

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS

**CONFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS À BASE
DE PECTINA BTM E DE PECTINA BTM/ALGINATO RETICULADOS
COM CÁLCIO**

Autora: Andréa Cristiane Krause Bierhalz

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – SP
Julho de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

B477c Bierhalz, Andréa Cristiane Krause
Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina BTM e pectina BTM/alginato reticulados com cálcio / Andréa Cristiane Krause Bierhalz. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Theo Guenter Kieckbusch.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biofilme. 2. Pectina. 3. Alginatos. 4. Antimicrobianos. 5. Embalagem ativa. I. Kieckbusch, Theo Guenter. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Preparation and characterization of active films based on LM-pectin and LM-pectin/alginate crosslinked with calcium

Palavras-chave em Inglês: Biofilms, Pectin, Alginates, Antimicrobial, Active packaging

Área de concentração: Engenharia de Processos

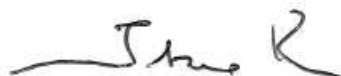
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Fabio Yamashita, Fernanda Paula Collares Queiroz


Data da defesa: 19/07/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de mestrado defendida por Andréa Cristiane Krause Bierhalz e aprovada em 19 de julho de 2010 pela banca constituída pelos seguintes doutores:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch – Orientador
(FEQ/UNICAMP)



Prof. Dr. Fabio Yamashita – Titular
(UEL)



Profa. Dra. Fernanda Paula Collares Queiroz – Titular
(FEQ/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, defendida por Andréa Cristiane Krause Bierhalz e aprovada pela comissão julgadora em 19 de julho de 2010.



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch – Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, tornando tudo possível.

Ao Prof. Theo Guenter Kieckbusch, pela orientação e pelos muitos ensinamentos transmitidos durante este período.

À minha família, em especial à minha mãe, minha primeira educadora, pelo apoio, estímulo e carinho.

Ao querido Jefferson, pelo constante incentivo, dedicação, paciência e pelo grande exemplo de determinação...Obrigada!

Ao Prof. Fabio Yamashita e a Prof^a. Fernanda Queiroz, pelas sugestões apresentadas para a finalização deste trabalho.

À prof^a. Meuris e seus alunos Ambrósio e Ana Lúcia, pela disponibilidade em ajudar nas análises de espectrofotometria.

À Mariana, pela grande ajuda no desenvolvimento da pesquisa e pela boa companhia no laboratório.

Aos amigos e colegas da FEQ, pelos bons momentos e por tornar esta caminhada mais alegre.

À empresa CpKelco, pela doação da pectina, imprescindível para a realização deste trabalho e à Danisco, em especial ao Sr. Antonio Salles, pelo fornecimento da natamicina.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Pectinas e alginatos são polímeros naturais com grande potencial de aplicação no desenvolvimento de filmes biodegradáveis, por serem materiais renováveis e obtidos a partir de diversas fontes a baixo custo. Atualmente, diversos estudos estão voltados ao desenvolvimento de tecnologia que controle o crescimento indesejável de microorganismos, pelo uso de embalagens ativas. Na presente pesquisa, foram desenvolvidos filmes simples de pectina e filmes compostos de pectina e alginato em diferentes proporções, reticulados com cálcio e contendo glicerol como plastificante. Foi avaliada a influência das concentrações de cálcio e do plastificante e do tempo de reticulação sobre as propriedades características dos filmes. A adição de natamicina como agente antimicrobiano também foi investigada. Os filmes foram preparados por *casting*, isto é, alíquotas da solução filme-formadora foram vertidas em moldes de acrílico e submetidas à gelificação e secagem. Devido ao alto poder gelificante do Ca^{++} , filmes com baixo grau de reticulação foram inicialmente confeccionados (1º estágio). Estes pré-filmes foram submetidos a uma reticulação complementar com imersão em uma solução mais concentrada de íons cálcio contendo plastificante. O alginato e a pectina mostraram-se compatíveis em todas as proporções, resultando em filmes com bom aspecto visual. O aumento da concentração de alginato diminuiu a solubilidade em água e o grau de intumescimento e aumentou a espessura, a resistência à tensão, a flexibilidade, a opacidade e a temperatura de transição vítrea dos filmes. Filmes pré-reticulados com 1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13,60 mg Ca^{++}/g biopolímero) na solução do 1º estágio, imersos durante 20 minutos em uma solução contendo 5% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% glicerol (2º estágio) apresentaram um compromisso entre alta resistência mecânica, boa aparência e baixa solubilidade em água. Esta formulação foi selecionada para a confecção dos filmes ativos contendo natamicina. A adição da natamicina provocou um aumento na permeabilidade ao vapor de água, na solubilidade em água e na opacidade, e uma redução na tensão na ruptura em relação aos filmes sem antimicrobiano. Determinações experimentais da massa de natamicina liberada em ensaios nos quais os filmes eram imersos em água apresentaram bom ajuste ao modelo difusional da segunda Lei de Fick, com valores de difusividade efetiva variando entre $9,53 \cdot 10^{-9}$ e $9,22 \cdot 10^{-12}$ cm^2/s . A difusividade aumentou com a espessura e diminuiu com o aumento da concentração de alginato no filme.

