



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS DE
ALIMENTOS

**FILMES ATIVOS ANTIMICROBIANOS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO-
QUITOSANA E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA INCORPORADOS COM
LISOZIMA**

LUANA DIAS ARAÚJO

Itapetinga – BA
Maior/2020
Brasil.

LUANA DIAS ARAÚJO

**FILMES ATIVOS ANTIMICROBIANOS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO-
QUITOSANA E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA INCORPORADOS COM
LISOZIMA**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora:

Prof^a. D. Sc. Cristiane Patrícia de Oliveira

Co-Orientadores:

Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos

Prof^a. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Itapetinga – BA
Maio/2020
Brasil.**



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA
 Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos - UESB/RTR/PPG/PPGECAL

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: FILMES ATIVOS ANTIMICROBIANOS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICOQUITOSANA E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA INCORPORADOS COM LISOZIMA.

Autor (a): LUANA DIAS ARAÚJO

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cristiane Patrícia de Oliveira

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

| | |
|---|--|
| Prof. ^a Dr. ^a Cristiane Martins Veloso UESB | Prof. ^a Dr. ^a Alexilda Oliveira de Souza UESB |
| Prof. ^a Dr. ^a Cristiane Patrícia de Oliveira Orientadora - UESB Presidente da Banca | |

Itapetinga-BA, 28 de maio de 2020



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Martins veloso, Professor Titular**, em 13/09/2020, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).

Documento assinado eletronicamente por **Alexilda Oliveira de Souza, Professor**, em 13/09/2020, às 23:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº](#)



[15.805, de 30 de dezembro de 2014.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Patricia de Oliveira, Professor Titular (3º Grau)**, em 14/09/2020, às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://seibahia.ba.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **00022104084** e o código CRC **FD9A1BD4**.

Referência: Processo nº 072.7475.2020.0013381-77

SEI nº 00022104084

660.63 Araújo, Luana Dias
4 Filmes ativos antimicrobianos de álcool polivinílico-quitosana e
A69f quitosana-amido-gelatina incorporados com lisozima. / Luana Dias Araújo.
- Itapetinga: UESB, 2020.
84f.

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Cristiane Patrícia de Oliveira e coorientação do Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos e Prof^a. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

1. Embalagens ativas - Antimicrobiana. 2. Filmes biodegradáveis - Enzima antimicrobiana. 3. Blendas poliméricas - Filmes biodegradáveis. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Oliveira, Cristiane Patrícia de. III. Santos, Leandro Soares. IV. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Filmes ativos - Enzima - Álcool polivinílico - Quitosana
2. Enzima antimicrobiana - Filmes ativos - Amido e gelatina

“A *persistência é o menor caminho do êxito*”. (Charles Chaplin)

Á Deus, pelo dom da vida e por me abrir caminhos.

Aos meus pais Santos Zeferino Dias e Maria da Silva Araújo por me apoiarem nos estudos, me amarem e estar ao meu lado.

Aos meus irmãos Felipe Dias Araújo e Flávia Dias Araújo pelo companheirismo.

Ao meu amado José Paulo da Rocha e família por zelarem por mim.

Aos mestres Cristiane Patrícia, Leandro Soares e Renata Bonomo pelos ensinamentos.

E a todos que participaram desta jornada, contribuindo de alguma forma para a conclusão desta pesquisa.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço esta conquista ao meu pai, o Sr. Santos Zeferino Dias por ser o principal incentivador e financiador da pesquisa, apoiando com muito zelo e carinho os meus passos e proporcionando toda a estrutura para que eu concluísse esta etapa com êxito. À minha mãe, Sra. Maria da Silva Araújo por me educar como pessoa e ser humano compassivo, pelo apoio, cuidado e amor incondicional. Eu amo vocês!

Aos meus familiares Delcy Mendes, Antônio Roque da Silva, minha avó Adelina Soares, minha cunhada Francelly Ferreira, meus irmãos Felipe Dias Araújo, Flávia Dias Araújo e Same Dias o meu muito obrigado por estarem sempre ao meu lado contribuindo de alguma forma para a minha formação, externo a minha admiração, orgulho e amor.

Ao meu amado, José Paulo da Rocha, por estar comigo todos os dias acompanhando esta trajetória, me ajudando e auxiliando da melhor forma, ainda que estivesse em outro Estado (Minas Gerais). À família dele, por cuidarem de mim como uma filha, recebam o meu sentimento de gratidão.

Aos meus amigos agradeço todo o carinho e compreensão pela minha ausência, incumbida por um bem maior. Agradeço também aos amigos que a Universidade me proporcionou, que me auxiliaram em algum momento no decorrer deste trabalho, sem dúvida sem vocês não seria possível chegar até aqui.

Às meninas do Laboratório de Análise de Alimentos (Lab 3): Aléssia, Jéssica, Lavínia, Júlia, Camilly e Taci por estarem sempre ao meu lado, aprendemos muito juntas, espero revê-las em alguma outra oportunidade nessa vida, vou levar vocês no meu coração com muito carinho. Ao Tarcísio, Gilberto, Dona Fátima, Marcos e Jardel por serem tão acolhedores, de grande alma, além de excelentes profissionais: sem vocês certamente o dia a dia no módulo de laboratórios não seria o mesmo! Sentirei muitas saudades!

Aos meus mestres, professora Cristiane Patrícia, Leandro Soares, Renata Bonomo, Paulo Bonomo, Rafael Fontan, Gabrielle Fontan, Lígia Miranda, Daniela Oliveira, Andréa Gomes, Luciano Brito, Sibelli Passini, Alexilda Oliveira, Cristiane Martins Veloso, Leonardo Pontes, Simone Andrade e Carlos Bernard o meu muito obrigado por me concederem o material, conhecimento ou o espaço em seus respectivos laboratórios para que fosse possível a execução das análises deste trabalho, aprendi com vocês o real significado de ensinar, continuem dispostos a contribuir com o

progresso da pesquisa no país. Para aqueles não foram citados, desde já peço que perdoe a falta e deixo o meu muito obrigado a vocês também.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho e a CAPES pelos recursos cedidos à Instituição.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | x |
| QUADROS DO APÊNDICE | xi |
| RESUMO | xii |
| SUMMARY | xiii |
| I – REFERENCIAL TEÓRICO..... | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1. Embalagens ativas | 3 |
| 2.2. Embalagens ativas antimicrobianas | 3 |
| 2.2.1. Lisozima como agente antimicrobiano em embalagens ativas..... | 8 |
| 2.3. Polímeros biodegradáveis na produção de filmes | 12 |
| 2.3.1. Quitosana | 12 |
| 2.3.2. Álcool polivinílico (PVA) | 13 |
| 2.3.3. Amido | 14 |
| 2.3.4. Gelatina | 15 |
| 2.4. Blendas poliméricas para produção de filmes | 16 |
| 2.5. Análise e caracterização de filmes | 18 |
| 2.5.1. Atividade antimicrobiana | 18 |
| 2.5.2. Propriedades de barreira..... | 19 |
| 2.5.3. Propriedades mecânicas..... | 20 |
| 2.5.4. Análise de cor | 21 |
| 2.5.5. Caracterização dimensional, física e química | 21 |
| 2.5.6. Análises térmicas..... | 22 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 24 |
| II – OBJETIVOS GERAIS..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 1. Objetivo geral | 31 |
| 2. Objetivos específicos | 31 |
| III – CAPÍTULO I – Neste capítulo apresenta-se o esboço do artigo intitulado: SÍNTESE E PROPRIEDADES DOS FILMES DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO-QUITOSANA (PVAQ) E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA (QAG) INCORPORADAS COM LISOZIMA a ser submetido para a Revista “Food Hydrocolloids” ISSN 0268-005X. | |
| RESUMO | 32 |
| 1. INTRODUÇÃO | 32 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 2.1. Material para o preparo dos filmes | 34 |
| 2.2. Elaboração das soluções filmogênicas | 34 |
| 2.2.1. Preparo dos filmes | 34 |
| 2.2.1.1. Filme de PVA e quitosana (PVAQ) | 34 |
| 2.2.1.2. Filme de quitosana, fécula de batata e gelatina comercial (QAG) | 35 |
| 2.3. Avaliação dos filmes | 35 |
| 2.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana | 35 |
| 2.3.2. Espessura | 35 |
| 2.3.3. Solubilidade | 36 |
| 2.3.4. Permeabilidade ao vapor d’água | 36 |
| 2.3.5. Propriedades mecânicas | 37 |
| 2.3.6. Análise colorimétrica | 38 |
| 2.3.7. Percentual de Transparência | 39 |
| 2.3.8. Espectroscopia UV/VIS | 39 |
| 2.3.9. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier | 39 |
| 2.3.10. Difração de raios X | 40 |
| 2.3.11. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA) . | 40 |
| 2.3.12. Análise estatística | 41 |
| 2.3.12.1. Delineamento experimental | 41 |
| 2.3.12.2. Análise estatística dos ensaios | 41 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Análise visual dos filmes de PVAQ e QAG | 41 |
| 3.2. Atividade Antimicrobiana | 42 |
| 3.3. Espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e percentual de transparência dos filmes | 44 |
| 3.4. Propriedades mecânicas | 46 |
| 3.5. Análise de cor | 48 |
| 3.6. Espectroscopia UV/VIS | 49 |
| 3.7. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier | 50 |
| 3.8. Difração de raios X (DRX) | 54 |
| 3.9. Análises térmicas | 56 |
| 3.9.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) | 56 |
| 3.9.2. Termogravimetria (TGA) | 60 |
| 4. CONCLUSÃO | 61 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
| IV – CONCLUSÃO GERAL | 67 |

LISTA DE FIGURAS

I – REFERENCIAL TEÓRICO

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura da quitosana. Fonte: Google Imagens..... | 12 |
| Figura 2: Estrutura parcial do álcool polivinílico. Fonte: Google Imagens..... | 13 |
| Figura 3: Estrutura da amilose com cadeia simples do tipo α (1-4). Fonte: Google Imagens..... | 14 |
| Figura 4: Estrutura da amilopectina com cadeias lineares e ramificadas do tipo α (1-4) e α (1-6). Fonte: Google Imagens..... | 14 |

III – CAPÍTULO I - SÍNTESE E PROPRIEDADES DAS BLENDS DAS BLENDS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO-QUITOSANA (PVAQ) E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA INCORPORADAS COM LISOZIMA (QAG)

| | |
|---|----|
| Figura A: Filme controle de PVAQ 0,0%..... | 42 |
| Figura B: Filme controle de QAG 0,0%..... | 42 |
| Figura 1: Espectroscopia de varredura nas regiões UV/Visível na faixa de 200 a 700 nm para os filmes de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5%; 2,5%. | 50 |
| Figura 2: Comportamento das blends de PVAQ e QAG com 0,0%; 1,5% e 2,5% de lisozima em espectroscopia via FTIR | 52 |
| Figura 3: Difratoograma dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%. | 56 |
| Figura 4: Calorimetria diferencial de varredura para os filmes de PVAQ incorporados com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%. | 58 |
| Figura 5: Calorimetria diferencial de varredura para os filmes de QAG incorporados com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%. | 59 |

LISTA DE TABELAS

III – CAPÍTULO I - SÍNTESE E PROPRIEDADES DAS BLENDS DAS BLENDS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO-QUITOSANA (PVAQ) E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA INCORPORADAS COM LISOZIMA (QAG)

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Atividade antimicrobiana dos discos de filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima em diferentes concentrações para o <i>Micrococcus lysodeikticus</i> | 43 |
| Tabela 2: Propriedades de espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e percentual de transparência dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima | 45 |
| Tabela 3: Propriedades mecânicas dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com diferentes concentrações da lisozima | 47 |
| Tabela 4: Análise das coordenadas de cor e índice de brancura dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima em diferentes concentrações | 48 |
| Tabela 5: Temperaturas de transição vítrea, fusão e grau de cristalinidade das blends de PVAQ e QAG incorporadas com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5% | 57 |

QUADROS DO APÊNDICE

| | |
|---|---|
| Quadro 1: Estudos com filmes ativos antimicrobianos..... | 5 |
|---|---|

ARAÚJO, Luana Dias. Filmes ativos antimicrobianos de álcool polivinílico-quitosana e quitosana-amido-gelatina incorporados com lisozima. Itapetinga, BA: UESB, 2020. 84 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Ciência de Alimentos).*

RESUMO

Embalagens ativas podem ser definidas como sistemas que favorecem a segurança do alimento por possuírem compostos capazes de interagir com o produto promovendo, por exemplo, o aumento da vida de prateleira dos mesmos. Diferentes tipos de bases poliméricas e agentes vêm sendo testados para o desenvolvimento deste tipo de embalagem. Neste trabalho, a lisozima, enzima de origem animal, foi incorporada em filmes desenvolvidos pelo método de *casting* utilizando blendas de álcool polivinílico com quitosana (PVAQ) e à base de quitosana, amido e gelatina (QAG). Os filmes foram testados quanto a atividade antimicrobiana da lisozima utilizando o *Micrococcus lysodeikticus* pela técnica disco-difusão e também avaliando a migração da enzima em meio simulante. Foi avaliada a influência da enzima sobre as propriedades físicas, mecânicas, ópticas e térmicas das blendas. Os filmes contendo a enzima demonstraram atividade antimicrobiana, e não foi constatada a influência antimicrobiana dos demais polímeros na amostra controle (0,0%), inclusive, a presença da quitosana não gerou efeito antimicrobiano. Pelo teste da atividade enzimática observou-se que a interação com as bases poliméricas utilizadas, principalmente a quitosana presente nas blendas retardaram a dissolução da lisozima em meio aquoso. A adição da enzima não influenciou nas propriedades de espessura, solubilidade, percentual de transparência e nas propriedades mecânicas dos filmes de PVAQ e QAG, mas sim a composição e a interação entre as bases poliméricas utilizadas nas blendas. Ao avaliar a cor dos filmes de PVAQ e QAG, o parâmetro b^* indicou que o aumento da concentração da lisozima intensificou a coloração amarela, cor propensa nos materiais devido a presença da quitosana. Ambos os filmes apresentaram barreira a luz UV que foi reforçada pela presença da lisozima. Na análise de difração de raios X, o aumento da concentração da lisozima aumentou as linhas de difração para as blendas de PVAQ, enquanto que para os filmes de QAG o aumento da concentração da enzima exibiu regiões amorfas e menor intensidade na difração. A adição da enzima no filme de PVAQ (1,5%) exibiu baixo grau de cristalinidade diferindo das demais, e no geral as blendas apresentaram boa resistência térmica. Os filmes produzidos pelas blendas de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima podem ser considerados como materiais promissores para o segmento de embalagens ativas para aplicação em alimentos.

Palavras-chave: embalagens ativas; blendas; enzima antimicrobiana; filmes biodegradáveis.

*Orientadora: Cristiane Patrícia de Oliveira, DSc. UESB. Co-orientadores: Leandro Soares Santos, DSc.. UESB e Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc. UESB.

SUMMARY

Active packaging can be defined as systems that favor food safety because they have compounds capable of interacting with the product, promoting, for example, their shelf life. Different types of polymeric bases and agents have been tested for the development of this type of packaging. In this work, lysozyme, an enzyme of animal origin, was incorporated into films developed by the casting method using blends of polyvinyl alcohol with chitosan (PVAQ) and based on chitosan, starch and gelatin (QAG). The films were tested for the antimicrobial activity of lysozyme using *Micrococcus lysodeikticus* by the disc-diffusion technique and also evaluating the migration of the enzyme in a simulant medium. The influence of the enzyme on the physical, mechanical, optical and thermal properties of the blends was evaluated. The films containing the enzyme showed antimicrobial activity, and the antimicrobial influence of the other polymers was not found in the control sample (0,0%), including the presence of chitosan did not generate an antimicrobial effect. By the enzymatic activity test it was observed that the interaction with the polymeric bases used, mainly the chitosan present in the blends, delayed the dissolution of the lysozyme in aqueous medium. The addition of the enzyme did not influence the thickness, solubility, percentage of transparency and mechanical properties of the PVAQ and QAG films, but the composition and interaction between the polymer bases used in the blends. When evaluating the color of the PVAQ and QAG films, parameter b* indicated that the increase in lysozyme concentration intensified the yellow color, a color prone in the materials due to the presence of chitosan. Both films presented a barrier to UV light, which was reinforced by the presence of lysozyme. In the analysis of x-ray diffraction, the increase in lysozyme concentration increased the diffraction peaks for the PVAQ blends, while for the QAG films the increase in the enzyme concentration exhibited amorphous regions and less intense diffraction. The addition of the enzyme in the PVAQ film (1,5%) exhibited a low degree of crystallinity differing from the others, and in general the blends showed good thermal resistance. The films produced by the PVAQ and QAG blends incorporated with lysozyme can be considered as promising materials for the active packaging segment for application in food.

Keywords: active packaging; blends; antimicrobial enzyme; biodegradable films.

*Orientadora: Cristiane Patrícia de Oliveira, DSc. UESB. Co-orientadores: Leandro Soares Santos, DSc.. UESB e Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc. UESB.

I – REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, as embalagens ativas são uma perspectiva de inovação para as indústrias de alimentos e são pesquisadas, dentre elas os filmes ativos antimicrobianos. Também são estudadas para o desenvolvimento desta nova tecnologia materiais que seja compatível com os compostos antimicrobianos a serem incorporados e que ofereçam características adequadas as embalagens. Desta forma o estudo de compostos com atividade antimicrobiana e de novos materiais, ou a mistura deles, para a elaboração dessas embalagens apresenta-se como uma linha de pesquisa promissora para o desenvolvimento de novas tecnologias no ramo.

As embalagens ativas estabelecem interação com o alimento, pois contém substâncias que retardam processos fisiológicos, prolongam a vida de prateleira do alimento e melhoram a qualidade ao oferecerem a segurança do alimento (ABDOLLAHI *et al.*, 2012). Como um segmento de embalagens ativas, as embalagens antimicrobianas obtidas a partir de compostos ativos podem ser uma alternativa para garantir a segurança do alimento e proporcionar a estabilidade por um período maior, pois o agente antimicrobiano é incorporado na matriz polimérica e se difunde para o alimento permitindo a inibição ou eliminação da atividade microbiológica (PÉREZ-CÓRDOBA *et al.*, 2018).

Alguns agentes antimicrobianos podem ser utilizados ou incorporados em filmes ativos (LOPES *et al.*, 2014), dentre estes, destaca-se a lisozima. A lisozima é uma enzima que está presente em alimentos de origem animal como o leite humano e na clara dos ovos (LIBURDI *et al.*, 2016). Diversos trabalhos apontam a efetividade da ação antimicrobiana da lisozima em bactérias gram-positivas quando incorporada em filmes ativos (DE SOUZA *et al.*, 2010; BARBIROLI *et al.*, 2012; COLAK *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018). Com base nestes estudos a lisozima foi escolhida para ser avaliada como agente antimicrobiano neste estudo.

Kanatt *et al.* (2012) consideram embalagens ativas como sistemas promissores para o aumento da qualidade e validade dos produtos, podendo ser elaborada também a partir de materiais funcionais, cogitada como um substituto de grande potencial para embalagens de caráter convencional. Segundo Quesada *et al.* (2016) filmes ativos

podem ser preparados a partir de materiais de origem natural como amidos, derivados de plantas como a celulose, derivados de animais como quitina e quitosana, derivados de proteínas de origem animal como a gelatina, dentre outros. Polímeros sintéticos como o álcool polivinílico também podem ser utilizados para a elaboração de filmes ativos (PANDELE *et al.*, 2014).

Neste estudo foi proposto o desenvolvimento de filmes formados por blendas a base de quitosana, álcool polivinílico, amido e gelatina. Esta proposta é interessante tendo em vista que os filmes destes materiais isoladamente apresentam características que inviabilizam sua aplicação em embalagens para alimentos.

Os filmes destes materiais apresentam algumas desvantagens que podem ser corrigidas formando blendas poliméricas, combinação com outros polímeros para melhorar as propriedades das embalagens (MACIEL *et al.*, 2012). Segundo Pachekoski *et al.* (2014) blendas poliméricas são a junção de dois ou mais polímeros para aprimorar ou melhorar as propriedades como barreira, resistência a tração, reforço ou complementação de estruturas onde ambas requerem compatibilidade para a interação. Além das características benéficas a estrutura das embalagens, as blendas permitem a incorporação de agentes que favoreçam a segurança de alimentos (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011) possibilitando o desenvolvimento de embalagens ativas antimicrobianas.

Portanto, desenvolver e caracterizar um filme ativo antimicrobiano a base de lisozima utilizando blendas de polímeros biodegradáveis é uma alternativa inovadora para a indústria de alimentos. Estas considerações deram base para o presente trabalho, que teve como objetivo desenvolver e caracterizar filmes à base de blendas da quitosana com álcool polivinílico, amido e gelatina incorporados com lisozima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Embalagens ativas

Do ponto de vista tecnológico, as embalagens têm a função de acondicionar os alimentos para conservar e manter a sua integridade. Dentro do segmento de embalagens, estão sendo formuladas embalagens com compostos que migram para o interior do produto a fim de favorecer a durabilidade do alimento e manter a qualidade. Esta tecnologia é denominada embalagem ativa.

