariz e pistilo de porcelana até a obtenção de um pó fino, o qual foi dividido em duas porções, dispostas em barcas de porcelana.

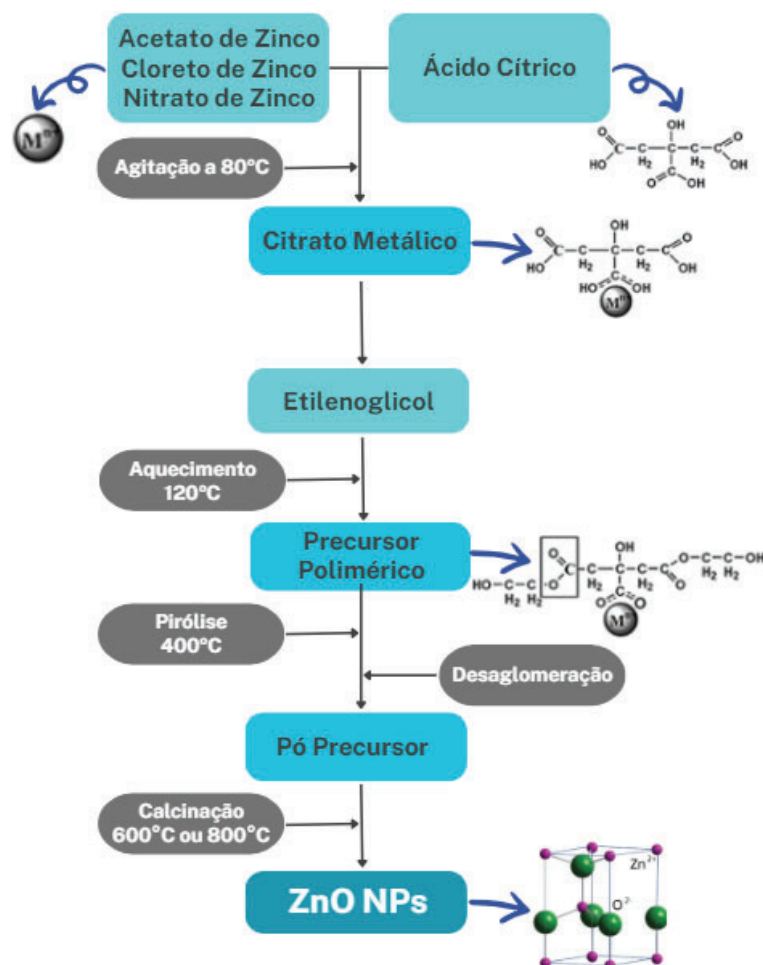
Na etapa final, para obtenção das ZnO NPs, procedeu-se à calcinação em mufla a 600° para uma das amostras e a 800°C para a outra, ambas com taxa de aquecimento de 10°C/min, por 3 horas.

Esse procedimento foi repetido para cada um dos sais de zinco utilizados como precursores (acetato, cloreto e nitrato de zinco), resultando em um total de seis porções de ZnO NPs, para posterior comparação entre suas características. O cálculo

das quantidades foi efetuado para obtenção de 4g de ZnO NPs, que após a separação na calcinação, resultou em aproximadamente 2g de cada produto.

Os passos do método Pechini aplicados à síntese das ZnO NPs estão resumidos no fluxograma a seguir.

Figura 11 – Fluxograma da Metodologia de Síntese das ZnO NPs pelo método Pechini.



Fonte: Elaboração própria (2022).

3.2.2 Preparo de Filmes de PLA e PLA com incorporação de CS e ZnO NPs

Para a análise comparativa das propriedades antimicrobianas do PLA, da quitosana e do óxido de zinco (ZnO), foram produzidos seis discos de filme:

- PLA;
- PLA + ZnO (600°C);
- PLA + ZnO (800°C);
- PLA + Quitosana;
- PLA + Quitosana + ZnO (600°C);
- PLA + Quitosana + ZnO (800°C)

Após a caracterização das ZnO NPs, foram escolhidas para a preparação dos filmes as amostras sintetizadas a partir do precursor ZnCl_2 , devido à maior cristalinidade e homogeneidade das nanopartículas.

3.2.2.1 Filmes de PLA

Os filmes de PLA foram preparados pela dissolução de 200 mg de PLA em 5 ml de diclorometano (DCM), por cerca de 24 horas. Após o desmanche completo do PLA, a mistura foi mantida sob agitação constante em capela, a 1000 rpm, com a adição de 2 gotas de glicerol, por 30 minutos. A solução resultante foi vertida em uma placa de Petri de 7 cm de diâmetro e deixada na capela para secagem à temperatura ambiente por 48 horas, para melhor eliminação do solvente. O disco formado foi facilmente removido da placa com o auxílio de uma espátula.

As quantidades de PLA, DCM e glicerol foram padronizadas para todos os discos confeccionados, sendo a mesma base aplicada a todas as amostras, apenas com o acréscimo das ZnO NPs e da quitosana. As partículas foram adicionadas sem preparo ou dissolução, diretamente ao biopolímero.

3.2.2.2 Filmes de PLA + ZnO NPs (600°C e 800°C)

Os filmes de PLA com a incorporação de ZnO NPs foram preparados seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, adicionando-se 10 mg de ZnO NPs no início da agitação, a uma razão 20:1 (m/m). O procedimento foi realizado para ambas as amostras de ZnO NPs (600°C e 800°C de calcinação).

3.2.2.3 Filmes de PLA + Quitosana

O filme de PLA com adição de quitosana foi preparado com a mesma base de PLA, acrescentando-se 80 mg de quitosana à mistura e procedendo-se à agitação por cerca de 30 minutos.

3.2.2.4 Filmes de PLA + Quitosana + ZnO NPs (600°C e 800°C)

Para os filmes com incorporação das ZnO NPs (600°C e 800°C) e quitosana, conjuntamente, foram adicionadas as mesmas quantidades dos filmes isolados, ou seja, 10 mg de ZnO NPs e 80 mg de quitosana, à base do PLA.

3.3 Técnicas de Caracterização

As ZnO NPs obtidas a partir dos diferentes precursores — acetato de zinco, cloreto de zinco e nitrato de zinco — foram caracterizadas por meio das técnicas de Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman, Espectroscopia UV-Vis e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Potencial Zeta (PZ). Os filmes à base de PLA tiveram a caracterização realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia Raman.

3.3.1 Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é uma técnica que utiliza radiação eletromagnética, tendo comprimento de onda e frequência definidos, conforme fonte emissora. Os raios x são gerados por um tubo de raios catódicos e, por meio de um filtro, são convertidos em um feixe monocromático. Ao entrarem em contato com a amostra, as ondas podem ser refletidas ou difratadas, dependendo da disposição dos átomos no material, gerando interferências construtivas, quando há simetria na distância atômica e satisfaça a Lei de Bragg e, destrutiva nos espaçamentos, pois as ondas ficam fora de fase. Um padrão de difração, contendo áreas claras e escuras, é gerado pelo espalhamento dos raios x, com posições características da estrutura cristalina (BUNACIU *et al.*, 2015; ZEVIN; KIMMEL, 1995).

Como cada material possui características específicas de espaçamento, a análise do padrão de difração permite identificar o material cristalino pela comparação com outros perfis conhecidos, presentes em bancos de dados de estruturas cristalinas, como, por exemplo, a base Crystmet, utilizada nesta caracterização, com acesso pelo portal BDEC (Bases de Estruturas Cristalinas). Também é possível obter informações sobre pureza, cristalinidade, tamanho do cristalito, microdeformações, estrutura e fase por meio da avaliação de um difratograma (BUNACIU *et al.*, 2015).

O desempenho das propriedades das nanopartículas está relacionado a fatores como o tamanho do cristalito e a cristalinidade (WANG *et al.*, 2014). Esses valores foram obtidos a partir do difratograma de cada amostra, por meio da integração dos picos e da aplicação de suas respectivas equações.

As medidas de raios X foram efetuadas às seis amostras de ZnO NPs, com o

objetivo de analisar a cristalinidade e a pureza das nanopartículas de óxido de zinco para cada sal precursor, bem como o determinar o tamanho aproximado dos cristalitos utilizando cálculos específicos do método gráfico de Williamson-Hall (W-H). O difratômetro utilizado foi da marca Rigaku, modelo RINT 2000, operado nas condições 40kV e 150 mA, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), velocidade de varredura de $0,02^\circ$ por minuto, e intervalo (2θ) de 10° a 80° , à velocidade de $0,5^\circ \text{ min}^{-1}$.

3.4.1.1 Cálculo da porcentagem de cristalinidade

A cristalinidade é um fator que representa a organização dos átomos de um material. Na difração de raios X, o padrão dos picos e a intensidade permitem avaliar esse parâmetro. Elevados índices de cristalinidade representam uma estrutura homogênea e organizada, enquanto a presença de mais bandas amorfas, ou seja, menor cristalinidade, levará a picos mais dispersos, sinalizando uma estrutura desordenada (ZEVIN; KIMMEL, 1995).

O cálculo da porcentagem de cristalinidade foi realizado utilizando os softwares Origin e Excel, pela integração dos picos cristalinos e da banda amorfa, obtendo suas áreas e substituindo-as na equação abaixo.

$$\text{Cristalinidade (\%)} = \frac{\text{Área dos picos cristalinos}}{\text{Área de todos os picos (cristalinos+amorfos)}} \times 100 \quad (6)$$

3.4.1.2 Cálculo do tamanho médio do cristalito – Equação de Scherrer e Método gráfico de Williamson-Hall (W-H)

O método gráfico de Williamson-Hall (W-H), aplicado na cristalografia, é uma técnica que utiliza o alargamento dos picos de difração de raios X para determinar o tamanho do cristalito, mas sem desprezar a microdeformação do material em análise. A fórmula de Scherrer, por outro lado, não leva em conta as microestruturas da rede, considerando apenas o tamanho do cristalito pelo alargamento dos picos de DRX. Durante a formação de nanocristais policristalinos, os defeitos pontuais e interfaciais, causados pelos limites de grãos, junções triplas e falhas de empilhamento, tornam a deformação inerente. Assim, tanto o tamanho do cristalito quanto a deformação da rede contribuem para o alargamento dos picos da DRX (NATH; SINGH; DAS, 2020; PRABHU *et al.*, 2014).

Os cientistas Williamson e Hall propuseram um método que engloba ambos os parâmetros em função de 2θ , após observarem que os perfis de alargamento seguiam

o formato de curvas Lorentzianas. Com isso, desenvolveram matematicamente uma expressão que considera a largura do pico de difração, o tamanho médio de partícula e a microdeformação (NATH; SINGH; DAS, 2020; PRABHU *et al.*, 2014).

Nos dados obtidos na DRX, o alargamento total dos picos (β_T) é resultado da combinação do tamanho do cristalito (β_D) e das microdeformações (β_ε):

$$\beta_T = (\beta_D) + (\beta_\varepsilon) \quad (7)$$

Pela equação de Scherrer, temos que:

$$D = \frac{K \gamma}{\beta_D \cos \theta}, \text{ logo } \beta_D = \frac{K \gamma}{D \cos \theta} \quad (8)$$

Na qual, β_D é o FWHM (ou seja, alargamento do pico) em radianos; o fator de forma, $K=0,9$; o comprimento de onda da fonte de raios X, $\gamma=0,15406$ nm; o tamanho do cristalito D ; e θ a posição do pico em radianos.

O alargamento do pico de DRX em função da microdeformação se dá por:

$$\beta_\varepsilon = 4 \varepsilon \tan \theta \quad (9)$$

Substituindo as equações (8) e (9) na (7), temos:

$$\beta_T = \frac{K \gamma}{D \cos \theta} + 4 \varepsilon \tan \theta \quad (10)$$

Reorganizando, substituindo a tangente:

$$\beta_T \cos \theta = \varepsilon (4 \sin \theta) + \frac{K \gamma}{D} \quad (11)$$

A equação (11) representa uma linha reta, na qual ε é o gradiente (inclinação) e $\frac{K \gamma}{D}$, a interceptação em y. A equação geral da reta é dada por:

$$y = mx + c \quad (12)$$

Sendo “m” a inclinação da reta e “c” a interceptação y, em comparação à equação (11):

$$y = \beta_T \cos \theta \quad (13)$$

$$m = \varepsilon \quad (14)$$

$$x = 4 \sin \theta \quad (15)$$

$$c = \frac{K \gamma}{D} \quad (16)$$

Para a plotagem, o eixo x será $(4 \sin \theta)$ e o eixo y, $(\beta_T \cos \theta)$. O valor de “m” representa a deformação (ε), e o tamanho dos cristalitos é calculado a partir da interceptação em y ($K \gamma/D$).

A diferença, em relação à equação de Scherrer, é que ela utiliza a dependência $1/\cos \theta$, mas não $\tan \theta$, como método de plotagem W-H. Através da inclinação da curva é possível obter informações sobre o tamanho médio do cristalito e, por meio da

intersecção com o eixo das ordenadas, a microdeformação do material (DEVESA *et al.*, 2021; PRABHU *et al.*, 2014).

O tamanho do cristalito foi calculado tanto pela equação de Scherrer quanto pelo método de plotagem de Williamson-Hall, permitindo uma análise comparativa entre as duas abordagens.

3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A radiação infravermelha situa-se entre a luz visível e as micro-ondas no espectro eletromagnético. Seu espectro caracteriza-se como uma impressão digital da amostra, apresentando picos de absorção relacionados às frequências específicas, de acordo com os modos vibracionais moleculares das ligações atômicas que constituem o material. Como cada substância possui uma composição singular de átomos e ligações, o espectro de IR é único, permitindo a identificação da mesma (VEERASINGAM *et al.*, 2021).

Ao interagir com a amostra, parte da frequência da radiação IR incidida é absorvida e o restante é transmitida. Compostos que possuem momento dipolar absorvem de forma seletiva a radiação IR, de acordo com os grupos funcionais específicos que os compõem. A absorção de radiação IR por uma molécula se dá quando ela se encontra em seu estado fundamental (menor energia vibracional) e, ao receber energia, sofre transição para o estado vibracional excitado (maior energia). Essas transições são responsáveis pela geração de picos, capazes de identificar a composição química de substâncias, de acordo com a posição, a intensidade e o formato que apresentam (GUERRERO-PÉREZ; PATIENCE, 2020; THEAKSTONE *et al.*, 2021).

No espectro eletromagnético que compreende a faixa do IR há três regiões principais presentes: o infravermelho próximo (NIR), com faixa de comprimento de onda de 0,78 a 2,5 μm e número de ondas de 14.000 a 4.000 cm^{-1} , apresentando sensibilidade a tons harmônicos e às combinações vibracionais; o infravermelho médio (MIR), na faixa de comprimentos de onda no intervalo de 2,5 a 30 μm e número de ondas entre 4.000 e 400 cm^{-1} , relacionado às vibrações fundamentais das moléculas; e infravermelho distante (FIR), entre comprimentos de onda de 30 a 1000 μm , número de ondas na faixa de 400 - 10 cm^{-1} , aplicado nas investigações de rotações moleculares (VEERASINGAM *et al.*, 2021).

Desta forma, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

(FTIR) é uma técnica de caracterização utilizada para identificar os grupos funcionais presentes nas substâncias, conforme suas interações com a radiação infravermelha (MUHAMMAD *et al.*, 2019). Além da precisão, as vantagens da FTIR incluem praticidade operacional, metodologia simples, rápida execução, baixo custo, uso mínimo de reagentes, alta reprodutibilidade tanto quantitativa quanto qualitativa, sendo não destrutiva para as amostras e oferecendo alto refinamento analítico (THEAKSTONE *et al.*, 2021).

Com exceção dos gases diatômicos, todos os compostos covalentes apresentam um espectro IR característico. Os modos vibracionais são responsáveis pela frequência de absorção do infravermelho, enquanto a intensidade está relacionada a três fatores: a quantidade de radiação transmitida, a efetividade na transferência de energia para a molécula e a sensibilidade do detector (GUERRERO-PÉREZ; PATIENCE, 2020).

Esta técnica foi aplicada às seis amostras de ZnO NPs para identificar as espécies químicas presentes, com base nos grupos funcionais detectados na estrutura do material, e para analisar a presença de elementos indesejados dos precursores da síntese, como resquícios de sais de zinco.

O espectrômetro usado para a obtenção dos dados foi um Vertex 70, da marca Bruker Instruments, com diamante ATR e utiliza pastilhas de brometo de potássio (KBr), pelo método de refletância total, com varredura de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.3.3 Espectroscopia Raman

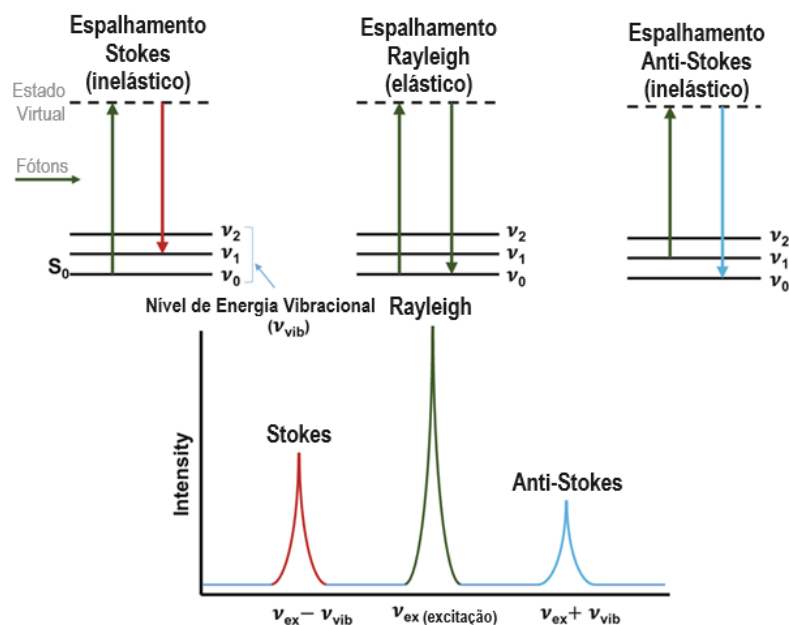
A espectroscopia Raman é uma ferramenta analítica de grande potencial, empregada na identificação de espécies químicas de maneira rápida e simples (CHO, 2020). Cada molécula possui um padrão específico de níveis energéticos, em função das transições de níveis, capazes de gerar espectros característicos que as identifique e forneçam, também, outras informações. Essa técnica permite realizar tais análises, e o efeito Raman é considerado uma boa opção para a confirmação da presença de determinada molécula e avaliação da pureza, com a vantagem de ser, atualmente, de fácil aplicação (STAVELEY, 1971).

