

Efeito da Migração de Composto Antimicrobiano nas Propriedades Finais de Selagem de Filme Poliolefínico

Márcia Pires, Cesar Liberato Petzhold, Ramon Vieira Santos
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Leandro Perão, Ana Paula Chies
Centro de Inovação e Tecnologia, Braskem S.A., Triunfo, RS, Brasil

Resumo: Filmes base PELBD + PEBD contendo 5% de sorbato de potássio (SK) foram preparados por extrusão plana. Os filmes com e sem SK foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e fluorescência de Raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF). O perfil de migração do SK foi acompanhado por FTIR/ATR e UV-Vis e sua influência na curva de selagem (hot tack) dos filmes foi determinada. A adição de SK não causou alteração nas propriedades térmicas do polietileno na concentração estudada, porém a migração do SK para a superfície do filme interferiu na curva de selabilidade, atuando como uma impureza, causando diminuição da força de selagem em faixa de temperaturas mais baixas.

Palavras-chave: Embalagens ativas, antimicrobiano, migração, filme, polietileno.

Effect of Antimicrobial Compound Migration on Final Properties of Polyethylene Based Film

Abstract: Films produced with blends of linear low density polyethylene and low density polyethylene (LLDPE + LDPE) containing 5 wt % of potassium sorbate (KS) were prepared by flat film extrusion. These films were characterized by differential scanning calorimetry and wavelength dispersive X-ray fluorescence. The migration profile of KS was followed by Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared and Ultraviolet spectroscopies and its effect on the sealing curve was determined. The addition of 5% of KS showed no effect in the thermal properties of polyethylene. However, the sealing properties were slightly affected by KS migration, acting as an impurity in the sealed area, which needed a higher sealing force at lower temperatures.

Keywords: Active packaging, antimicrobial, migration, film, polyethylene.

Introdução

Embalagens ativas são aquelas que alteram suas condições internas a fim de aumentar a segurança, melhorar propriedades sensoriais, com o objetivo de aumentar o tempo de vida útil do produto embalado^[1]. Existem diversos tipos de embalagens ativas e cada uma das tecnologias é utilizada em função da aplicação e necessidade do produto a ser embalado. Um dos tipos mais estudados são as embalagens antimicrobianas^[2].

Embalagem antimicrobiana é uma possibilidade para empacotamento de vários produtos, como carnes, massas, queijos, etc. Principalmente, porque a contaminação destes produtos inicia-se na superfície, devido ao manuseio após corte e processamento^[3]. Uma das técnicas que pode ser aplicada é a aspersão de um agente antimicrobiano diretamente na superfície do alimento, porém, dependendo do tipo de alimento, este é um benefício limitado devido à possibilidade de neutralização da substância ativa pela sua difusão, da superfície para o interior da massa do produto.

Desta forma, a utilização de embalagens contendo agentes antimicrobianos em sua formulação, pode ser bem mais eficiente devido à lenta migração do composto ativo do material da embalagem para a superfície do

produto, comparada à tecnologia de aspersão. Se a embalagem antimicrobiana apresentar a característica de liberação do composto por um longo período de tempo, poderá ser utilizada desde o transporte até o armazenamento, garantindo sua ação por todo o tempo em que o produto está embalado.

Vários agentes antimicrobianos podem ser incorporados para criar novos sistemas de embalagem^[1]. Alguns métodos de incorporação do agente antimicrobiano envolvem: incorporação do composto ativo no material da embalagem, em sachês e uso de revestimentos que atuam como antimicrobiano e/ou contêm um agente antimicrobiano^[4].

As embalagens antimicrobianas podem ser produzidas através de dois conceitos diferentes: com ou sem migração do agente antimicrobiano^[5]. Os agentes antimicrobianos que podem ser incorporados na embalagem são, geralmente, classificados em dois grupos: agentes sintéticos e naturais (estes últimos incluem: óleos essenciais, enzimas, entre outros)^[6].