As embalagens ativas podem ser definidas como sistemas que prolongam a vida de prateleira dos alimentos, oferecendo segurança alimentar e em conjunto, melhorando a qualidade do alimento (DA SILVA CÉSAR *et al.*, 2010). Já Pires *et al.* (2014) definem embalagens ativas como embalagens que alteram suas condições internas para promover a segurança do alimento, melhorar as propriedades sensoriais do produto e prolongar o *shelflife*, oferecendo um produto com valor agregado ao consumidor desde a sua elaboração até o acondicionamento. Embalagens ativas são filmes contendo componentes que estabelecem interação com o alimento para promover a conservação, segurança do alimento e por consequência manter um produto de qualidade minimizando alterações químicas, fisiológicas e microbiológicas (DE OLIVEIRA *et. al*, 2008).

Conforme a necessidade, são elaborados filmes ativos com efeito antioxidante, antiulectante, controladores de gases, preservadores de cor, e antimicrobiano (DA SILVA CÉSAR *et al.*, 2010), o que mostra as diferentes funções que podem ser atribuídas a esta tecnologia inovadora na área de embalagens para alimentos.

2.2. Embalagens ativas antimicrobianas

As embalagens ativas antimicrobianas são aquelas nas quais são incorporados componentes que, ao migrar para o interior do produto, são capazes de inibir ou interromper a atividade de microrganismos deteriorantes ou patogênicos com o rompimento de sua estrutura celular (SOARES *et al.*, 2009). Tal embalagem deve ainda conter em sua estrutura barreiras contra a ação do meio externo para conceder ao consumidor um produto que ofereça a segurança do alimento e qualidade do ponto de vista sanitário.

O uso das embalagens antimicrobianas se justifica porque a utilização de agentes antimicrobianos no produto pode perder o efeito ao longo do tempo antes de concluir o prazo de validade devido à composição do próprio alimento. Com o agente antimicrobiano incorporado e disperso na matriz polimérica, o microrganismo é contido, por inibição ou eliminação da sua atividade à medida que o agente vai migrando da embalagem para o produto (LOPES *et al.*, 2014).

Pires *et al.* (2014) sugere o uso de filmes ativos antimicrobianos especialmente para o acondicionamento de produtos perecíveis como carnes, queijos ou massas, uma vez que são alimentos de fácil contaminação. A superfície de tais alimentos, de maneira geral é onde se inicia a contaminação de acordo com a manipulação. A migração de compostos da embalagem para o interior do alimento tende a causar o efeito antimicrobiano, inibindo a ação da flora vegetativa presente.

Nos últimos anos várias pesquisas explanaram o desenvolvimento e aplicação de embalagens ativas nos alimentos. São temas abordados nestes trabalhos o tipo de base polimérica, os parâmetros de qualidade da embalagem, o agente antimicrobiano e sua eficiência frente a microorganismos específicos bem como a sua aplicação em alguns produtos. O Quadro 1 apresenta alguns trabalhos que abordaram esse tema. Em geral os autores reportam o efeito antimicrobiano principalmente para bactérias gram-positivas, em filmes incorporados por ácidos, óleos essenciais, quitosana, extratos de plantas e lisozima em diferentes bases poliméricas. Alguns desses trabalhos foram aplicados também em produtos mostrando a efetividade das embalagens ativas não só em situações *in vitro*, mas também no próprio alimento.

Quadro 1: Estudos com filmes ativos antimicrobianos

| Autor (es) | Base polimérica | Agente antimicrobiano | Microorganismo testado | Produto |
|--------------------------------|---|---|---|-------------------------------------|
| Park <i>et al.</i> (2004) | Quitosana | Lisozima | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. faecalis</i> | - |
| Moraes <i>et al.</i> (2007) | Base celulósica | Ácido sórbico | Fungos filamentosos e leveduras | Manteiga |
| Botre <i>et al.</i> (2010) | Resina celulósica com acetona | Óleo essencial de orégano | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) e <i>Penicillium sp</i> | Pizza pronta |
| De Souza <i>et al.</i> (2010) | Caseínato de sódio | Lisozima | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 | - |
| Pereda, <i>et al.</i> (2011) | Quitosana com glicerol e gelatina | Quitosana | <i>Escherichia coli</i> (O157:H732158) e <i>Listeria monocytogenes innocua</i> | - |
| Abdollahi <i>et al.</i> (2012) | Quitosana | Óleo essencial de alegrim e nanopartículas de argila montmorilonita (MMT) | <i>Listeria monocytogene</i> (PTCC 1163), <i>Pseudomonas putida</i> (PTTC 1694), <i>Streptococcus agalactiae</i> PTCC 1768, <i>Escherichia coli</i> (PTCC 1533) e <i>Lactococcus lactis</i> | - |
| Barbiroli <i>et al.</i> (2012) | Carboximetilcelulose | Lisozima e lactoferrina | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (ATCC 4698), <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i> | Papel em carne bovina de corte fino |
| Kanatt <i>et al.</i> (2012) | Quitosana e álcool polivinílico | Extrato de menta aquosa e extrato de casca de romã | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P) e <i>Bacillus cereus</i> (MTCC 470) | - |
| Corradini <i>et al.</i> (2013) | Politereftalato de etileno (PET) | Lisozima | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> | - |
| Hanusová <i>et al.</i> (2013) | Poliamida, ionômero e celulose regenerada | Glicose oxidase e lisozima | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> | - |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|---|---|--|
| Mattei <i>et al.</i> (2013) | Amido com sorbitol e gelatina com sorbitol | Óleo de <i>Rosmarinus officinalis</i> | As bactérias <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) e o fungo <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) | - |
| Lopes, <i>et al.</i> (2014) | Acetato de celulose e acetona | Aldeído cinâmico | As bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 153113), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229), os fungos filamentosos, <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> | - |
| Rodríguez-Núñez, <i>et al.</i> (2014) | Poliamida com quitosana | Quitosana | <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 51812) and <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632) | - |
| Synowiec <i>et al.</i> (2014) | Pupulano | Extrato de manjeriçãõ doce | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633), <i>S. enteritidis</i> (ATCC 13076), <i>E. coli</i> (ATCC 25922), os fungos <i>Penicillium expansum</i> (ATCC 7861), <i>Rhizopus arrhizus</i> (ATCC 11145), <i>Aspergillus niger</i> (ATCC 9142), <i>Saccharomycopsis fibuliger</i> (ZBMZ 2) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IPF5) | Maçãs (<i>Malus domestica</i>) cv. Jonagold refrigeradas |
| Bhatia e Bharti (2015) | Amido | Nisina, lisozima e EDTA | Bactérias gram-negativas | - |
| De Souza <i>et al.</i> (2015) | Amido de mandioca com glicerol | Extrato etanólico de própolis | <i>Escherichia coli</i> (IAL 339) e <i>Staphylococcus aureus</i> (IAL 1875) | - |
| Silva <i>et al.</i> (2015) | Quitosana preparada com ácido clorídrico | Quitosana | Fungo <i>Aspergillus parasiticus</i> | Grãos de amendoim |
| Liburdi <i>et al.</i> (2016) | Quitosana | Lisozima | <i>Oenococcus oeni</i> | Vinhos brancos |
| Quesada <i>et al.</i> (2016) | Quitosana | Óleo essencial de tomilho | Bactérias mesofílicas aeróbias totais, bactérias mesofílicas do ácido láctico (MLAB), enterobactérias, bolores e leveduras | Carne cozida |
| Jiang <i>et al.</i> (2017) | Nanocompósitos de quitina | Lisozima | Bactéria gram-negativa <i>Escherichia coli</i> (ATCC 27325) e bactérias gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) e <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 23631) | - |
| Pérez-Córdoba <i>et al.</i> (2018) | Gelatina e Quitosana | Nanoemulsões encapsuladas | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15692) e <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 3515) | - |
| De Almeida-Couto e Cestari | Ecoflex, amido e glicerol | Óleos essenciais: óleo de orégano, óleo do cravo e óleo | <i>Estafilococcus spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> e <i>Clostridium</i> | Nuggets |

| | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|--|---|
| (2018) | | de alecrim | | |
| Silva <i>et al.</i> (2018) | Pululano | Nanofibras de lisozima | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) | - |
| Galindo <i>et al.</i> (2019) | Gelatina e quitosana com glicerol | Óleos essenciais: óleo de alecrim e óleo de orégano com Tween 80 | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25922) e <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) | - |

2.2.1. Liozima como agente antimicrobiano em embalagens ativas

Um grupo de enzimas com atividade antimicrobiana vem sendo utilizado para o desenvolvimento de embalagens, dentre elas, destaca-se a liozima. A liozima pode ser descrita como uma enzima de origem animal capaz de exercer atividade antimicrobiana. Esta enzima está presente na clara do ovo, leite de mamíferos, mucosas, secreções e em lágrimas, secreções urinárias, respiratórias e cervicais (BENKERROW, 2008).

De acordo De Souza Medeiros *et al.* (2017), a liozima é uma proteína de estrutura primária formada por 129 aminoácidos e sua cadeia detém 4 pares de cisteínas (grupos hidrofóbicos) ligados por uma ponte dissulfídica para estabelecer, por ligação covalente, a união dos pontos mais distantes do arranjo primário. O ponto isoelétrico da liozima situa-se em pH próximo a 10 (RUSSELL *et al.*, 2017).

Mohammad *et al.* (2015) consideram a liozima uma enzima termoestável pois apresenta o ponto de fusão do pó cristalino em torno de $T_m = 187^\circ\text{C}$, $\Delta H^\circ = 125,3\text{kJ/mol}$ e a 134°C alcança cerca de apenas 8,5% de desnaturação sem provocar alterações de seu estado de sólido para líquido, mas sim a alteração de sua conformação molecular para um formato desnaturado. Este fenômeno ocorre porque a estrutura da enzima supera forças intramoleculares na tentativa de preservar ao máximo o estado nativo, no entanto, os autores relatam que a liozima em soluções aquosas apresenta ponto de fusão a T_m aproximadamente 76°C devido a separação de suas moléculas pelas moléculas de água do meio.

Bhatia e Bharti (2015) explicam que a estrutura polipeptídica da liozima dispõe de cisteínas hidrofóbicas e uma ponte dissulfídica que atuam como agente de controle microbiológico, com efeito bacteriostático sobre bactérias gram-positivas, hidrolisando a parede celular de peptídeoglicanonas ligações do tipo 1-4 entre N-acetil ácido D-muramico e N-acetil D-glucosamina. Já quanto as bactérias gram-negativas, Hanusová *et al.* (2013) relata que para a ação eficaz da liozima sobre este tipo de microorganismo são necessários tratamentos físicos e químicos de permeação que afetem a barreira da membrana externa para que este grupo seja sensível a presença da enzima.

Alguns estudos revelam a ação antimicrobiana da enzima liozima em diferentes materiais e filmes sobre determinadas microbiotas.

Park *et al.* (2004) desenvolveram filmes de quitosana incorporando diferentes concentrações da liozima a fim de verificar o comportamento antimicrobiano da enzima para com *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis* e a sua influência nas

propriedades básicas dos filmes. Os pesquisadores constataram que a enzima demonstrou atividade antimicrobiana e observaram que a difusão da enzima aumentou conforme aumentava o percentual da enzima na matriz polimérica e perceberam que sua incorporação não influenciou na permeabilidade ao vapor d'água dos filmes, no entanto, afetou as propriedades mecânicas afetando a tensão, formando filmes mais resistentes ao alongamento, comportamento percebido conforme aumentada a concentração da lisozima.

De Souza *et al.* (2010) prepararam filmes ativos de caseinato com modificações no pH e incorporaram 1% de lisozima. Estes filmes se mostraram promissores para estender efeitos antimicrobianos para o armazenamento de alimentos e possibilitar segurança do alimento pela ação inibidora sobre bactérias gram-positivas, uma vez que provocou a inibição de colônias de *Staphylococcus aureus* incubados por um período de 24h a 37°C em pH 4,6. Depois do *staply*, tal enzima foi testada para verificar o efeito antimicrobiano sobre o *Micrococcus lysodeikticus*, que é o microrganismo considerado o indicador da presença da lisozima devido a sua alta sensibilidade a ação da enzima (CORRADINI *et al.*, 2013).

Em 2012, Barbirolli *et al.* estudaram a atividade antimicrobiana da lisozima e lactoferrina em embalagens celulósicas sendo observada a solubilidade de ambas enzimas em meio aquoso. Os autores testaram a atividade antimicrobiana contra a *Listeria innocua* DSMZ20649 e *Escherichia coli* DSMZ 50902 em carne onde verificaram que a lisozima forneceu os resultados mais favoráveis, se tratando de inibição, para a *Listeria* e em menor grau de inibição para *E. coli*.

Corradini *et al.* (2013) elaboraram filmes a base de poli (tereftalato de etileno) (PET) utilizando via sol-gel com incorporação de lisozima a fim de obter embalagens ativas que liberasse o agente de maneira controlada. Como resultado, os pesquisadores notaram que a aplicação foi expressiva para a inibição do *M. lysodeikticus*.

Hanušová *et al.* (2013) incorporaram a lisozima e a enzima glicose oxidase pela técnica de Reação Ugi em filmes de poliamida, filmes de ionômero e filme de celulose regenerada. Para a determinação da atividade da lisozima, os autores testaram os filmes incubando o microrganismo *Micrococcus lysodeikticus* para posteriormente aplicarem contra as cepas de *Escherichia coli* CNCTC 6859, *Pseudomonas fluorescens* CNCTC 5793, *Lactobacillus helveticus* CH-1, *Bacillus subtilis* CNCTC 5615, *Listeria ivanovii* CCM 5884 e *Listeria innocua* CCM 4030. Como resultado, diferente da glicose oxidase, a incorporação da lisozima em filmes de poliamida e ionômero geraram perda

da atividade enzimática, portanto tal enzima não provoca inibição microbiológica nestas bases poliméricas.

Bhatia e Bharti (2015) produziram filmes antimicrobianos à base de amido e glicerol, incorporados de nisina, lisozima e o agente quelante etilenodiaminotetraacetato (EDTA) a fim de avaliar a combinação dos três agentes antimicrobianos contra a *Listeria monocytogenes*. Como resposta, embora o filme de amido e glicerol isento das enzimas não tenha exibido atividade antimicrobiana, os dados obtidos para a os filmes com a combinação de ambas as enzimas proporcionaram curto efeito bactericida pois não foram obtidos resultados inibitórios por um longo tempo de incubação. Assim, os autores sugerem estudos posteriores para melhorar a eficácia quanto a dosagem dos agentes antimicrobianos em conjunto.

Colak *et al.* (2015) elaboraram filmes de caseinato de sódio e glicerol por extrusão soprada, imobilizando a lisozima. Para verificar a atividade antimicrobiana dos filmes, os pesquisadores testaram a ação da enzima para o *Micrococcus luteus* CIP A270 com 24h a 37°C de acordo com o halo de inibição e perceberam que nas primeiras 25h não foram observados o crescimento microbiológico, enquanto que nas placas controle foi observada a presença de colônias do microrganismo. A atividade enzimática foi continuamente observada por pelo menos cinco semanas com este resultado até mesmo para os filmes de concentração mínima de lisozima.

No estudo com vinhos brancos de Liburdi *et al.* (2016) foi observada a ação da lisozima livre e imobilizada em esferas de quitosana pura e com gelatina para analisarem o efeito antimicrobiano sobre a cepa de *Oenococcus oeni*. Apesar de a imobilização reduzir a eficiência do efeito antimicrobiano, a forma do emprego da enzima não impediu a lise celular da bactéria, pois a ação sobre a bactéria foi constatada.

Jiang *et al.* (2017) estudaram a atividade enzimática e antimicrobiana da lisozima em nanofibras de quitina e o efeito antimicrobiano nas bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Como resposta, a atividade antimicrobiana se destacou melhor em bactéria gram-negativa do que bactérias gram-positivas, no entanto os efeitos foram significativos para ambos. Os autores perceberam que conforme aumentava a concentração, a eficácia foi potencializada mostrando que a quitina combinada com a lisozima possui propriedades que podem interromper a ação de bactérias.

Silva *et al.* (2018) produziram filmes a base de pululano incorporados com a nanofibras de lisozima para testar a atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Foi observado que com 24 e 48h não foram detectados sinais de inibição para o *S. aureus*, obtendo o mesmo comportamento para a amostra controle. Conforme foram aumentadas as quantidades de nanofibras utilizadas em cada ensaio, foi verificado o crescimento do microrganismo, cuja lisozima em nanofibras mostra-se inviável para o uso em embalagem ativa.

Liburdi *et al.* (2016) acreditam que a lisozima estabelece ligações covalentes com a quitosana devido a imobilização da enzima no material evidenciar compatibilidade com os grupos hidrofóbicos da quitosana. Os pesquisadores também constataram que a fase insolúvel do material interage com a parede celular do microrganismo, provocando a ruptura do substrato. No entanto, a proteína possui a fase polar que pode interagir com polímeros hidrofílicos por ligação de hidrogênio ou interações de Van der Waals.

Bonomo *et al.* (2018) elaboraram filmes ativos antimicrobianos de amido de jaca incorporados com a lisozima utilizando concentrações de 0, 2 e 8% e estudaram pela técnica disco-difusão o efeito antimicrobiano para o *Micrococcus lysodeikticus* onde constataram inibição significativa para filmes contendo a enzima descartando o efeito do amido de jaca no filme controle. Neste sentido, por se tratar de uma enzima de caráter antimicrobiano, torna interessante verificar a sensibilidade de microrganismos gram-positivos em concentrações inferiores da enzima em filmes ativos para examinar a sua eficácia e em que interfere nas propriedades do filme.

O tipo de material onde a enzima será incorporada pode influenciar na sua ação antimicrobiana e, além disto, a interação da enzima com o tipo de base polimérica utilizada não garante que a embalagem manterá as barreiras contra ar, gases e umidade que são exigidas para as embalagens de caráter antimicrobiano (SOARES *et al.*, 2009). Estudar diferentes tipos de bases poliméricas e suas misturas para a incorporação da enzima, bem como aspectos do efeito da lisozima nas características dos diferentes filmes torna-se um ponto para pesquisa de âmbito tecnológico no ramo de embalagens alimentícias.

2.3. Polímeros biodegradáveis na produção de filmes

Atualmente, a sociedade tem tomado consciência quanto ao prejuízo ambiental que o consumo de embalagens sintéticas pode promover e têm despertado o interesse quanto ao uso de polímeros com características de biodegradabilidade. Compostos como as proteínas do soro de leite, gelatina, caseína, quitosana, quinoa, amido de mandioca, pectina, entre outros polímeros estão sendo usados com a finalidade de obter filmes que sejam biodegradáveis (MACIEL *et al.*, 2012). Desta forma, bases poliméricas de origem natural como a quitosana, amido e a gelatina e polímeros sintéticos biodegradáveis como o álcool polivinílico podem ser estudados para a aplicação em filmes ativos.

2.3.1. Quitosana

De acordo Gonsalves *et al.* (2011) a quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da *N*-desacetilação da quitina, sendo este polímero considerado um copolímero que atua como uma base, de baixa hidrofília, solúvel em meio ácido em pH inferior a 6,0 e com atuação de base fraca ($K_{pa} = 6,3$ e $7,2$) que apresenta vários sítios reativos pois é formado por unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopirranose (*GlcN*), 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopirranose (*GlcNAc*) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) sendo a glicosamina (*GlcN*) a estrutura em maior proporção. A reação para obtenção do polímero influencia nas características da quitosana com relação às propriedades de capacidade hidrofóbica, solubilidade, viscosidade, e capacidade de reticulação na presença de agentes formadores de ligações cruzadas. A Figura 1 mostra a estrutura da quitosana.

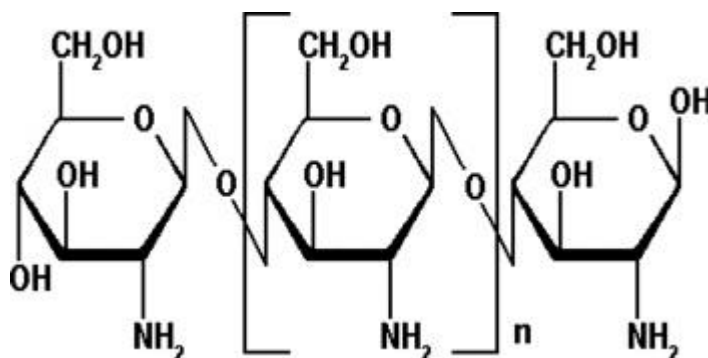


Figura 1: Estrutura da quitosana. Fonte: Google Imagens.

Segundo Moura *et al.* (2006) e Gonsalves (2011) a quitosana apresenta além da biodegradabilidade, características como compatibilidade com outros polímeros e caráter hidrofóbico com baixa hidroflicidade, sendo amplamente empregada desde o uso em curativos, cicatrizantes, tratamento de efluentes em esgotos, agentes quelantes de metais, floculantes, adsorventes de corantes, adsorventes de ânions metálicos até a aplicação para tratamentos antimicrobianos nos mais diversos setores, inclusive na indústria de alimentos para embalagens ativas.

A quitosana é um polissacarídeo que apresenta capacidade de formar filmes ativos antimicrobianos, antioxidantes e revestimentos comestíveis (PEREDA *et al.*, 2011). Maciel *et al.* (2012), aponta que a quitosana atua como uma base polimérica capaz de formar embalagens consideradas flexíveis, biodegradáveis e que vem sendo indicada como uma possível substituta de polímeros sintéticos de difícil decomposição.

2.3.2. Álcool polivinílico (PVA)

De acordo com Kanatt *et al.* (2012) e Pandele *et al.* (2014), o álcool polivinílico ou polivinil álcool (PVA, PVOH ou PVAL) é uma base polimérica sintética amplamente aplicada na indústria de alimentos cuja formação de filmes costuma proporcionar propriedades de formação, transparência, resistência mecânica (à tração), adesividade, solubilidade em água e biodegradabilidade, fator que faz com que tal polímero seja incorporado em blendas com outros biomateriais como por exemplo a quitosana e o amido.