Palavras-chave: biofilme, pectina, alginato, reticulação, natamicina, difusividade.

ABSTRACT

Pectin and alginate are natural polymers with potential applications in the development of biodegradable package films, since they can be obtained at low cost from a large variety of renewable sources. There is a growing interest concerning the control of microbial activity in prepared food using active packaging. In this work, single and composite films based on alginate and pectin crosslinked with calcium ions and containing glycerol as plasticizer were prepared. The influence of calcium and glycerol concentrations and of the time of reticulation on the film characteristics was evaluated and the addition of natamycin as an active agent was investigated. The strong gelling power of Ca^{++} ions hinders smooth casting procedures so that a film with low degree of reticulation has to be initially confectioned by casting (1st stage). These pre-films are further crosslinked in a second contact with a more concentrated Ca^{++} solution containing plasticizer (2nd stage). Alginate and pectin were compatible in all proportions studied resulting in visually attractive films. Increasing the alginate concentration decreased film solubility in water and the swelling degree and increased the thickness, resistance to tensile stress, flexibility, water vapor permeability, opacity and glass transition temperature. Films pre-reticulated with 1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13.60 mg Ca^{++} /g biopolymer) in the solution of the 1st stage, immersed for 20 minutes in a 5% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 3% glycerol solution (2nd stage) showed a good compromise between high mechanical resistance, attractive appearance and low solubility in water. This formulation was selected for the manufacture of active films containing natamycin. Addition of natamycin promoted an increase in water vapor permeability, solubility in water and opacity and decreased the tensile strength when compared to films without the added anti-microbial agent. Experimental data of mass of natamycin released by immersion of the film in water were well fitted to Fick's second law diffusional model, with effective diffusivity values ranging from $9.53 \cdot 10^{-9}$ e $9.22 \cdot 10^{-12}$ cm^2/s . The diffusivity increased with the thickness and decreased with alginate concentrations in the film.