A dispersão Raman consiste na radiação inelástica, espalhada de forma dispersa ao entrar em contato com a amostra, com diferentes frequências (ν_M) em relação à radiação monocromática incidente, ao contrário do que é visto no espalhamento de Rayleigh, que ocorre na mesma frequência (ν_0), de forma elástica.

Este fenômeno foi observado em 1928 pelo cientista indiano Chandrasekhara Venkata Raman. Essas frequências se dão de forma absoluta ($\nu = \nu_0 \pm \nu_M$), porém as bandas de deslocamento Raman estão relacionadas à mudança de frequência ($\nu - \nu_0$) = ν_M , fator característico das moléculas dispersas (KUDELSKI, 2008).

Ao ser gerado o espalhamento Raman, os comprimentos de onda da luz espalhada podem sofrer diminuição (Stokes Raman) ou aumento (anti-Stokes) (CHO, 2020). No espalhamento Stokes Raman, ao interagir com a radiação incidente, a molécula, que se encontra em seu estado fundamental, realiza uma transição ascendente entre os níveis energéticos E_1 e E_2 , absorvendo a energia $h\nu_M = E_1 - E_2$, a qual é abstraída da radiação de energia $h\nu_0$, resultando no espalhamento de uma radiação de baixa frequência, $\nu_0 - \nu_M$. No espalhamento anti-Stokes Raman, a transição realizada pela molécula, já em estado excitado, é descendente entre os níveis E_1 e E_2 de energia molecular, e tem como resultado a liberação da energia $h\nu_M = E_1 - E_2$, então adicionada à radiação incidente de energia $h\nu_0$, provocando o espalhamento de uma radiação de alta frequência, $\nu_0 + \nu_M$ (STAVELEY, 1971).

Figura 12 – Espalhamentos Rayleigh e Raman (Stokes e anti-Stokes).



Fonte: Cho, 2020.

Na espectroscopia Raman, em contraste às técnicas de espectroscopia infravermelha e ultravioleta, uma frequência ν_M , associada a uma transição entre dois níveis de energia molecular, dá origem às emissões nas frequências $\nu_0 + \nu_M$ e $\nu_0 - \nu_M$ quando a radiação incidente possui a frequência ν_0 . Pela ocorrência em moléculas

que se encontram em seu estado fundamental, o processo de Stokes é favorecido em relação ao anti-Stokes, apresentando maior intensidade, conforme demonstrado na figura 10, uma vez que este último envolve a transição de um estado energético mais elevado, pelo fato de as moléculas estarem em estado excitado.

Os deslocamentos Raman que envolvem frequências mais altas, ν_M , tendem a ser observados fracamente ou mesmo não serem detectados no espalhamento anti-Stokes. Sob temperaturas ambientes, o espectro anti-Stokes é de utilidade limitada para valores de ν_M acima de 1000 cm^{-1} , e geralmente só se registra o espectro vibracional Raman Stokes (STAVELEY, 1971 e CHO, 2020). Ao ser submetida aos espectros Raman, o comprimento de onda da luz incidente se modifica em contato com a substância, devido às diferenças vibracionais de energia, intrínsecas de cada molécula. Desta forma, a composição ou estrutura de um material químico pode se confirmar pelo espalhamento de luz Raman (CHO, 2020). Para esta finalidade, essa caracterização foi escolhida, junto às demais, sendo mais uma possibilidade de confirmar a composição do material sintetizado.

As medidas de Raman, referentes aos aspectos vibracionais dos grupos moleculares, foram realizadas em um equipamento Metrohm Raman Spectrometer, modelo i-Raman Plus 532H/EUA, aplicando-se um comprimento de onda de 532 nm e 100% de potência do nível do laser, em uma faixa de deslocamento Raman de 200 a 800 cm^{-1} . O espectro resultante foi obtido pela fusão de dez espectros, coletados em 60 segundos cada, totalizando seis minutos para cada amostra de ZnO NPs.

3.3.4 Espectroscopia UV-Vis

No espectro eletromagnético, a radiação UV-Vis abrange as faixas de ultravioleta (UV), na qual os comprimentos de onda são mais curtos, e do visível (Vis), com comprimentos de onda mais longos, compreendendo um intervalo de comprimento de onda de cerca de 180 a 800 nm (PASSES; SARAIVA, 2019). Embora alguns grupos absorvam abaixo de 200 nm, exceto em condições de vácuo, essa região é complexa para análise devido à absorção do oxigênio ocorrer abaixo de 200 nm. As transições de energia são frequentemente associadas a níveis eletrônicos, mas também podem ocorrer em escalas vibracionais quânticas (ANDERSON; BENDELL, 2004).

O método se baseia na Lei de Lambert-Beer, a qual estabelece uma relação matemática para a medição da absorção de radiação em diversas regiões do espectro

eletromagnético, como ultravioleta, visível e infravermelho e pode ser aplicado a amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Desta forma, a absorbância (A) é dada por (BEHERA, 2012; ROCHA; TEIXEIRA, 2004):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (17)$$

I_0 é a intensidade da radiação monocromática incidente na amostra; e

I é a intensidade da radiação emergente da amostra;

ε é o coeficiente de absorção molar;

c é a concentração da substância (mol/L);

l é o comprimento do caminho óptico através da solução (cm).

O funcionamento dos espectrofotômetros UV-Vis de feixe duplo baseia-se na incidência de dois feixes paralelos, onde um atravessa a amostra dissolvida e o outro atravessa apenas o solvente. O detector capta a intensidade transmitida no solvente (I_0) e a relaciona à intensidade da luz transmitida na amostra (I) (ANDERSON; BENDELL, 2004).

A absorção da radiação UV-Vis leva à promoção de um elétron do estado fundamental (E_1), de baixo nível energético, ao nível eletrônico excitado (E_2). Durante o processo há transições vibracionais e rotacionais, podendo o elétron, de E_1 , ser deslocado a qualquer um dos níveis de energia vibracional ou rotacional de E_2 , o que resulta em bandas amplas de absorção UV-Vis (ANDERSON; BENDELL, 2004).

As transições de elétrons entre orbitais não ligantes (n) e orbitais antiligantes (σ^*), assim como entre orbitais sigma ligantes (σ) e sigma antiligantes (σ^*), requerem uma quantidade maior de energia, o que leva a uma absorção na região do ultravioleta (UV). Por outro lado, as transições de elétrons entre orbitais pi ligantes (π) e pi antiligantes (π^*), que requerem menos energia, levam à absorção na região do UV-Vis. (PASSES; SARAIVA, 2019).

A espectrometria UV-Vis é amplamente utilizada como técnica analítica devido a suas diversas vantagens, incluindo sensibilidade, simplicidade, baixo custo, facilidade de operação, confiabilidade, flexibilidade, resposta rápida, necessidade de pequena quantidade de amostra e ausência de degradação da amostra (PASSES; SARAIVA, 2019; PENA-PEREIRA *et al.*, 2011).

Os espectros foram utilizados para analisar as amostras de ZnO NPs, com o objetivo de obter informações sobre sua composição química por meio da absorção em diferentes comprimentos de onda, e comparar os resultados com dados da

literatura. As medidas de refletância total e difusa foram realizadas com o espectrômetro LAMBDA 1050 UV/Vis/NIR da PerkinElmer, equipado com esferas de encaixe de 150 mm e detectores duplos de Si e InGaAs. O intervalo de varredura foi fixado entre 250 e 1000 nm. O ensaio foi realizado diretamente no material em pó das ZnO NPs, compactado sobre a superfície do porta-amostra até ficar nivelado com sua borda superior.

3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica eficaz e versátil, utilizada para caracterizar a composição química e investigar a morfologia de estruturas de materiais orgânicos, inorgânicos, metais e polímeros, em escalas nano (nm) e micrométricas (μm). A ampliação proporcionada pela MEV pode chegar a 300.000 vezes ou até 1 milhão em equipamentos modernos, gerando imagens de alta precisão (MOHAMMED; ABDULLAH, 2019; ZHOU, *et al.*, 2006). Quando aplicada a nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs), a MEV oferece informações detalhadas sobre a morfologia, distribuição de tamanho de partículas e aspectos da superfície, como porosidade e rugosidade.

Os principais itens que compõem um microscópio eletrônico de varredura são: o canhão eletrônico, responsável pela emissão de elétrons; o sistema de lentes, com a função de foco e direcionamento do feixe; a câmara da amostra, onde esta é inserida; os detectores, que coletam os sinais gerados, produtos da interação do feixe primário com a amostra, e os quais são ligados a uma tela e um sistema de fotografação; e, por fim, um sistema de vácuo que garante condições operacionais adequadas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; GOLDSTEIN *et al.*, 2003).

Para a análise, utiliza-se um feixe de elétrons de alta energia (de 100 a 30 mil eV), gerado normalmente por uma fonte térmica, sendo o filamento de tungstênio um dos mais utilizados, ou por um cátodo de emissão de campo elétrico. O feixe é focado em uma pequena região da amostra e varre sua superfície ponto a ponto, produzindo uma corrente de elétrons, que irá depender da energia com a qual os elétrons atingem a amostra. Essa corrente é ampliada e captada pelo detector, transmitindo uma imagem no tubo de raios catódicos (MOHAMMED; ABDULLAH, 2019; SMITH; OATLEY, 1955). Os sinais, oriundos da interação do feixe com a amostra, podem ser: elétrons secundários (SE), utilizados para determinar morfologia e topografia; elétrons

retroespalhados (BSE), comumente aplicados na definição da composição química; raios X próprios, auxiliando na identificação e quantificação dos elementos; além de outros fótons de diferentes energias (GOLDSTEIN *et al.*, 2003; SUN, C. *et al.*, 2020).

Desta forma, os MEVs podem ser associados a diferentes tipos de detectores, ampliando sua aplicabilidade e fornecendo resultados quali e semiquantitativos. Além disso, a MEV pode ser usada para investigar a agregação ou aglomeração das nanopartículas, fornecendo previsões sobre a sua estabilidade em dispersões ou matrizes (MOHAMMED; ABDULLAH, 2019; SUN, C. *et al.*, 2020). A técnica também pode fornecer informações sobre a cristalinidade das ZnO NPs, por meio da análise de difração de elétrons retroespalhados (EBSD), revelando dados sobre estrutura cristalina, orientação e defeitos.

As ZnO NPs foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura para avaliação das morfologias obtidas para cada um dos materiais, por meio de equipamento da marca Zeiss, modelo EVO LS-15. Para a análise, uma ponta minúscula de espátula da amostra foi dispersada em 1,0 ml de álcool isopropílico em um ependorf e, a seguir, mantida em banho ultrassônico por 30 min. Um pedaço de fita de carbono foi colada no stub e uma gota superficial foi colhida e depositada sobre a fita. A amostra secou à temperatura ambiente por 24 horas. Não foi realizado recobrimento com Au ou C em nenhuma das amostras.

Para os filmes, foi utilizado microscópio eletrônico de varredura (MEV) de alta resolução, equipado com um canhão de emissão de campo (FEG – Field Emission Gun) como fonte de elétrons, acoplado a um sistema de Espectrometria por Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), da marca Jeol, modelo JSM IT500-HR. As análises foram feitas diretamente nos filmes, sem necessidade de preparo ou recobrimento.

3.3.6 Potencial Zeta (PZ)

A medida de potencial zeta refere-se à diferença de potencial elétrico entre o meio de dispersão e a superfície de um material sólido. Quando misturada a um líquido, a carga superficial formada na superfície da partícula sólida atrai os íons de cargas opostas do líquido em suspensão, formando uma região conhecida como plano de deslizamento ou dupla camada elétrica. O zeta corresponde à magnitude do potencial nessa região de atração e repulsão eletrostática, o qual diminui com a distância do sólido. Esse parâmetro é crucial para determinar a estabilidade, pois representa o equilíbrio eletroquímico entre as partículas e o líquido em soluções

coloidais de nanopartículas (LUNARDI *et al.*, 2021; MANDAL; SHAW; WILLIAMS, 2022).

Altos valores de potencial zeta indicam uma forte repulsão entre as cargas, conferindo estabilidade ao sistema e impedindo a aglomeração de partículas. Por outro lado, potenciais zeta baixos ou inexistentes podem levar à formação de agregados ou floculação, uma vez que as forças de atração superam as forças de repulsão (HANAOR *et al.*, 2021).

Para as medidas de potencial zeta foi utilizado o instrumento Zetasizer Nano ZS, da empresa Malvern Instruments, lotada no Instituto de Química da Unesp de Araraquara (IQ-UNESP). A suspensão foi inicialmente preparada em pH 12, mediante a adição de NaOH $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O ajuste para os pHs inferiores foi realizado por injeção automática de solução de HCl, na concentração de $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, até que atingisse o valor de aproximadamente 2, com variações de 1 unidade de pH. As medições foram realizadas em triplicata para cada pH das amostras de ZnO NPs, e a partir dos resultados foram calculados as médias e os desvios padrão, resultando em onze valores por amostra, utilizados para a construção do gráfico.

3.4 Atividade Antimicrobiana: Método de Difusão em Disco de Ágar

Para investigar as propriedades antimicrobianas da matriz polimérica e a ação dos compósitos em sua estrutura, foi aplicado o método de difusão em disco em ágar, também conhecido como teste de sensibilidade a antimicrobianos ou antibiograma. Esse teste, idealizado por Bauer, Kirby, Sherris e Turck e publicado em 1966, se trata de um método laboratorial oficial utilizado para avaliar, *in vitro*, a suscetibilidade antimicrobiana de extratos ou compostos puros (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2015).

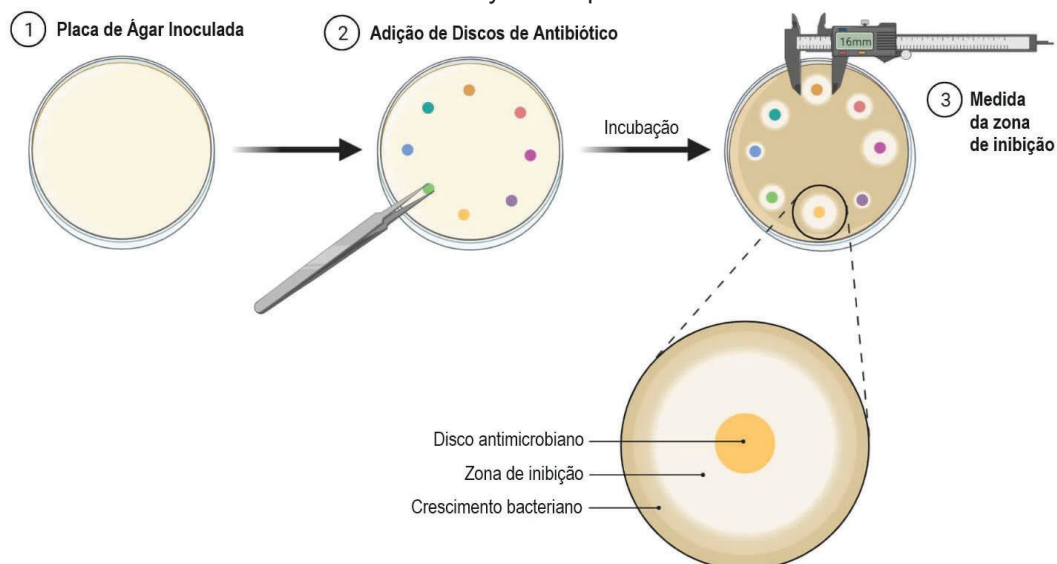
A aplicação deste método inicia-se com a adição de ágar estéril à placa de Petri para a criação de um meio de cultura, que será inoculado com o micro-organismo de teste por meio de espalhamento homogêneo na superfície do ágar. Discos de papel filtro (geralmente com 6 mm de diâmetro), contendo concentrações conhecidas de antimicrobianos, são colocados na superfície do ágar. Em seguida, a placa de Petri é incubada sob condições de tempo e temperatura adequadas ao desenvolvimento dos micro-organismos. A sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos, difundidos no ágar e inibindo o crescimento microbiano, é avaliada pela formação de

halos de inibição ao redor dos discos, cujos diâmetros são medidos para interpretação (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2015).

Os ensaios foram realizados em triplicata para todas as amostras de filmes: PLA, PLA+CS, PLA+ZnO (600°C), PLA+ZnO (800°C), PLA+CS+ZnO (600°C), PLA+CS+ZnO (800°C), com cepas oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* (25922), *Salmonella enterica* (14028), *Bacillus Cereus* (14579) e *Staphylococcus aureus* (6538), aplicando o método de difusão em ágar pela técnica do disco. Como controle positivo, foram utilizadas as substâncias puras cloranfenicol e imipenem, na concentração de 0,05 mg/mL.