O álcool polivinílico é produzido a partir da polimerização do acetato de polivinil (Figura 2).

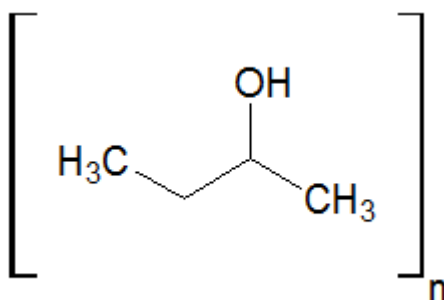


Figura 2: Estrutura parcial do álcool polivinílico. Fonte: Google Imagens.

2.3.3. Amido

Dentre os polímeros mais estudados para elaboração dos filmes, o amido ganha destaque. Vários pesquisadores consideram o amido como uma fonte renovável para a elaboração de filmes biodegradáveis, uma vez que é um polímero natural capaz de sofrer ação bioquímica de microrganismos e enzimas para decompor tal fonte (CAMPOS *et al.*, 2011).

O amido consiste em um polissacarídeo formado pelos polímeros amilose e amilopectina. A amilose é formada por cadeias lineares do tipo α 1-4 (Figura 3), cuja estrutura é responsável pela formação de gel mais rígido e relativamente solúvel; já a amilopectina é formada por cadeias lineares e ramificadas do tipo α 1-4e α 1-6 (Figura 4), o que representa cerca de 75% da composição do amido sendo responsável pela elasticidade do gel (DERNADIN e SILVA, 2008). Desta maneira, a interação entre ambas conduz ao rearranjo das estruturas, onde posteriormente são mantidas por ligações de hidrogênio (SHIMAZU *et al.*, 2007).

O amido da batata inglesa (*Solanum tuberosum L.*) é considerado como uma classe de amido com maior poder de inchamento, solubilidade, clareza na pasta, viscosidade e a amilose é considerado um carboidrato que facilita a hidrólise ácida para a síntese da glicose, com baixa temperatura de gelatinização comparado a outros amidos como de milho, trigo e arroz (DE FRANÇA *et al.*, 2017). Segundo Garcia *et al.* (2015) a porcentagem de amilose contidas nas mais diversas cultivares de batata pode variar entre 3,30 a 5,69%.

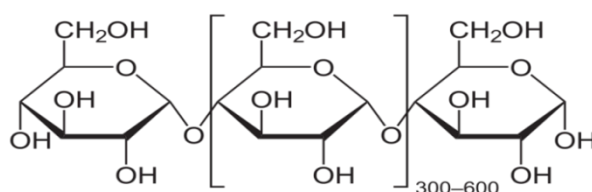


Figura 3: Estrutura da amilose com cadeia simples do tipo α (1-4). Fonte: Google Imagens.

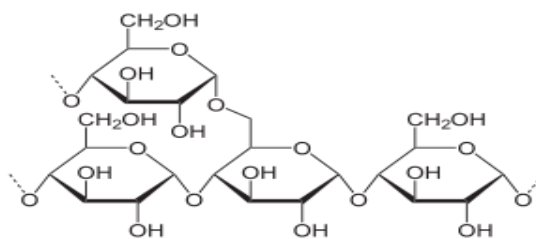


Figura 4: Estrutura da amilopectina com cadeias lineares e ramificadas do tipo α (1-4) e α (1-6). Fonte: Google Imagens.

Dentre os polímeros mais estudados para elaboração dos filmes, o amido ganha destaque. Vários pesquisadores consideram o amido como uma fonte renovável para a elaboração de filmes biodegradáveis, uma vez que é um polímero natural capaz de sofrer ação bioquímica de microrganismos e enzimas (CAMPOS *et al.*, 2011).

O princípio filmogênico do amido baseia-se na desconstrução da estrutura granular semicristalina pela gelatinização, processo que requer a presença de água e temperatura para transformação irreversível do amido em gel viscoelástico. O resultado desta interação é a criação de uma matriz polimérica homogênea de característica amorfa, onde a água aquecida é o principal agente de deprecimento das regiões cristalinas organizadas em sua estrutura, principalmente sobre as ligações de hidrogênio. O rompimento da estrutura do amido é caracterizado pelo processo de fusão, onde posteriormente ocorre o processo de gelatinização, chamada de retrogradação ou recristalização, o qual ocorre o agrupamento por interação de hidrogênio das cadeias, no entanto, ao alcançar o resfriamento completo, os filmes de amido tendem a se apresentar pouco rígidos e quebradiços (DERNADIN e SILVA, 2008).

2.3.4. Gelatina

De acordo Pereda *et al.* (2011), a gelatina é uma proteína de origem animal que pode ser extraída através da hidrólise e aquecimento condicionada do colágeno (presente nos ossos e pele animal em fibras insolúveis) que permitem posteriormente o rearranjo da estrutura copolímerimérica formada por uma tríade de glicinas. Estes autores consideram que a gelatina tem capacidade de formar filmes flexíveis e transparentes que melhoram propriedades ópticas e podem oferecer barreira a gases, no entanto, a gelatina contém caráter hidrofílico, deixando a desejar quanto a permeabilidade ao vapor d'água.

A gelatina é um composto polifuncionais e contém o -NH₂ e -COOH em suas cadeias, fazendo com que este composto apresente grupos disponíveis para estabelecer interações como a reticulação na união com outros polímeros (HAMARAT SANLIER *et al.*, 2016).

2.4.Blendas poliméricas para produção de filmes

Blendas poliméricas são a combinação de polímeros para promover propriedades desejáveis aos materiais, bem como para embalagens. Segundo Luna *et al.* (2015) a formação de blendas poliméricas diz respeito a misturas de polímeros com a finalidade de combinar características desejáveis seja nas propriedades mecânicas, químicas ou de barreiras do material, alinhando baixo custo de produção pela combinação ajustada dos materiais.

As blendas podem ser elaboradas por extrusão (PACHEKOSKI *et al.*, 2014), contudo o pelo método de *Casting* é uma técnica que tem sido amplamente utilizada para obter filmes cujos materiais são de fonte naturais e/ou biodegradável. Esta técnica consiste na distribuição proporcional das soluções filmogênicas em placas por sobreposição ou mistura de dois ou mais soluções de polímeros para que, com a temperatura controlada, o solvente seja evaporado e forme filmes (VINHAS *et al.*,2013).

Gonsalves *et al.* (2011) acreditam que a mistura de polímeros em blendas podem sofrer o fenômeno da reticulação, que constitui na formação de ligações cruzadas entre cadeias simples ou ramificadas dos polímeros por interação inter ou intramoleculares através de sítios ativos específicos presentes nos polímeros. As reações de reticulação tendem a influenciar em propriedades como estabilidade química, térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação, imobilização celular e em outras características finais do material.

Os filmes de quitosana são em geral materiais de baixa flexibilidade com tendência a alcançar a ruptura quando submetidos a altas tensões (HUANG *et al.*, 2012). Os filmes de amido deixam a desejar com relação às propriedades mecânicas sendo frágeis, altamente rígidos, alta permeabilidade e solubilidade e quanto às propriedades ópticas costumam apresentar alta opacidade, quesito que favorece a proteção contra a oxidação pela luz, no entanto gera a incapacidade de percepção visual do produto, desfavorecendo o material com relação a intenção de compra por parte do consumidor

(PELISSARI *et al.*, 2012 e DA SILVA *et al.*, 2016). Os filmes de PVA por sua vez são solúveis em água e produz filmes de caráter hidrofílico (CAZÓN *et al.*, 2018) assim como os filmes de gelatina, deixando a desejar nas propriedades de permeabilidade ao vapor d'água e na solubilidade, visto que em meio aquoso é rapidamente dissolvido (PEREDA *et al.*, 2011).

Estudos apontam que o uso destes polímeros em blendas pode resultar em filmes com características diferenciadas e com maior possibilidade de aplicação (KANATT *et al.*, PELISSARI *et al.*, HUANG *et al.* (2012) e QIAO *et al.* (2017)). Em geral as blendas levam ao desenvolvimento de filmes com características diferenciadas, em relação aos polímeros individuais, devido as interações químicas que ocorrem entre esses polímeros.

Blendas de amido e quitosana pode ser uma alternativa para tentar solucionar parte dos problemas das propriedades dos filmes de amido, aliando a característica antimicrobiana e a baixa permeabilidade ao vapor d'água em filmes de amido, uma vez que a quitosana possui caráter hidrofóbico e capacidade antimicrobiana (PELISSARI *et al.*, 2012). Estes autores verificaram que em blendas de quitosana e amido, os grupos protonados da quitosana interagem com as hidroxilas livres do amido, reduzindo a capacidade de interação com a água. A redução da permeabilidade é um fator positivo ao pensar na aplicação desta blenda em embalagens para alimentos não desidratados.

Zanela *et al.* (2015) sugerem que o uso do álcool polivinílico (PVA) na produção de blendas pode melhorar as propriedades do material quanto a transparência, propriedades mecânicas, conferir aspecto plastificante e oferecer mínima barreira à permeabilidade ao vapor de água. Além disto, Bonilla *et al.* (2014) avaliaram a capacidade antimicrobiana em filmes de PVA e perceberam que o material possui capacidade de formar barreira ao oxigênio, fator que controlou o crescimento microbiológico. Assim, blendas contendo o PVA podem ser estudadas também com a finalidade antimicrobiana. Cazón *et al.* (2018) estudaram blendas de álcool polivinílico e verificaram que o PVA é capaz, por exemplo, de interagir com polímeros pela interação dos seus grupos hidroxilas (OH) com os grupos amino (NH) da quitosana enquanto que com polímeros de característica polar como o amido e gelatina, o PVA estabelece ligação de hidrogênio.

Hosseini *et al.* (2013) estudaram as propriedades dos filmes de quitosana com gelatina de peixe e acreditam que a quitosana causa alterações nas cadeias polipeptídicas da gelatina favorecendo a formação de filmes com propriedades

mecânicas, ópticas e de barreira diferenciados. Zanela *et al.* (2015) acreditam que a gelatina, devido a própria estrutura, não apresenta cristalinidade e, em blendas, encontra-se em estado característico ao amorfo, o que permite menor transmitância de luz e tal característica requer uma correção com o uso de polímeros como o amido, que quando sofrem recristalização, favorecem estes aspectos.

O exposto mostra que existem muitas possibilidades de formação de blendas e estas podem atender a demanda de formação de filmes com as mais variadas características e para um grande número de aplicações. Para definição destas características faz-se necessário um conjunto de análises dentre as quais o objetivo de algumas serão descritas a seguir.

2.5. Análise e caracterização de filmes

Os filmes elaborados a partir de uma matriz polimérica ou em blendas necessitam ser caracterizados para o direcionamento a uma aplicação, especialmente na indústria de alimentos devido à grande heterogeneidade. Filmes contendo mais de uma base polimérica formam blendas e tais materiais costumam exibir comportamentos distintos, melhorando ou não as propriedades de barreira a luz, umidade, ar, forças mecânicas, resistência térmica, dentre outras.

2.5.1. Atividade antimicrobiana

De acordo com Synowiec *et al.* (2014) existem grandes chances de bactérias gram-positivas mesófilas proliferarem em alimentos armazenados a temperatura ambiente e, por vezes, a alternativa usual é a refrigeração. Ao tratar de embalagens ativas em que são incorporadas substâncias para agregar efeito antimicrobiano, é necessária a realização de testes para a verificação da eficácia do agente incorporado à matriz e tal confirmação pode ser estudada a partir da técnica disco-difusão, em meio cultivado por microrganismos ao qual é avaliada a atividade antimicrobiana para verificar a possibilidade de elaborar uma embalagem que assegure o controle microbiológico.

Neste estudo foi utilizado o teste de disco difusão utilizando o *Micrococcus sp*, que é uma bactéria gram-positiva considerada não patogênica, deteriorante, presente em solos e áreas com alimentos, que hidrolizam o hidrogênio molecular de material vegetal para obter energia (DE ARAÚJO *et al.*, 2013). Alguns estudos relatam que esse grupo

de microrganismos, dentre eles o *Micrococcus lysodeikticus* pode ser utilizado como substrato para a lisozima, visto que a enzima é capaz de hidrolisar em sua estrutura celular ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, estrutura comum da parede celular de microrganismos gram-positivos (VASILESCU *et al.*, 2017).

Kanatt *et al.* (2012) consideram que, além dos agentes incorporados a filmes antimicrobianos, a quitosana é capaz de estabelecer controle microbiológico sobre microrganismos positivos por interação com a membrana das células bacterianas, uma vez que a quitosana possui grupos amino carregado positivamente e estas estruturas podem interagir com as membranas celulares dos microrganismos carregadas negativamente, cuja ligação conduz ao rompimento da estrutura celular e perda de nutrientes e compostos intracelulares. Assim, torna-se necessário verificar o efeito da enzima incorporada em filmes e a possibilidade de compostos como a quitosana influenciar na atividade antimicrobiana do material.

Eventualmente, a liberação da lisozima no meio fluido pode produzir efeitos de alternância durante a lise das células bacterianas, visto que a interação de Van der Waals e forças eletrostáticas entre as bactérias e a enzima pode ter o efeito de atração, sem excluir a repulsão: este movimento sinérgico pode proporcionar aumento efetivo da atividade antimicrobiana (JIANG *et al.*, 2017). Não é descartada a possibilidade que a presença de fragmentos de outros materiais presentes no filme exerce influência na alternância da ação da lisozima (PARK *et al.*, 2004).

2.5.2. Propriedades de barreira

A capacidade de uma embalagem resistir à absorção ou à evaporação de gases, vapores, à permeação de lipídeos e a passagem de luz é definida como barreira, estando estas características associadas à estabilidade do alimento (CAZÓN *et al.*, 2018). São exemplos de medidas das propriedades de barreira a análise da permeabilidade ao vapor d'água e medidas relacionadas a capacidade de transmissão de luz.

De acordo com Mali *et al.* (2011) a permeabilidade é uma propriedade que avalia a permeação de gases e vapores pelos espaços entre as moléculas, sendo divididas em três etapas: a sorção, solubilização do permeante na superfície do material e o gradiente de concentração com a evaporação deste composto na superfície do filmes. Este fenômeno pode ser resumido na difusão molecular, cujos materiais que devem

estar isentos de rachaduras ou cavidades. Para blendas, observa-se que quanto maior a presença de compostos de caráter hidrofílico maior é a permeação aquosa na superfície do material, visto que a condição da análise a 100% de umidade relativa intensifica a mobilidade da água e o enfraquecimento das interações intramoleculares (ABDOLLAHI *et al.*, 2012), revelando a necessidade da adição de material com caráter hidrofóbico.

Quanto à capacidade de transmissão de luz, podem ser estudadas as propriedades ópticas dos filmes, tais como a absorção, a reflexão, o espalhamento e a refração de luz que podem representar esta característica dos filmes. Medidas relacionadas com a da quantidade de cor dos filmes, a transparência dos filmes e a exposição destes materiais a diferentes comprimentos de onda no espectro são excelentes parâmetros para qualificar e quantificar a passagem de luz pelo filme. A mistura de polímeros em blendas proporciona o desenvolvimento de filmes com características diferenciadas quanto a suas propriedades ópticas. Denavi *et al.* (2009), Kanatt *et al.* (2012), Hosseini *et al.* (2013), Bonilla *et al.* (2014) e Balakrishnan *et al.* (2018) estudaram propriedades ópticas de blendas e verificaram que a mistura dos polímeros geralmente é vantajosa para os filmes quanto a melhoria das propriedades de transparência e barreira quanto a luz ultravioleta.

2.5.3. Propriedades mecânicas

Para que o alimento esteja acondicionado de forma adequada para o consumidor, é importante que o material forneça barreira contra fatores de influência externa e esteja ausente de danos físicos visíveis ou pouco perceptíveis (PEREDA *et al.* 2011). Assim, estudam-se as propriedades mecânicas dos filmes avaliando os parâmetros de alongamento, tensão máxima (ou até a ruptura) e o módulo de elasticidade, conhecido como o Módulo de Young.

Segundo Oliveira *et al.* (2013) as propriedades mecânicas de blendas poliméricas são influenciadas por seus componentes e a contribuição das propriedades particulares de cada material adicionado. As propriedades mecânicas das blendas estão relacionadas com a morfologia, tamanho das partículas, compatibilidade na interação entre os polímeros da blenda e a relação com a interação interfacial entre eles.

2.5.4. Análise de cor

Quando se trata da elaboração de embalagens na indústria alimentícia, além da exigência sobre as condições ideais para o acondicionamento em longo prazo de alimentos, é importante incumbir a ela atributos que chamarão a atenção do consumidor: um dos atributos levado em consideração no momento de adquirir um produto é a cor, cujo fator está intrinsecamente ligado a qualidade, intenção de compra, segurança do alimento e o grau de maturidade do produto (SYNOWIEC *et al.*, 2014). A análise colorimétrica é verificada pelas coordenadas de cor pelas letras a* (coordenada do verde ao vermelho), b* (coordenada do azul ao amarelo), luminosidade (L), diferença total de cor (ΔE) e índice de brancura (WI) (ZANELA *et al.*, 2015).

Estudos com a avaliação de cor das blendas mostram que a mistura dos polímeros em blendas altera a coloração final dos filmes desenvolvidos. Pereda *et al.* (2011) avaliaram a cor das blendas de quitosana e gelatina e perceberam que a quitosana pura esboça coloração amarelada. Zanela *et al.* (2015) produziram blendas de amido de mandioca com PVA e notaram que o amido apresentou coloração tendendo ao amarelo esbranquiçado enquanto que o PVA apresenta coloração próxima ao branco.

Todas as análises descritas acima são importantes para a avaliação do comportamento dos filmes elaborados neste trabalho.

2.5.5. Caracterização dimensional, física e química

Este tipo de caracterização pode ser feita por uma série de análises que incluem avaliações visuais, avaliações dimensionais, espessura, gramatura, análises objetivas para a determinação de características estruturais da blenda. Destas destacamos as técnicas de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise de Difração de Raios X (DRX), que são utilizadas para fazer análises objetivas das embalagens. A caracterização por estas técnicas é dependente do tipo de ligação química entre os compostos e torna possível reconhecer a presença de diferentes grupos estruturais presentes nas blendas, avaliar a presença de regiões cristalinas e amorfas.

Alguns estudos relatam a análise via FTIR para filmes poliméricos contendo a quitosana, o álcool polivinílico, a gelatina e o amido puros e em blendas (DENAVI *et al.*, 2009; PEREDA *et al.*, 2011; HOSSEINI *et al.* e WU *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2016; CAZÓN *et al.* e SILVA *et al.*, 2018). Estes estudos mostram diferenças entre espectros obtidos para filmes dos polímeros puros em comparação aos filmes

desenvolvidos com as blendas, bem como a diferença nos espectros devido a incorporação de outros compostos tais como plastificantes e outros aditivos.

O uso da técnica de difração de Raios X para os polímeros puros e para blendas também mostrou características diferentes quanto a formação de regiões cristalinas para os polímeros puros e para as blendas (PEREDA *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2013, GIANNAKAS *et al.* e DA SILVA *et al.*, 2016; PÉREZ-CÓRDOBA *et al.* e SILVA *et al.*, 2018).

Estas técnicas sempre que possível devem ser utilizadas em conjunto com outras técnicas de caracterização. No caso de avaliações qualitativas, a associada à análises térmicas é recomendada.

2.5.6. Análises térmicas

De acordo com Rydz *et al.* (2013), as análises térmicas são uma condição relevante no ramo de embalagens, especialmente as utilizadas nas indústrias de alimentos, para que possa ser definida a sua aplicação, bem como o estimar condições ideais de processamento. Assim, estudam-se os efeitos da ação do calor em análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA) sobre filmes.

Segundo Denardin e Silva (2008) a calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma das técnicas utilizadas para avaliar o comportamento de polímeros de acordo a formação da estrutura filmogênica e a geleificação. Estuda-se também o processo de decomposição térmica. O comportamento de uma leitura em análise de calorimetria diferencial exploratória (DSC) é plotada com o fluxo de calor em função da temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2013) onde são avaliados principalmente a temperatura de transição vítrea (T_g), a temperatura de fusão (T_f) e, a partir destes dados, o grau de cristalinidade X_c (%). Segundo alguns autores a mistura de polímeros em blendas geram propriedades distintas de T_g , T_f e X_c (%), em relação aos compostos puros, devido ao fato de que pode haver a formação de ligações intermoleculares cruzadas e reticulação das substâncias (SU *et al.*, 2010). Estas variáveis podem ser um indicativo de compatibilidade entre os polímeros (AL-HASSAN e NORZIAH, 2012).

Na termogravimetria ou análise termogravimétrica é possível estudar a estabilidade térmica do material e os efeitos da completa degradação em suas propriedades físicas e químicas pela análise da perda de massa em função do tempo ou

da temperatura (RYDZ *et al.* 2013). Esta análise também apresenta informações importantes do polímero e das blendas por estar associada à degradação de grupos funcionais a medida que ocorre a degradação térmica (BONILLA *et al.*, 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, Mehdi; REZAEI, Masoud; FARZI, Gholamali. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 343-350, 2012.