Na última década diversos estudos têm sido publicados, e alguns destes dados foram apresentados por Bonilla & Fernandez^[2], mostrando o efeito

antimicrobiano de polímeros, com diferentes grupos químicos, tais como nitrogênio quaternário e polímeros halogenados. Estudo recente com poli(adipato de butileno) funcionalizado com grupos fosfônio quaternário mostrou a atividade antimicrobiana deste polímero, reportando a vantagem de não necessitar de liberação de nenhum composto para o produto embalado para garantir o desempenho da embalagem^[7].

Estudos da literatura também mostram diversos desenvolvimentos baseados no uso de biopolímeros, como quitosana, na produção de filmes antimicrobianos^[8].

Dentre os diversos compostos com atividade antimicrobiana, existem aqueles ativos para uma determinada faixa de microorganismos, podendo ser específicos para cada tipo de alimento. A escolha do antimicrobiano a ser utilizado envolve tanto a atividade antimicrobiana em si quanto a possibilidade de entrar em contato com alimento. Em sistemas onde ocorre migração do composto ativo para o alimento, devem ser considerados apenas àqueles compostos aprovados como aditivos de alimentos^[9]. Exemplos de aditivos para alimentos são alguns ácidos orgânicos e seus derivados.

Vários estudos têm sido realizados mostrando o uso de sorbatos e outros sais orgânicos no controle do crescimento microbiano em alimentos. Estes estudos mostram a aplicação destes compostos diretamente no alimento ou adicionados à embalagem^[10-12]. Estudo anterior^[10], utilizando filme base polietileno de baixa densidade (PEBD) contendo 5% de sorbato de potássio (SK), apresentou atividade antimicrobiana potencial contra fungos. A adição de compostos antimicrobianos que atuam por migração necessita de uma avaliação sobre seu efeito nas demais propriedades do filme a fim de garantir o desempenho desejado na aplicação final. Vários trabalhos^[13-15] têm sido realizados mostrando o perfil de migração dos compostos antimicrobianos após produção dos filmes, porém, o efeito desta migração nas propriedades do filme ainda não foi explicado. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a caracterização de filme base polietileno linear de baixa densidade (PELBD + PEBD) contendo sorbato de potássio (SK) como agente antimicrobiano e sua avaliação quanto à migração do SK assim como seu efeito na facilidade de selagem do filme.

Experimental

Material

Poliétileno linear de baixa densidade - PELBD (0,918 g/cm³), contendo buteno como comonomero, índice de fluidez de aproximadamente 2,4 g/10min (medido a 190 °C/2,16 kg) e polietileno de baixa densidade (PEBD), fornecidos pela Braskem S.A. Sorbato de potássio p.a. (SK) (Merck) foi utilizado como composto antimicrobiano (AM).

Foram utilizados os seguintes aditivos: tris(2,4-di-tert-butilfenil)fosfito (grau de pureza de 99%), como antioxidante, estearato de cálcio (grau de pureza 99%) como antiácido para neutralizar resíduo catalítico e fluoropolímero (60% poli(1,4-butadienol/2-

oxeapanona + 40% poli (fluoreto de vinilideno) (grau de pureza 90%) como auxiliar de fluxo.

Preparação das misturas

Esferas de PELBD foram aditivadas com 2700ppm de antioxidante, 800ppm de antiácido, 100ppm de auxiliar de fluxo e 5,5% de SK. Uma amostra sem o antimicrobiano foi preparada como controle.

A granulação das misturas foi realizada em extrusora dupla-rosca, marca Coperion, modelo ZSK18 K38 utilizando-se sistema de degasagem a vácuo, matriz de dois furos e com resfriamento em água. O perfil de temperatura utilizado foi de 160/170/180/185/190/195/200 °C, 350 rpm com 3 Kg/h de produtividade. As amostras foram secas em secador Arburg por 2 horas a 90 °C, pois apresentaram umidade residual após a granulação a qual foi visualmente detectada.

Produção dos filmes

Filmes planos foram produzidos em equipamento semi-industrial de extrusão de filme tubular marca Leonard modelo 6405.2, adicionando 10% de PEBD. Os filmes foram processados com perfil de temperatura de 220/230/240/250/260/270/270 °C, rotação de rosca de 42rpm, pressão de massa de 64bar e temperatura do rolo de resfriamento de 15 °C.