A técnica do disco para determinar a atividade antibacteriana, inicia-se com o preparo do meio de cultura Agar Muller Hinton (AMH). Após seu resfriamento a 50°C, transfere-se 50 mL do meio para as placas de Petri esterilizadas, até que cheguem à espessura de 4 mm. O inóculo é então espalhado, utilizando-se um swab estéril, na superfície do ágar. O sistema é deixado em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Os discos de 6 mm (3 para cada amostra) são aplicados sobre a placa de Petri contendo a cultura bacteriana e mantidos em repouso por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se à incubação em estufa bacteriológica, a 36°C, por 18 horas.

Figura 13 – Método de difusão em disco Kirby Bauer para testes de suscetibilidade a antibióticos.



Fonte: Site educacional de microbiologia Microbe Notes.³

³ Disponível em: <<https://microbenotes.com/kirby-bauer-disc-diffusion/>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

Após a incubação, para melhor visualização dos halos de inibição, foram aplicados 8 mL de cloreto de trifeniltetrazólio em gel de ágar bacteriológico (1%), composto químico usado como revelador, nas placas de Petri de 20 x100 mm. As placas são novamente incubadas, por 30 minutos, a 37°C. Ao final, observa-se uma zona de inibição ao redor dos discos, pela qual se verifica a eficácia das propriedades antibacterianas do material em relação aos micro-organismos testados. Os halos de inibição foram medidos ao longo de todo o diâmetro da circunferência com o auxílio de uma régua milimetrada. Como as análises foram realizadas em triplicata, os valores obtidos se referem à média junto ao desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese nas ZnO NPs

A síntese das ZnO NPs foi realizada aplicando-se o método Pechini, que neste trabalho teve como partida o ácido cítrico e o sal de zinco, mantidos sob agitação constante e temperatura de 80°C, para liberação do cátion metálico Zn^{2+} . Após a formação do citrato metálico, ao adicionar o etilenoglicol e aumentar a temperatura até 120°C, ocorreu a reação de esterificação, resultando em uma resina polimérica com aparência de gel transparente, demonstrada na Figura 14(a).

Na etapa de pirólise, realizada a 400°C, a água foi evaporada, gerando uma espuma sólida expandida, composta por intermediários da reação, com coloração cinza brilhante, decorrente do aprisionamento de substâncias como CO e CO₂. Esta fase amorfa confirma a ocorrência das reações quelantes, como observado na formação homogênea do *puff* (KE *et al.*, 2021), ilustrado na Figura 14(b). O material macerado até sua redução a pó está representado na Figura 14(c).

Figura 14 – Síntese de ZnO NPs por Pechini. (a) resina polimérica - poliéster; (b) puff de poliéster; (c) poliéster macerado; (d) ZnO NPs.



Fonte: Autoria própria (2022).

Por fim, as ZnO NPs exibidas na Figura 14(d) foram obtidas após a calcinação da resina escura a 600°C e 800°C, resultando em um pó branco característico do ZnO. Altas temperaturas promovem a eliminação de matéria orgânica e de outras substâncias presentes no sal precursor, como por exemplo, o cloreto ou nitrato, além de favorecer a oxidação do metal, objeto da síntese.

A síntese de ZnO NPs gerou seis amostras, conforme Figura 15, com base nos sais precursores de zinco e nas temperaturas de calcinação:

- Acetato de Zinco (600°C);
- Acetato de Zinco (800°C);
- Cloreto de Zinco (600°C);

- Cloreto de Zinco (800°C);
- Nitrato de Zinco (600°C);
- Nitrato de Zinco (800°C).

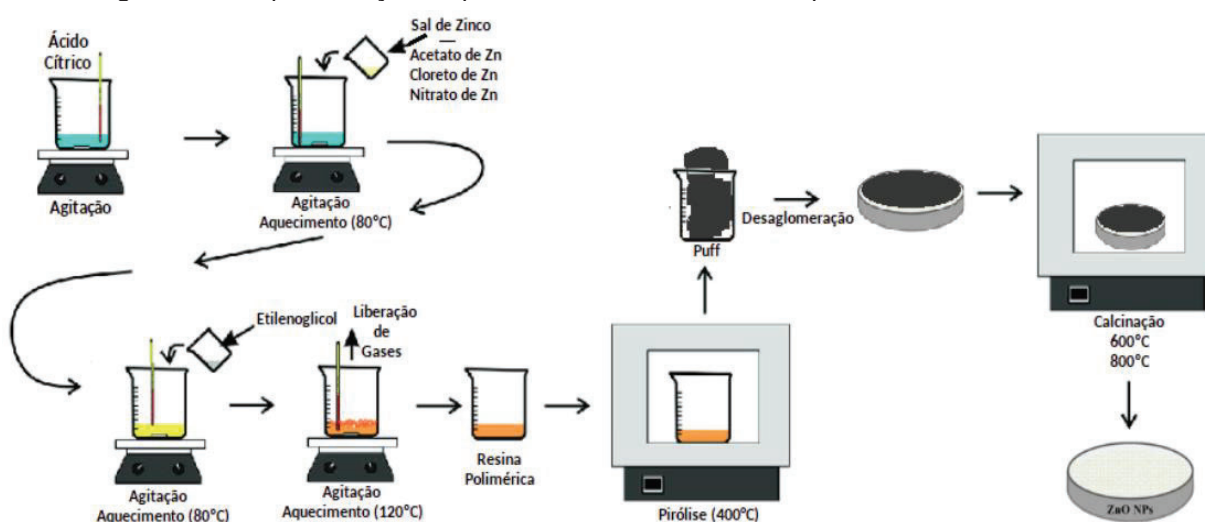
Figura 15 – Amostras de ZnO NPs, obtidas a partir de diferentes sais precursores e T de calcinação.



Fonte: Autoria própria (2022).

Após a síntese, verificou-se que o método Pechini é relativamente simples, de fácil execução, e consiste em quatro principais etapas: preparo da solução homogênea, gelificação, secagem/pirólise e calcinação. Essas etapas permitem a obtenção de nanopartículas a partir de sais inorgânicos, conforme esquematizado na Figura 16.

Figura 16 – Representação esquemática do Método Pechini para síntese de ZnO NPs.



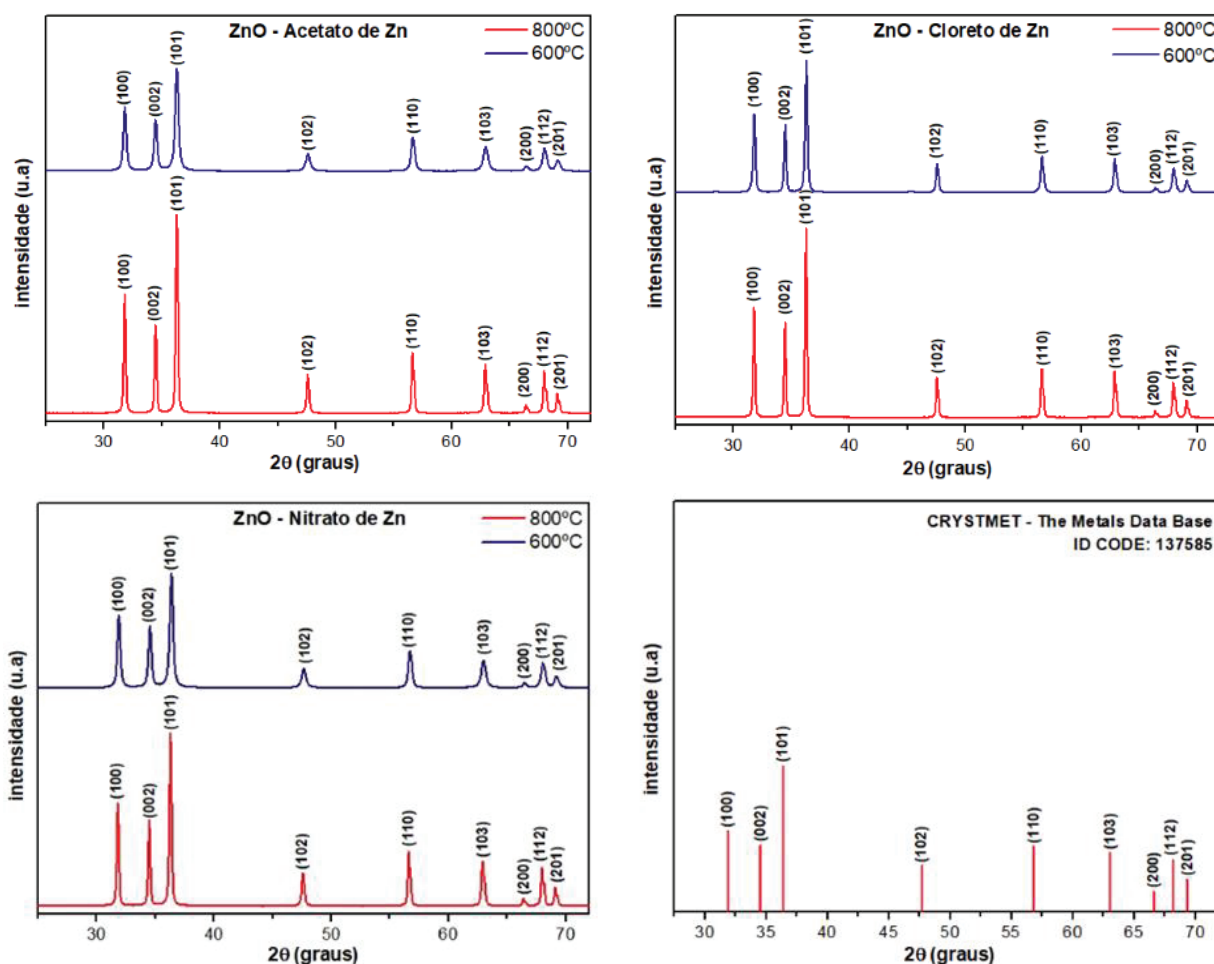
Fonte: Autoria própria (2023).

4.2 Caracterização das ZnO NPs

4.2.1 Difração de Raios X (DRX)

A Figura 17 apresenta os padrões de difração de raios X das ZnO NPs, para os três sais de zinco utilizados como precursores (acetato, cloreto e nitrato de Zn) e para as duas temperaturas de calcinação (600°C e 800°C), conforme indicado na legenda. O último difratograma corresponde ao padrão do ZnO, extraído da base de dados *Crystmet – The Metals Data Base*, cadastrados sob ID CODE 137585, e serve como referência para comparação com os picos obtidos. Os gráficos foram gerados no intervalo de ângulo 2θ , de 20° a 72°.

Figura 17 – Difratogramas de raios X das amostras de ZnO NPs.



Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados obtidos revelam picos de DRX em 2θ , que correspondem, respectivamente, aos espectros nas linhas de difração informados entre parênteses

sobre cada pico. Todos esses picos de difração de Bragg são característicos da estrutura hexagonal *wurzita* dos cristais de óxido de zinco, conforme os padrões da base de dados cristalográfica Crystmet (ID CODE 137585), que especifica dimensões de célula $a = b = 3,2427 \text{ \AA}$ e $c = 5,1948 \text{ \AA}$.

A análise dos difratogramas indica que, para as seis amostras, os picos são bem definidos e não há evidências de picos adicionais de impureza, o que sugere que as nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método Pechini apresentam alta pureza e cristalinidade. As intensidades dos picos se apresentaram proporcionalmente maiores com o aumento da temperatura de calcinação, evidenciado pelo alongamento e estreitamento dos picos nas amostras calcinadas a 800°C , em comparação às outras três amostras, submetidas à calcinação a 600°C .

Na DRX, a intensidade está diretamente relacionada à cristalinidade, ou seja, quanto mais compridos os picos, maior predominância da fase cristalina, pois representa a quantidade de radiação difratada devido às regiões cristalinas organizadas e bem definidas, presentes no material. A largura dos picos de difração está relacionada ao tamanho médio dos cristalitos presentes, conforme equação de Scherrer, que tem como divisor a largura à meia altura, β (FWHM). Desta forma, partículas menores exibem picos mais largos enquanto as maiores, picos mais afinados (ZEVIN; KIMMEL, 1995). Com base nessas informações e nos resultados da DRX para as nanopartículas de ZnO, constata-se que as amostras calcinadas a 800°C apresentam cristalitos maiores e maior cristalinidade em comparação às amostras submetidas a 600°C .

O índice de cristalinidade foi determinado pela razão entre a área dos picos cristalinos e a área total dos picos, multiplicada por 100 para obter a porcentagem, conforme indicado na Equação (6).

Os tamanhos médios dos cristalitos foram obtidos pelo método de plotagem de Williamson-Hall (W-H), utilizando o alargamento de todos os picos de difração, e pela equação de Scherrer. As duas formas de cálculo foram aplicadas com propósito comparativo, considerando a complexidade na determinação do tamanho de nanopartículas.

A integração dos picos, necessária para calcular as áreas e aplicar as fórmulas, foi realizada utilizando o software OriginPro 8.5.0 SR1. Os valores desses parâmetros estão apresentados a seguir.

Tabela 2 - Cristalinidade e tamanho médio do cristalito das ZnO NPs sintetizadas, a partir de diferentes sais precursores e T de calcinação, por Scherrer e Williamson-Hall (W-H).

Sal Precursor (T de calcinação)	Cristalinidade (%)	D (nm) W-H	D (nm) Scherrer
Acetato de Zinco (600°C)	81,39	29,43	21,66
Acetato de Zinco (800°C)	86,54	54,65	33,81
Cloreto de Zinco (600°C)	86,69	29,24	21,52
Cloreto de Zinco (800°C)	90,51	44,97	29,10
Nitrato de Zinco (600°C)	79,80	29,61	22,51
Nitrato de Zinco (800°C)	82,23	47,32	30,61

Fonte: Autoria própria (2023).

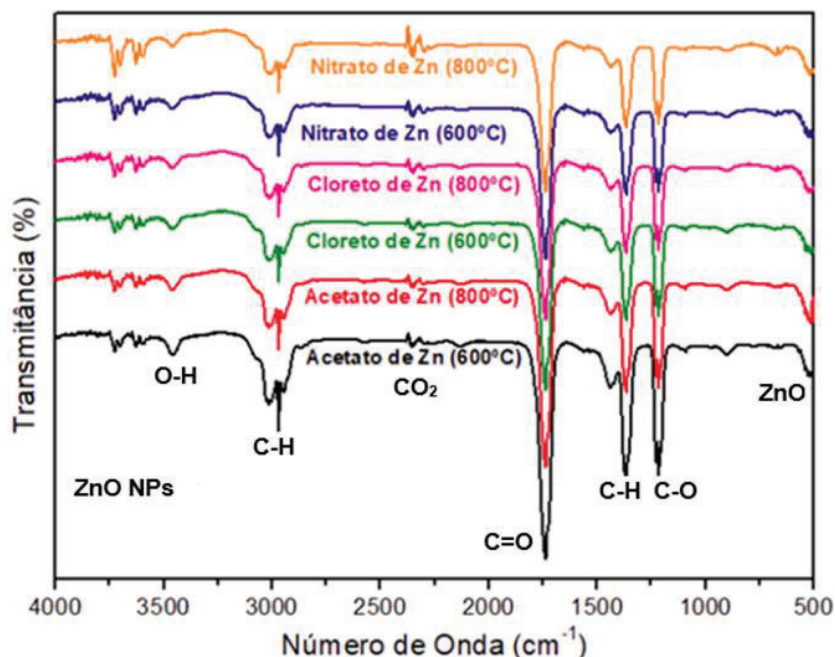
Os cálculos apresentados na Tabela 2 corroboram os resultados observados nos difratogramas, indicando que as amostras de ZnO NPs submetidas à calcinação a 800°C exibiram uma cristalinidade superior, independentemente do precursor utilizado (acetato, cloreto ou nitrato). Além disso, essas amostras apresentaram maiores tamanhos médios de cristalitos, conforme demonstrado por ambos os métodos de cálculo utilizados, Scherrer e Williamson-Hall (W-H) (PRABHU *et al.*, 2014; ZAK *et al.*, 2011).

4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para identificar os grupos funcionais presentes nas amostras de ZnO NPs, abrangendo a faixa de 500 a 4000 cm^{-1} . As seis amostras apresentaram picos de absorção principais nas mesmas regiões (496 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} , 1729 cm^{-1} , 2366 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 3092 cm^{-1} , 3463 cm^{-1}). A região do espectro entre 400 e 500 cm^{-1} está associada ao modo vibracional de ligações metal-oxigênio. Desta forma, o pico de absorção acentuado em 495 cm^{-1} , se refere ao estiramento da ligação Zn-O, confirmando a formação da substância (SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

O pico intenso observado em 1224 cm^{-1} compreende uma região relacionada à vibração de estiramento da ligação simples C-O e, o pico seguinte, também de alta intensidade, em 1383 cm^{-1} , ao estiramento C-H. O pico mais intenso da amostra, situado em 1729 cm^{-1} , representa a vibração de estiramento do grupo carbonila (C=O). A presença de picos discretos na região de 2366 cm^{-1} pode estar associada à absorção de dióxido de carbono (CO_2), proveniente da atmosfera, ligado aos cátions metálicos.

Figura 18 – Espectros de FTIR das amostras de ZnO NPs.



Fonte: Autoria própria (2023).