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

AYALA-ZAVALA, Jesus. Fernando; VEJA-VEJA, Violeta; ROSAS-DOMÍNGUEZ, Cindy; PALFOX-CARLOS, Hugo; VILLA-RODRIGUEZ, José A.; WASIM SIDDQUI, Mohammed; DÁVILA-AVINÃ, Jorge Esteban; GONZÁLEZ-AGUILAR, Gustavo Adolfo. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1866-1874, 2011.

BALAKRISHNAN, Preetha; GOPI, Sreerag, M.S., Sreekala; THOMAS, Sabu. UV resistant transparent bionanocomposite films based on potato starch/cellulose for sustainable packaging. **Starch-Stärke**, v. 70, n. 1-2, p. 1700139, 2018.

BARBIROLI, Alberto; BONOMI, Francesco; CAPRETTI, Giorgio; IAMETTI, Stefania; MANZONI, Matilde; PIERGIOVANNI, Luciano; ROLLINI, Manuela. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 387-392, 2012.

BENKERROUM, Noreddine. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, 2008.

BHATIA, Sugandha; BHARTI, Anoop. Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 6, p. 3504-3512, 2015.

BONILLA, Jeannine; FORTUNATI, Elena; ATARÉS, Lorena; CHIRALT, Amparo; KENNY, José Maria. Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 463-470, 2014.

BONOMO, Renata Cristina Ferreira; SANTOS, Taline Amorim; SANTOS, Leandro Soares; FONTAN, Rafael da Costa Ilhéu; RODRIGUES, Luciano Brito; PIRES, Ana Clarissa dos Santos; VELOSO, Cristiane Martins; GANDOLFI, Olga Reinert Ramos; BONOMO, Paulo. Effect of the Incorporation of Lysozyme on the Properties of Jackfruit Starch Films. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 2, p. 508-517, 2018.

BOTRE, Diego Alvarenga; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; ESPITIA, Paula Judith Perez; DE SOUSA, Solange; RENHE, Isis Rodrigues Toledo. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Ceres**, v. 57, n. 3, 2010.

CAMPOS, Adriana de; TEODORO, Kelcilene Bruna Ricardo; MARCONCINI, José Manoel; MATTOSO, Luiz Henrique Capparelli. Efeito do tratamento das fibras nas propriedades do biocompósito de amido termoplástico/policaprolactona/sisal. **Polímeros**, p. 217-222, 2011.

CAZÓN, Patricia; VÁZQUEZ, Manuel; VELAZQUEZ, Gonzalo. Composite films of regenerate cellulose with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of water adsorption, mechanical and optical properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 235-246, 2018.

COLAK, Basak Yilin; PEYNICHOU, Pierre; GALLAND, Sophie; OULAHAL, Nadia; ASSEZAT, Gilles; PROCHAZKA, Frédéric; DEGRAEVE, Pascal. Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 142-151, 2015.

CORRADINI, Claudio; ALFIERI, Ilaria; CAVAZZA, Antonella; LANTANO, Claudia; LORENZI, Andrea; ZUCCHETTO, Nicola; MONTENERO, Angelo. Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol-gel technique. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 3, p. 580-587, 2013.

DA SILVA CÉSAR, Aldara; DE MORI, Cláudia; BATALHA, Mário Otávio. Inovações tecnológicas de embalagens nas indústrias de alimentos: estudo de caso da adoção de embalagem ativa em empresas de torrefação de café. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 9, n. 2, p. 355-378, 2010.

DA SILVA, Juliana Fonseca Moreira; PRADO, Guilherme; MADEIRA, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz; OLIVEIRA, Marize Silva; FARACO, André Augusto Gomes; MALTA, Camilla Martins; NICOLI, Jacques Robert; PIMENTA, Raphael Sanzio. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 467-475, 2015.

DA SILVA, Paloma Lima; GOMES, Anida Maria Moraes; RICARDO, Nágila Maria Pontes Silva; MACHADO, Terezinha Feitosa. Elaboração e caracterização de blendas de amido fosforilado com quitosana e pva. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 450-455, 2016.

DE ALMEIDA-COUTO, JÉSSICA MARIA FERREIRA; CESTARI, LUCINÉIA APARECIDA. Estabilidade oxidativa e microbiológica de empanados de frango em embalagens ativas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 30, n. 1, 2018.

DE ARAUJO, Livia Vieira; GUIMARAES FREIRE, Denise Maria; NITSCHKE, Marcia. Biosurfactants: anticorrosive, antibio film and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

DE FRANÇA, Francisco; MOREIRA, Denise da Rocha; DE ALMEIDA, Raimundo Rodrigues; RODRIGUES, Francisco Helder Almeida; RIBEIRO, Maria; RICARDO, Nágila Maria Pontes Silva. Novos surfactantes alquil poliglicosídicos à base de amilose extraída da batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.). **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 275-283, 2017.

DE OLIVEIRA, Talita Moreira; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; DE PAULA, Cláudia Denise; VIANA, Giulliano Amaral. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.

DE SOUZA MEDEIROS, Bartolomeu Garcia; LUCENA, Valeska Silva; CONFESSOR, Maine Virgínia Alves; PEIXOTO, Maria do Socorro Rocha Melo; OLIVEIRA, Stéphanhy Sallomé Sousa; RAMOS, Sidney Rodrigues. ANÁLISE MOLECULAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LISOZIMA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 13, n. 2, 2017.

DE SOUZA, Silvio José de; DA SILVA, Marcos Vieira; LEIMANN, Fernanda Vitória; SHIRAI, Marianne Ayumi. Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas de filmes de amido contendo extrato de própolis. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1800-1805, 2015.

DE SOUZA, Poliana Mendes; FERNÁNDEZ, Avelina; LÓPEZ-CARBALLO, Gracia; GAVARA, Rafael; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, Pilar. Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 300-306, 2010.

DENARDIN, Cristiane Casagrande; SILVA, Leila Picolli da. Starch granules structure and its regards with physicochemical properties. **Ciência rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DENAVI, Gabriela Alejandra; PÉREZ-MATEOS, Miriam; AÑÓN, María Cristina; MONTERO, Pilar; MAURI, Adriana Noemi; GÓMEZ-GILLÈN, Maria Carmen. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2094-2101, 2009.

GALINDO, Marcella Vitoria; Paglione, Isabela dos Santos; BALAN, Geane Cristiane; SAKANAKA, Lyssa Setsuko; SHIRAI, Marianne Ayumi. Atividade antimicrobiana e antioxidante de filmes comestíveis de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. e019008-e019008, 2019.

GARCIA, Émerson Loli; DO CARMO, Ezequiel Lopes; DE PÁDUA, Joaquim Gonçalves; LEONEL, Magali. Potencialidade de processamento industrial de cultivares de batatas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1742-1747, 2015.

GIANNAKAS, Aris; VLACHA, Maria; SALMAS, Constatinos; LEONTIOU, Areti; KATAPODIS, Petros; STAMATIS, Haralambos; BARKOULA, Nektaria-Marianthi; LADAVOS, Athanasios. Preparation, characterization, mechanical, barrier and antimicrobial properties of chitosan/PVOH/clay nanocomposites. **Carbohydrate polymers**, v. 140, p. 408-415, 2016.

GONSALVES, Arlan de Assis; ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SOARES, Nivaldo Alves; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; DE ABREU, Fabiane Caxico. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

HAMARAT SANLIER, Senay; YASA, Merve; CIHNIOGLU, Asli Ozge; ABDULHAYOGLU, Merve; YILMAZ, Habibe; AK, Guliz. Development of gemcitabine-adsorbed magnetic gelatin nanoparticles for targeted drug delivery in lung cancer. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 943-949, 2016.

HANUŠOVÁ, Kristýna; VÁPENKA, Lukáš; DOBIÁŠ, Jaroslav; MIŠKOVÁ, Linda. Development of antimicrobial packaging materials with immobilized glucose oxidase and lysozyme. **Open Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 1066-1078, 2013.

HOSSEINI, Seyed Fakhreddin; REZAEI, Masoud; ZANDI, Mojgan; GHAVI, FarhidFarahmand. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1490-1495, 2013.

HUANG, Dajian; MU, Bin; WANG, Aiqin. Preparation and properties of chitosan/poly (vinyl alcohol) nanocomposite films reinforced with rod-like sepiolite. **Materials Letters**, v. 86, p. 69-72, 2012.

JIANG, Suisui; QIN, Yang; YANG, Jie; LI, Man; XIONG, Liu; SUN, Qingjie. Enhanced antibacterial activity of lysozyme immobilized on chitin nanowhiskers. **Food chemistry**, v. 221, p. 1507-1513, 2017.

KANATT, Sweetie R.; RAO, M. S.; CHAWLA, Surinder Pritamdas; SHARMA, Arun. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 290-297, 2012.

LIBURDI, Katia; BENUCCI, Ilaria; PALUMBO, Fabio; ESTI, Marco. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. **Food Control**, v. 63, p. 46-52, 2016.

LOPES, Franceline Aparecida; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; LOPES, Cristiane de Cássia Pires; SILVA, Washington Azevedo da. Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico/Development and characterization of cellulose based films with cinnamaldehyde incorporated. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 33, 2014.

LUNA, Carlos Bruno Barreto; DA SILVA, Divânia Ferreira; ARAÚJO, Edcleide Maria; DE MELO, Tomás Jeferson Alves; DE OLIVEIRA, Amanda Dantas. Estudo do comportamento mecânico, termomecânico e morfológico de misturas de poliestireno/composto de borracha reciclada (SBR). **Revista Matéria**, v. 20, n. 2, p. 322-334, 2015.

MACIEL, Vinícius Borges Vieira; FRANCO, Telma Teixeira; YOSHIDA, Cristiana Maria Pedroso. Alternative intelligent material for packaging using chitosan films as colorimetric temperature indicators. **Polímeros**, v. 22, n. 4, p. 318-324, 2012.

MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Victória Eiras; YAMASHITA, Fábio. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137-155, 2011.

MATTEI, Dariane; GUIMARÃES, LetíciaFaciolli; FERREIRA, Fabiana Borges Padilha; DOS SANTOS, Sandra Regina Da Silva Reis; MARTIN, Andressa Amado; GAZIM, Zilda Cristiani; DRAGUNSKI, Douglas Cardoso. Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes à base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* L.-LAMIACEAE. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 16, n. 2, 2013.

MOHAMMAD, Mohammad Amin; GRIMSEY, Ian M.; FORBES, Robert Thomas. Mapping the solid-state properties of crystalline lysozyme during pharmaceutical unit-operations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 114, p. 176-183, 2015.

MORAES, Allan Robledo Fialho; GOUVEIA, Luis Eduardo Reis; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; SANTOS, Manoela Maciel de Souza; GONÇALVES, Maria Paula Junqueira Conceição. Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 33-36, 2007.

MOURA, Catarina Motta de; MUSZINSKI, Patrícia; SCHMIDT, Cristiano; ALMEIDA, Janaína; PINTO, Luiz Antonio Almeida. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. 2006.

OLIVEIRA, Ricardo Vinícius Bof de; FERREIRA, Creusa Iara; PEIXOTO, Luciano J. F.; BIANCHI, Otávio; Silva, Patricia A.; DEMORI, Renan; SILVA, Rodrigo P.; VERONESE, Vinicius Bassanesi. Mistura polipropileno/poliestireno: um exemplo da relação processamento-estrutura-propriedade no ensino de polímeros. **Polímeros**, v. 23, n. 1, p. 91-96, 2013.

PACHEKOSKI, Wagner Mauricio; DALMOLIN, Carla; AGNELLI, José Augusto Marcondes. Blendas poliméricas biodegradáveis de PHB e PLA para fabricação de filmes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 24, n. 4, p. 501-507, 2014.

PANDELE, Andreea Madalina; IONITA, Mariana; CRICA, Livia; DINESCU, Sorina; COSTACHE, Marieta; IOVU, Horia. Synthesis, characterization, and in vitro studies of graphene oxide/chitosan-polyvinyl alcohol films. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 813-820, 2014.

PARK, Sang-I.; DAESCHEL, Mark A.; ZHAO, Yu. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. M215-M221, 2004.

PELLISSARI, Franciele Maria; YAMASHITA, Fábio; GARCIA, María Alejandra; MARTINO, Miriam Nora; ZARITZSKY, Noemi Elisabet; GROSSMANN, Maria Victoria E..Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 2, p. 262-267, 2012.

PEREDA, Mariana; PONCE, A.G.; MARCOVICH, Norma E.; RUSECKAITE, Roxana A.; MARTUCCI, Josefa F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, 2011.

PÉREZ-CÓRDOBA, Luis J.; NORTON, Ian T.; BATCHELOR, Hannah K.; GKATZIONIS, Konstantinos; SPYROPOULOS, Fotios; SOBRAL, Paulo J. A. Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. **Food hydrocolloids**, v. 79, p. 544-559, 2018.

PIRES, Marcia Lopes; SANTOS, Ramom Vieira; PERÃO, Leandro; CHIES, Ana Paula. Efeito da migração de composto antimicrobiano nas propriedades finais de selagem de filme poliolefinico. **Polímeros: ciência e tecnologia**. Vol. 24, n. 2 (mar./abr. 2014), p. 237-242, 2014.

QIAO, Congde; XIANGUANG, Ma; ZHANG, Jianlong; YAO, Jinshui. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. **Food chemistry**, v. 235, p. 45-50, 2017.

QUESADA, Jesús; SENDRA, Esther; NAVARRO, Casilda; SAYAS-BARBERÁ, Estrella. Antimicrobial active packaging including chitosan films with *Thymus vulgaris* L. essential oil for ready-to-eat meat. **Foods**, v. 5, n. 3, p. 57, 2016.

RAWDKUEN, Saroat; SUTHILUK, Phunsiri; KAMHANGWONG, Damrongpol; BENJAKUL, Soottawat. Mechanical, physico-chemical, and antimicrobial properties of gelatin-based film incorporated with catechin-lysozyme. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 131, 2012.

RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, Jesús Rubén; LÓPEZ-CERVANTES, Jaime; SÁNCHEZ-MACHADO, Dalia I.; RAMÍREZ-WONG, Benjamin; TORRES-CHAVEZ, Patricia; CORTEZ-ROCHA, Mario Onofre. Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **International journal of food science & technology**, v. 47, n. 10, p. 2127-2133, 2012.

RUSSELL, Ben Allan; JACHIMSKA, Barbara; KOMOREK, Paulina; MULHERAN, Paul. A.; CHEN, Yu. Lysozyme encapsulated gold nanoclusters: effects of cluster synthesis on natural protein characteristics. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 10, p. 7228-7235, 2017.

RYDZ, Joanna; WOLNA-STYPHA, Katarzyna; MUSIOL, Marta; SZELUGA, Urszula; JANEK, Henryk; KOWALCZUK, Marek. Further evidence of polylactide degradation in paraffin and in selected protic media. A thermal analysis of eroded polylactide films. **Polymer degradation and stability**, v. 98, n. 8, p. 1450-1457, 2013.

SHIMAZU, Angélica Aimoto; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Victória Eiras. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SILVA, Juliana Fonseca Moreira da; PRADO, Guilherme; MADEIRA, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz; OLIVEIRA, Marize Silva; FARACO, André Augusto Gomes; MALTA, Camila Martins; NICOLI, Jacques Robert; PIMENTA, Raphael Sanzio.

Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 467-475, 2015.

SILVA, Nuno Helder da Cruz Simões; VILELA, Carla; ALMEIDA, Adelaide; MARRUCHO, Isabel Maria; FREIRE, Carmem Sofia Rocha. Pullulan-based nanocomposite films for functional food packaging: Exploiting lysozyme nanofibers as antibacterial and antioxidant reinforcing additives. **Food hydrocolloids**, v. 77, p. 921-930, 2018.

SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; DA SILVA, Washington Azevêdo, PIRES, Ana Clarissa dos Santos; CAMILLOTO, Geany Peruch; SILVA, Paula Santiago. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Ceres**, v. 56, n. 4, 2009.

SU, Jun-Feng; HUANG, Zhen; YAN-YUAN, Xiao; WANG, Xin-Yan; LI, Min. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate polymers**, v. 79, n. 1, p. 145-153, 2010.

SYNOWIEC, Alicja; GNIEWOSZ, Małgorzata; KRAŚNIEWSKA, Karolina; PRZYBYŁ, Jarosław Leon; BĄCZEK, Katarzyna; WĘGLARZ, Zenon. Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 23, p. 171-181, 2014.

VASILESCU, Alina; GÁSPÁR, Szilveszter; GHEORGHIU, Mihaela; DAVID, Sorin; DINCA, Valentina; PETEU, Serban; WANG, Qian; LI, Musen; BOUKHERROUB, Rabah; SZUNERITS, Sabine. Surface Plasmon Resonance based sensing of lysozyme in serum on *Micrococcus lysodeikticus*-modified graphene oxide surfaces. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 525-531, 2017.

VINHAS, Glória Maria; ALMEIDA, Yêda Medeiros Bastos de; COELHO, Nadjane Soares. A biodegradabilidade da blenda de poli (β -hidroxibutirato-co-valerato)/amido anfótero na presença de microrganismos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 270-276, 2013.

ZANELA, Juliano; REIS, Mônica Oliveira; DIAS, Adriana Passos; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Victória Eiras; YAMASHITA, Fabio. Laminados biodegradáveis de blendas de amido de mandioca e poli (vinil álcool): efeito da formulação sobre a cor e opacidade. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 25, n. 3, p. 326-329, 2015.

WU, Jia; ZHONG, Fang; LI, Yue; SHOEMAKER, Charles F.; XIA, Wenshui. Preparation and characterization of pullulan-chitosan and pullulan-carboxymethyl chitosan blended films. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 82-91, 2013.

II – OBJETIVOS GERAIS

1. Objetivo geral

Elaborar e analisar as características de filmes ativos formados por quitosana, álcool polivinílico, amido e gelatina incorporados com a lisozima.

2. Objetivos específicos

- Elaborar filmes a partir das blendas formadas por álcool polivinílico-quitosana e blendas de quitosana-amido-gelatina pelo Método de *Casting*;
- Incorporar a lisozima as blendas em diferentes concentrações;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes;
- Verificar as características físicas, químicas e de barreira dos filmes;
- Estudar as propriedades mecânicas de tensão, alongamento e Módulo de Young;
- Estudar a propriedade de cor por seus parâmetros de coordenadas de cor, luminosidade, diferença total de cor e índice de brancura;
- Analisar a estrutura química gerada pela interação entre as bases poliméricas e a lisozima;
- Verificar o comportamento térmico do material.

III – CAPÍTULO I – Neste capítulo apresenta-se o esboço do artigo intitulado: **SÍNTESE E PROPRIEDADES DOS FILMES DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO-QUITOSANA (PVAQ) E QUITOSANA-AMIDO-GELATINA (QAG) INCORPORADAS COM LISOZIMA** a ser submetido para a Revista “Food Hydrocolloids” ISSN 0268-005X.

RESUMO

Filmes ativos antimicrobianos foram preparados utilizando quitosana e álcool polivinílico (PVAQ) e quitosana, amido e gelatina (QAG) incorporados com lisozima nas concentrações de 0%, 1,5% e 2,5%. Para os filmes foi estudada a ação antimicrobiana, a atividade enzimática e o efeito da adição da enzima em seus atributos físicos, químicos, ópticos, mecânicos, de barreira e térmicos. Todos os filmes contendo a enzima apresentaram efeito antimicrobiano para *Micrococcus lysodeikticus* avaliado pelo teste de halo. Na avaliação da atividade enzimática em água percebeu-se que a lisozima foi liberada no meio aquoso aos poucos com a dissolução dos demais compostos das blendas. Não foram observadas modificações nas propriedades físicas e mecânicas dos filmes com a adição da enzima. Na análise de cor, a incorporação da lisozima favoreceu o aumento da coloração amarela na coordenada b^* nos filmes, coloração pré-disposta no material devido a presença da quitosana. A transparência das blendas não foi afetada pela adição da lisozima. Na análise de varredura na região UV/visível, a presença da enzima reforçou a barreira na região ultravioleta em ambas as blendas (PVAQ 0%=304 nm; PVAQ 1,5%= 278 nm e PVAQ 2,5%= 277 nm/ QAG 0%=310 nm e QAG 1,5 e 2,5% = 281 nm). Pela avaliação de difração de raios (DRX), os filmes de PVAQ aumentaram a intensidade da linha de difração em torno de 19° na linha de difração do 2θ devido a presença da lisozima enquanto que as blendas de QAG apresentaram halos amorfos. Em calorimetria diferencial de varredura (DSC), filmes de PVAQ a 1,5% indicaram baixo grau de cristalinidade (0,64%), apontando regiões de estrutura amorfa que indica a presença de substâncias reticuladas enquanto que os filmes de QAG a estrutura amorfa foi identificada em todos os ensaios. De maneira geral, as blendas de PVAQ e QAG se apresentam termicamente estáveis, fator melhorado com a presença da lisozima. Ainda que blendas com a enzima apresentaram variações pontuais em suas características, os filmes apresentaram eficácia na inibição microbiológica e propriedades mecânicas e térmicas que podem ser aplicada em embalagem na indústria alimentícia de acordo a composição do alimento.

Palavras-chave: blendas; enzima antimicrobiana; polímeros biodegradáveis.

1. INTRODUÇÃO

Materiais biodegradáveis vêm sendo utilizados em embalagens de alimentos, no entanto, algumas propriedades em filmes de um único material deixam a desejar exigindo a realização de estudos para aprimorar esta aplicação (Bonilla *et al.*, 2014).