Caracterização das amostras

Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do SK foram obtidos em equipamento Thermo Nicolet, modelo Nexus 470. A amostra de SK foi analisada em pastilha de KBr, utilizando-se uma proporção de 3:1 (KBr:SK). Os espectros foram coletados no modo transmitância, na região de 400 a 5000 cm⁻¹ com 64 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹. As bandas entre 1650 a 1550 cm⁻¹, região característica de deformação axial de dienos conjugados e de estiramento simétrico e assimétrico do ânion carboxilato, foram utilizadas para caracterizar a presença do sorbato de potássio, visto que estas bandas não são características do polietileno^[16,17].

A migração do SK foi acompanhada pelo aumento na intensidade das bandas características do sorbato por análise de FTIR na superfície dos filmes no equipamento Thermo Nicolet, modelo Nexus 470 utilizando acessório de ATR (*attenuated transmittance reflectance*), com cristal de germânio. As bandas na região entre 1610-1520 cm⁻¹ e 1484-1420 cm⁻¹ foram utilizadas para calcular a relação de áreas entre SK e polietileno, respectivamente.

Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF)

Após granulação do PELBD com e sem AM, o teor de SK incorporado foi analisado por WDXRF em equipamento Bruker modelo S4, SW-XRF, utilizando método de varredura de elementos com uso de vácuo. As amostras foram analisadas em forma de disco de 6 mm prensado a 180 °C em prensa hidráulica. A quantidade de SK foi determinada através da quantificação do elemento

potássio e cálculo estequiométrico considerando a fórmula química deste composto ($C_6H_7KO_2$).

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As temperaturas de fusão e cristalização dos filmes foram determinadas em equipamento DSC TA Instruments, modelo: Q2000. A primeira fusão da amostra foi determinada com aquecimento até 200 °C, utilizando-se uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A temperatura de cristalização (T_c) da amostra foi determinada após resfriamento a -20 °C, na mesma taxa. A segunda fusão (T_m2) foi determinada com novo aquecimento da amostra de -20 °C a 200 °C, utilizando-se uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Toda a análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

Análise de espectrofotometria no UV-Vis

A migração do AM foi avaliada pela técnica de absorção da energia ultravioleta utilizando equipamento UV-Vis em espectrofotômetro Varian Cary 100 UV-Vis na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. As leituras foram realizadas utilizando uma cubeta de vidro de 1 cm (caminho ótico) e a absorção no comprimento de onda de 255nm foi determinada.

A quantificação do SK migrado para a superfície do filme foi realizada através de uma curva de calibração preparada a partir de soluções de SK em água, com diferentes concentrações. A absorvância de cada solução foi medida e um gráfico da absorvância 255 nm \times concentração SK em água foi construído. Dessa forma a migração medida em cada leitura foi utilizada para cálculo da migração total acumulada.

Amostras de filmes, com e sem SK, foram imersas em 50 mL de água, através de fixação em suporte, na temperatura ambiente e analisadas periodicamente. Os corpos de prova, com diâmetro de 5 cm, foram coletados a partir da parte mais central da bobina com relação às bordas do filme tubular produzido. Este procedimento foi realizado a fim de garantir menor variação de espessura.

Propriedades de selabilidade dos filmes (Hot tack)

As propriedades de tração na solda a quente (*Hot tack*) foram determinadas em equipamento de avaliação de selabilidade de filmes marca J&B, modelo 4000, segundo norma ASTM D 1921. O *Hot tack* pode ser definido como a medida da resistência da solda após a selagem do corpo de prova, obtendo-se o pico de força 0,2s após a abertura das barras de solda. As condições utilizadas para o ensaio foram 5s de tempo de contato do corpo de prova com as barras de solda, 44 Psi de pressão e 200 mm/s de velocidade de tração. A temperatura de teste foi inicialmente de 95 °C, variando-se 5 °C até obtenção da solda das amostras. O teste foi repetido duas vezes na temperatura de solda obtida e mais duas leituras, em temperaturas de 5 °C e 10 °C acima desta temperatura, foram realizadas. Os resultados foram expressos em um gráfico de temperatura de solda *versus* força de selagem.