Os picos formados na região acerca de 3000 cm^{-1} apresentam menor intensidade e são característicos do estiramento das ligações C-H. O pico mais discreto, localizado em aproximadamente 3463 cm^{-1} , está relacionado à absorção característica dos grupos hidroxila, correspondendo ao estiramento O-H da ligação de hidrogênio intramolecular. Picos não resolvidos em outras regiões do espectro podem indicar a presença de impurezas nas amostras.

4.2.3 Espectroscopia Raman

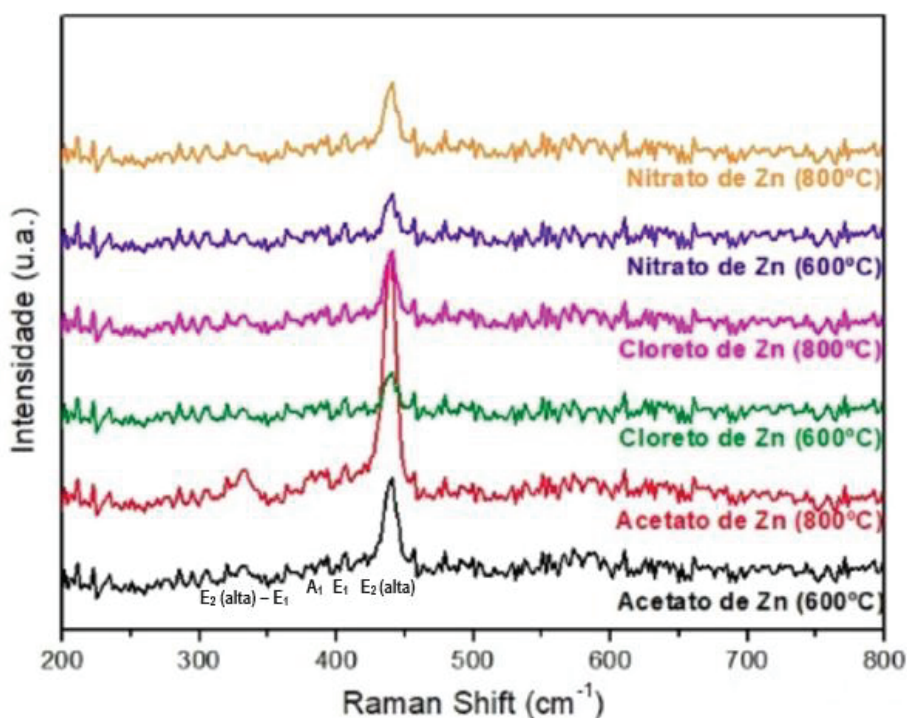
A espectroscopia Raman foi aplicada por ser uma técnica versátil de análise, capaz de identificar a composição química, desordens e defeitos estruturais, além da cristalinidade, por meio das propriedades vibracionais das nanopartículas de ZnO sintetizadas.

Por se tratar da estrutura wurzita, com simetria hexagonal, as ZnO NPs cristalizam-se no plano espacial $P6_3mc$. Em um cristal perfeito, somente os fônons ópticos no ponto Γ , da zona de Brillouin, fazem parte do espalhamento Raman de primeira ordem. De acordo com a teoria dos grupos, usada para determinar modos vibracionais de materiais cristalinos como o ZnO, a estrutura wurzita compreende os modos ópticos conforme equação (SILAMBARASAN *et al.*, 2015):

$$\Gamma_{\text{opt}} = A_1 + 2B_2 + E_1 + 2E_2 \quad (18)$$

Na qual, A_1 , E_1 e E_2 são modos Raman ativos de primeira ordem. A_1 e E_1 são ramos polares, os quais se subdividem em componentes ópticos longitudinais (LO) e transversais (TO) com frequências distintas, em função dos campos elétricos macroscópicos associados aos fônons LO, e B_1 são modos inativos (SILAMBARASAN *et al.*, 2015).

Figura 19 – Espectros Raman das amostras de ZnO NPs.



Fonte: Autoria própria (2023).

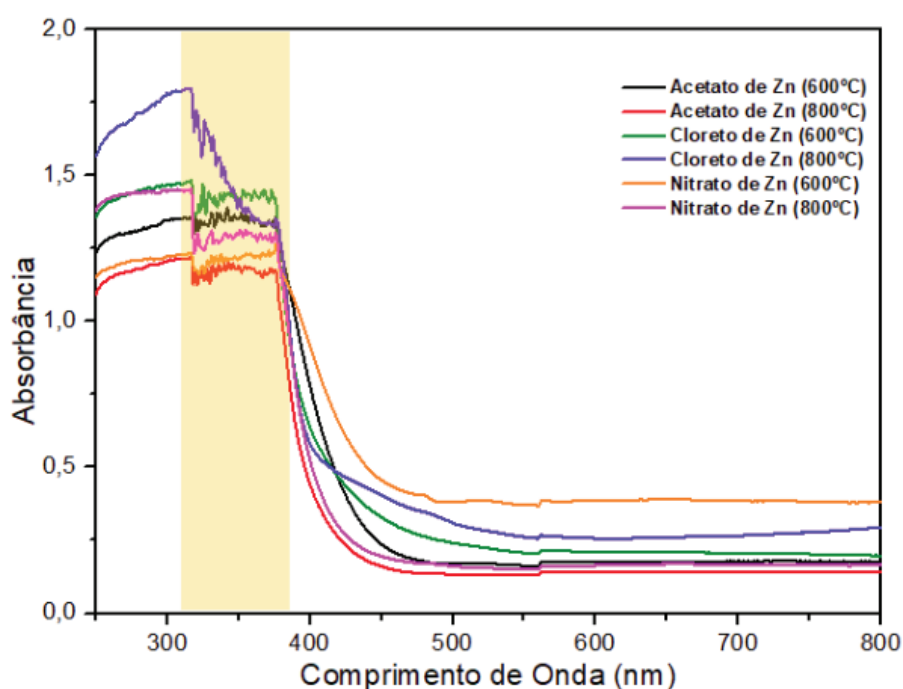
O gráfico da Figura 19 demonstra que, para todas as amostras de ZnO NPs, o pico principal se formou em 438 cm^{-1} , correspondente ao modo E_2 (alta), associado à vibração do oxigênio na estrutura wurzita do ZnO, o que se relaciona ao grau de cristalinidade. Nas amostras das ZnO NPs que tiveram o acetato de zinco como precursor, calcinadas tanto a 600°C como a 800°C , foi identificado um pico discreto em torno de 334 cm^{-1} , correspondente à estrutura de segunda ordem do ZnO (SHARMA, 2012). Esses dados corroboram com os dados obtidos na FTIR para a formação do óxido de zinco.

4.2.4 Espectroscopia UV-Vis

A Figura 20 exibe os espectros de absorção na região do UV-Vis das ZnO NPs, em função do comprimento de onda, para as seis amostras sintetizadas. Em todas as

amostras, observa-se que a absorção máxima ocorreu em um comprimento de onda de 324 nm, na região UV, característica atribuída à transição eletrônica do ZnO, confirmando a formação do composto inorgânico. Já na área do visível, os espectros apresentaram baixa absorbância (CHIKKANNA *et al.*, 2019). Entre as amostras analisadas, as ZnO NPs obtidas a partir do cloreto de zinco como precursor, calcinadas a 800°C, apresentaram maior pico de absorbância, enquanto as sintetizadas a partir do acetato de zinco, calcinadas a 800°C, geraram menor pico.

Figura 20 – Espectros de absorção UV-Vis das amostras de ZnO NPs.



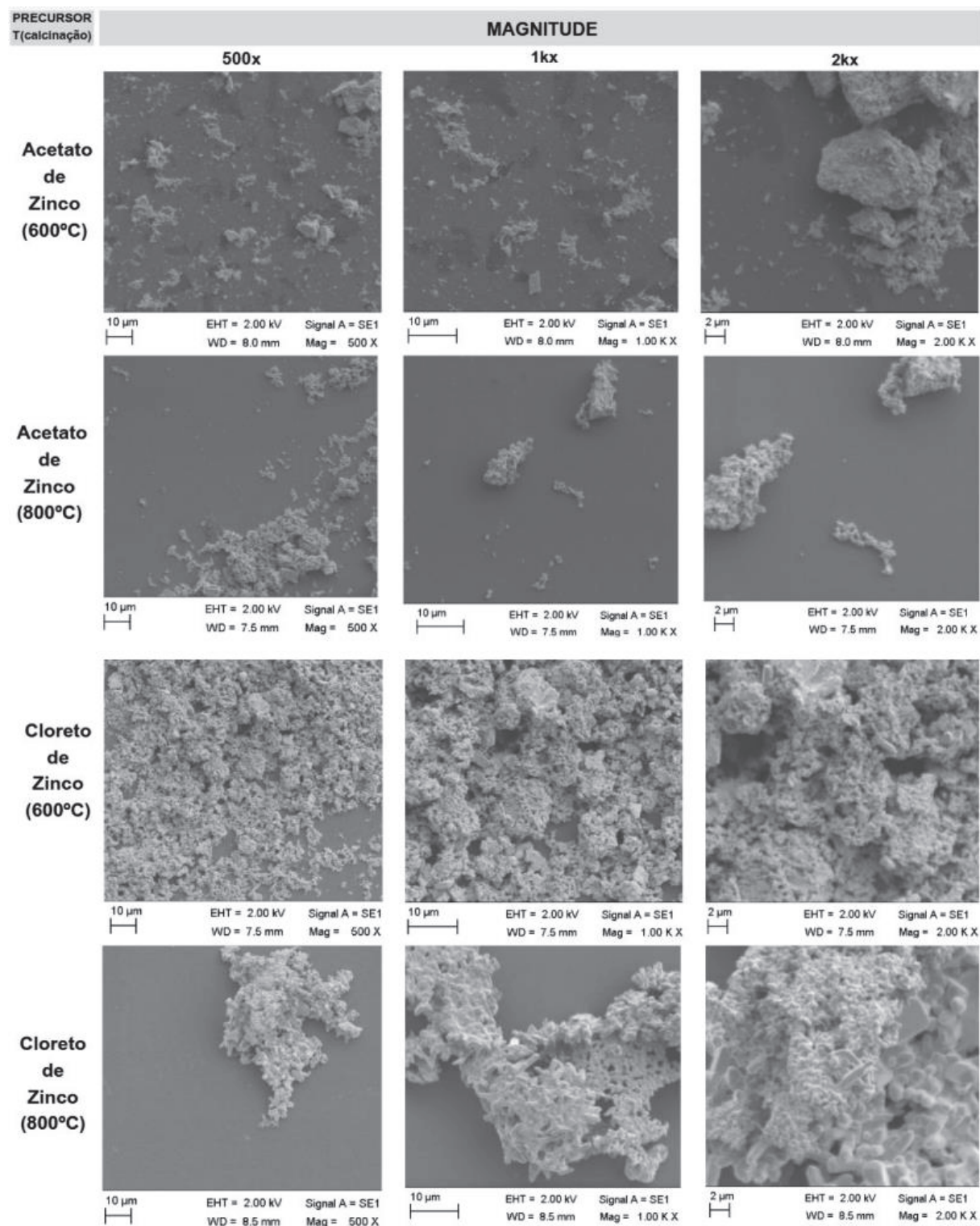
Fonte: Autoria própria (2023).

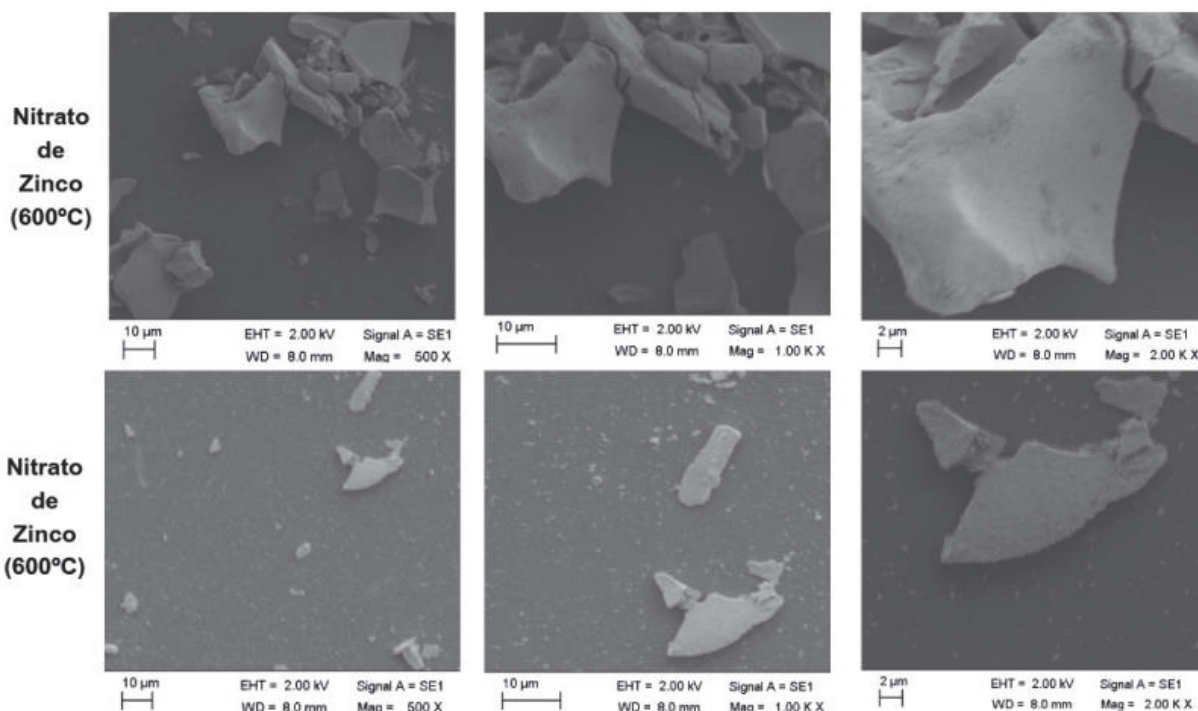
Não foi possível identificar um padrão espectrométrico em relação à temperatura de calcinação ou ao sal precursor. No entanto, todas as amostras exibiram pico no mesmo comprimento de onda, apesar da variação na intensidade da absorbância. Também é possível identificar que os valores de absorção das ZnO NPs se apresentam altos para os comprimentos de onda inferiores (menores que 400 nm), porém baixos para os comprimentos de onda maiores (acima de 450 nm). A absorbância alta na faixa de comprimentos de onda menores é uma propriedade própria de materiais opacos (SHABANNIA e HASSAN, 2014). Como a análise foi realizada diretamente no pó compactado, dificultando a passagem da luz, essa característica foi evidenciada.

4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para as seis amostras de ZnO NPs, em diferentes faixas de ampliação (500x, 1kx e 2kx) e estão demonstradas na Figura 21.

Figura 21 – Micrografias obtidas por MEV das amostras de ZnO NPs.





Fonte: Autoria própria (2023).

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstram que tanto o tipo de sal precursor quanto a temperatura de calcinação exerceram influência nas propriedades finais das nanopartículas de ZnO. Nas amostras calcinadas a 800°C, verifica-se que os cristalitos apresentaram um maior tamanho médio em comparação com aqueles tratados a 600°C, além de exibirem uma estrutura cristalina mais nítida. Essas observações confirmam os resultados obtidos nos difratogramas de raios X.

Em relação aos precursores, as ZnO NPs sintetizadas a partir cloreto de zinco apresentaram uma estrutura com maior definição e homogeneidade em comparação às demais amostras. As nanopartículas que partiram do sal de acetato de zinco exibiram tanto nanobastões como pequenos aglomerados em sua morfologia, enquanto as geradas a partir do nitrato de zinco resultaram em uma estrutura compacta de aglomerados, sem que fosse possível estabelecer a forma das nanopartículas.

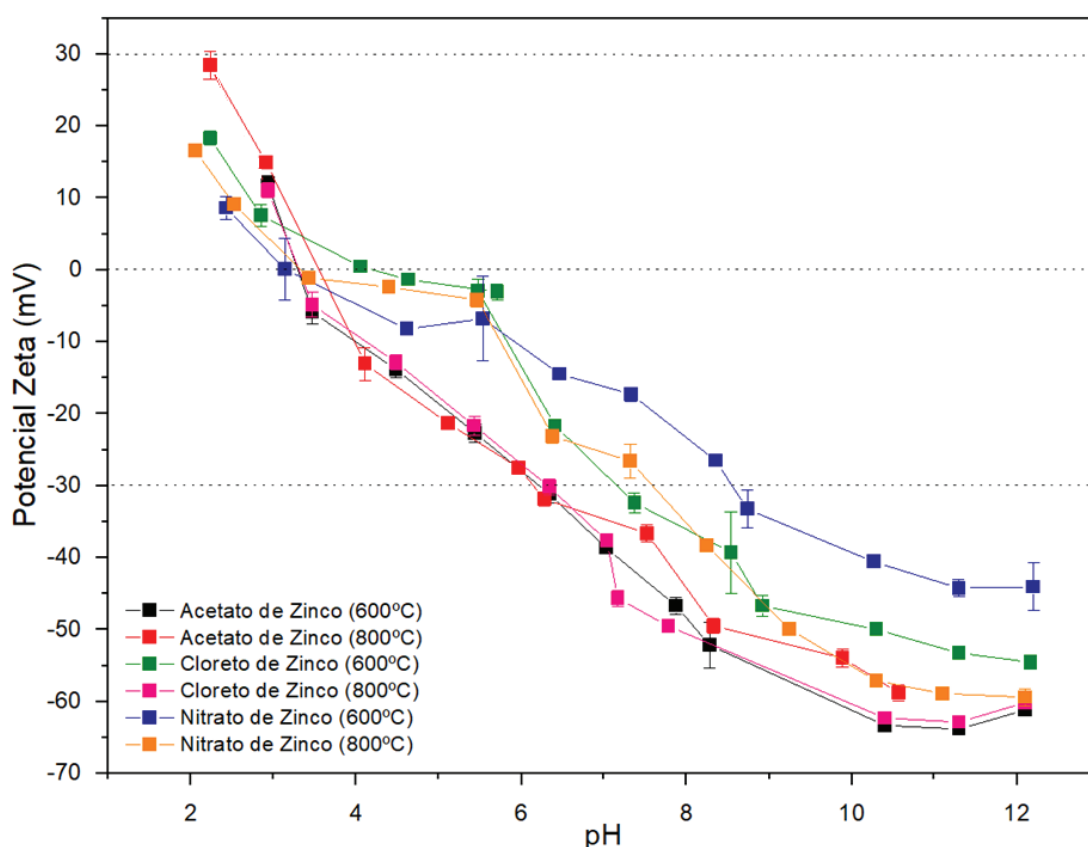
4.2.6 Potencial Zeta (PZ)

Quando dispersas em meio aquoso, as nanopartículas passam por um processo de ionização, adquirindo uma carga superficial capaz de gerar um potencial elétrico entre os nanocristais e o meio dispersivo, o qual pode ser obtido

experimentalmente como potencial zeta. O método de determinação utiliza técnicas eletroforéticas, que se baseiam no espalhamento de luz, e eletrocinéticas, uma vez que a velocidade das partículas no líquido, quando submetidas a um campo elétrico, é medida e convertida em potencial zeta (PUNNOOSE *et al.*, 2014).