Polímeros podem ser unidos em blendas pela mistura de duas ou mais soluções filmogênicas para melhorar as propriedades dos filmes (Synowiec *et al.*, 2014). Compostos como a quitosana e gelatina (Hosseini *et al.*, 2013), o álcool polivinílico (Huang *et al.*, 2012) e o amido (Al-Hassan e Norziah, 2012) podem ser combinados em filmes promovendo características como resistência á abrasão, flexibilidade, alongamento, propriedades de barreiras á radiação UV, permeabilidade ao vapor d'água, resistência térmica, boa transparência e coloração atrativa (Pelissari *et al.*, 2012).

Além da formação de blendas, outros constituintes podem ser incorporados a estes materiais para estabelecer princípios ativos tais como antioxidante, antiuementante e antimicrobianos. A incorporação destes compostos caracteriza embalagens ativas, que são embalagens que estabelecem interação com o alimento pela adição de substâncias que retardam processos fisiológicos, prolongam a vida de prateleira do alimento e influenciam na qualidade ao oferecer a segurança do alimento (Abdollahi *et al.*, 2012). A quitosana é um polímero promissor para o desenvolvimento de embalagens ativas (Pereda *et al.*, 2011; Quesada *et al.*, 2016 e Galindo *et al.*, 2019) pois as características deste polímero possibilitam formar blendas com outros materiais melhorando suas características como filme (Kanatt *et al.*, 2012; Bonilla *et al.*, 2014 e Pérez-Córdoba *et al.*, 2018).

Estudos recentes têm reportado que, dentre alguns agentes antimicrobianos, a lisozima, enzima presente nas lágrimas, mucosas, leite de mamíferos e em ovos, exerce atividade efetiva na inibição microbiológica, principalmente de bactérias gram-positivas (De Souza Medeiros *et al.*, 2017, Dinca *et al.*, 2018 e Silva *et al.*, 2018). Esta vem sendo utilizada para o desenvolvimento de embalagens ativas antimicrobianas com glicose oxidase (Hanusová *et al.*, 2013), em filmes de amido com nisina e etilenodiaminotetracetato (Bhatia e Bharti, 2015), imobilizada em esferas de quitosana testada em meio líquido (Liburdi *et al.*, 2016), entre outras aplicações.

Visto que a elaboração de blendas pode levar ao desenvolvimento de filmes com características mais adequadas e que a incorporação de um agente antimicrobiano no desenvolvimento de uma embalagem ativa é uma tecnologia inovadora na área de alimentos, este trabalho propõe como objetivo estudar as características de blendas elaboradas a partir de quitosana, álcool polivinílico, amido e gelatina incorporadas com lisozima e verificar o efeito da adição da enzima nas propriedades dos filmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material para o preparo dos filmes

Como materiais para o preparo dos filmes foram utilizados quitosana em pó Polymar (01 Kg), álcool polivinílico P.S Dinâmica – Química contemporânea LTDA (500g), ácido acético Glacial (P.A.), gelatina comercial em pó sem sabor (24g) e fécula de batata em pó (200g), adquiridos em comércio local.

2.2. Elaboração das soluções filmogênicas

Foi preparada uma solução de quitosana 2% (m/v) onde o peso da quitosana é calculada com relação ao volume de ácido acético, que é preparado a concentração de 3% (v/v) e a esta solução é adicionada 20% (m/m) do plastificante glicerol (em relação ao peso da quitosana em grammas).

Preparou-se uma solução de PVA a 10% (m/v) em água destilada, acrescida com 5% (m/m) de glicerol (referente ao peso do álcool polivinílico em grammas).

Preparou-se uma solução de gelatina a 2% (p/v) em água destilada a 40°C sob agitação magnética por 30 minutos.

Por último, foi elaborada uma solução de amido de batata 3% (p/v) em água destilada a 70°C sob agitação magnética até que, com a homogeneização, fosse obtido um gel transparente.

Estas soluções foram utilizadas para preparo dos filmes.

2.2.1. Preparo dos filmes

Os filmes foram produzidos pelo Método de *Casting*, com adaptações da metodologia empregada por Vinhas *et al.* (2013).

Foram elaborados filmes controle (contendo apenas as bases poliméricas) e filmes incorporados com a enzima lisozima em cinco concentrações diferentes (0,0%- controle; 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; e 2,5%) com base na quantidade de massa em grammas da quitosana em pó, polímero em comum com as blendas do presente trabalho.

2.2.1.1. Filme de PVA e quitosana (PVAQ)

O filme foi desenvolvido com a mistura de 70% da solução de PVA e 30% da solução de quitosana, cujas soluções foram misturadas sob agitação magnética em cuba

ultra-sônica digital Soni Clean - Sanders por 25 minutos. Em seguida, o conteúdo foi disposto em placa de vidro retangular de dimensão 33x23cm², sendo posteriormente colocada para secagem a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

2.2.1.2. Filme de quitosana, fécula de batata e gelatina comercial (QAG)

As soluções filmogênicas de quitosana, amido e gelatina foram mescladas na proporção de 2:1:1 (v/v) respectivamente e colocadas em cuba ultra-sônica digital Soni Clean - Sanders por 25 minutos para homogeneização. Em seguida, a solução foi colocada em placa de vidro retangular de dimensão 33x23cm² para a secagem a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

2.3. Avaliação dos filmes

Antes das avaliações os filmes foram acondicionados em dessecador contendo cloreto de bário em pó por 24h a 25°C para a uniformização da umidade (UR = 0%).

2.3.1. Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana em função da concentração da lisozima foi realizada conforme a metodologia utilizada por Synowiec *et al.* (2014), com adaptações no diâmetro dos discos e tempo de análise. Foi preparada solução de 1% de gel de agarose em tampão de fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH=6,8) contendo 1mg.mL⁻¹ do microrganismo *Micrococcus lysodeikticus*. A solução foi vertida em placa de Petri e, após esfriada, os discos de filmes de 6mm de diâmetro foram colocadas na região central do ágar. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24, 48 e 72h e a atividade antimicrobiana foi expressa conforme a formação dos halos de inibição em milímetros (mm).

2.3.2. Espessura

Para a determinação da espessura, foi utilizada a metodologia descrita por Escobar *et al.*(2009), no qual foi usado o Micrômetro Externo Digital Pantec com contador de 0,001mm. Com o filme em posição horizontal, as faces de contato foram aproximadas em um ponto do material, indicando no visor a espessura do mesmo em milímetros (mm). O procedimento foi realizado 10 vezes ao longo do filme, abrangendo

extremidades, pontos centrais e laterais. Os valores foram expressos em média aritmética.

2.3.3. Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado conforme a metodologia utilizada por Pérez-Córdoba *et al.*(2018). Os filmes foram cortados em formato quadrangular com 20 mm de diâmetro. Foi retirada a umidade dos filmes, utilizando o método de secagem à temperatura de 105°C por 12h em estufa. O peso da amostra seca foi anotado correspondendo ao peso inicial para a análise de solubilidade. A amostra seca foi colocada em erlenmayer contendo 50 mL de água destilada, sendo posteriormente colocada em Mesa Agitadora Orbital MA-140/CF a temperatura de 25°C, a 60 rpm/24h. Após completar o tempo, foi removida a água da amostra por filtração e o material foi novamente desidratado, conforme o teste de umidade anterior. O peso da amostra seca desta vez correspondeu à massa final após solubilização. A análise foi realizada em triplicata e a solubilidade foi determinada pela Equação 1:

$$S (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

- S (%) = Percentual de solubilidade
- M_i = massa inicial (após a 1° secagem) (g)
- M_f = massa final (após a 2° secagem) (g)

2.3.4. Permeabilidade ao vapor d'água

Para a determinação da permeabilidade ao vapor d'água foi utilizado o método ASTM E96-92, com adaptações no tempo da técnica utilizada por Abdollahi *et al.* (2012). Os filmes em formato circular de aproximadamente 3 cm de diâmetro, foram colocados sobre a superfície do frasco de permeação contendo sílica gel seca. A célula para permeação foi pesada e colocada em dessecador contendo água destilada (UR=100%; pressão de vapor = 32,23 mmHg) em ambiente climatizado a 20°C. Após 24h, os frascos foram pesados para verificar a migração de água para o interior dos

mesmos. As pesagens foram realizadas por 16 dias e a permeabilidade do vapor d'água foi calculada pela Equação 2:

$$WVP = \frac{G \times \delta}{A \times T \times (P1 - P2)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

- WVP = Permeabilidade do vapor d'água (g/ m.s.mmHg)
- G = Ganho de massa em 24h (g)
- δ = Espessura (m)
- A = Área do filme (m²)
- T = Tempo (s)
- P1 - P2 = Gradiente de Pressão (mmHg)

2.3.5. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram testadas conforme metodologia descrita por Sueiro *et al.* (2016), com adaptações no número de filmes e a velocidade do teste. No equipamento Brookfield modelo CT3 (Estados Unidos) de carga máxima de 25 kg foram ajustados 05 corpos de prova com dimensão de 2,7x10,8 cm². Cada amostra foi posicionada com distância inicial de 10 cm entre as bases. Os corpos de prova foram esticados verticalmente, imprimindo a força e deformação à velocidade de 0,04 mm/s até que as bases do equipamento atingissem o deslocamento programado ou até o cisalhamento do material. Após a computação dos dados, foram calculados o Alongamento (%), a Tensão Máxima (MPa) e o Módulo de Young (MPa) pelas Equações 3, 4 e 5:

➤ Alongamento:

$$\varepsilon = \frac{l_f - l_o}{l_o} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

- ε = Alongamento (%)
- Lf = deformação final (m)
- Li = deformação inicial (m)

➤ Tensão Máxima:

$$\sigma = \frac{F_{max}}{A} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

- σ = Tensão máxima
- F = Força máxima (N)
- A = Área (m²), que diz respeito à largura x espessura do filme.

➤ Módulo de Young (Módulo de elasticidade):

$$MY = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

- MY = Módulo de Young
- $\Delta\sigma$ = Variação da Tensão (MPa)
- $\Delta\varepsilon$ = Variação do alongamento na região de deformação elástica (m).

2.3.6. Análise colorimétrica

As coordenadas de cor foram determinadas utilizando o Colorímetro Color Quest XE (Hunter Lab), cujas amostras de dimensão 2,7x10,8 cm² foram posicionadas no orifício para medição colorimétrica a temperatura de 24 °C. Assim como o trabalho de Pereda *et al.* (2011), foram avaliados os parâmetros a*, b*, L* e ΔE , onde:

- a* = Coordenada do + vermelho/-verde
- b* = Coordenada do + amarelo/-azul
- L* = Luminosidade
- dE^* ou ΔE = Diferença total de cor

Após a obtenção de tais parâmetros, foi determinado o Índice de Brancura (WI) pela Equação 6:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Eq. 6})$$

2.3.7. Percentual de Transparência

O teste de transparência foi realizado conforme a metodologia utilizada por Pérez-Córdoba *et al.* (2018). Os filmes foram cortados com dimensão de aproximadamente 3x1 cm², inseridos no local das cubetas e foram comparados com a transmitância do ar como o “branco” da leitura em comprimento de onda a 670 nm. O teste foi realizado em triplicata para a obtenção da média aritmética. A transparência foi quantificada pela seguinte Equação 7:

$$T\%_{670} = \frac{\text{Log } I}{(\delta)} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

- T% = Percentual de transparência
- I = Transmitância (%)
- δ = Espessura (mm)

2.3.8. Espectroscopia UV/VIS

As propriedades de barreira da transmissão ultravioleta (UV) e luz visível foram analisadas em UV-1800 UV Spectrophotometer (Modelo PC, Shimadzu, Kyoto, Japão) via absorbância abrangendo a faixa de 200 a 700 nm em filmes de dimensão 3x1 cm² conforme a metodologia descrita por Hosseini *et al.* (2013).

2.3.9. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FTIR foram coletados no modo de transmissão utilizando o espectrômetro Cary630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) realizando a leitura na região do Infravermelho médio (MIR) no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹, reflectância total atenuada (ATR) e detector sulfato de triglicínadeuterado (DTGS). A varredura de 64 scans de infravermelho sobre a amostra durou aproximadamente 30 segundos a temperatura de 25°C. Antes de cada coleta foi realizada uma leitura do espectro de fundo (*background*). Os dados foram obtidos com uso do software Microlab e o Resolution Pro, marca Agilent (Santa Clara – USA).

2.3.10. Difração de raios X

Os padrões de difração de raios X foram analisados com adaptações dos parâmetros de programação da metodologia utilizada por Wu *et al.* (2013). Foi utilizado o difratômetro de raios X de bancada D2 Phaser (Bruker) com $\lambda = 1,54184$, tensão de 30 V e corrente de 10 mA. Os filmes (dimensão 1,8 cm²) previamente condicionados em cloreto de bário no dessecador (UR=0%) foram posicionados no centro da peça de quartzo (diâmetro: 5,1 cm) e colocados no equipamento para serem analisadas na linha de difração do 2 θ de 5 a 40° a velocidade de 4°/ min e temperatura de 25°C.

2.3.11. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)

Para a calorimetria diferencial de varredura foram utilizados cerca de 20 mg de amostra em calorímetro TGA/DSC Test Instrument LINSEIS Modelo STA PT – 1000 (Simultaneous, Germany) com rampa de aquecimento de 25 a 900°C programado a 10°C/min, com influência do ar. Foram determinadas as temperaturas de transição vítrea (Tg), de fusão (Tm) e o grau de cristalinidade (Xc %) conforme o registro das reações endotérmicas e exotérmicas durante o aquecimento. Para a análise termogravimétrica (TGA), foi avaliada a perda de massa no mesmo equipamento e nas condições equivalentes às utilizadas para o DSC.

Segundo Soliman e Furuta (2014) o grau de cristalinidade pode ser obtido pela Equação 9, com as entalpias de fusão dos polímeros sólidos 100% cristalinos:

$$Xc_{\%} = \frac{\Delta H_f}{(\Delta H^{\circ}\phi \times W)_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde:

- Xc (%) = Grau de cristalinidade em percentual
- ΔH_f = Entalpia de fusão
- $\Delta H^{\circ}\phi$ = Entalpia de cristalização por fusão de material 100% cristalino
- W = Fração mássica de um constituinte da blenda

Foram utilizados valores experimentais de ΔH_f em 4,2 kJ/mg para a quitosana (Bonilla *et al.*, 2017), 45,8 kJ/mg para álcool polivinílico (Claro *et al.*, 2016), 219,63

kJ/mg para o fécula de batata (Corradini *et al.*, 2007) e 22,6 kJ/mg para a gelatina (Bonilla *et al.*, 2017).

2.3.12. Análise estatística

2.3.12.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido por delineamento inteiramente casualizado onde todos os testes foram realizados em triplicata.

2.3.12.2. Análise estatística dos ensaios

As respostas da atividade antimicrobiana dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima nas concentrações de 0,0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0% e 2,5% foram avaliados por análise de regressão linear múltipla via RSREG (SAS Institute INC., Cary, NC - EUA) licenciado pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Após a resposta da atividade antimicrobiana, os dados dos filmes de PVAQ e QAG nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5% foram selecionados para análise em esquema fatorial 2x3, onde foi realizada a Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ao nível de significância de ($p < 0,05$) pelo programa estatístico PROC ANOVA (SAS Institute INC., Cary, NC - EUA) do SAS University Edition para comparar a influência da enzima sobre as propriedades dos filmes, conforme realizado por Bonomo *et al.* (2018).

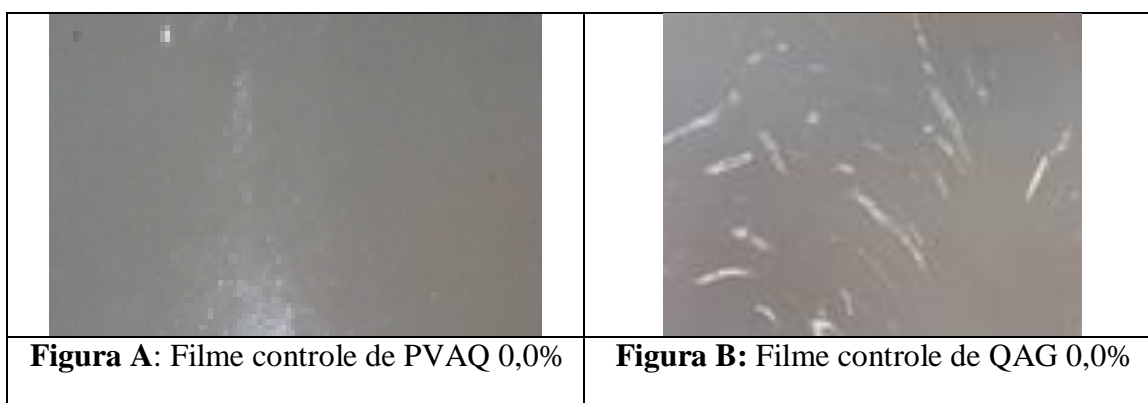
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise visual dos filmes de PVAQ e QAG

Os filmes de PVAQ apresentaram superfície lisa, transparência, coloração levemente amarelada. Os filmes de QAG apresentaram coloração amarelada, opacidade e aspecto quebradiço. As Figuras A e B apresentam os filmes de PVAQ e QAG controle.

O álcool polivinílico é um polímero sintético transparente (Bonilla *et al.*, 2014) e a presença majoritária deste composto na blenda de PVAQ pode ter influenciado em tal característica. Já os filmes de QAG apresentaram-se opacos possivelmente devido à presença do amido, que quando degradado pela ação da temperatura tende a gerar filmes de característica opaca (Zanela *et al.*, 2015).

Os filmes de PVAQ e QAG apresentaram coloração amarelada possivelmente influenciada pela presença da quitosana (Pereda *et al.*, 2011).



3.2. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada de acordo a formação de halos de inibição cujos resultados da técnica disco-difusão estão expressos na Tabela 1. Os dados mostram que o filme controle de PVAQ e QAG não apresentaram atividade antimicrobiana, no entanto, com a incorporação da enzima os filmes formaram halos de inibição, sendo que maiores concentrações de lisozima reproduziram diâmetros maiores, demonstrando maior ação antimicrobiana.

Apesar dos filmes apresentarem na sua composição o PVA e a quitosana que já são associados à inibição de crescimento microbiano, no presente trabalho, os filmes controle não formou halo de inibição, mostrando que para o microorganismo testado os polímeros não influenciaram na inibição da atividade microbiológica, reforçando a necessidade da incorporação de agentes de capacidade antimicrobiana para controle microbiológico quando estes polímeros forem utilizados em blendas. Segundo Rodríguez-Núñez, *et al.* (2012) não detectar efeito antimicrobiano da quitosana em blendas indica que a mobilidade da quitosana foi limitada na matriz da blenda, onde as cargas positivas do grupo amino estão estabelecendo interação com os demais componentes da blenda, impedindo a ação destes grupos sobre a parede celular dos microrganismos.

Bhatia e Bharti, (2015), De Souza Medeiros *et al.*, (2017) e Dinca *et al.* (2018) explicam que a estrutura polipeptídica da lisozima dispõe de cisteínas hidrofóbicas e uma ponte dissulfídica agindo como agente de controle microbiológico, esta enzima atua com efeito bacteriostático sobre bactérias gram-positivas, hidrolisando na parede

celular ligações de peptídeoglicanonas do tipo 1-4 entre N-acetil ácido D-muramico e N-acetil D-glucosamina.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana dos discos de filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima em diferentes concentrações para o *Micrococcus lysodeikticus*.

| Filme | Lisozima (%) | Halo de inibição (mm) | | |
|-------|--------------|-----------------------|--------------|---------------|
| | | 24h | 48h | 72h |
| PVAQ | 0,0 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| PVAQ | 0,5 | 3,83 ± 0,29 | 7,00 ± 1,73 | 10,33 ± 5,13 |
| PVAQ | 1,0 | 6,66 ± 0,57 | 11,00 ± 2,00 | 15,90 ± 3,75 |
| PVAQ | 1,5 | 9,00 ± 2,59 | 14,00 ± 5,29 | 20,33 ± 6,82 |
| PVAQ | 2,0 | 15,00 ± 2,64 | 25,00 ± 3,00 | 31,00 ± 4,58 |
| PVAQ | 2,5 | 14,33 ± 1,15 | 22,33 ± 3,05 | 27,66 ± 3,21 |
| QAG | 0,0 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| QAG | 0,5 | 6,10 ± 4,04 | 11,33 ± 7,65 | 16,16 ± 10,25 |
| QAG | 1,0 | 4,00 ± 1,00 | 9,16 ± 3,55 | 16,00 ± 7,54 |
| QAG | 1,5 | 6,00 ± 0,86 | 11,16 ± 2,75 | 18,66 ± 7,65 |
| QAG | 2,0 | 6,33 ± 0,57 | 12,16 ± 3,68 | 18,00 ± 6,53 |
| QAG | 2,5 | 7,16 ± 2,36 | 13,16 ± 4,53 | 19,83 ± 4,85 |

Os resultados são as médias ± o desvio padrão para as três repetições. R² do PVAQ = 0.9513; R² do QAG = 0.8577.

Alguns autores testaram a lisozima em filmes ativos e estes materiais mostraram efeitos antimicrobianos contra microrganismos como *Staphylococcus aureus* (De Souza *et al.*, 2010), *Listeria innocua* DSMZ 20649 e *Escherichia coli* DSMZ 50902 (Barbirolli *et al.*, 2012), *Bacillus subtilis* CNCTC 5615, *Listeria ivanovii* CCM 5884 e *Listeria innocua* CCM 4030, *Pseudomonas fluorescens* CNCTC 5793, *Lactobacillus helveticus* CH-1, *Listeria monocytogenes* (Bhatia e Bharti, 2015), *Micrococcus luteus* CIP A270 (Colak *et al.*, 2015), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Silva *et al.*, 2018) onde em todos os estudos a enzima foi testada também contra o *Micrococcus lysodeikticus* constatando, assim como no presente trabalho, a ação efetiva desta enzima.