Resultados e Discussão

Inicialmente foram preparadas as misturas de polímeros através de processo de granulação em extrusora dupla rosca conforme descrito na parte experimental. A Tabela 1 mostra a composição inicial e final das amostras estudadas. O resultado de WDXRF do grão mostra uma perda de 5,5% do SK durante a granulação das amostras, indicando que durante o processamento ocorreu perda do composto antimicrobiano. Portanto, dependendo da atividade antimicrobiana necessária, a quantidade de composto antimicrobiano adicionado ao polietileno deve ser redimensionada a fim de manter o desempenho desejado.

Outro fator importante para embalagens ativas é a difusão do agente antimicrobiano do filme para o alimento. A análise de FTIR e FTIR/ATR foi empregada para acompanhar a migração do SK para a superfície do filme após extrusão, já que é possível identificar separadamente as bandas de absorção características do polietileno e do SK. Esta avaliação é necessária visto que uma das etapas do funcionamento do SK como composto antimicrobiano é sua migração para a superfície do filme^[10,18,19].

O espectro de FTIR da amostra contendo SK (Figura 1) mostra a presença das bandas, na região de 1600-1500 cm^{-1} , inexistentes no polietileno, as quais são características do estiramento do íon carboxilato presente no SK. Neste espectro também é possível identificar as bandas referentes à deformação axial de dienos conjugados e estiramento simétrico e assimétrico do íon carboxilato do SK a 1621 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , respectivamente. A partir dessa caracterização, foi possível acompanhar a migração do SK para a superfície do filme através da técnica de FTIR/ATR em diferentes tempos após o processamento dos filmes^[19].

Os tempos avaliados foram 0, 6, 7, 11, 18, 20 e 24 dias (Figura 2). A variação da relação entre as bandas

Tabela 1. Composição e identificação das amostras estudadas e resultados obtidos na análise de WDXRF.

| Identificação das amostras | Composição | WDXRF |
|----------------------------|--|-----------------------|
| Grão PELBD controle | Grão de PELBD sem sorbato de potássio (SK) | 0ppm K |
| Grão PELBD + SK | Grão de PELBD + 5,5% m/m* (SK) | 13560ppm K 5,2% SK |

*quantidade adicionada.

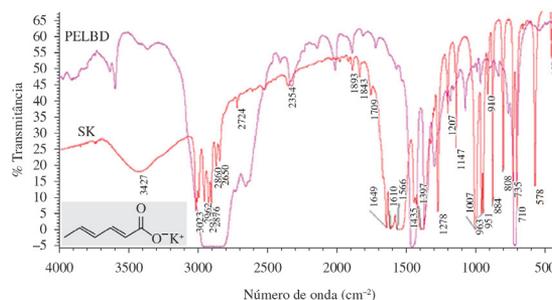


Figura 1. Sobreposição de espectros de FTIR modo transmitância do sorbato de potássio e polietileno.

de absorção características do SK e do polietileno mostra um perfil de migração do SK para a superfície do filme dependente do tempo, onde esta migração atinge um máximo após 15 dias da extrusão do filme (Figura 3). A mesma avaliação foi feita no filme sem SK (controle) onde nenhuma alteração foi observada. Estes resultados estão de acordo com estudos da literatura que mostram a migração do SK em biopolímeros^[10,18,20,21]. No filme estudado neste trabalho foi observada uma queda na migração do SK após 15 dias da extrusão do filme. Este efeito pode ser devido à perda deste composto pelo manuseio do filme. Devido a isto houve a necessidade de utilização de uma segunda técnica para obtenção do perfil completo da migração do composto antimicrobiano, neste caso a espectroscopia no Uv-Vis.

A Figura 4 apresenta o perfil de migração de sorbato de potássio para uma solução aquosa que permaneceu em contato com o filme durante 30 dias. Através da análise de UV-Vis foi possível observar, assim como em outros trabalhos da literatura^[14,21], que o sorbato de potássio migra para a superfície do filme, atingindo um nível máximo após 15 dias, na curva acumulada, confirmando o resultado do FTIR/ATR. O mesmo efeito não foi observado nos grãos onde não ocorreu migração do SK. Este resultado pode ser atribuído à maior área superficial do filme em relação ao grão, sendo estimado que a área superficial total durante a avaliação do filme é o dobro da área superficial total dos grãos. Desta forma, espera-se que não ocorra migração do composto antimicrobiano antes da produção dos filmes, consequentemente minimizando as chances de perda deste composto antes da produção da embalagem.