Key-words: biofilms, alginate, pectin, crosslinking, natamycin, diffusivity.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| NOMENCLATURA | x |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivos gerais | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos | 3 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 3.1 Filmes e coberturas biodegradáveis..... | 4 |
| 3.2 Matérias-primas utilizadas na fabricação de biofilmes..... | 5 |
| 3.3 Pectina..... | 7 |
| 3.4 Alginato..... | 9 |
| 3.5 Gelificação e reticulação da pectina e alginato..... | 12 |
| 3.6 Filmes simples à base de pectina | 15 |
| 3.7 Filmes compostos: alginato e pectina | 16 |
| 3.8 Plastificantes..... | 17 |
| 3.9 Caracterização dos filmes..... | 19 |
| 3.9.1 <i>Espessura</i> | 19 |
| 3.9.2 <i>Solubilidade em água</i> | 20 |
| 3.9.3 <i>Grau de intumescimento</i> | 21 |
| 3.9.4 <i>Propriedades mecânicas</i> | 22 |
| 3.9.5 <i>Permeabilidade ao vapor de água</i> | 23 |
| 3.9.6 <i>Temperatura de transição vítrea</i> | 25 |
| 3.10 Filmes ativos antimicrobianos | 27 |
| 3.11 Natamicina..... | 29 |
| 3.12 Transporte de substâncias ativas em filmes poliméricos..... | 31 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 Matérias-primas | 35 |
| 4.2 Reagentes | 35 |
| 4.3 Agente antimicrobiano | 35 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.4 | Processo de confecção dos filmes | 35 |
| 4.5 | Caracterização dos filmes | 39 |
| 4.1.4 | <i>Aspecto visual</i> | 39 |
| 4.1.5 | <i>Espessura, δ</i> | 39 |
| 4.1.6 | <i>Conteúdo de umidade, ω</i> | 39 |
| 4.1.7 | <i>Massa solubilizável em água, MS</i> | 39 |
| 4.1.8 | <i>Grau de Intumescimento, GI</i> | 40 |
| 4.1.9 | <i>Propriedades mecânicas</i> | 40 |
| 4.1.10 | <i>Permeabilidade ao vapor de água, PVA</i> | 41 |
| 4.1.11 | <i>Cor e opacidade</i> | 42 |
| 4.1.12 | <i>Temperatura de Transição Vítre, T_g</i> | 44 |
| 4.1.13 | <i>Microestrutura</i> | 44 |
| 4.1.14 | <i>Teor de cálcio</i> | 44 |
| 4.6 | Ensaio de liberação de natamicina em água | 44 |
| 4.7 | Análise estatística dos dados..... | 45 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 5.1 | Filmes de pectina e pectina/alginato | 46 |
| 5.1.1 | <i>Definição da concentração de cálcio na pré-reticulação</i> | 46 |
| 5.1.2 | <i>Definição do tempo de imersão na solução reticuladora do 2º estágio</i> | 59 |
| 5.1.3 | <i>Definição da concentração de glicerol na solução reticuladora do 2º estágio</i> | 64 |
| 5.1.4 | <i>Definição da concentração de cálcio na solução reticuladora do 2º estágio</i> | 68 |
| 5.1.5 | <i>Caracterização complementar</i> | 73 |
| 5.2 | Filmes ativos | 84 |
| 5.2.1 | Caracterização e comparação com os filmes sem natamicina | 84 |
| 5.1.2 | <i>Ensaio de liberação de natamicina em água</i> | 98 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 109 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 111 |
| | APÊNDICE A – Temperatura de transição vítrea do alginato..... | 122 |
| | APÊNDICE B – Valores de Opacidade | 123 |
| | APÊNDICE C – Curvas de liberação de filmes de 60 e 70g..... | 124 |

NOMENCLATURA

| | | |
|---|--|------------------------------|
| <i>A</i> | Alongamento do filme | % |
| <i>A_e</i> | Área exposta do filme | m ² |
| <i>A_s</i> | Área da seção transversal do filme | m ² |
| <i>C</i> | Croma | - |
| <i>d</i> | Distância final da separação das garras | mm |
| <i>d₀</i> | Distância inicial da separação das garras | mm |
| <i>D_{ef}</i> | Difusividade efetiva | cm ² /s |
| <i>E'</i> | Módulo de perda | - |
| <i>E''</i> | Módulo de armazenamento | - |
| <i>F</i> | Fator de correção | - |
| <i>FC</i> | Formulação | - |
| <i>F_m</i> | Força máxima no momento da ruptura | N |
| <i>G</i> | Taxa de massa | g/dia |
| <i>GI</i> | Grau de intumescimento | % |
| <i>H</i> | Ângulo Hue | ° |
| <i>k</i> | Constante difusional | s ⁻¹ |
| <i>L*, a*, b*</i> | Parâmetros de cor | - |
| <i>L_p*, a_p*, b_p*</i> | Parâmetros de cor do filme padrão | - |
| <i>M_∞</i> | Massa de soluto liberada em tempo infinito | g |
| <i>MEV</i> | Microscopia eletrônica de varredura | - |
| <i>m_f</i> | Massa final da amostra | g |
| <i>m_i</i> | Massa inicial da amostra | g |
| <i>MS</i> | Massa solubilizável em água | % (g /100g filme) |
| <i>M_t</i> | Massa liberada no tempo t | g |
| <i>M_t /M_∞</i> | Fração liberada | - |
| <i>m_u</i> | Massa de filme úmido | g |
| <i>n</i> | Coeficiente difusional | - |
| <i>PVA</i> | Permeabilidade ao vapor de água | g.mm/m ² .dia.kPa |
| <i>R</i> | Coeficiente de correlação | - |
| <i>T_g</i> | Temperatura de transição vítrea | °C |
| <i>TR</i> | Tensão na ruptura | MPa |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Y | Opacidade do filme em modo de transmitância | % |
| Y_b | Opacidade em relação a um padrão branco | |
| Y_p | Opacidade em relação a um padrão preto | |
| ΔE^* | Diferença total de cor | - |
| ΔP_{H_2O} | Diferença de pressão parcial de vapor de água | kPa |