Tendo em vista que os filmes contendo 0,5 e 1,0% da lisozima apresentaram halos de inibição similares aos filmes de 1,5% e os filmes contendo 2,0 e 2,5% apresentaram zonas de inibição semelhantes entre si, os filmes contendo 0,0; 1,5 e 2,5% foram selecionados para as demais análises.

3.3.Espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e percentual de transparência dos filmes

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos para a espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e percentual de transparência dos filmes de PVAQ e QAG. Observa-se que a adição da lisozima não interferiu na espessura dos filmes. Comparando-se as blendas, nota-se que os filmes de PVAQ tiveram maiores valores de espessura quando comparado aos filmes de QAG.

Como a metodologia de fabricação dos filmes foi única, percebe-se que o tipo de material utilizado para produção da blenda pode influenciar na espessura do filme. Os valores das espessuras dos filmes de PVAQ variaram de $0,087\pm 0,039$ a $0,179\pm 0,035$ mm e os de QAG variaram entre $0,027\pm 0,007$ e $0,032\pm 0,005$ mm. Blendas poliméricas contendo o álcool polivinílico tendem a apresentar maior espessura uma vez que o PVA é capaz de interagir com outros materiais por ligação de hidrogênio, flexibilizando as cadeias de polímeros compatíveis por meio da hidratação, como a quitosana (Da Silva *et al.*, 2016). A espessura dos filmes é um parâmetro que interfere diretamente nas características de permeabilidade ao vapor d'água, gases, e luz dos materiais e nas propriedades mecânicas (Pavoni *et al.*, 2019).

A solubilidade para os filmes de PVAQ e QAG não diferiu entre si com a presença da lisozima (Tabela 2). Ao observar os materiais das blendas, os filmes de PVAQ mostraram-se mais solúveis do que as blendas de QAG. Comparando a solubilidade dos dois tipos de blendas, a alta solubilidade dos filmes de PVAQ pode ser explicada pela alta solubilidade do álcool polivinílico, pois a sua alta afinidade com a água e a sua capacidade de interagir com as cadeias dos polímeros por ligação de hidrogênio faz com que as blendas nas quais ele faz parte sejam mais flexíveis por facilitar a entrada de água no material, assim como um plastificante. Na blenda de quitosana, gelatina e amido, a quitosana pode ter interagido pelo grupo amino de carga positiva presente no segundo carbono do monômero de glucosamina com as hidroxilas dos demais compostos reduzindo a capacidade que eles possuem de ligação com a água e diminuindo assim a solubilidade dos filmes QAG (Pereda *et al.*, 2011).

Rawdkuen *et al.* (2012) reconhecem que a composição de filmes contendo mais de um polímero pode alterar a estrutura química da blenda, implicando em alterações na solubilidade dos componentes, inclusive da lisozima, onde os autores apontam que o teor de proteínas afeta a solubilidade do filme, no entanto, apesar das proteínas

apresentarem caráter hidrofílico, no presente trabalho a incorporação da enzima não interferiu neste parâmetro.

Tabela 2: Propriedades de espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e percentual de transparência dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima

| Filme | Lisozima (%) | Espessura (mm) | Solubilidade (%) | WVP* (g/ m. s. mmHg) | %T** |
|-------|--------------|---------------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| PVAQ | 0,0 | 0,087±0,039 ^{Aa} | 72,31±17,36 ^{Aa} | 2,272x10 ⁻³ ±0,001 ^{Aa} | 25,05±9,86 ^{Aa} |
| PVAQ | 1,5 | 0,179±0,035 ^{Aa} | 90,83±1,50 ^{Aa} | 5,278x10 ⁻³ ±0,001 ^{Aa} | 11,20±2,50 ^{Aa} |
| PVAQ | 2,5 | 0,162±0,095 ^{Aa} | 81,15±14,08 ^{Aa} | 4,868x10 ⁻³ ±0,002 ^{Aa} | 16,95±13,29 ^{Aa} |
| QAG | 0,0 | 0,027±0,007 ^{Ba} | 10,48±0,95 ^{Ba} | 1,046x10 ⁻³ ±0,000 ^{Ba} | 74,86±24,74 ^{Ba} |
| QAG | 1,5 | 0,032±0,005 ^{Ba} | 21,48±6,46 ^{Ba} | 1,220x10 ⁻³ ±0,000 ^{Ba} | 59,33±8,41 ^{Ba} |
| QAG | 2,5 | 0,030±0,004 ^{Ba} | 16,06±5,23 ^{Ba} | 1,167x10 ⁻³ ±0,000 ^{Ba} | 62,62±9,50 ^{Ba} |

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, maiúscula para coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey (P<0,05). *WVP = Permeabilidade ao vapor d'água; **%T = Percentual de transparência.

A incorporação de lisozima aos filmes de PVAQ e QAG não interferiu na permeabilidade ao vapor d'água (Tabela 2). Como observado para solubilidade, os filmes de PVAQ apresentaram maior permeabilidade ao vapor d'água do que os filmes de QAG. Embora as blendas de PVAQ apresentem maior espessura do que os filmes de QAG, este parâmetro não exerceu influência na formação de barreira para a permeabilidade ao vapor d'água, pois, o álcool polivinílico, que constitui 70% da blenda de PVAQ, é um polímero que exibe comportamento altamente hidrofílico devido a presença de vários grupos OH em sua estrutura, fator que pode ter influenciado na permeabilidade das blendas de PVAQ do presente estudo (Da Silva *et al.*, 2016). Assim como foi verificada em análise de solubilidade, Gonsalves *et al.* (2011), Pelissari *et al.* (2012) e Hosseini *et al.* (2013) acreditam que a quitosana, o constituinte em maior fração na blenda de QAG, possui caráter hidrofóbico devido aos grupos protonados da quitosana interagirem com as hidroxilas livres do amido, da gelatina e da lisozima por reticulação, reduzindo a capacidade de interação com a água e tal motivo pode ter ocasionado baixa permeabilidade ao vapor d'água das blendas de QAG.

Conforme a Tabela 2, os filmes de PVAQ e QAG não sofreram influência na transparência com relação à incorporação da lisozima em diferentes concentrações.

Os filmes de QAG apresentaram maior percentual de transparência do que os filmes de PVAQ, cuja resposta conforme o trabalho desenvolvido por Zanela *et al.* (2015) pode estar relacionada à espessura: os filmes de QAG apresentaram espessura média em torno de 0,027±0,007e 0,032±0,005 mm e maior transparência enquanto que

os filmes de PVAQ apresentaram espessura entre de $0,087\pm 0,039$ e $0,179\pm 0,035$ mm implicando em menor percentual de transparência, onde o quociente entre o log da transmitância sobre o parâmetro físico resultou em maior barreira na transparência. Hosseini *et al.* (2013) constataram em seus estudos que blendas de gelatina e quitosana exibem alta transparência na região visível, cujos componentes correspondem a 75% da composição da blenda de QAG do presente trabalho.

3.4. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de alongamento, tensão e módulo de Young (MY) para os filmes de PVAQ e QAG não apresentaram diferença quanto à incorporação da lisozima conforme os dados da Tabela 3. Pode-se observar que o comportamento mecânico das blendas de PVAQ e QAG (0%) exibiram diferenças quanto a deformação para diferentes tensões.

Os filmes de PVAQ demonstraram bom alongamento e resistência à ruptura enquanto que as blendas de QAG apresentaram percentuais que indicaram rápido cisalhamento. Ao observar a tensão máxima, os filmes de PVAQ demandaram menores valores de tensão comparados aos filmes de QAG. Os valores encontrados para a porcentagem de alongamento confirmam os resultados das tensões máximas aplicadas pelo material, visto que filmes de maior perfil elástico tendem a sofrer longas deformações plásticas e demandam menor força para o alcance do alongamento (Oliveira *et al.*, 2013). O quociente da relação entre a variação da tensão sobre a deformação diz respeito ao módulo requerido para a elasticidade (Medeiros e Wiebeck, 2013), ou seja, o módulo de Young e foi constatado que as forças demandadas para alcançar a elasticidade para os filmes de QAG foram superiores apresentando valores de $6691,33\pm 1834,10$ a $8602,94\pm 1222,40$ MPa enquanto que filmes de PVAQ apresentaram números entre $571,22\pm 106,61$ e $1176,09\pm 65,75$ MPa.

A velocidade do rearranjo molecular durante o processo de recristalização influencia na rigidez do material por conta das ligações de hidrogênio entre as cadeias dos componentes da blenda (Mali *et al.*, 2011). Park *et al.* (2004) acreditam que as hidroxilas presentes na estrutura da lisozima podem ter estabelecido interações com o PVA e a quitosana reforçando as interações na blenda. Porém, Kanatt *et al.* (2012) testaram as propriedades mecânicas de filmes de PVAQ e constataram que a medida que se aumenta a fração de PVA na blenda, as propriedades mecânicas são melhoradas

pois este polímero apresenta de alta plasticidade, sendo necessários valores maiores de força mecânica para alcançar a ruptura dos filmes.

Tabela 3: Propriedades mecânicas dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com diferentes concentrações da lisozima

| Filme | Lisozima (%) | Alongamento (%) | Tensão (MPa) | MY (MPa) |
|-------|--------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| PVAQ | 0,0 | 80,08±10,43 ^{Aa} | 30,52±17,29 ^{Aa} | 986,79±164,52 ^{Aa} |
| PVAQ | 1,5 | 82,62±3,67 ^{Aa} | 12,60±2,03 ^{Aa} | 571,22±106,61 ^{Aa} |
| PVAQ | 2,5 | 61,82±20,33 ^{Aa} | 21,15±15,59 ^{Aa} | 1176,09±65,75 ^{Aa} |
| QAG | 0,0 | 3,22±0,57 ^{Ba} | 89,47±24,52 ^{Ba} | 8602,94±1222,40 ^{Ba} |
| QAG | 1,5 | 3,77±0,70 ^{Ba} | 74,50±20,55 ^{Ba} | 8336,48±1645,90 ^{Ba} |
| QAG | 2,5 | 3,45±0,73 ^{Ba} | 84,27±8,23 ^{Ba} | 6691,33±1834,10 ^{Ba} |

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, maiúscula para coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Considerando que a gelatina forma filmes flexíveis, Pelissari *et al.* (2012) investigaram as propriedades mecânicas em filmes de amido de mandioca e quitosana e descobriram que a quitosana foi o principal fator que influenciava no aumento da resistência a tração, detectando que quando a interação entre os polímeros demonstra baixa compatibilidade, formam filmes menos resistentes, de menor elasticidade, mais rígidos e quebradiços. Da Silva *et al.* (2016) não descartam a contribuição da presença do amido nas baixas propriedades mecânicas em que, no momento da retrogradação, as cadeias de amilose e amilopectina tentam reorganizar a estrutura estabelecendo interações de hidrogênio entre as cadeias do amido (amilose e amilopectina) e os demais polímeros da blenda, porém ficam resíduos deste rearranjo molecular durante o processo de recristalização, influenciando na rigidez do material formando filmes de baixas resistência mecânica, de menor elasticidade, mais rígidos e quebradiços assim como as blendas de QAG. Devido ao comportamento dos filmes de QAG, esta blenda pode ser considerada como um material mais rígido do que a blenda PVAQ, revelando a necessidade da adição de agentes plastificantes para melhorar as propriedades mecânicas gerais destes filmes (Mali *et al.*, 2011).

A adição da lisozima não alterou as características de polimerização das blendas, e apesar de Park *et al.* (2004) acreditarem que filmes contendo a lisozima podem interferir nas propriedades mecânicas de alongamento exigindo maior tensão para escoar, o tamanho da molécula da enzima e o resultado da sua interação com a matriz polimérica das blendas não interferiu nem na espessura e nem na resistência dos filmes de PVAQ e QAG.

3.5. Análise de cor

A adição da lisozima não interferiu nas variáveis de cor dos filmes de PVAQ e QAG para os parâmetros a^* , L^* , ΔE e WI quando comparado aos filmes controle, conforme pode ser visto na Tabela 4, mostrando que a diferença se encontra na composição de cada blenda. Os filmes de PVAQ e QAG não apresentaram diferença quanto ao tipo de material presente na blenda para a coordenada de cor b^* , no entanto o aumento da concentração da lisozima nos filmes favoreceu a intensificação da cor amarela no ângulo de matiz formado pelas coordenadas de a^* e b^* .

Rawdkuen *et al.* (2012) constataram em seus estudos que o aumento da concentração da lisozima em filmes aumenta a cor amarela no material indicando que a coloração amarelada das blendas de PVAQ e QAG podem ter sofrido influência da adição da lisozima. Os autores relatam que a formação de outras cores pode ser resultado das alterações químicas nos materiais poliméricos durante a elaboração das blendas.

Tabela 4: Análise das coordenadas de cor e índice de brancura dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima em diferentes concentrações

| Filme | Lisozima (%) | L^* | a^* | b^* | ΔE | WI |
|-------|--------------|--------------------------|--|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| PVAQ | 0,0 | 41,71±0,10 ^{Aa} | -0,36±0,02 ^{Aa} | 1,28±0,14 ^{Aa} | 41,74±0,10 ^{Aa} | 41,69±0,11 ^{Aa} |
| PVAQ | 1,5 | 41,64±0,15 ^{Aa} | -0,49 ^a ±0,08 ^{Aa} | 1,90±0,50 ^{Ab} | 41,69±0,12 ^{Aa} | 41,60±0,17 ^{Aa} |
| PVAQ | 2,5 | 41,77±0,31 ^{Aa} | -0,41 ^a ±0,22 ^{Aa} | 1,42±1,07 ^{Ac} | 41,81±0,28 ^{Aa} | 41,74±0,33 ^{Aa} |
| QAG | 0,0 | 42,08±0,23 ^{Ba} | -0,28 ^a ±0,04 ^{Ba} | 1,28±0,27 ^{Aa} | 42,10±0,24 ^{Ba} | 42,07±0,24 ^{Ba} |
| QAG | 1,5 | 42,19±0,11 ^{Ba} | -0,29 ^a ±0,03 ^{Ba} | 1,45±0,20 ^{Ab} | 42,21±0,11 ^{Ba} | 42,17±0,08 ^{Ba} |
| QAG | 2,5 | 42,12±0,07 ^{Ba} | -0,27 ^a ±0,02 ^{Ba} | 1,34±0,15 ^{Ac} | 42,15±0,08 ^{Ba} | 42,10±0,08 ^{Ba} |

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, maiúscula para coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Segundo Pereda *et al.* (2011) e Pelissari *et al.* (2012) a quitosana apresenta coloração amarelada devido a presença da repetição do grupo 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose ligada ao b-(1-4) em sua estrutura. Hamarat Sanlier *et al.* (2016) consideram a gelatina como uma substância incolor. Zanela *et al.* (2015) produziram blendas de amido de mandioca e álcool polivinílico para a avaliação da cor de cada polímero em filmes individuais e notaram que o amido apresentou coloração tendendo ao amarelo enquanto que o PVA abrangia a coloração próxima ao branco. Embora filmes de PVA apresentem coloração característica mais próxima ao branco, os filmes de PVAQ (70% PVA; 30% quitosana) do presente estudo reproduziram a coloração característica da quitosana assim como as blendas de QAG (50% quitosana; 25%

amido; 25% gelatina), no entanto a lisozima contribuiu para que intensificasse a cor amarela.

3.6. Espectroscopia UV/VIS

Nos espectros de luz os filmes de PVAQ e QAG apresentaram alta absorção de energia na região do ultravioleta, indicando que estes filmes apresentam barreira a região de raios ultravioleta (Figura 1) e transmitância na região visível.

As blendas de PVAQ 0,0%; 1,5% e 2,5% apresentaram picos de absorbância em comprimento de onda, respectivamente, 304 nm, 278 nm e 277 nm, indicando que à medida que se aumentou a concentração da lisozima aumentou a barreira à radiação ultravioleta. Estes dados se aproximam dos valores encontrados por Kanatt *et al.* (2012) e Bonilla *et al.* (2014) para blendas de álcool polivinílico e quitosana com agentes incorporados, que apresentaram forte barreira a radiação em ultravioleta identificando picos de absorbância entre 273 a 280 nm, enfatizando a necessidade do agente incorporado para estabelecer barreiras para radiação indesejada.

Para as blendas de QAG nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5% foram constatados picos de absorbância menores para a concentração de 0,0% da enzima, onde a faixa de comprimento de onda alcançou aproximadamente 310 nm. Para as blendas de QAG a 1,5% e 2,5% da enzima notou-se uma pequena inflexão em 281 nm em maior faixa de absorbância, no entanto a curva da blenda para a concentração de 1,5% da enzima sobrepôs as demais, cujo comportamento pode estar relacionado com a reticulação entre compostos da blenda, cuja interação cria fases amorfas e reforçam a proteção para a luz ultravioleta (Gonsalves *et al.*, 2011), especialmente devido a interação polissacarídeo-proteína (Pereda *et al.*, 2011) e proteína-proteína (Denavi *et al.*, 2009).

Acredita-se que, assim como nos trabalhos de Cazón *et al.* (2018), a quitosana é um polímero capaz de diminuir a transmissão de luz devido à coloração amarelada característica de sua composição, verificada na análise de cor.

Foram encontrados valores próximos aos apresentados por Balakrishnan *et al.* (2018), cuja proteção UV formou-se em aproximadamente 270 a 300 nm, e este fator reforça que a adição da enzima contribuiu para o estabelecimento da barreira a luz UV.

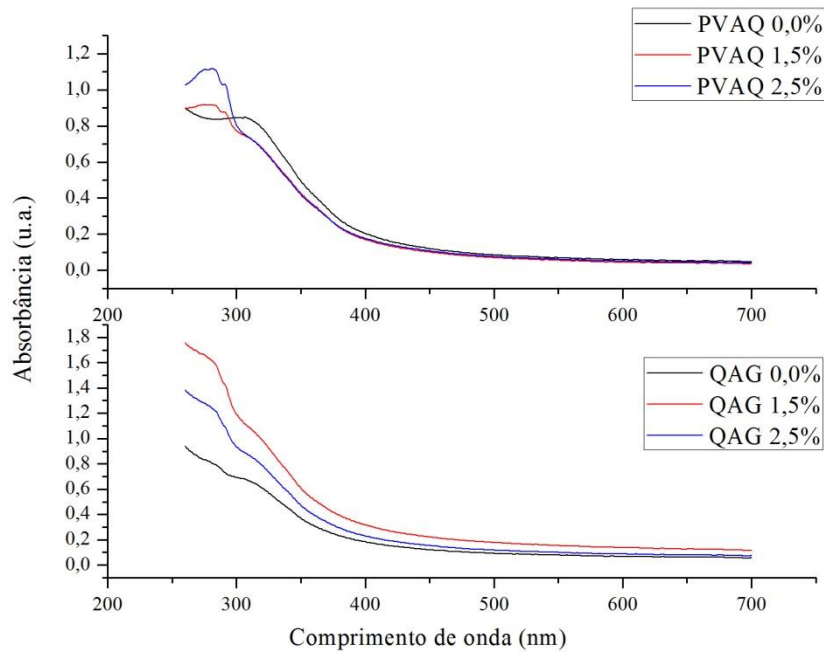


Figura 1: Espectroscopia de varredura nas regiões UV/Visível na faixa de 200 a 700 nm para os filmes de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5%; 2,5%.

As respostas para as blendas de QAG contendo a enzima correspondem aos valores encontrados para Denavi *et al.* (2009) em filmes de gelatina isolados com proteína de soja (280 a 295 nm), em que foi relacionada a presença de resíduos hidrofóbicos das proteínas e a ionização de grupos hidroxila dos constituintes da blenda. Hosseini *et al.* (2013) constataram em blendas de gelatina e quitosana que estes polímeros unidos são capazes de criar barreira para o comprimento de onda entre 200 a 280 nm e alta transparência na região visível, mencionando que filmes à base de proteínas são considerados adequados para alta barreira da radiação UV. Pérez-Córdoba *et al.* (2018) complementam que a gelatina deixa resíduos de aminoácidos que podem reforçar a capacidade protetora dos filmes, cuja característica pode ser melhorada com a adição de compostos, que no presente trabalho foi empregada a proteína lisozima.

3.7. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A Espectroscopia via FTIR foi utilizada para verificar o modo vibracional centrado em bandas das interações entre os constituintes das blendas de PVAQ e QAG e

as interações com a lisozima. Os espectros de FTIR dos filmes foram apresentados na Figura 2.