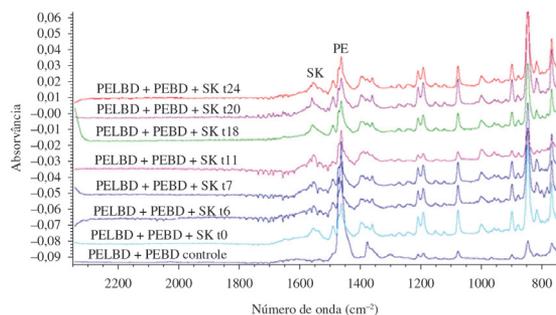


Figura 2. Sobreposição dos espectros de FTIR/ATR do filme contendo SK após 0, 6, 7, 11, 18, 20 e 24 dias após extrusão do filme.

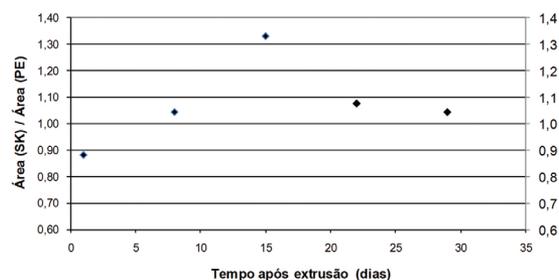


Figura 3. Perfil de migração do SK-Relação entre as bandas de absorção características SK e do polietileno em função do tempo após extrusão do filme.

Tendo em vista a comprovação da migração do SK espera-se que este filme possa ser utilizado como filme antimicrobiano em embalagens alimentícias, visto que este composto é aprovado como aditivo para alimentos. Dessa forma, torna-se importante também a avaliação da influência da presença do SK nas propriedades térmicas e de selagem destes filmes.

A Figura 5 mostra a curva de DSC da segunda fusão obtida para o grão e filme sem agente antimicrobiano e contendo SK. Na curva de DSC do grão foi observado um pico de fusão a 124 °C, característico da fusão do PELBD e na curva do filme, além da fusão do PELBD, foi observado um ombro a 110 °C, evidenciando a presença do PEBD adicionado no momento do processamento do filme. Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras com e sem SK, indicando que o composto antimicrobiano, na quantidade adicionada, deve-se encontrar na região amorfa do polímero, não interferindo no seu processo de cristalização.

Considerando que o SK migra para superfície do filme e que para atuação como antimicrobiano precisa estar em contato com o alimento, o filme estudado apresenta duas funções importantes na embalagem: atividade antimicrobiana e selabilidade. O mecanismo de selagem de filmes poliméricos está descrito na literatura e possui, basicamente, 3 etapas^[22,23]: dois filmes são colocados em contato entre duas barras de solda, até atingir a temperatura de fusão na interface dos dois filmes; esta interface desaparece com a difusão e o entrelaçamento entre cadeias poliméricas fundidas através da superfície dos filmes. Após resfriamento, ocorre a formação de cristais do polímero gerando a selagem. A força de selagem está relacionada ao número de cadeias poliméricas capazes de fundir na temperatura da barra de solda e também ao número de cristais formados. O mecanismo de selagem pode ser dificultado pela presença de impurezas que atrapalham a difusão das cadeias poliméricas. Por esta razão, o desempenho do filme quanto à selabilidade foi avaliado, visto que o SK adicionado tende a migrar para a superfície do filme.

Os resultados obtidos no teste de *Hot tack* mostraram que não houve diferença na temperatura de selagem do filme, assim como não houve diferença expressiva na força medida nesta temperatura.

Porém, em temperaturas menores que 100 °C, foi observada uma diminuição na força, indicando uma

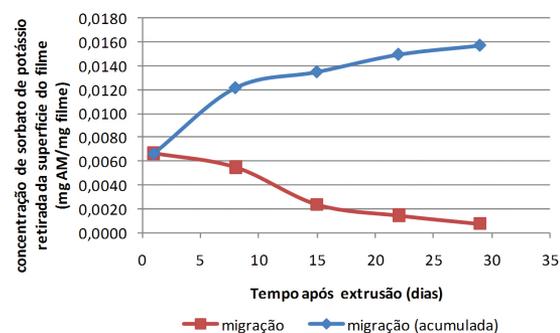


Figura 4. Perfil de migração do SK em água da amostra PELBD + PEBD + 5%SK.