Com o objetivo de obter informações sobre a estabilidade das nanopartículas de óxido de zinco em suspensão coloidal, e avaliar sua tendência à repulsão ou agregação, foram realizadas medidas de potencial zeta para as seis amostras de ZnO NPs. As medições foram conduzidas em função do pH da solução, iniciando-se com pH 12, e a seguir adicionou-se HCl até atingir o pH 2, conforme apresentado na Figura 22 a seguir.

Figura 22 – Valores de Potencial Zeta, das ZnO NPs, em função do pH (25 °C).



Fonte: Autoria própria (2023).

Devido às diferenças de potencial zeta entre as amostras, verifica-se que o sal precursor e a temperatura de calcinação interferem na estrutura superficial final e, na química das ZnO NPs. A distinção dos valores entre si denota a variação nas interações entre as partículas e na densidade líquida da carga superficial, o que pode também ocasionar divergência nas propriedades dessas nanopartículas.

Exceto para o acetato de zinco como precursor, as amostras de ZnO NPs calcinadas a 800°C atingiram valores mais altos de potencial zeta, indicando uma maior estabilidade coloidal. As micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e os padrões de Difração de Raios X (DRX) demonstram que o material calcinado a temperaturas mais elevadas possui maior porcentagem de cristalinidade e uma morfologia mais bem definida, o que está de acordo com os resultados do potencial zeta.

O ponto isoelétrico (pI), que corresponde ao equilíbrio entre cargas positivas e negativas (potencial zeta igual a zero), das amostras de ZnO NPs foi semelhante para todas as amostras, situando-se na faixa de pH entre 3,13 e 4,06, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Ponto isoelétrico para as ZnO NPs de acordo com o precursor.

Sal Precursor (T de calcinação)	Ponto Isoelétrico (pI)
Acetato de Zinco (600°C)	3,35
Acetato de Zinco (800°C)	3,67
Cloreto de Zinco (600°C)	4,06
Cloreto de Zinco (800°C)	3,35
Nitrato de Zinco (600°C)	3,13
Nitrato de Zinco (800°C)	3,42

Fonte: Autoria própria (2023).

As nanopartículas de óxidos metálicos (M_xO_y) apresentam sistemas coloidais estáveis em meio alcalino, quando possuírem cargas negativas e, em meio ácido, os colóides terão estabilidade quando suas cargas forem positivas. A superfície dessas nanopartículas costumam apresentar hidroxilas neutras que se conectam ao metal, levando à formação de camadas de M-OH, sendo responsáveis pelas características de carga superficial dos nanocristais, uma vez que estão relacionadas ao equilíbrio químico. Em pHs mais altos, em solução aquosa, os prótons (H^+) se deslocam para fora da superfície, rumo ao solvente, deixando-a negativa, apenas com o oxigênio parcialmente ligado ao metal ($M-O^-$). À medida que o pH é reduzido, os prótons (H^+) do ácido migram para a superfície das nanopartículas, restituindo a carga positiva pela presença dos grupos $M-OH_2^+$ (QU; MORAIS, 2000).

Valores elevados de potencial zeta indicam uma grande diferença de potencial elétrico entre a superfície das nanopartículas e a região correspondente à dupla camada elétrica que as circunda. Essa diferença resulta em uma forte repulsão eletrostática entre as nanopartículas, evitando a formação de aglomerados e permitindo que elas permaneçam dispersas no colóide. Assim, tal condição confere estabilidade à suspensão coloidal. Por outro lado, em potenciais zeta baixos ou próximos de zero, a repulsão eletrostática é fraca, o que torna a suspensão instável e pode levar à aglomeração ou sedimentação das partículas.

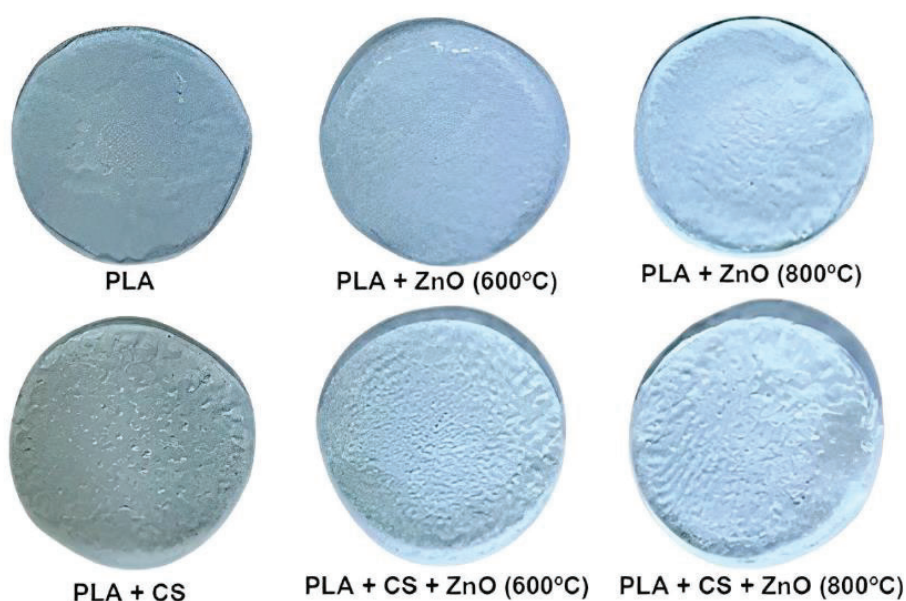
Considerando o gráfico e os baixos valores de pH dos pontos isoelétricos, os quais se relacionam à distribuição de cargas nas moléculas, as ZnO NPs sintetizadas apresentam características mais ácidas, provavelmente em razão dos grupos funcionais presentes em sua estrutura.

4.3 Preparo de Filmes de PLA e PLA com incorporação de CS e ZnO NPs

Os filmes à base de PLA foram preparados por dissolução do PLA em diclorometano e pela incorporação direta das ZnO NPs e da quitosana. Ao final das etapas, foram obtidos seis filmes, conforme Figura 23:

PLA; PLA + ZnO (600°C); PLA + ZnO (800°C); PLA + CS; PLA + CS + ZnO (600°C); PLA + CS + ZnO (800°C).

Figura 23 – Filmes de PLA, PLA+ZnO (600°C e 800°C), PLA+CS, e PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).



Fonte: Autoria própria (2023).

Na imagem, é possível observar que tanto as NPs de ZnO quanto a quitosana estão dispersas em toda a matriz polimérica. Entretanto, há alguns pequenos sítios de deposição, uma vez que esses materiais não são solúveis em diclorometano, permanecendo suspensos na solução.

A adição de glicerina, atuando como agente plastificante, conferiu ao PLA maior resistência e flexibilidade, permitindo sua dobração sem causar rachaduras ou deformações. Além disso, a glicerina facilitou a remoção dos filmes das placas de Petri que serviram como base.

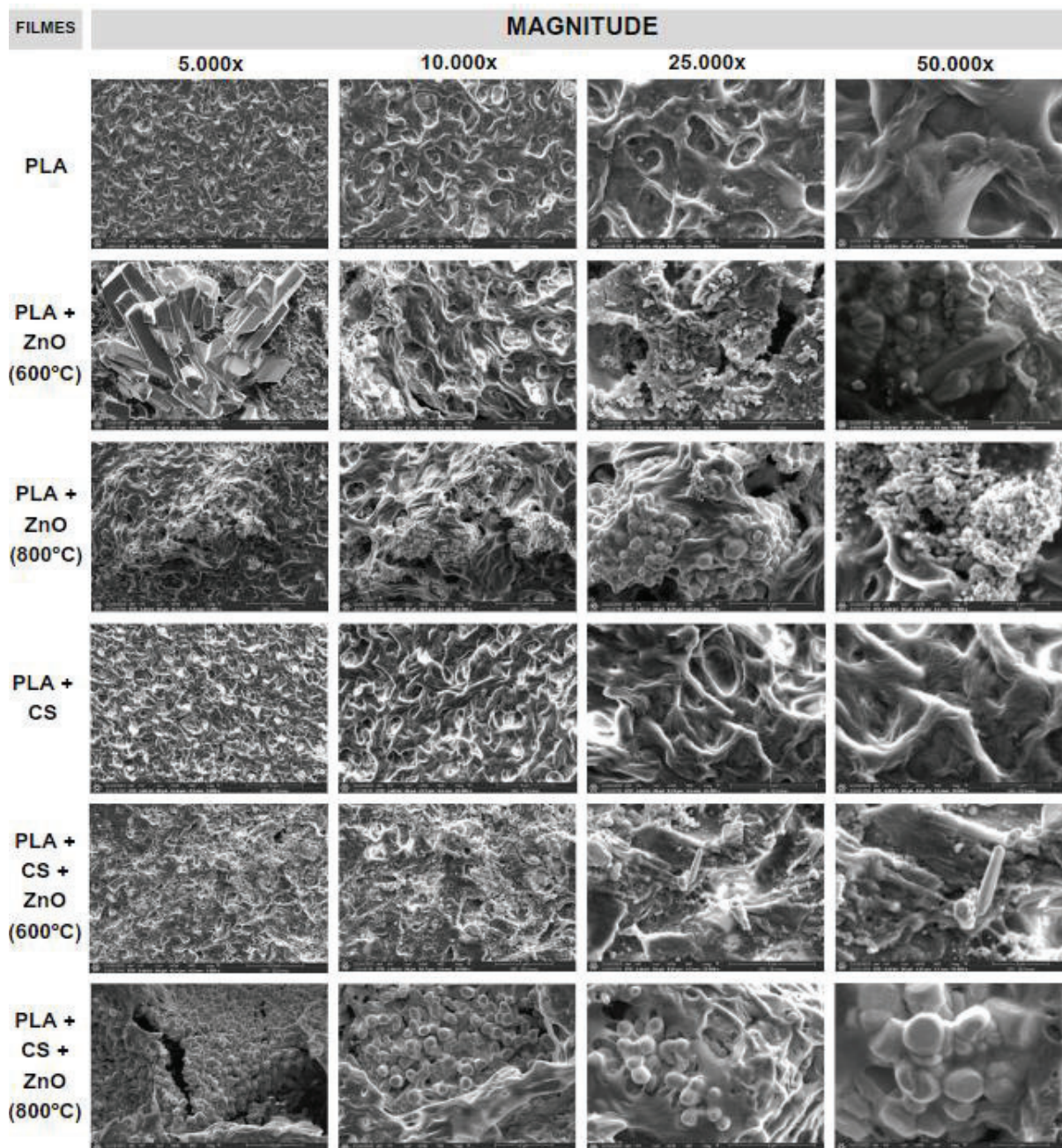
A maior parte dos estudos que envolvem a produção de filmes de PLA utiliza o clorofórmio como solvente devido à sua eficiência em dissolver polímeros. No entanto, considerando o elevado risco toxicológico associado ao clorofórmio, especialmente sua toxicidade aguda e potencial carcinogênico, esta pesquisa buscou alternativas mais seguras. Após tentativas de solubilização do PLA em diversos solventes, optou-se pelo diclorometano. Essa escolha se deu em função de sua alta volatilidade e baixo PE, sendo mais facilmente removido do material; eficiência como solvente, inclusive para compostos heterocíclicos; e maior segurança relativa em comparação ao clorofórmio, embora ainda demande cuidados rigorosos de manuseio devido à sua volatilidade e efeitos adversos à saúde em exposições prolongadas. O DCM é amplamente empregado nas indústrias de polímeros, farmacêuticas, químicas e alimentícias (SHARMA, *et al.*, 2021; TILLEY; FRY, 2015; WATANABE, 2005).

4.4 Caracterização dos Filmes de PLA e PLA com incorporação de CS e ZnO NPs

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

A análise da morfologia da seção transversal dos biofilmes à base de PLA, bem como da distribuição das ZnO NPs e da quitosana incorporadas à matriz polimérica, foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa técnica é amplamente utilizada para a caracterização estrutural de superfícies de materiais, ao oferecer imagens de alta resolução, que permitem observar detalhes topográficos e estruturais em nível microscópico. As imagens de MEV para os seis desenvolvidos estão demonstradas na Figura 24.

Figura 24 – Micrografias obtidas por MEV dos filmes de PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, e PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).



Fonte: Autoria própria (2023).

O filme de poli (ácido láctico), PLA, apresenta uma superfície rugosa e heterogênea, com cavidades e poros distribuídos por toda a estrutura, mas sem rachaduras ou fraturas visíveis. A adição de glicerina, como agente plastificante, pode ser um fator significativo na obtenção da morfologia final, uma vez que, ao penetrar na estrutura molecular, reduz as forças de atração entre as cadeias poliméricas. Esse

processo também aumenta a flexibilidade, tornando o polímero mais resistente à quebra. Além disso, o processo de secagem pode gerar essas alterações, pois a evaporação do solvente cria espaços vazios que resultam nas cavidades observadas (KIM *et al.*, 2022).

As nanopartículas de ZnO incorporadas aos filmes de PLA exibiram morfologias de nanobastões e nanoesferas, em tom mais esbranquiçado e aspecto saliente. Elas foram distribuídas uniformemente no biopolímero, embora em algumas regiões houvesse a associação de pequenos aglomerados. Em filmes nanocompósitos, uma boa dispersão da carga inorgânica na matriz polimérica pode melhorar as propriedades físicas do material (KIM *et al.*, 2019).

As partículas de quitosana, de acordo com as imagens, se encontram dispersas homogeneamente e com boa adesão ao PLA, apresentando uma morfologia granular e sem formação de aglomerados. Em comparação ao PLA puro, observa-se um aumento da rugosidade na estrutura do poliéster.

Os filmes que tiveram as duas substâncias agregadas, ZnO e quitosana, resultaram em morfologias irregulares, mas com boa dispersão de ambas as substâncias. Embora presente em menor proporção, o ZnO teve predominância nas micrografias, destacando-se em relação à quitosana, de forma bem incorporada ao PLA, em estruturas majoritárias de nanobastões.

A MEV foi essencial para avaliar a morfologia da superfície dos filmes, a dispersão das ZnO NPs e da quitosana, a interação entre os componentes do biofilme e a formação de pequenos aglomerados, como foi possível observar nas amostras que contêm ZnO NPs.

A Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS) foi utilizada para a identificação dos elementos que compõem as amostras e análise da presença de possíveis contaminantes. Os padrões EDS estão representados nas Figuras 25 e 26, junto às imagens capturadas de raios X.