Silva *et al.* (2018) verificou que filmes que apresentam espectros FTIR na região de 3310 cm^{-1} correspondente ao alongamento do O-H, 2927 cm^{-1} pode ser relativo ao alongamento do C-H e CH₂, em 1646 cm^{-1} para a flexão da água adsorvida (O-H-O), em 1150 a 1060 cm^{-1} correspondente ao alongamento da interação C-O-C presente em pontes glicosídicas e 754 cm^{-1} referente ao alongamento da ligação glicosídica. Para a quitosana, espectros em 3500 e 3400 cm^{-1} indicam banda larga de absorção devido ao alongamento de N-H, na região de 1637 cm^{-1} refere-se a banda amida I do grupo acetil, em 1570 cm^{-1} pode ser verificada o modo vibracional centrado em bandas para o NH₃, que pode ser imposta como amida II, em 1150 a 900 cm^{-1} para anéis de piranose e grupos amidos e, em especial, na região de 1293 cm^{-1} ocorre o alongamento da amida III possivelmente pelas interações C-N e N-H (Pereda *et al.*, 2011). Espectros na faixa de 1716 e 1733 cm^{-1} indicam a presença do álcool polivinílico (PVA) por causa do grupo C=O, onde a carbonila é o resíduo do acetato de vinila, composto que origina o PVA, já para o amido, espectros em trono de 1076 e 999 indicam o estiramento do C-OH do anel de piranose, mais largas e menos intensas á medida que a concentração do amido diminui (Da Silva *et al.*, 2016). Para a gelatina, são identificados espectros na região 3320 cm^{-1} correspondente ao alongamento do N-H, 1677 cm^{-1} referente ao alongamento da amida I e 1242 cm^{-1} correspondente a amida III, C-N e alongamento do N-H (Hosseini *et al.*, 2013). A lisozima apresenta espectros de 3281 cm^{-1} referente ao alongamento do grupo N-H, 1625 cm^{-1} correspondente a banda de amida I e absorção de CO₂, em 1528 cm^{-1} para a banda de amida II e em torno de 1231 cm^{-1} para a banda de amida III (Silva *et al.*, 2018). A quitosana com o amido de milho, por exemplo, apresenta espectros na faixa de 1584 cm^{-1} devido a presença do amino, diferente do filme de quitosana, que o espectro de leitura situa-se em 1578 cm^{-1} (Wu *et al.*, 2013). A quitosana com a gelatina em filme apresenta ainda espectros em 1680 a 1630 cm^{-1} devido a alteração no colágeno ou na região da estrutura secundária envolvendo a região da amida I pois a quitosana e a gelatina interagem por ligações eletrostáticas formando pectina solúvel e as ligações de hidrogênio estabelecida entre ambas exercem baixa influencia na formação de blendas entre os dois polímeros (Pereda *et al.*, 2011).

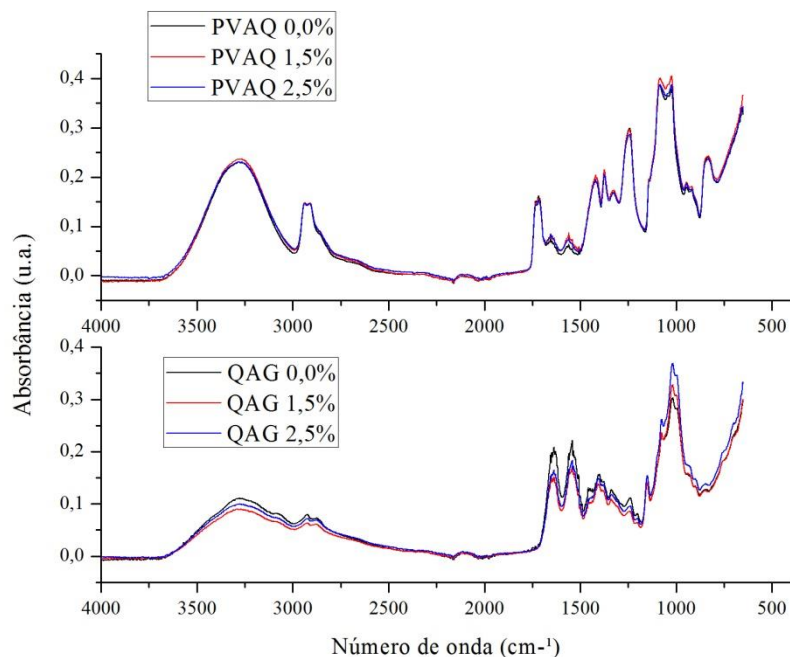


Figura 2: Comportamento das blendas de PVAQ e QAG com 0,0%; 1,5% e 2,5% de lisozima em espectroscopia via FTIR

Ao avaliar as blendas de PVAQ e QAG 0,0; 1,5 e 2,5% foram observadas bandas largas em torno de 3280 cm^{-1} para as blendas de PVAQ e 3274 e 2901 cm^{-1} para as blendas de QAG, respectivamente. De acordo com Wu *et al.* (2013) estas bandas correspondem a interações entre esses os grupos C-H, N-H, O-H intra e intermoleculares em que as vibrações, segundo Denavi *et al.* (2009) podem ser associadas principalmente a presença da hidroxila pois bandas de alta intensidade de absorção nesta faixa são consequência do alongamento das vibrações de grupos O-H, e as ligações de hidrogênio alargam as bandas. Hosseini *et al.* (2013) atribui tal característica como o alongamento do grupo amina (N-H), composto presente principalmente no grupo acetil da quitosana (Pereda *et al.*, 2011) e pode estar relacionado a presença de polímeros proteicos como a gelatina na blenda de QAG e a lisozima nos filmes estudados no presente trabalho (Silva *et al.*, 2018).

Os espectros de baixa intensidade situaram-se na região de 2112 cm^{-1} para as blendas de PVAQ e 2097 cm^{-1} para as blendas de QAG, que pode ser atribuída a vibrações do tipo $\text{C}\equiv\text{C}$ ou $\text{C}\equiv\text{N}$. Contudo, de acordo com Cazón *et al.* (2018), vibrações na faixa de 2900 cm^{-1} podem ser caracterizados pela presença de grupos C-H alifáticos e em faixas menores, próximas a 2260 cm^{-1} existe a possibilidade de ocorrer estiramento dos grupos C-H e O-H.

Nas blendas de PVAQ foram identificados espectros em torno de 1719 cm^{-1} que, de acordo Da Silva *et al.* (2016), bandas na região entre 1716 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} são característicos ao estiramento do grupo carbonila que por ventura é um resíduo do acetato de vinila, substância em que se obtém o álcool polivinílico.

As blendas de PVAQ apresentaram bandas em torno 1645 cm^{-1} assim como para as blendas QAG, que mostraram bandas de 1638 cm^{-1} (QAG 0,0%), 1652 cm^{-1} (QAG 1,5 e 2,5%) o que indica uma flexão na água adsorvida no grupo O-H-O (Wu, *et al.*, 2013). Em torno da faixa de 1652 cm^{-1} houve uma redução na intensidade da banda, fator que indica alterações entre as cadeias. Pereda *et al.* (2011) acreditam que a quitosana é capaz de causar alterações nas cadeias polipeptídicas da gelatina, provocando a redução no número de hélices e estruturas desordenadas em solução filmogênica e produzindo bandas próximo a faixa de 1652 cm^{-1} que se referem ao alongamento do grupo amida I, constatado nas blendas de QAG.

Espectros em 1551 cm^{-1} nas blendas de QAG indicam que houve vibrações em grupos com interação C=C, C=O e C=N que pode estar associado ao alongamento dos grupos amida II, característico da quitosana para os filmes isentos da enzima e característico da quitosana e da lisozima em filmes contendo a enzima (Silva *et al.*, 2018).

Foi observada uma série de estiramentos abrangendo números de onda na faixa de 1240 , 1055 e 821 cm^{-1} para os filmes de PVAQ e bandas em 1406 , 1340 , 1241 , 1196 , 1153 e 1021 cm^{-1} para as blendas de QAG. Hosseini *et al.* (2013) citam que as bandas em torno de 1411 cm^{-1} correspondem ao modo vibracional centrado em bandas dos grupos OH, onde pode-se perceber que a enzima aumenta a intensidade do dobramento nas blendas de PVAQ a medida em que se aumenta a concentração da enzima. Pereda *et al.* (2011) relatam que espectros em torno de 1239 cm^{-1} podem ser associados com alongamento da ligação amida III, C-N, e N-H e que bandas formadas próximos a faixa de 900 a 1150 cm^{-1} correspondem a vibrações dos anéis de piranose e grupos aminos da quitosana e possível estiramento do C-OH (DA SILVA *et al.*, 2016), porém Silva *et al.* (2018) consideram que o alongamento da banda de amida III na região em torno de 1231 cm^{-1} são característicos da lisozima e que existe a possibilidade de ter ocorrido o alongamento das estruturas glicosídicas do C-O-C ressaltadas pela presença da lisozima, fator que favoreceu a intensidade das bandas para todos os materiais.

Foi observado que as blendas de QAG na concentração de 1,5% da lisozima emitiram menor intensidade na absorbância, indicando que houve menor presença de

tais grupos funcionais disponíveis para vibração e/ou rotação, sugerindo que os componentes do filme QAG (1,5%) pode conter grupos disponíveis para interação que não foram acessados durante o processo de recristalização dos filmes tais como as cadeias da solução de amido contendo resíduos da amilose empacotadas nas ramificações das cadeias de amilopectina (Dernadin e Silva, 2008). Tal comportamento pode explicar a baixa resistência mecânica reforçando a necessidade de agentes plastificantes para a flexibilização e união das cadeias (Mali *et al.*, 2011).

Silva *et al.* (2018) relatam que é comum a lisozima apresentar bandas de aproximadamente 3281 cm^{-1} para o alongamento de N-H, 1625 cm^{-1} para banda de amida I bem como a absorção de CO_2 , 1528 cm^{-1} para banda de amida II e em torno de 1231 cm^{-1} para a banda de amida III, no entanto, no presente trabalho, os filmes de PVAQ e QAG isentos da enzima (0,0%) também esboçaram tal comportamento, levando a crer que interação entre os polímeros nas blendas foi responsável por emitir as respectivas bandas de absorção.

3.8. Difração de raios X (DRX)

Os padrões de difração de raios X obtidos podem ser observados na Figura 3 para as blendas de PVAQ e blendas de QAG. Os difratogramas de raios X das blendas de PVAQ apresentaram reflexões em torno de 19° , similar a um arranjo semi cristalino. Já os filmes de QAG apresentaram comportamento halo amorfo, fator que indica a presença de retículo desorganizado (Pereda *et al.*, 2011).

A formação de linhas de difração cristalinas na região de 2θ é comumente descrito na literatura para os polímeros e enzima utilizada. A quitosana apresenta padrões de difração de raios X em 7 , 11 e 18° (Wu *et al.*, 2013), o álcool polivinílico em torno de 20° (Giannakas *et al.*, 2016), o amido em 12 e 23° (Da Silva *et al.*, 2016), a gelatina em 10 e 21° (Pereda *et al.*, 2011) e a lisozima em $18,6^\circ$ (Silva *et al.*, 2018) onde pode-se observar que a presença da quitosana, polímero em comum de ambos os filmes, pode ter influenciado nas reflexões em torno de 19 e 20° para ambas as blendas.

Na região de 30° para estas blendas foi identificado uma formação de linha de difração característica de halo amorfo, que de acordo Pérez-Córdoba *et al.* (2018) indica que a quitosana foi hidratada e este mesmo fator pode estar relacionado a presença da lisozima, em que o aumento da concentração da proteína no filme aumenta a sua capacidade hidratação. Segundo Pereda *et al.* (2011) a incorporação de agentes como as

proteínas tendem a formar halos amorfos nesta região. Isto pode mostrar que há interações de hidrogênio com os compostos utilizados, como a interação dos grupos OH do álcool polivinílico com os grupos amina (N-H) da quitosana (Cazón *et al.*, 2018) e da lisozima (Silva *et al.*, 2018).

As blendas de QAG apresentaram halos amorfos de menor intensidade á medida que a concentração de lisozima aumentou esboçando características de material amorfo em $2\theta = 20^\circ$, comportamento contrário ao observados para as blendas de PVAQ. Alguns autores descrevem que a formação de halo amorfos indica a formação de retículo desorganizado dos polímeros em conjunto onde a presença de fortes interações intra e intermoleculares de hidrogênio com os grupos aminos disponíveis entre os polímeros e a enzima ao ponto de ampliar reflexões que antes compreendiam regiões cristalinas, especialmente para a quitosana (7, 11 e 18° por Wu *et al.*, 2013), amido (12 e 23° por Da Silva *et al.*, 2016) e gelatina (10 e 21° por Pereda *et al.*, 2011). Os filmes de PVAQ apresentaram o retículo semicristalino, possivelmente pela presença do álcool polivinílico, polímero sintético com material de alta cristalinidade. Assim como nas blendas de PVAQ, as blendas de QAG nas concentrações de 0,0; 1,5 e 2,5% exibiram halos amorfos em torno de $2\theta = 30^\circ$ cujo fator pode estar associado a presença da quitosana hidratada (Pérez-Córdoba *et al.*, 2018), ocorrido com o polímero comum em ambas as blendas.

Giannakas *et al.* (2016) desenvolveram filmes de quitosana e álcool polivinílico puros e em blendas com nanocompósitos de argila e perceberam que os filmes de exibiram padrões de difração de raios X com linhas de difração em aproximadamente 20° . No presente estudo, as linhas de difração dos filmes de PVAQ, com e sem a enzima também formaram reflexões de característica cristalina em valores próximos de 20° .

Assim como o comportamento dos filmes de quitosana e gelatina incorporados com nanoemulsões elaborados por Pérez-Córdoba *et al.* (2018), não houve traços de região cristalina da estrutura tripla-hélice da gelatina em torno de 10° no eixo 2θ dos filmes de QAG do presente estudo, no entanto, em filmes de gelatina pura foi verificado halos amorfos na região próxima de 21° que também podem estar relacionados principalmente com a presença e interação da quitosana com a gelatina.

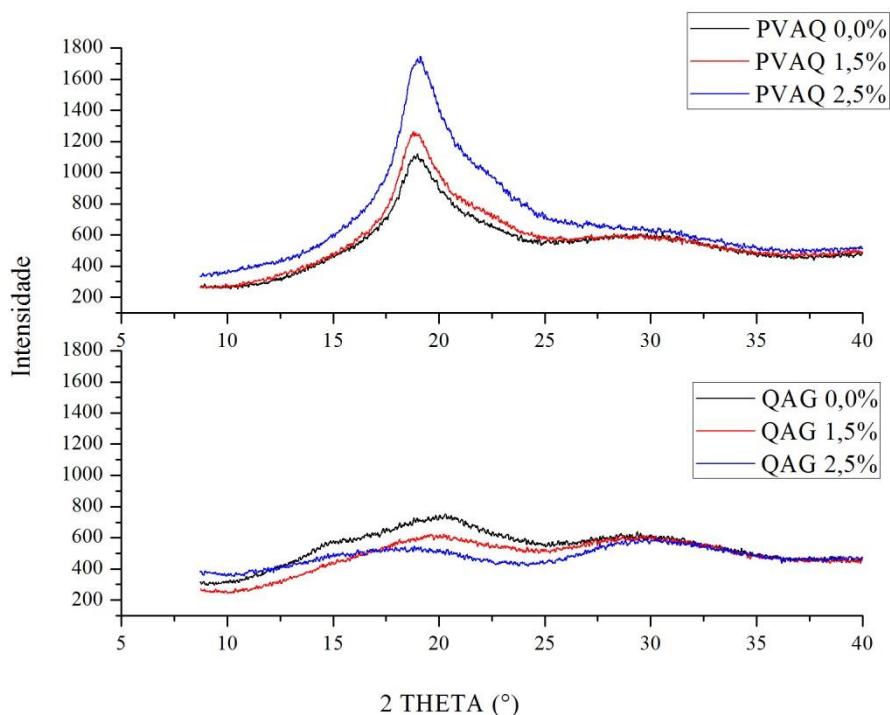


Figura 3: Difratoograma dos filmes de PVAQ e QAG incorporados com lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%.

Segundo Pereda *et al.* (2011), proteínas exibem padrões amorfos e temperaturas de secagem próximas a 30°C durante elaboração dos filmes podem estimular a formação de regiões cristalinas. Os padrões amorfos foram identificados em ambas as blendas e a temperatura da secagem na elaboração dos filmes podem ter influenciado apenas nos filmes de PVAQ, que formaram estruturas mais organizadas, devido a presença do polímero sintético álcool polivinílico, que possui arranjo ordenado.

Embora houvesse compatibilidade com os demais polímeros, as ligações intermoleculares de hidrogênio da quitosana podem ter influenciado no comportamento da manutenção de halos amorfos na faixa de 19° a 20° nos difratogramas das blendas de PVAQ e QAG, independente da concentração de lisozima incorporada (WU *et al.*, 2013).

3.9. Análises térmicas

3.9.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os resultados obtidos na análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os filmes de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima em diferentes

concentrações são apresentados nas Figuras 4 e 5 e na Tabela 5. A Figura 4 ilustra o comportamento das blendas de PVAQ e a Figura 5 apresenta a varredura da calorimetria dos filmes QAG nas concentrações de 0,0; 1,5 e 2,5% submetidas a rampa de aquecimento de 25 a 900°C, indicando a resposta do fluxo de calor e da perda de massa dos materiais.

Verifica-se que a presença da enzima não influenciou no processo de transição vítrea, na temperatura de fusão e as entalpias correspondentes para as blendas de PVAQ e QAG. No entanto, foi percebido que o grau de cristalização igual a 0,64% da blenda de PVAQ na concentração de 1,5% foi baixo quando comparado às demais blendas. Para o PVAQ 0,0% e PVAQ 2,5% o grau de cristalinidade ficou em torno de 12,20% e 7,39%, respectivamente.

Já para as blendas de QAG, foi observada a formação de picos amplos de característica amorfa, conforme os dados encontrados em análise de difração de raios X e confirmados pelos dados da Tabela 5 para o grau de cristalinidade, com valores para o QAG (0,0%) de 0,28%, QAG (1,5%) de 0,25% e QAG (2,5%) de 0,21%.

Possivelmente a blenda de PVAQ (1,5%) sofreu o processo de reticulação da quitosana com a lisozima pela ligação cruzada entre grupos hidrofóbicos de ambas as estruturas (Gonsalves *et al.*, 2011) e ligação de hidrogênio entre grupos hidroxila do álcool polivinílico e da enzima (Kanatt *et al.*, 2012) refletindo assim no baixo grau de cristalinidade da blenda de PVAQ com 1,5% da enzima.

Tabela 5: Temperaturas de transição vítrea, fusão e grau de cristalinidade das blendas de PVAQ e QAG incorporadas com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%

| Filmes | T _g (Temperatura de transição vítrea) | ΔH _{T_g} (Entalpia de transição vítrea) | T _m (Temperatura de Fusão) | ΔH _{T_m} (Entalpia de fusão) | X _c (%) (Grau de cristalização) |
|-----------|---|---|--|--|---|
| PVAQ 0,0% | 132,50±3,16 ^{Aa} | -52,96±68,89 ^{Aa} | 390,21±12,09 ^{Aa} | 56,56±41,63 ^{Aa} | 12,20 ^{Cc} |
| PVAQ 1,5% | 138,21±6,19 ^{Aa} | -25,31±51,02 ^{Aa} | 398,26±0,84 ^{Aa} | 4,10±45,43 ^{Aa} | 0,64 ^{Cd} |
| PVAQ 2,5% | 133,69±3,95 ^{Aa} | -22,24±57,62 ^{Aa} | 398,46±3,36 ^{Aa} | 56,01±67,69 ^{Aa} | 7,39 ^{Cc} |
| QAG 0,0% | 103,40±3,43 ^{Ba} | -52,23±58,79 ^{Ba} | 324,39±25,08 ^{Ba} | 49,96±22,64 ^{Ba} | 0,28 ^{Cc} |
| QAG 1,5% | 111,96±1,66 ^{Ba} | -44,28±56,55 ^{Ba} | 337,72±2,06 ^{Ba} | 44,17±22,37 ^{Ba} | 0,25 ^{Cc} |
| QAG 2,5% | 111,72±4,06 ^{Ba} | -48,15±5,34 ^{Ba} | 345,57±15,81 ^{Ba} | 37,42±0,39 ^{Ba} | 0,21 ^{Cc} |

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, maiúscula para coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey (P<0,05).

Foi observado para os filmes de PVAQ e QAG que a presença da lisozima aumentou o fluxo de calor durante o processo de transição vítrea. As blendas de QAG

1,5 e 2,5% alcançaram temperaturas de transição vítrea mais altas do que as blendas com 0,0% de lisozima e os filmes de PVAQ alcançaram a transição vítrea em torno de 133°C, chegando próximo a 138°C ao acrescentar a enzima. Segundo Mohammad *et al.* (2015) a lisozima aumenta a estabilidade térmica dos filmes, alcançando cerca de 134°C com apenas 8,5% de desnaturação sem provocar grandes alterações em sua estrutura. Su *et al.* (2010) e Al-Hassan e Norziah (2012) acreditam que a uniformidade da faixa temperatura de T_g de blendas pode ser um indicativo de compatibilidade entre os polímeros e Bonilla *et al.* (2014) consideram que o efeito da mistura de polímeros em blenda leva a valores de T_g intermediários com relação aos polímeros puros devido a formação de ligações intermoleculares entre estes.

Ao observar a temperatura de fusão dos filmes de PVAQ, percebe-se a formação de picos estirados endotérmicos de característica cristalina em cerca de 390°C para a blenda de PVAQ 0,0% e em aproximadamente 398°C para as blendas de PVAQ 1,5% e PVAQ 2,5% picos mais intensos, indicando que a presença da lisozima reforça a estabilidade térmica da blenda em meio à transição de fase. De acordo Bannach *et al.* (2011) um alto grau de cristalinidade origina picos de maior intensidade devido aos rearranjos estruturais indicando que, assim como ilustrado na análise de DRX, as blendas estabeleceram boa compatibilidade e a adição da enzima favoreceu a cristalinidade dos filmes. Foram observados picos exotérmicos amplos, indicando que a cristalização do polímero ocorreu de forma prolongada entre as temperaturas de 669.33 a 899,61°C.