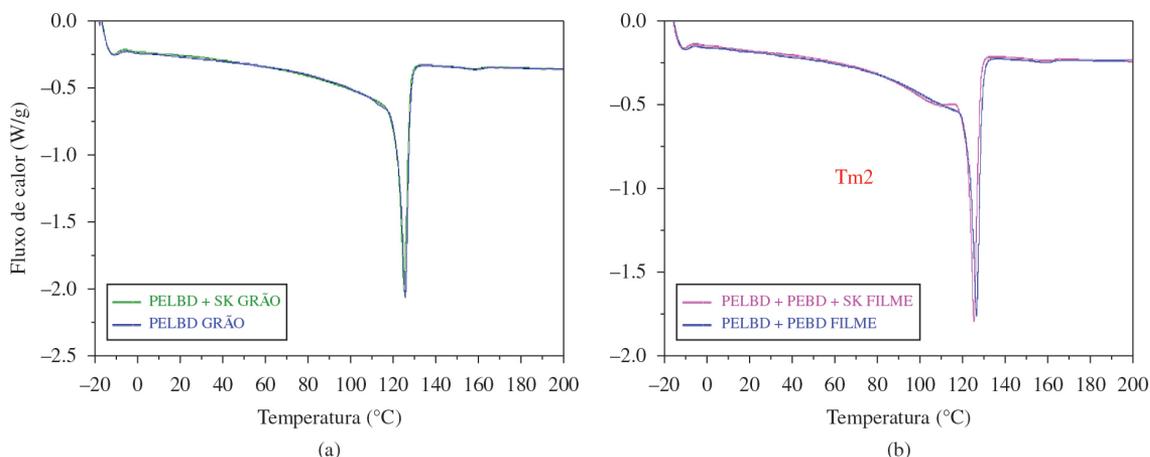


Figura 5. Curvas de DSC das amostras do grão (a) e do filme (b) com e sem SK. (2° aquecimento).

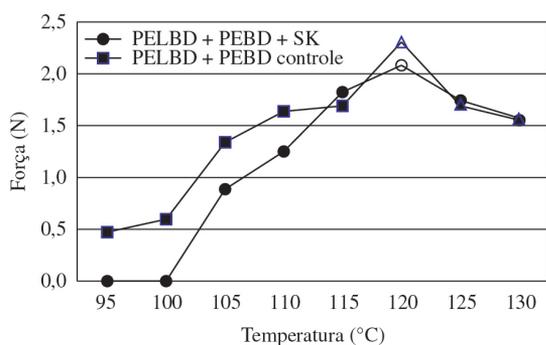


Figura 6. Resultado de Hot Tack das amostras com e sem SK após 3 dias do processamento— símbolos sem preenchimento indicam a temperatura de solda do filme.

janela de selagem menor para o filme contendo SK e avaliado logo após o processamento (Figura 6). Este efeito foi também observado por outros autores em filmes contendo agentes deslizantes, que apresentam mecanismo de migração para superfície do filme^[23].

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a adição de sorbato de potássio, como agente antimicrobiano, não interfere na cristalinidade do polietileno, indicando que na concentração utilizada o SK permanece na região amorfa do polímero. No entanto, a migração do SK interfere nas propriedades de selagem do filme. Este comportamento indica a necessidade de maior cuidado neste processo a fim de garantir a integridade da embalagem final, visto que a presença do SK causa uma diminuição na janela de selagem. O perfil de migração do SK para a superfície do filme foi acompanhado por FTIR/ATR e também por absorção no UV-Vis após contato com água. Estes resultados mostraram que não ocorre migração do SK nos grãos, indicando que não haverá perda deste composto antimicrobiano durante estocagem que antecede o processamento dos filmes. A migração do SK no filme de polietileno atinge um máximo após 15 dias do processamento. Este efeito também deve ser considerado no momento da selagem do filme, visto que o

SK migrado para sua superfície atua como uma impureza dificultando o processo de selagem.