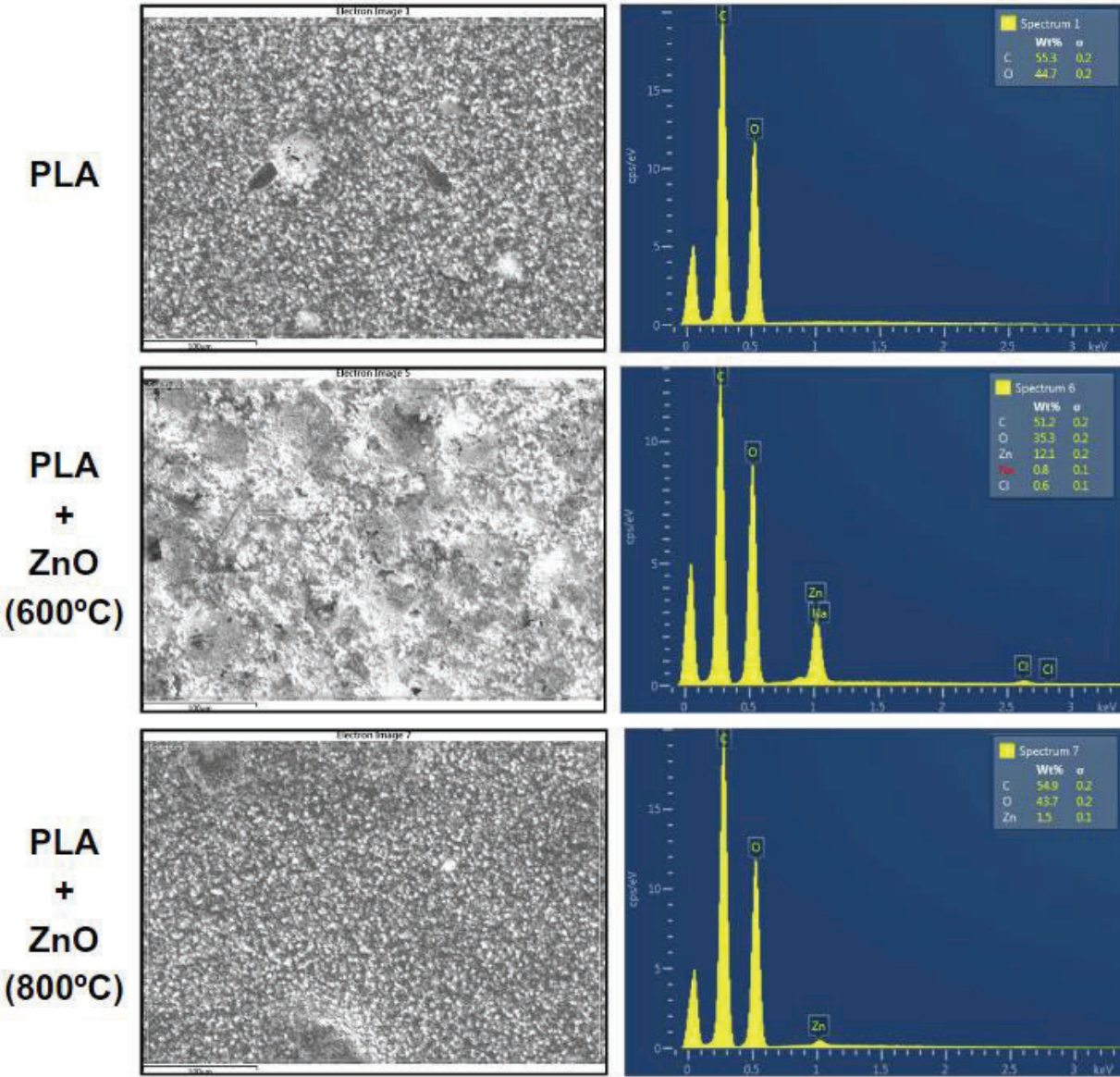
Devido ao fato de os filmes apresentarem regiões com maior deposição das nanopartículas de óxido de zinco e de quitosana, em detrimento de outras, o que pode gerar variações quantitativas, a análise EDS foi realizada em triplicata. Três áreas distintas foram selecionadas para cada amostra, e os resultados foram expressos como médias e desvios-padrão, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Porcentagem em peso e desvio padrao dos elementos identificados na EDS para os filmes de PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, e PLA + CS + ZnO (600°C e 800°C).

	Peso (%)									
	C	σ	O	σ	Zn	σ	Cl	σ	Na	σ
PLA	55,30	0,2	44,70	0,2	-	-	-	-	-	-
PLA + ZnO (600°C)	52,72	0,2	42,58	0,2	3,50	0,1	0,80	0,1	0,40	0,1
PLA + ZnO (800°C)	54,70	0,2	43,70	0,2	1,60	0,1	-	-	-	-
PLA + CS	54,90	0,2	45,10	0,2	-	-	-	-	-	-
PLA + CS + ZnO (600°C)	55,45	0,2	43,65	0,2	0,70	0,1	0,20	0,1	-	-
PLA + CS + ZnO (800°C)	55,25	0,2	42,60	0,2	2,15	0,1	-	-	-	-

Fonte: Autoria Própria (2024).

Figura 25 – Padrão EDS para os filmes de PLA e PLA + ZnO (600°C e 800°C).

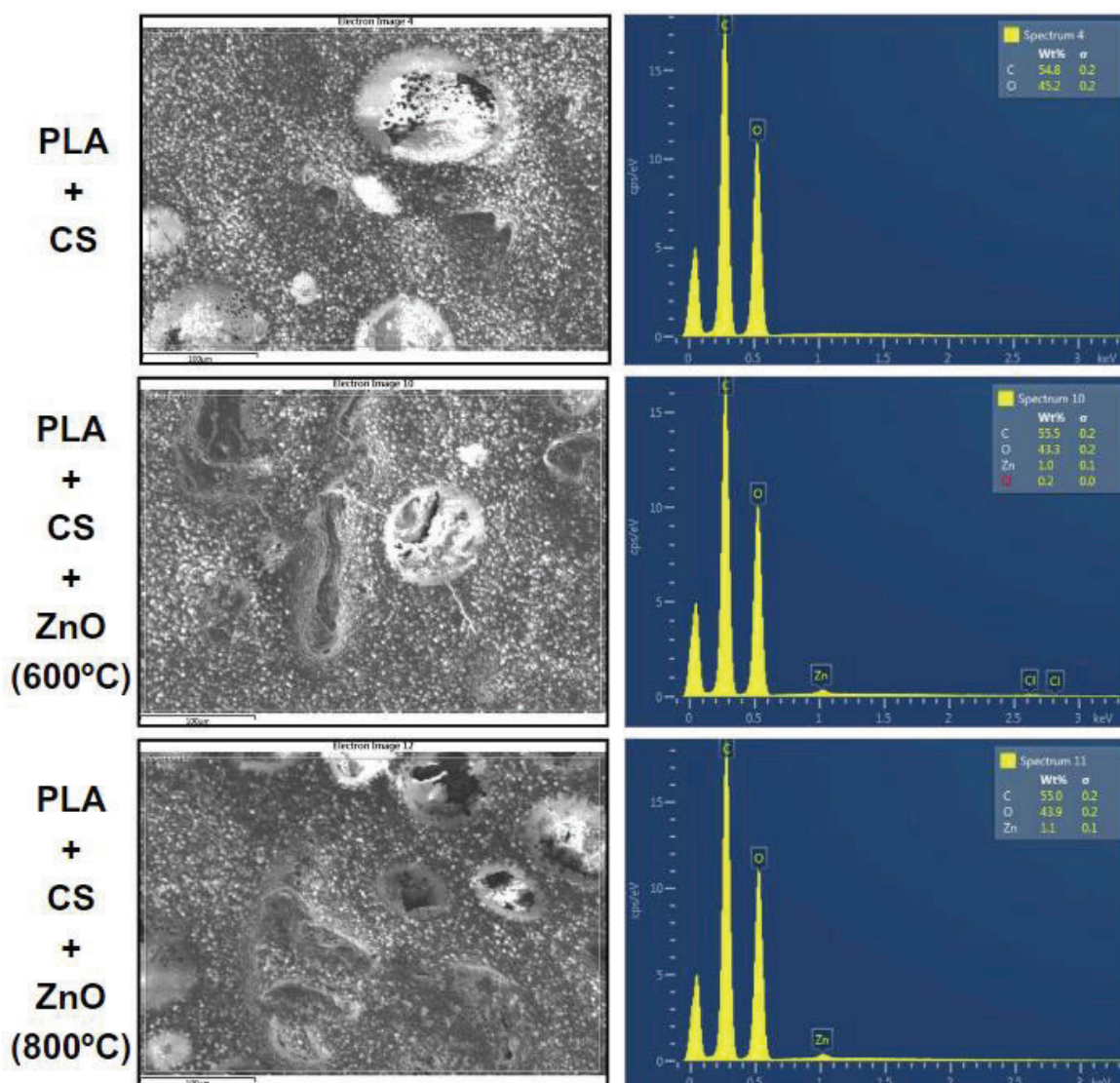


Fonte: Autoria Própria (2024).

A porcentagem em peso da composição química, identificada nas amostras pela técnica EDS, revelou que o carbono e o oxigênio são os elementos mais abundantes em todos os filmes. Considerando que o hidrogênio dificilmente emite raios X, em função de sua estrutura eletrônica e propriedades energéticas, raramente sendo identificado por EDS, os resultados são coerentes com os materiais utilizados. A base dos filmes é o polímero PLA ($C_3H_4O_2$)_n, composto de unidades de ácido láctico, contendo 50% da porcentagem em peso de carbono e cerca de 44% de oxigênio.

Em todos os filmes que tiveram a incorporação de ZnO NPs, o zinco foi identificado, porém na amostra de PLA + ZnO (600°C) também surgiu um indicador da presença de sódio (Na), em vermelho, podendo se tratar de contaminação no manuseio do material ou falha espectral (interferências ou sobreposições).

Figura 26 – Padrão EDS para os filmes de PLA + CS e PLA + CS + ZnO (600°C e 800°C).



Fonte: Autoria Própria (2024).

A quitosana apresenta fórmula química $(C_6H_{11}NO_4)_n$, sendo predominantemente composta pelos elementos carbono (C) e oxigênio (O). O nitrogênio (N), embora presente, requer condições especiais para ser detectado por EDS devido à baixa sensibilidade da técnica para esse elemento.

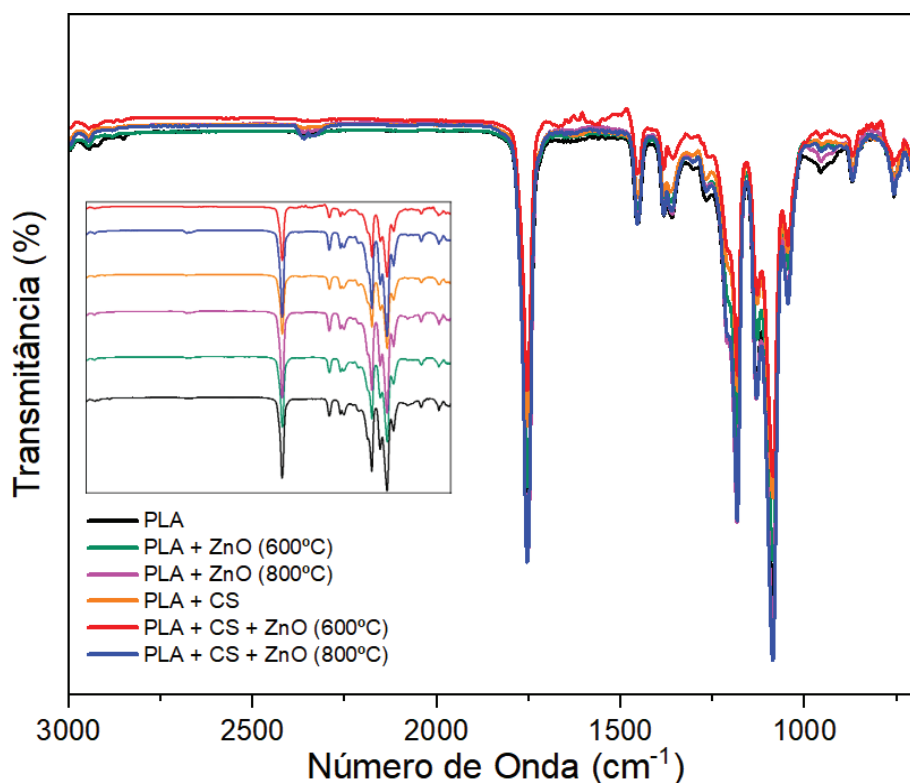
A análise por EDS revelou outro aspecto significativo: os filmes contendo NPs de ZnO calcinadas a 600°C, tanto isoladas quanto junto à quitosana, apresentaram sinais de cloro (Cl), oriundo do precursor $ZnCl_2$. Isso indica que essa temperatura de calcinação não foi suficiente para eliminar completamente o cloro residual. Por outro lado, nas amostras contendo NPs de ZnO calcinadas a 800°C, não foram detectados compostos intermediários da síntese ou outros contaminantes.

Devido à deposição heterogênea das partículas nos filmes, a variação nos níveis de zinco entre as amostras pode estar relacionada às diferentes regiões selecionadas durante a análise.

4.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados da FTIR para os filmes se encontram na Figura 27.

Figura 27 - Espectros de FTIR para os filmes: PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).



Fonte: Autoria Própria (2024).

A estrutura dos filmes à base de PLA foi analisada por meio desta técnica com o objetivo de identificar as interações presentes entre os materiais e as diferenças entre eles. Os espectros mostraram uniformidade em todos os picos observados, com variação apenas na intensidade, o que indica que a estrutura do biopolímero foi preservada, mesmo após a adição de outras partículas. Para facilitar a análise do comportamento de cada filme, foi incluído no gráfico um recorte espaçado, devido à sobreposição das linhas.

Na região entre 2852 cm^{-1} a 2996 cm^{-1} é possível notar alguns picos discretos, os quais se relacionam às vibrações de estiramento das ligações C-H, provavelmente do grupo metila ($-\text{CH}_3$) e da cadeia principal do PLA. O pico em 1452 cm^{-1} , o pico formado refere-se às mesmas interações, mas associadas à deformação simétrica dessas ligações. Em 1753 cm^{-1} observa-se um pico acentuado que corresponde à vibração de estiramento do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), comum nos ésteres. Nos filmes com ZnO NPs nota-se um aumento na intensidade pelo esticamento dos picos, em especial ao que está representado pela cor azul (PLA+ZnO 800°C), confirmando a modificação na estrutura e nas propriedades do biopolímero (CHIANG *et al.* 2013; FANG *et al.*, 2022; MOFOKENG *et al.*, 2012).

No intervalo entre 1410 e 1315 cm^{-1} , alguns picos foram atribuídos às vibrações de estiramento das ligações C-O, além das deformações do grupo metila ($-\text{CH}_3$). Pelo fato do PLA se tratar de um poliéster, o pico intenso em 1181 cm^{-1} e o subsequente em 1133 cm^{-1} estão associados ao estiramento das ligações C-O-C, característico desta função orgânica. O pico de maior transmitância, em 1083 cm^{-1} , pode representar o estiramento assimétrico das ligações C-O-C ou C-O, assim como o próximo pico em 1045 cm^{-1} . Os picos finais, em 871 cm^{-1} e 757 cm^{-1} , em polímeros, geralmente envolvem vibrações de deformações de algumas ligações (CHIANG *et al.* 2013; FANG *et al.*, 2022; MOFOKENG *et al.*, 2012).

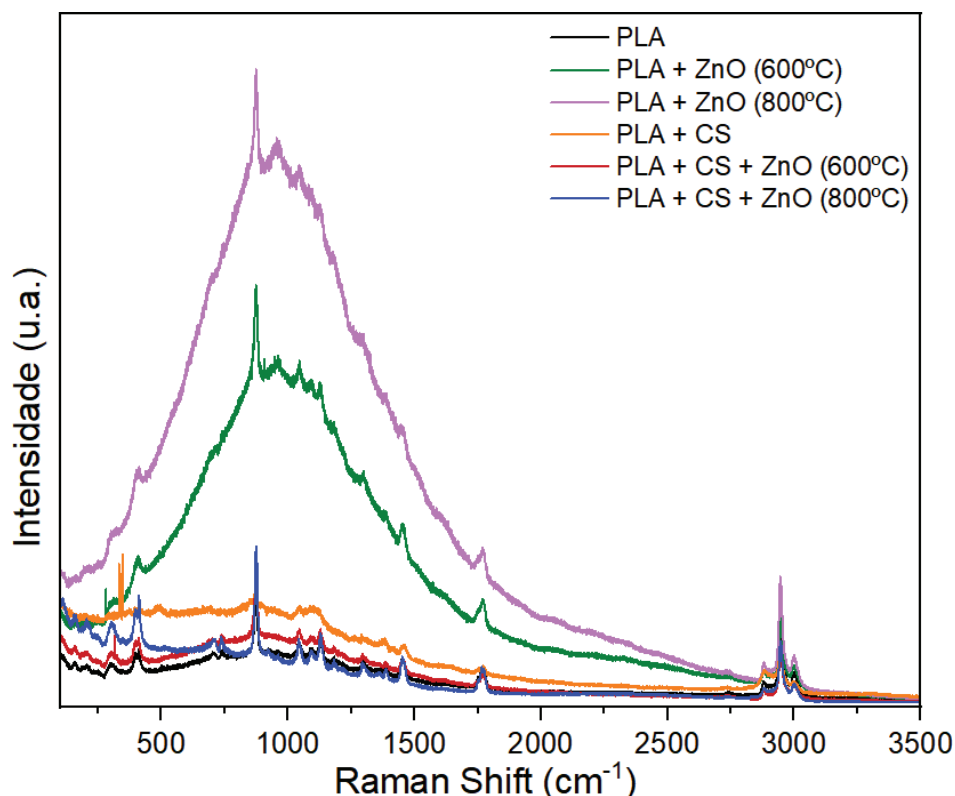
Embora não tenha havido variação significativa no alargamento dos picos, a intensidade foi maior nas amostras que contêm nanopartículas de ZnO calcinadas a 800°C, sugerindo que a cristalinidade dessas nanopartículas influencia as propriedades vibracionais dos filmes.

Aparentemente, a quitosana não afetou as características do PLA, porém apresentou picos ainda menos intensos que o do filme de PLA puro, constatando sua interação com o PLA.

4.4.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman obtidos para os filmes estão demonstrados na Figura 28.

Figura 28 - Espectros Raman para os filmes: PLA, PLA + ZnO (600°C e 800°C), PLA + CS, PLA+CS+ZnO (600°C e 800°C).



Fonte: Autoria Própria (2024).