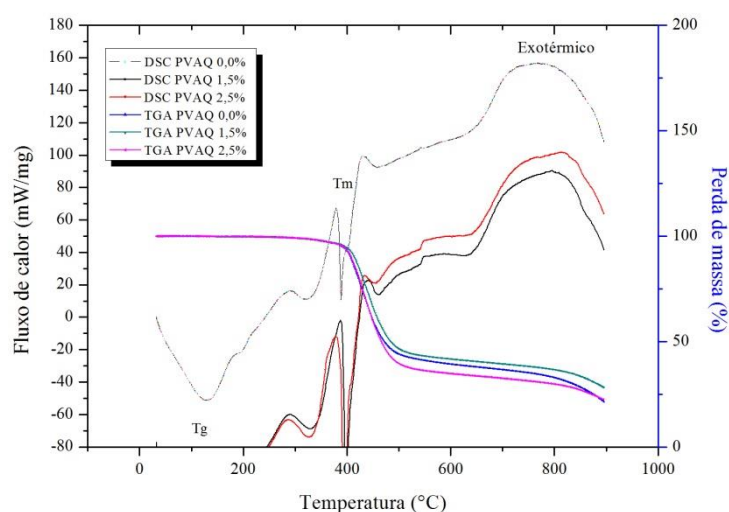


Figura 4: Calorimetria diferencial de varredura para os filmes de PVAQ incorporados com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%.

Estudos apontam o ponto de fusão do pó cristalino da lisozima em torno de $T_m=187^\circ\text{C}$ e entalpia a $\Delta H^\circ= 125,3\text{kJ/mol}$ (Mohammad *et al.*, 2015), no entanto apesar da enzima apresentar relativa resistência térmica, o presente trabalho constatou o aumento da resistência térmica nos filmes com e sem a presença da enzima, cujos comportamentos demonstraram desnaturação tardia devido a interação entre os compostos das blendas (Silva *et al.*, 2018).

Comparado as blendas de PVAQ, os filmes de QAG apresentaram valores menores para a temperatura de fusão, entre $324,39$ e $345,57^\circ\text{C}$. Ainda que a quitosana seja considerada um polímero de boa estabilidade térmica (Gonsalves *et al.*, 2011) e componha 50% da blenda, Oliveira *et al.* (2013) relata que durante o processo de elaboração do filme, inserir um componente de característica amorfa em solução filmogênica pode gerar um enfraquecimento das ligações entre os compostos presentes ocasionando a redução da temperatura de fusão. O amido (Dernadin e Silva, 2008), e compostos de caráter protéico como a gelatina e a lisozima tendem a formar estruturas amorfas (Pereda *et al.*, 2011).

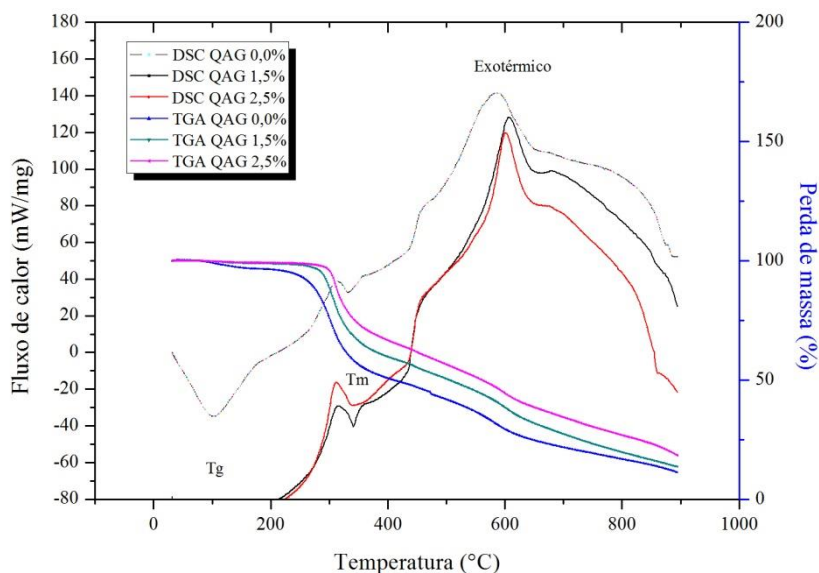


Figura 5: Calorimetria diferencial de varredura para os filmes de QAG incorporados com a lisozima nas concentrações de 0,0%; 1,5% e 2,5%.

Bannach *et al.* (2011) relatam que picos exotérmicos nas curvas de DSC em materiais poliméricos podem estar relacionados a cristalização, que ocorre devido ao rápido resfriamento, que será refletido no grau de cristalinidade, e Mali *et al.* (2011) acreditam que o rearranjo molecular durante o processo de recristalização influencia na

rigidez do material devido as interações intermoleculares, principalmente, para as blendas de QAG, onde a 50% dos polímeros utilizados tem caráter polar com tendência a estabelecer ligações de hidrogênio entre os polímeros e a enzima, refletindo baixo grau de cristalinidade entre 0,21 e 0,28 e assim, indicando a formação de estado amorfo á medida aumenta a concentração da lisozima.

Ao avaliar os picos exotérmicos das blendas de QAG, picos intensos em altas temperaturas podem indicar a presença de substância reticulada, pois as formações de ligações cruzadas aumentam a possibilidade de ocorrer a transição vítrea numa temperatura maior (Su *et al.*, 2010).

3.9.2. Termogravimetria (TGA)

Os filmes de PVAQ nas concentrações de 0,0; 1,5 e 2,5% apresentaram estabilidade térmica até a temperatura de 399,09°C marcada pelo pico do ponto de fusão destes materiais. Ao final do processo de fusão, foi iniciada a perda de massa significativa em torno de 38,79% para a blenda de PVAQ 0,0%; 34,40% para PVAQ 1,5% e 41,42% para os filmes de PVAQ 2,5%. Por conseguinte, o estágio final resultou na decomposição das blendas de 0,0 e 2,5% com 41,10% de massa residual e a blenda contendo 1,5% alcançou o final da rampa de aquecimento com 46,36% de massa.

Para os filmes de QAG, a primeira fase da perda de massa situou-se em torno de 11,36% a 234,23°C para a blenda de QAG 0,0%; em 8,83% a 282,52°C para a blenda de QAG 1,5% e 7,99% a 299,65 para a blenda de QAG 2,5%. A primeira fase da perda de massa finalizou no tempo próximo à temperatura de fusão de cada blenda, e o estágio posterior finalizou em curva constante, marcado por reações e originando picos exotérmicos de energia até enfim os filmes de QAG 0,0%; 1,5% e 2,5% apresentarem percentual residual de massa em 15,62%, 15,62% e 20,60%, respectivamente. Este fato sugere que o aumento da concentração da enzima favoreceu a estabilidade térmica da blenda.

Mohammad *et al.* (2015) consideram a lisozima uma enzima termoestável suportando temperaturas de aproximadamente 134°C com mínima desnaturação, sem provocar alterações de seu estado físico. A interação com os demais componentes da blenda pode ter favorecido a resistência térmica quando comparada com a blenda de QAG 0,0% pois os autores relatam que esse fenômeno pode ocorrer pela resistência à

desnaturação em que a estrutura da enzima que supera forças intramoleculares na tentativa de preservar ao máximo o estado nativo ao ser submetido a altas temperaturas.

Para a quitosana, polímero em comum utilizado na elaboração dos filmes de PVAQ e QAG, a perda de massa de aproximadamente 10% na primeira fase de decomposição térmica é proveniente da presença de água adsorvida e ácido acético residual, onde a vaporização da umidade costuma ocorrer entre as temperaturas de 100 a 170°C, seguindo a segunda etapa da degradação (perda de aproximadamente 50 a 55% do peso) de grupos de hidrocarbonetos (CH) e os demais grupos funcionais gerados pela degradação dos polímeros se intensifica até a formação do resíduo final (Bonilla *et al.*, 2014).

Al-Hassan e Norziah (2012) relatam que blendas contendo amido e gelatina exercem comportamento de filmes de caráter hidrofílico e por este motivo mostram compatibilidade na transição vítrea, no entanto a presença da quitosana em maior quantidade exibiu curvas de decomposição térmica característica deste composto. Bonilla *et al.* (2014) apontam que a degradação térmica da quitosana inicia-se a partir de 200 a 300°C com um ou mais polímeros e a degradação térmica do álcool polivinílico inicia em torno de 380 a 500°C com percentual final de aproximadamente 15 a 38% de resíduos de acordo a quantidade de quitosana presente na blenda, constatados para as blendas de QAG e PVAQ do presente estudo.

As blendas de PVAQ e de QAG do presente trabalho apresentaram indicativo de resistência térmica e tal comportamento foi favorecido pela adição da enzima, condizendo aos valores encontrados na literatura.

4. CONCLUSÃO

Foi possível preparar os filmes em blendas incorporados com a lisozima, bem como caracterizá-los. A enzima não influenciou na maioria das propriedades químicas, físicas, mecânicas e ópticas estudadas.

A adição da enzima gerou efeito antimicrobiano nos filmes de PVAQ e QAG e não foi constatado o efeito da lisozima sobre as propriedades físicas, mecânicas e transparência dos filmes, mas sim a composição de cada polímero utilizado na elaboração dos filmes. Observou-se que tanto a quitosana quanto a enzima influenciaram na coloração dos filmes.

Ao analisar o comportamento de cada filme, a lisozima favoreceu a barreira a luz ultravioleta, reforçou propriedades térmicas, no entanto reduziu o grau de cristalinidade de blendas de PVAQ (1,5%). A difração de raios X exibiu comportamentos opostos para as blendas de PVAQ e QAG quanto à presença da enzima, indicando que o álcool polivinílico possui maior grau de organização cristalina. A quitosana influenciou na coloração amarela para ambos os filmes.

Os filmes de PVAQ e QAG incorporados com a lisozima apresentaram características adequadas para que possam ser utilizados no desenvolvimento de embalagens e outros materiais para a indústria de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111, 343-350.

Albers, A. P. F., Melchiades, F. G., Machado, R.; Baldo, J. B.; Boschi, A. O. (2002). A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction. *Cerâmica*, 48, 34-37.

Al-Hassan, A. A., Norziah, M. H. (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food hydrocolloids*, 26, 108-117.

Balakrishnan, P., Gopi, S., M.S., S., Thomas, S. (2018). UV resistant transparent bionanocomposite films based on potato starch/cellulose for sustainable packaging. *Starch-Stärke*, 70, 1-2.

Bannach, G., Perpétuo, G. L., Cavalheiro, É. T. G., Cavalheiro, C. C. S., Rocha, R. R. (2011). Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero PET: um experimento para ensino de análise térmica. *Química Nova*, 34, 1825-1829.

Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L., Rollini, M. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26, 387-392.

Bhatia, S., Bharti, A. (2015) Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *Journal of food science and technology*, 52, 3504-3512.

Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463-470.

- Bonilla, J., Bittante, A. Q. B., Sobral, P. J. A. (2017). Thermal analysis of gelatin–chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130, 1221-1227.
- Bonomo, R. C. F., Santos, T. A., Santos, L. S., Fontan, R. C. I., Rodrigues, L. B., Pires, A. C. S.; Veloso, C. M., Gandolfi, O. R. R., Bonomo, P. (2018). Effect of the Incorporation of Lysozyme on the Properties of Jackfruit Starch Films. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 508-517.
- Cazón, P., Vázquez, M., Velazquez, G. (2018). Composite films of regenerate cellulose with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of water adsorption, mechanical and optical properties. *International journal of biological macromolecules*, 117, 235-246.
- Claro, P. I. C., Neto, A. R. S., Bibbo, A. C. C., Mattoso, L. H. C., Bastos, M. S. R., Marconcini, J. M. (2016). Biodegradable blends with potential use in packaging: a comparison of PLA/chitosan and PLA/cellulose acetate films. *Journal of Polymers and the Environment*, 24, 363-371.
- Corradini, E., Teixeira, E. M., Agnelli, J. A. M., Mattoso, L. H. C. (2007). Amido Termoplástico. *Embrapa Instrumentação Agropecuária*, 30, 1-27.
- Corradini, C., Alfieri, I., Cavazza, A., Lantano, C., Lorenzi, A., Zucchetto, N., Montenero, A. (2013) Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol–gel technique. *Journal of Food Engineering*, 119, 580-587.
- Da Silva, P. L., Gomes, A. M. M., Ricardo, N. M. P. S., Machado, T. F. (2016). Elaboração e caracterização de blendas de amido fosforilado com quitosana e pva. *Química Nova*, 39, 450-455.
- De Souza Medeiros, B. G., Lucena, V. S., Confessor, M. V. A., Peixoto, M. S. R. M., Oliveira, S. S. S., Ramos, S. R. (2017). Análise molecular da atividade antimicrobiana da lisozima. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 13, 50-55.
- De Souza, P. M., Fernández, A., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 24, 300-306.
- Denardin, C. C., Silva, L. P. (2008). Starch granules structure and its regards with physicochemical properties. *Ciência rural*, 39, 945-954.
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., Gómez-Gillèn, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23, 2094-2101.
- Dinca, V., Zaharie-Butucel, D., Stanica, L., Brajnicov, S., Marascu, V., Bonciu, A., Cristoceca, A., Gaman, L., Gheorghiu, M., Astilean, S., Vasilescu, A. (2018). Functional *Micrococcus lysodeikticus* layers deposited by laser technique for the optical sensing of lysozyme. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 98-107.

- Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harispe, R., Márquez, R. (2009). Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. *Innotec*, 4, 33-36.
- Galindo, M. V., Paglione, I. S., Balan, G. C., Sakanaka, L. S., Shirai, M. A. (2019). Atividade antimicrobiana e antioxidante de filmes comestíveis de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 26, 019008-019008.
- Giannakas, A., Vlachas, M., Salmas, C., Leontiou, A., Katapodis, P., Stamatis, H., Barkoula, N-M., Ladavos, A. (2016). Preparation, characterization, mechanical, barrier and antimicrobial properties of chitosan/PVOH/clay nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 140, 408-415.
- Gonsalves, A. A., Araújo, C. R. M., Soares, N. A., Goulart, M. O. F., De Abreu, F. C. (2011). Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, 34, 1215-1223.
- Hamarat Sanlier, S., Yasa, M., Cihnioglu, A., Abdulhayoglu, M., Yilmaz, H., AK, G. (2016). Development of gemcitabine-adsorbed magnetic gelatin nanoparticles for targeted drug delivery in lung cancer. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44, 943-949.
- Hanušová, K., Vápenka, L., Dobiáš, J., Mišková, L. (2013). Development of antimicrobial packaging materials with immobilized glucose oxidase and lysozyme. *Open Chemistry*, 11, 1066-1078.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., Ghavi, F. F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food chemistry*, 136, 1490-1495.
- Huang, D., Mu, B., Wang, A. (2012). Preparation and properties of chitosan/poly (vinyl alcohol) nanocomposite films reinforced with rod-like sepiolite. *Materials Letters*, 86, 69-72.
- Jiang, S., Qin, Y., Yang, J., Li, M., Xiong, L., Sun, Q. (2017). Enhanced antibacterial activity of lysozyme immobilized on chitin nanowhiskers. *Food chemistry*, 221, 1507-1513.
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., Sharma, A. (2012). Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29, 290-297.
- Liburdi, K., Benucci, I., Palumbo, F., Esti, M. (2016). Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. *Food Control*, 63, 46-52.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F. (2011). Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 137-155.

- Medeiros, F. A., Wiebeck, H. (2013). PVC Orientado: avaliação de processo de orientação e das propriedades mecânicas em função da razão de estiramento. *Polímeros*, 23, 636-643.
- Mohammad, M. A., Grimsey, I. M., Forbes, R. T. (2015). Mapping the solid-state properties of crystalline lysozyme during pharmaceutical unit-operations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 114, 176-183.
- Oliveira, R. V.B., Ferreira, C. I., Peixoto, L. J. F., Bianchi, O., Silva, P. A., Demori, R., Silva, R. P., Veronese, V. B. (2013). Mistura polipropileno/poliestireno: um exemplo da relação processamento-estrutura-propriedade no ensino de polímeros. *Polímeros*, 23, 91-96.
- Park, S.I., Daeschel, M. A., Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69, M215-M221.
- Pavoni, J. M. F., Luchese, C. L., Pollo, L. D., Tessaro, I. C. (2019). Avaliação da influência da utilização do ácido láctico na produção de filmes de quitosana/Evaluation the influence of the use of lactic acid in the production of chitosan film. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 2, 813-821.
- Pelissari, F. M., Yamashita, F., Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., Grossmann, M. V. E. (2012). Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films. *Journal of Food Engineering*, 108, 262-267.
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., Martucci, J. F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25, 1372-1381.
- Pérez-Córdoba, L. J., Norton, I. T., Batchelor, H. K., Gkatzionis, K., Spyropoulos, F., Sobral, P. J. A. (2018). Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food hydrocolloids*, 79, 544-559.
- Quesada, J., Sendra, E., Navarro, C., Sayas-Barberá, E. (2016). Antimicrobial active packaging including chitosan films with *Thymus vulgaris* L. essential oil for ready-to-eat meat. *Foods*, 5, 57-70.
- Rawdkuen, S., Suthiluk, P., Kamhangwong, D., Benjakul, S. (2012) Mechanical, physico-chemical, and antimicrobial properties of gelatin-based film incorporated with catechin-lysozyme. *Chemistry Central Journal*, 6, 131-141.
- Rodríguez-Núñez, J. R., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I., Ramírez-Wong, B., Torres-Chavez, P., Cortez-Rocha, M. O. (2012). Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *International journal of food science & technology*, 47, 2127-2133.
- Russell, B. A., Jachimska, B., Komorek, P., Mulheran, P. A., Chen, Y. (2017). Lysozyme encapsulated gold nanoclusters: effects of cluster synthesis on natural protein characteristics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19, 7228-7235.

Silva, N. HCS., Vilela, C., Almeida, A., Marrucho, I. M., Freire, C. S. R. (2018). Pullulan-based nanocomposite films for functional food packaging: Exploiting lysozyme nanofibers as antibacterial and antioxidant reinforcing additives. *Food hydrocolloids*, 77, 921-930.

Soliman, E. A., Furuta, M. (2014). Influence of phase behavior and miscibility on mechanical, thermal and micro-structure of soluble starch-gelatin thermoplastic biodegradable blend films. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1040-1055.

Sueiro, A. C., Tischer, P. C. S. F., Lonni, A. A. S. G., Mali, S. (2016). Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. *Química Nova*, XY, 1-6.

Su, J-F., Huang, Z., Yan-Yuan, X., Wang, X-Y. L., Min. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate polymers*, 79, 145-153.

Synowiec, A., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Przybył, J. L., Bączek, K., Węglarz, Z. (2014). Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. *Innovative food science&emergingtechnologies*, 23, 171-181.

Vinhas, G. M., Almeida, Y. M. B., Coelho, N. S. (2013). A biodegradabilidade da blenda de poli (β -hidroxibutirato-co-valerato)/amido anfótero na presença de microrganismos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18, 270-276.

Zanela, J., Reis, M. O., Dias, A. P., Mali, S., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F. (2015). Laminados biodegradáveis de blendas de amido de mandioca e poli (vinil álcool): efeito da formulação sobre a cor e opacidade. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 25, 326-329.

Wu, J., Zhong, F., Li, Y., Shoemaker, C. F., Xia, W. (2013). Preparation and characterization of pullulan–chitosan and pullulan–carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids*, 30, 82-91.

IV – CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento de embalagens ativas é uma área promissora para a realização de pesquisas inovadoras no âmbito de embalagens.

O estudo de blendas poliméricas mostrou-se um campo inovador, especialmente pela opção da utilização de materiais biodegradáveis, que não agridem o meio ambiente. Por meio de técnicas simples com polímeros naturais ou sintéticos biodegradáveis aliados com compostos que estão presentes em alimentos são capazes de formar materiais de excelente qualidade, com atributos iguais ou superiores às embalagens convencionais.

A incorporação da lisozima como agente antimicrobiano mostra-se como uma alternativa promissora na inibição microbiológica e para o emprego de novas tecnologias na área de embalagens, capaz de atender a demandas da indústria de alimentos e do consumidor, promovendo a segurança do alimento e favorecendo a manutenção da qualidade do produto.

Como vantagens no desenvolvimento deste trabalho pode-se ressaltar o baixo custo das bases poliméricas utilizadas, a disponibilidade de reagentes nos laboratórios, espaço para realizar as análises e o aprofundamento no estudo de embalagens, setor amplamente utilizado em inúmeras áreas, além da indústria de alimentos.

Recomenda-se a realização de combinações de bases poliméricas para alcançar as propriedades ideais que requerem as embalagens para que estas possam sair do conceito teórico e façam parte do cotidiano da população. As pessoas têm despertado cada vez mais o interesse em ter hábitos sustentáveis e este comportamento também pode estar relacionado com o tipo de embalagens que utilizam.

Outros agentes podem ser estudados para verificar o benefício a ser fornecido no segmento de embalagens ativas.

Como proposta de estudos futuros a este tipo de pesquisa, sugere-se aliar as embalagens ativas com o estudo da toxicidade da embalagem, o emprego destes materiais para a elaboração de embalagens inteligentes e a tentativa de extensão ao mercado consumidor para que cada vez mais a funcionalidade deste tipo de embalagem possa passar uma mensagem mais assertiva ao público, cedendo o poder da informação a respeito do conteúdo que estão adquirindo de forma consciente em prol da qualidade de vida.