Os filmes produzidos com sorbato de potássio serão posteriormente analisados quanto a sua atividade antimicrobiana.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Braskem S.A pelo fornecimento dos polímeros estudados e pela estrutura dos laboratórios para produção e avaliação dos filmes.

Referências Bibliográficas

- Kruijff, N. & Van Beest, M. D. - "Active Packing", in: Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering, Taylor & Francis (2007). PMID:PMC2292500.
- Bonilla, A. M. & Fernandez, M. - Prog. Polym. Sci., **37**, p.281 (2012).
- Quintavala, S. & Vicini, L. - Meat Sci., **62**, p.373 (2002).
- Cooksey, K. - Addit. Polym., **8**, p.6 (2001). [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-3747\(01\)80187-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-3747(01)80187-1)
- Kyung, W. K.; Min, J. B.; Young-Tec, K.; Kimmel, R. M.; Cooksey, K. & Park, S. I. - Food Sci. Techn., **44**, p.565 (2011).
- Kechichian, V.; Ditchfield, C.; Santos, P. V. & Tadini, C. C. - Food Sci. Techn., **43**, p.1088 (2010).
- Anthierens, T.; Billiet, L.; Devlieghere, F. & Du Prez, F. - Innov. Food Sci. Emerg. Technol., **15**, p.81 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.02.010>
- Higazy, A.; Hashem, M.; ElShafei, A.; Shaker, N. & Hady, M. A. - Carbohydr. Polym., **79**, p.867 (2010). <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.011>
- Restuccia, D.; Spizzirri, U. G.; Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Iemma, F.; Puoci, F.; Vinci, G. & Picci, N. - Food Control, **21**, p.1425 (2010). <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Uz, M. & Altinkaya, S. A. - Food Sci. Techn., **44**, p.2302 (2011).

11. Buonocore, G. G.; Sinigaglia, M.; Corbo, M. R.; Bevilacqua, A., La Notte, E. & Del Nobile, M. A. - *J Food Prot.* **67**, p.1190 (2004). PMID:15222548.
12. Pranoto, Y.; Rakshit, S. K. & Salokhe, V. M. - *Food Sci. Techn.*, **38**, p.859(2005).
13. Jung, H. H & Floros, J. - *J. Plast. Film Sheet.*, **13**, p.287 (1997).
14. Turbiani, F. R. B.; Kieckbusch, T. G. & Gimenes, M. L. G. - *Polímeros*, **21**, p.175 (2011). <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282011005000034>
15. Jipa, J. M.; Guzun, A. S. & Stroescu, S. - *Food Sci. Techn.*, **47**, p.400 (2012).
16. Silverstein, R. M. - "Spectrometric Identification on Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc, New York, p.96 (1994).
17. Meyers, R. A. (Ed.). - "Coates; Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach", John Wiley & Sons, Chichester, p.10815 (2000).
18. Choia, J. H.; Choia, W. Y.; Chaa, D. S.; Chinnanb, M. J.; Parka, H. J.; Leed, D. S. & Park, J. M. - *Food Sci. Techn.*, **38**, p.417 (2005).
19. Fu, Y. & Lim, L. T. - *Polym. Test.*, **31**, p.56(2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.08.015>
20. Ozdemir, M. & Floros, J. D. - *J. Food Eng.*, **47**, p.149 (2001). [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00113-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00113-8)
21. Yoshida, C. M. P.; Bastos, C. E. N & Franco, T. T. - *Food Sci. Techn.*, **43**, p.584 (2010).
22. Muller, C.; Capaccio, G.; Hiltner, A. & Baer, E. - *J. Appl. Pol. Sci.*, **70**, p.2021 (1998). [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19981205\)70:10%3C2021::AID-APP18%3E3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19981205)70:10%3C2021::AID-APP18%3E3.0.CO;2-A)
23. Farley, J. M. & Meka, P. - *J. Appl. Pol. Sci.*, **51**, p.121 (1994). <http://dx.doi.org/10.1002/app.1994.070510113>

Enviado: 05/11/12
Reenviado: 16/07/13
Aceito: 09/08/13