Os espectros obtidos revelam alguns picos coincidentes em todas as amostras analisadas. O pico mais proeminente localiza-se em 868 cm^{-1} , atribuído ao modo de alongamento C-COO, que no PLA se dá pela ligação entre o grupo carbonila e o oxigênio. Antes dele, dois picos baixos, sendo um em 411 cm^{-1} correspondente à vibração do grupo C-CO e outro em 303 cm^{-1} característico da vibração dos grupos C-O-C e C-CH. Em seguida, pequenos picos aparecem entre 1040 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} . Essa região compreende às vibrações de estiramento de ligações C-O e de deformação C-H. O pico que observado em 1764 cm^{-1} é característico da vibração de estiramento do grupo carbonila (C=O), típico de ésteres. Ao final do gráfico, verifica-se um pico mais elevado em 2939 cm^{-1} , com outros dois menores ao lado, 2865 cm^{-1} e 3001 cm^{-1} , os quais são associados às vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H, sobretudo do grupo metila ($-\text{CH}_3$), presente nos

monômeros do PLA (BOLSKIS; ADOMAVIČIŪTĖ; GRIŠKONIS, 2022; ROMASHKIN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017).

A linha correspondente ao espectro do PLA puro apresentou menor intensidade em comparação aos filmes contendo ZnO NPs e quitosana. A incorporação de ZnO NPs nos filmes de PLA provocou um aumento significativo na intensidade dos picos de Raman, para ambas as temperaturas de calcinação (600°C e 800°C). No entanto, o filme contendo as ZnO NPs calcinadas a 800°C exibiu maior intensidade, o que pode ser atribuído à maior cristalinidade das nanopartículas calcinadas a essa temperatura, conforme discutido anteriormente.

No filme composto por PLA e quitosana, a intensidade foi consideravelmente menor em comparação às amostras incorporadas apenas ZnO NPs. Isso ocorre porque a quitosana, sendo um polissacarídeo constituído por moléculas orgânicas e classificada como um polímero amorfo, não gera sinais Raman expressivos. No entanto, ainda foi possível observar uma leve modificação nos picos em relação ao PLA puro, sugerindo a interação entre o biopolímero e a quitosana.

A adição conjunta de quitosana e ZnO NPs aos filmes de PLA apresentou um padrão misto. Assim como nas amostras de PLA apenas com ZnO NPs, a presença dessas nanopartículas ampliou os picos Raman, indicando sua contribuição para as vibrações detectadas. O tratamento térmico a 800 °C novamente levou a picos mais intensos do que a 600 °C, evidenciando que a temperatura afeta a morfologia e a estrutura das nanopartículas.

Outra diferença acentuada, entre os espectros do PLA puro e dos filmes que tiveram a incorporação somente das ZnO NPs, é o alargamento dos picos, provavelmente resultado da interação entre o PLA e as nanopartículas.

4.5 Atividade Antimicrobiana: Método de Difusão em Disco de Ágar

Os resultados obtidos para os biofilmes à base de PLA com adição de ZnO NPs e quitosana, após a realização dos testes de difusão em disco de ágar, demonstraram atividade antimicrobiana nas amostras que tiveram a incorporação de nanopartículas de ZnO, tanto calcinadas a 600°C como a 800°C. Isso foi evidenciado pela formação de halos de inibição ao redor dos discos dos biofilmes depositados nas culturas das bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*). No entanto, para as bactérias Gram-negativas, não houve formação de zonas de inibição, revelando-se ineficaz como agente antimicrobiano contra *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*.

A diferença na estrutura das membranas celulares das bactérias pode estar relacionada à divergência nessas respostas. As bactérias Gram-positivas possuem ácidos teicóicos e camadas espessas de peptidoglicano, que conferem rigidez à parede celular. Em contraste, as Gram-negativas possuem uma ou poucas camadas de peptidoglicano além de outra membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas, o que as torna mais resistentes (FIROOZABADI *et al.*, 2022).

Nas amostras contendo apenas o PLA e a quitosana, não foram detectadas áreas significativas inibitórias, para nenhum dos tipos de bactérias, Gram-negativas ou Gram-positivas. Nos discos de PLA que tiveram a quitosana e as ZnO NPs integradas à matriz polimérica, o comportamento antimicrobiano ao observado nas amostras contendo apenas ZnO NPs, demonstrando que a quitosana não influenciou na propriedade antimicrobiana.

Para fins comparativos, o teste também foi aplicado a duas amostras de antibióticos, cloranfenicol e imepenem, fármacos voltados ao tratamento de infecções bacterianas, ou seja, com grande potencial antimicrobiano, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Medidas de diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelo método de difusão em disco de ágar para biofilmes à base de PLA incorporados com CS e ZnO NPs.

Teste de difusão em disco - Halos em milímetros (mm) – Média ± Desvio Padrão																								
PLA				PLA + ZnO (600°C)			PLA + ZnO (800°C)			PLA + Quitosana			PLA + Quitosana + ZnO (600°C)			PLA + Quitosana + ZnO (800°C)			Cloranfenicol (c. positivo)			Imepenem (c. positivo)		
Escherichia coli ATCC 25922	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,0	29,0	29,0	22,0	21,0	21,0
	0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			29,0 ± 0,0			21,6 ± 0,5		
Salmonella enterica ATCC 14028	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,0	25,0	25,0	31,0	30,0	30,0
	0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			0,0 ± 0,0			24,7 ± 0,5			30,3 ± 0,5		
Bacillus cereus ATCC 14579	0,0	0,0	0,0	14,0	14,0	14,0	14,0	13,0	13,0	0,0	0,0	0,0	14,0	14,0	14,0	14,0	13,0	14,0	28,0	30,0	24,0	41,0	45,0	45,0
	0,0 ± 0,0			14,0 ± 0,0			13,3 ± 0,5			0,0 ± 0,0			14,0 ± 0,0			13,7 ± 0,5			27,3 ± 2,5			43,7 ± 1,9		
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,0	0,0	0,0	14,0	12,0	12,5	12,0	11,5	14,0	0,0	0,0	0,0	13,0	13,0	12,0	14,0	11,5	14,0	26,0	26,0	26,0	45,0	46,0	46,0
	0,0 ± 0,0			12,8 ± 0,8			12,5 ± 1,1			0,0 ± 0,0			12,6 ± 0,5			13,2 ± 1,2			26,0 ± 0,0			45,7 ± 0,5		

Fonte: Autoria própria (2022).

Os nanocompósitos, como as ZnO NPs utilizadas, apresentam atividade antibacteriana tanto por ação direta, agindo nas membranas celulares, podendo causar a ruptura ou dissolução da célula, quanto pela geração das espécies reativas de oxigênio (ERO), a exemplo dos óxidos e peróxidos. Outro fator que potencializa

essa propriedade é a capacidade de liberar íons de zinco (Zn^{2+}) em meio úmidos, com efeitos tóxicos capazes de danificar as estruturas celulares das bactérias (JIANG *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÃO

A síntese de ZnO NPs pelo método Pechini se mostrou eficaz na obtenção de um material com alta cristalinidade e pureza, com forma predominante de nanobastões. As análises demonstraram que tanto os precursores quanto as temperaturas de calcinação são fatores determinantes na definição das propriedades e características estruturais do produto final.

Por meio das técnicas de caracterização aplicadas foi possível observar que entre os sais de zinco utilizados (acetato, cloreto e nitrato), o ZnCl_2 resultou em nanopartículas mais bem definidas e com maior cristalinidade. Embora os diâmetros dos cristalitos não tenham variado significativamente em função do precursor, a temperatura de calcinação influenciou tanto o tamanho quanto a cristalinidade das ZnO NPs. As amostras calcinadas a 800°C exibiram maior cristalinidade e diâmetro em comparação às submetidas a 600°C, que apresentaram cristalitos menores, porém ligeiramente menos cristalinos. Pelo método de Williamson-Hall (W-H), as nanopartículas aquecidas a 600°C apresentaram tamanho na faixa de 29 a 29,6 nm e as levadas a 800°C, de 44 a 54 nm. Já pelo método de Scherrer, os valores médios para 600°C variaram entre 21 e 22,5 nm, e para 800°C, entre 29 e 33 nm.

Os biofilmes à base de PLA exibiram uma microestrutura com rugosidade e presença de pequenos poros, porém bastante flexíveis e resistentes.

A incorporação de ZnO NPs e quitosana à matriz polimérica do PLA teve como objetivo conferir propriedades antimicrobianas, as quais foram testadas pelo método de difusão em disco de ágar. Os resultados comprovaram a atividade antimicrobiana nos discos que tiveram a adição de ZnO NPs, para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), evidenciada pela formação de halos de inibição, sem distinção significativa entre as temperaturas de calcinação aplicadas (600 e 800°C). Desta forma, o tamanho das nanopartículas não foi um fator relevante na ação biocida. A eficácia antimicrobiana não foi comprovada para bactérias Gram-negativas, que são mais resistentes. A quitosana, por sua vez, não demonstrou potencial antimicrobiano contra nenhum dos tipos de bactérias testadas.

Considerando as características apresentadas, a adição de ZnO NPs a biopolímeros apresenta-se como uma solução promissora, devido à sua segurança para a saúde, facilidade de incorporação por métodos simples e econômicos, e melhorias nas propriedades mecânicas e antimicrobianas. Isso faz com que essa combinação seja uma opção atrativa na área de embalagens de alimentos, podendo

prolongar a validade dos produtos e auxiliar na prevenção de contaminação.

Para uma maior otimização dos resultados e da atividade contra micro-organismos, futuros estudos devem explorar

Por meio de uma investigação mais aprofundada, fatores como a proporção de ZnO NPs, métodos de síntese, além de parâmetros como pH, temperatura e pressão aplicados durante o processo, podem ser explorados para uma maior otimização dos resultados e da atividade contra micro-organismos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. et al. (bio)polymer/ZnO nanocomposites for packaging applications: A review of gas barrier and mechanical properties. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, p. 1494, 2019.
- ABUBAKAR, S. et al. Controlled growth of semiconducting ZnO nanorods for piezoelectric energy harvesting-based nanogenerators. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 6, p. 1025, 2023.
- AGARWAL, H. et al. Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. **Chemico-biological interactions**, v. 286, p. 60–70, 2018.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quimica nova**, v. 25, n. 5, p. 835–841, 2002.
- ANDERSON, R. J.; BENDELL, D. J.; GROUNDWATER, P. W. **Organic Spectroscopic Analysis**. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry, 2004.
- ARANAZ, I. et al. Chitosan: An overview of its properties and applications. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3256, 2021.
- ARVANEH A. R.; SADAT-SHOJAI M., Biodegradable Aliphatic Polyesters for Application in Tissue Engineering, **Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)**, 34, 319-348, 2021.
- AVÉROUS, L. Polylactic acid: Synthesis, properties and applications. Em: **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 433–450.

AYOUB, I. et al. Advances in ZnO: Manipulation of defects for enhancing their technological potentials. **Nanotechnology reviews**, v. 11, n. 1, p. 575–619, 2022.

AZEREDO, H. M. C. et al. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. ed. Brasília/DF: Embrapa, 2012.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processo**, p. 27–34, 2007.

BA-ABBAD, M. M. et al. The effect of process parameters on the size of ZnO nanoparticles synthesized via the sol–gel technique. **Journal of alloys and compounds**, v. 550, p. 63–70, 2013.

BALLA, E. et al. Poly (lactic acid): A versatile biobased polymer for the future with multifunctional properties—from monomer synthesis, polymerization techniques and molecular weight increase to PLA applications. **Polymers**, v. 13, n. 11, p. 1822, 2021.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARIKANI, M. et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian polymer journal**, v. 23, n. 4, p. 307–326, 2014.

BARUAH, S.; DUTTA, J. Hydrothermal growth of ZnO nanostructures. **Science and technology of advanced materials**, v. 10, n. 1, p. 013001, 2009.

BEHERA, S. UV-visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. **Journal of analytical & bioanalytical techniques**, v. 03, n. 06, 2012.

BIKIARIS, N. D. et al. Recent Advances in the Investigation of Poly(lactic acid) (PLA) Nanocomposites: Incorporation of Various Nanofillers and their Properties and Applications. **Polymers**, v. 15, n. 5, p. 1196, 2023.

BOLSKIS, E.; ADOMAVIČIŪTĖ, E.; GRIŠKONIS, E. Formation and investigation of mechanical, thermal, optical and wetting properties of melt-spun multifilament Poly(lactic acid) yarns with added rosins. **Polymers**, v. 14, n. 3, p. 379, 2022.

BRADLEY, E. L.; CASTLE, L.; CHAUDHRY, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. **Trends in food science & technology**, v. 22, n. 11, p. 604–610, 2011.

BRASIL. Lei Nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada ANVISA - RDC Nº 843, de 22 de fevereiro de 2024**. Dispõe sobre a regularização de alimentos e embalagens sob competência do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) destinados à oferta no território nacional. Diário Oficial da União nº 40, Brasília, DF, 28 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada ANVISA - RDC Nº 326, de 3 de dezembro de 2019**. Estabelece a lista positiva de aditivos destinados à elaboração de materiais plásticos e revestimentos poliméricos em contato com alimentos e dá outras providências. Diário Oficial da União nº 234, Brasília, DF, 4 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 91, DE 11 DE MAIO DE 2001**. Diário Oficial da União nº 93-E, Brasília, DF, 15 mai. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Embalagens**. 19 out. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/alimentos/embalagens>>. Acesso em: 28 jun. 2024.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6.2, p. 127–139, 2011.

BUNACIU, A. A.; UDRIȘTIOIU, E. G.; ABOUL-ENEIN, H. Y. X-ray diffraction: Instrumentation and applications. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 45, n. 4, p. 289–299, 2015.

CASALINI, T. et al. A perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, 2019.

CASTRO-AGUIRRE, E. et al. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced drug delivery reviews**, v. 107, p. 333–366, 2016.

CHEN, C.; DONG, L.; CHEUNG, M. K. Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/chitosan blends. **European polymer journal**, v. 41, n. 5, p. 958–966, 2005.

CHIENG, B. et al. Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets. **Polymers**, v. 6, n. 1, p. 93–104, 2013.

CHIKKANNA, M. M.; NEELAGUND, S. E.; RAJASHEKARAPPA, K. K. Green synthesis of Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and their biological activity. **SN applied sciences**, v. 1, n. 1, 2019.

CHO, Y. C.; AHN, S. I. Fabricating a Raman spectrometer using an optical pickup unit and pulsed power. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020.

CHONG, W. J. et al. Biodegradable PLA-ZnO nanocomposite biomaterials with antibacterial properties, tissue engineering viability, and enhanced biocompatibility. **Smart Materials in Manufacturing**, v. 1, n. 100004, p. 100004, 2023.

COSTA, A. C. F. et al. Avaliação do tamanho da partícula do ZnO obtido pelo método Pechini. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 14–19, 2007.

DANA, H. R.; EBRAHIMI, F. Synthesis, properties, and applications of polylactic acid-based polymers. **Polymer Engineering & Science**, v. 63, n. 1, p. 22–43, 2023.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura- Aplicações e preparação de amostras - Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre/RS: EDUPUCRS, 2007.

DEVESA, S. et al. Williamson-hall analysis in estimation of crystallite size and lattice strain in $\text{Bi}_{1.34}\text{Fe}_{0.66}\text{Nb}_{1.34}\text{O}_{6.35}$ prepared by the sol-gel method. **Materials science & engineering. B, Solid-state materials for advanced technology**, v. 263, n. 114830, p. 114830, 2021.

DIMESSO, L. Pechini processes: An alternate approach of the sol–gel method, preparation, properties, and applications. Em: **Handbook of Sol-Gel Science and Technology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1–22.

DJURIŠIĆ, A. B.; LEUNG, Y. H. Optical properties of ZnO nanostructures. **Small**, v. 2, n. 8–9, p. 944–961, 2006.

DJURIŠIĆ, A. B.; NG, A. M. C.; CHEN, X. Y. ZnO nanostructures for optoelectronics: Material properties and device applications. **Progress in quantum electronics**, v. 34, n. 4, p. 191–259, 2010.

ESPITIA, P. J. P. et al. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and bioprocess technology**, v. 5, n. 5, p. 1447–1464, 2012.

FANG, H. et al. Improvement of mechanical property for PLA/TPU blend by adding PLA-TPU copolymers prepared via in situ ring-opening polymerization. **Polymers**, v. 14, n. 8, p. 1530, 2022.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced drug delivery reviews**, v. 107, p. 367–392, 2016.

FATHIMA, P. E. et al. Polylactic acid/chitosan films for packaging of Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*). **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 1002–1010, 2018.

FERNANDES, D. M. et al. Preparation, characterization, and photoluminescence study of PVA/ZnO nanocomposite films. **Materials chemistry and physics**, v. 128, n. 3, p. 371–376, 2011.

FIROOZABADI, F. D.; SAADATABADI, A. R.; ASEFNEJAD, A. In vitro studies and evaluation of antibacterial properties of biodegradable bone joints based on PLA/PCL/HA. **Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences**, v. 11, n. 1, 2022.

GABOR, D.; TITA, O. Biopolymers used in food packaging: a review. **Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology**, v. XVI, n.2, 2012.

GARLOTTA, D. A literature review of poly(lactic acid). **Journal of polymers and the environment**, v. 9, n. 2, p. 63–84, 2001.

GOLDSTEIN, J. I. et al. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. 4. ed. Nova Iorque, NY, USA: Springer, 2017.

GOTO, T. et al. Degradation of polylactic acid using sub-critical water for compost. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2434, 2020.

GRANDE, R.; CARVALHO, A. J. F. Compatible Ternary Blends of Chitosan/poly(vinyl alcohol)/poly(lactic acid) Produced by Oil-in-Water Emulsion Processing. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 907–914, 2011.

GUERRERO-PÉREZ, M. O.; PATIENCE, G. S. Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR. **The Canadian journal of chemical engineering**, v. 98, n. 1, p. 25–33, 2020.

GUPTA, A. P.; KUMAR, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. **European polymer journal**, v. 43, n. 10, p. 4053–4074, 2007.

HAMAD, K. et al. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. **EXPRESS polymer letters**, v. 9, n. 5, p. 435–455, 2015.

HANAOR, D. et al. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, n. 1, p. 235–244, 2012.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 3, p. 117–131, 2007.

HIRANO, S. Chitin Biotechnology Applications. Em: **Biotechnology Annual Review**. [s.l.] Elsevier, 1996. p. 237–258.

HIROTA, K. et al. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. **Ceramics international**, v. 36, n. 2, p. 497–506, 2010.

HOSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M.; KATOUZIAN, I. Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 2, p. 161–181, 2018.

HUANG, Y.-W.; WU, C.-H.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: Recent insights from in vitro studies. **Materials**, v. 3, n. 10, p. 4842–4859, 2010.

IKUTA, K. S. et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 2022.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL). Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA). Disponível em: <<https://ital.agricultura.sp.gov.br/cetea>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ITO, D.; PADULA, M. EMBALAGEM E SEGURANÇA DOS ALIMENTOS. **ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos. Informativo CETEA: Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 18, n. 2, 2006.

JAIN, A.; KHAN, W.; KYZIOŁ, A. Particulate systems of PLA and its copolymers. Em: **Materials for Biomedical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 349–380.

JIANG, S.; LIN, K.; CAI, M. ZnO nanomaterials: Current advancements in antibacterial mechanisms and applications. **Frontiers in chemistry**, v. 8, 2020.

JIN, T. et al. Chitin and chitosan on the nanoscale. **Nanoscale horizons**, v. 6, n. 7, p. 505–542, 2021.

JOE, A. et al. Antibacterial mechanism of ZnO nanoparticles under dark conditions. **Journal of industrial and engineering chemistry**, v. 45, p. 430–439, 2017.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H.-C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2–3, p. 105–119, 2010.

KAN, Z. et al. Facile preparation of stereoblock PLA from ring-opening polymerization of rac-lactide by a synergetic binary catalytic system containing ureas and alkoxides. **Frontiers in chemistry**, v. 6, 2018.

KE, C.-L. et al. Antimicrobial actions and applications of chitosan. **Polymers**, v. 13, n. 6, p. 904, 2021.

KHAN, M. F. et al. Sol-gel synthesis of thorn-like ZnO nanoparticles endorsing mechanical stirring effect and their antimicrobial activities: Potential role as nano-antibiotics. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 2016.

KIM, I. et al. Poly(lactic acid)/ZnO bionanocomposite films with positively charged ZnO as potential antimicrobial food packaging materials. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1427, 2019.

KIM, Y. H. et al. 3D-printed pectin/carboxymethyl cellulose/ZnO bio-inks: Comparative analysis with the solution casting method. **Polymers**, v. 14, n. 21, p. 4711, 2022.

KLINGSHIRN, C. ZnO: From basics towards applications. **Physica status solidi. B, Basic research**, v. 244, n. 9, p. 3027–3073, 2007.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

KRAŚNIEWSKA, K.; GALUS, S.; GNIEWOSZ, M. Biopolymers-based materials containing silver nanoparticles as active packaging for food applications—A review. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 698, 2020.

KUDELSKI, A. Analytical applications of Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 76, n. 1, p. 1–8, 2008.

KUMAR, R. et al. Zinc oxide nanostructures for NO₂ gas–sensor applications: A review. **Nano-micro letters**, v. 7, n. 2, p. 97–120, 2015.

KUMAR, R. et al. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. **Ceramics international**, v. 43, n. 5, p. 3940–3961, 2017.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. DE. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quimica nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

LAURENTI, M. et al. Surface engineering of nanostructured ZnO surfaces. **Advanced materials interfaces**, v. 4, n. 2, 2017.

LI, J.; ZHUANG, S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. **European polymer journal**, v. 138, n. 109984, p. 109984, 2020.

LI, Q. et al. **Applications of Chitin and Chitosan. Applications and Properties of Chitosan**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1996.

LU, X. et al. Modified Pechini synthesis and characterization of Y-doped strontium titanate perovskite. **Solid state ionics**, v. 178, n. 19–20, p. 1195–1199, 2007.

LUNARDI, C. N. et al. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. **The Canadian journal of chemical engineering**, v. 99, n. 3, p. 627–639, 2021.

MACEDO, J. et al. Atividade antimicrobiana de quitosanas e seus derivados: influência das características estruturais. **Quimica nova**, v. 45, p. 690–704, 2022.

MANDAL, S.; SHAW, G.; WILLIAMS, O. A. Comparison of nanodiamond coated quartz filter with commercial electropositive filters: Zeta potential and dye retention study. **Carbon**, v. 199, p. 439–443, 2022.

MANZOOR, U. et al. Quantum confinement effect in ZnO nanoparticles synthesized by co-precipitate method. **Physica. E, Low-dimensional systems & nanostructures**, v. 41, n. 9, p. 1669–1672, 2009.

MAPELLI, R. F. ZINCO – CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES COMO ELEMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA. **Revista Tecnologia e Tendências**, v. 9, n. 1, p. 86–98, 2014.

MATEI, A. et al. Synthesis and characterization of ZnO – polymer nanocomposites. **International journal of material forming**, v. 1, n. S1, p. 767–770, 2008.

MENDES, C. R. et al. Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 2022.

MENG, W. et al. Pickering emulsions with chitosan and macroalgal polyphenols stabilized by layer-by-layer electrostatic deposition. **Carbohydrate polymers**, v. 300, n. 120256, p. 120256, 2023.

MEULENKAMP, E. A. Synthesis and growth of ZnO nanoparticles. **The journal of physical chemistry. B**, v. 102, n. 29, p. 5566–5572, 1998.

MOEZZI, A.; MCDONAGH, A. M.; CORTIE, M. B. Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. **Chemical engineering journal (Lausanne, Switzerland: 1996)**, v. 185–186, p. 1–22, 2012.

MOFOKENG, J. P. et al. Comparison of injection moulded, natural fibre-reinforced composites with PP and PLA as matrices. **Journal of thermoplastic composite materials**, v. 25, n. 8, p. 927–948, 2012.

MOHAMMED, A.; ABDULLAH, A. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. **Proceedings of 201 international conference on hydraulics and pneumatics - HERVEX**, 2019.

MOHRIG, J. R.; HAMMOND, C. N.; SCHATZ, P. F. **Techniques in Organic Chemistry**. 3. ed. Nova Iorque, NY, USA: W.H. Freeman, 2010.

MOUSTAFA, H. et al. Eco-friendly polymer composites for green packaging: Future vision and challenges. **Composites. Part B, Engineering**, v. 172, p. 16–25, 2019.

MUHAMMAD, W. et al. Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using *Papaver somniferum* L. **RSC advances**, v. 9, n. 51, p. 29541–29548, 2019.

MULLA, M. Z. et al. Poly lactic acid (PLA) nanocomposites: Effect of inorganic nanoparticles reinforcement on its performance and food packaging applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 7, p. 1967, 2021.

MURALI, M. et al. Plant-mediated zinc oxide nanoparticles: Advances in the new millennium towards understanding their therapeutic role in biomedical applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1662, 2021.

NAHHAS, A. M. Recent advances of ZnO based nanowires and nanorods devices. **American journal of nanomaterials**, v. 6, n. 1, p. 15–23, 2018.

NATH, D.; SINGH, F.; DAS, R. X-ray diffraction analysis by Williamson-Hall, Halder-Wagner and size-strain plot methods of CdSe nanoparticles- a comparative study. **Materials chemistry and physics**, v. 239, n. 122021, p. 122021, 2020.

NAZEER, M. A. et al. 3D printed poly (lactic acid) scaffolds modified with chitosan and hydroxyapatite for bone repair applications. **Materials today. Communications**, v. 25, n. 101515, p. 101515, 2020.

NUNES, C.; MAHENDRASINGAM, A.; SURYANARAYANAN, R. Quantification of crystallinity in substantially amorphous materials by synchrotron X-ray powder diffractometry. **Pharmaceutical research**, v. 22, n. 11, p. 1942–1953, 2005.

OLIVEIRA, A. C. S.; BORGES, S. V. Poli (Ácido Lático) aplicado para embalagens de alimentos: uma revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 15, n.1, p. 1–10, 2020.

PADULA, M.; CUERVO, M. Legislação de embalagem para contato com alimentos: MERCOSUL e outros países Latinoamericanos. **Polímeros**, v. 14, n. 1, p. E8–E13, 2004.

PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. **Measurement: journal of the International Measurement Confederation**, v. 135, p. 896–904, 2019.

PECHINI, M. P. **Method of preparing lead and alkaline earth titanates and nionates and coating method using the same form a capacitor**. United States Patent Office: Patent N^o.3,330,697, July 11, 1967.

PERERA, K. Y.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Biopolymer-based sustainable food packaging materials: Challenges, solutions, and applications. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 12, p. 2422, 2023.

PORTA, R.; SABBAH, M.; DI PIERRO, P. Biopolymers as food packaging materials. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 14, p. 4942, 2020.

POZNANSKI, P.; HAMEED, A.; ORCZYK, W. Chitosan and chitosan nanoparticles: Parameters enhancing antifungal activity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 7, p. 2996, 2023.

PRABHU, Y. T. et al. X-ray analysis by Williamson-hall and size-strain plot methods of ZnO nanoparticles with fuel variation. **World journal of nano science and engineering**, v. 04, n. 01, p. 21–28, 2014.

PRASANNA, V. L.; VIJAYARAGHAVAN, R. Insight into the mechanism of antibacterial activity of ZnO: Surface defects mediated reactive oxygen species even in the

dark. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 31, n. 33, p. 9155–9162, 2015.

PUNNOOSE, A. et al. Cytotoxicity of ZnO nanoparticles can be tailored by modifying their surface structure: A green chemistry approach for safer nanomaterials. **ACS sustainable chemistry & engineering**, v. 2, n. 7, p. 1666–1673, 2014.

QU, F.; MORAIS, P. C. An oxide semiconductor nanoparticle in an aqueous medium: A surface charge density investigation. **The journal of physical chemistry. B**, v. 104, n. 22, p. 5232–5236, 2000.

RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in polymer science**, v. 28, n. 11, p. 1539–1641, 2003.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. Basingstoke, England: Palgrave Macmillan, 1992.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 807–812, 2004.

ROCHA, R. A.; MUCCILLO, E. N. S. Efeito da temperatura de calcinação e do teor de dopante nas propriedades físicas da céria-gadolínia preparada pela complexação de cátions com ácido cítrico. **Cerâmica**, v. 47, n. 304, p. 219–224, 2001.

ROMASHKIN, A. V. et al. Polylactide film deposition onto titanium surface from different solutions. **Journal of physics. Conference series**, v. 1124, p. 031027, 2018.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate polymers**, v. 82, n. 2, p. 277–283, 2010.

SAVI, B. M. et al. Obtenção de nanopartículas de ZnO a partir de processamento sol-gel. 55º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Porto de Galinhas, PE. p. 683–692, 2011.

SEKHON, B. S. Food nanotechnology – an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 3, p. 1, 2010.

SHABANNIA, R.; HASSAN, H. A. Characteristics of photoconductive UV photodetector based on ZnO nanorods grown on polyethylene naphthalate substrate by chemical bath deposition method. **Electronic materials letters**, v. 10, n. 4, p. 837–843, 2014.

SHARMA, A. et al. Effect of surface groups on the luminescence property of ZnO nanoparticles synthesized by sol–gel route. **Surface science**, v. 606, n. 3–4, p. L13–L17, 2012.

SHEN, L.; ZHANG, H.; GUO, S. Control on the morphologies of tetrapod ZnO nanocrystals. **Materials chemistry and physics**, v. 114, n. 2–3, p. 580–583, 2009.

SILAMBARASAN, M.; SARAVANAN, S.; SOGA, T. Raman and photoluminescence studies of Ag and Fe-doped ZnO nanoparticles. 2015.

SINGH, A. et al. Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. **Journal of materials science**, v. 53, n. 1, p. 185–201, 2018.

SMITH, K. C. A.; OATLEY, C. W. The scanning electron microscope and its fields of application. **British journal of applied physics**, v. 6, n. 11, p. 391–399, 1955.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts**. 3. ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2004.

SOUZA, V. G. L.; FERNANDO, A. L. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review. **Food packaging and shelf life**, v. 8, p. 63–70, 2016.

SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO). **Ceramics international**, v. 39, n. 8, p. 9803–9808, 2013.

STAVELEY, L. A. K. **The characterization of chemical purity : organic compounds**. Londres, England: Butterworths, 1971.

SUN, Y. et al. The applications of morphology controlled ZnO in catalysis. **Catalysts (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 12, p. 188, 2016.

SURYANI, S. et al. Modification of Poly Lactid Acid (PLA)/Chitosan with cinnamon essential oil for antibacterial applications. **IOP conference series. Materials science and engineering**, v. 830, n. 4, p. 042017, 2020.

TAM, K. H. et al. Antibacterial activity of ZnO nanorods prepared by a hydrothermal method. **Thin solid films**, v. 516, n. 18, p. 6167–6174, 2008.

TEMANE, L. T.; ORASUGH, J. T.; RAY, S. S. Recent advances and outlook in 2D nanomaterial-based flame-retardant PLA materials. **Materials**, v. 16, n. 17, p. 6046, 2023.

THEAKSTONE, A. G. et al. Fourier-transform infrared spectroscopy of biofluids: A practical approach. **Translational biophotonics**, v. 3, n. 2, 2021.

TILLEY, S. K.; FRY, R. C. Priority environmental contaminants. Em: **Systems Biology in Toxicology and Environmental Health**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 117–169.

TRIVEDI, A. K.; GUPTA, M. K.; SINGH, H. PLA based biocomposites for sustainable products: A review. **Advanced industrial and engineering polymer research**, v. 6, n. 4, p. 382–395, 2023.

VAID, R. et al. Hydrolytic degradation of polylactic acid fibers as a function of pH and exposure time. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 24, p. 7554, 2021.

VAKATI, S. R. et al. Synthesis of poly-lactic acid by ring open polymerization from beer spent grain for drug delivery. **Polymers**, v. 16, n. 4, p. 483, 2024.

VEERASINGAM, S. et al. Contributions of Fourier transform infrared spectroscopy in microplastic pollution research: A review. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 51, n. 22, p. 2681–2743, 2021.

VILLADIEGO, A. M. D. et al. Filmes e revestimentos comestíveis Na Conservação DE produtos alimentícios/ edible films and coatings for the preservation of food products. **Revista CERES**, v. 52, n. 300, 2005.

WAN, L.; ZHOU, S.; ZHANG, Y. Parallel advances in improving mechanical properties and accelerating degradation to polylactic acid. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 1093–1102, 2019.

WANG, M. et al. Time-resolved study of nanomorphology and nanomechanic change of early-stage mineralized electrospun poly(lactic acid) fiber by scanning electron microscopy, Raman spectroscopy and atomic force microscopy. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 8, p. 223, 2017.

WANG, X. et al. The influence of crystallite size and crystallinity of anatase nanoparticles on the photo-degradation of phenol. **Journal of catalysis**, v. 310, p. 100–108, 2014.

WANG, Z., LIU, Y., ZHANG, Z. Pyrolysis. In: **Handbook of Nanophase and Nanostructured Materials**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 26–54.

WANG, Z. L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. **Journal of physics. Condensed matter: an Institute of Physics journal**, v. 16, n. 25, p. R829–R858, 2004.

WATANABE, K. Chloroform and dichloromethane. In: **Drugs and Poisons in Humans**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 143–147.

WILFRED, O. et al. Biodegradation of Polyactic Acid and starch composites in compost and soil. **International Journal of Nano Research**, 1(2), 1-11, 2018.

WROŃSKA, N. et al. Antimicrobial effect of chitosan films on food spoilage bacteria. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 11, p. 5839, 2021.

XIAO, L. et al. Poly(lactic acid)-based biomaterials: Synthesis, modification and applications. Em: **Biomedical Science, Engineering and Technology**. [s.l.] InTech, 2012.

XU, X. et al. Antimicrobial mechanism based on H₂O₂ generation at oxygen vacancies in ZnO crystals. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 29, n. 18, p. 5573–5580, 2013.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZAK, A. K.; MAJID, W. A.; ABRISHAMI, M. E.; YOUSEFI, R. X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson–Hall and size–strain plot methods. *Solid State Sci.* 2011, 13, 251-256.

ZEVIN, L. S.; KIMMEL, G. **Quantitative X-ray diffractometry**. 1995. ed. Nova Iorque, NY, USA: Springer, 1995.

ZHANG, H. Z. et al. Properties of different chitosan/low-density polyethylene antibacterial plastics. **Journal of applied polymer science**, v. 113, n. 3, p. 2018–2021, 2009.

ZHANG, J. et al. Control of ZnO morphology via a simple solution route. **Chemistry of materials: a publication of the American Chemical Society**, v. 14, n. 10, p. 4172–4177, 2002.

ZHANG, Y. et al. Synthesis, characterization, and applications of ZnO nanowires. **Journal of nanomaterials**, v. 2012, p. 1–22, 2012.

ZHAO, X.; LI, M.; LOU, X. Sol–gel assisted hydrothermal synthesis of ZnO microstructures: Morphology control and photocatalytic activity. **Advanced powder technology: the international journal of the Society of Powder Technology, Japan**, v. 25, n. 1, p. 372–378, 2014.

ZUBER, M.; ZIA, K. M.; BARIKANI, M. Chitin and chitosan based blends, composites and nanocomposites. Em: **Advances in Natural Polymers**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 55–119.