Letras gregas

| | | |
|------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| δ | Espessura do filme | mm |
| δ_f | Espessura após imersão com água | mm |
| δ_i | Espessura inicial do filme | mm |
| ω | Conteúdo de umidade | % (g H ₂ O/100g filme) |

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com as questões ambientais, sobretudo com o acúmulo de resíduos e o possível esgotamento dos recursos não renováveis, vem impulsionando, nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias como a de filmes biodegradáveis. Esses materiais são produzidos a partir de polímeros naturais como polissacarídeos, proteínas e lipídios e apresentam uma alternativa viável para a redução do emprego de embalagens sintéticas tradicionais de origem petroquímica (Debeaufort *et al.*, 1998).

Dentre os polímeros naturais que se apresentam como potenciais formadores de filmes, destacam-se o alginato e a pectina de baixo teor de metoxilação (BTM). Estes polissacarídeos aniônicos são abundantes na natureza, de fácil extração e possuem a característica de reagir com íons divalentes, principalmente cálcio, pela formação de ligações cruzadas, resultando em filmes fortes e insolúveis que superam a baixa resistência à água dos filmes hidrofílicos (Fang *et al.*, 2008). As misturas do alginato e pectina formam géis com alta interação molecular e esta característica está baseada, sobretudo, na grande similaridade das estruturas, uma vez que a seqüência dos ácidos α -D-galacturônico da pectina é praticamente imagem especular das regiões de ácidos α -D-gulurônico no alginato (Braccini e Pérez, 2001).

Neste sentido, o Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos (LEPPbio) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, desde 1998, está pesquisando o potencial de utilização de biofilmes como embalagem de alimentos, em substituição a filmes poliméricos de origem petroquímica. Ênfase tem sido dada à caracterização de filmes cuja matriz é o alginato de sódio e esforços estão sendo direcionados a filmes ativos antimicrobianos, isto é, filmes contendo antimicóticos que são liberados até a superfície do produto, contribuindo para retardar a proliferação de microorganismos.

As pesquisas conduziram a um processo próprio de produção de filmes de alginato que consiste em dois estágios (Zactiti e Kieckbusch, 2005). No 1º estágio, obtém-se um filme de baixo grau de reticulação com íons Ca^{++} , produzido pela técnica *casting*, com a secagem da solução formadora de filme feita em um molde. Esse filme é manuseável e possui uma matriz polimérica homogênea, mas é solúvel em água. Quando em contato com uma solução mais concentrada de cálcio (2º estágio), esse filme tem facilidade em receber esse íon por difusão e agregá-lo em sua estrutura. Como resultado, o filme apresenta baixa solubilidade em água e

sua permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência mecânica e taxa de liberação de antimicóticos podem ser ajustados pela intensidade da reticulação no 2º estágio. Esses filmes usam glicerol como plastificante a fim de melhorar a elasticidade. As pesquisas no LEPPbio indicam que os cuidados tomados na confecção do filme de baixo grau de reticulação no 1º estágio, que é o diferencial desse processo em relação à metodologia usual, irão se refletir nas características dos filmes definitivos (Turbiane, 2007).

Apesar da metodologia de confecção dos filmes de alginato estar bem estabelecida, o comportamento da pectina e dos filmes compostos de pectina e alginato frente aos parâmetros como concentração de cálcio, concentração de plastificante e tempo de imersão em solução reticuladora, são ainda desconhecidos, necessitando de um estudo mais aprofundado. A literatura também não disponibiliza estudos sobre filmes de pectina BTM como embalagens antimicrobianas e seu potencial para esta aplicação ainda não foi estabelecido.

Os filmes antimicrobianos são considerados promissores, pois permitem a transferência do agente ativo incorporado na matriz polimérica para o alimento, de maneira a manter uma concentração predeterminada do composto ativo na superfície e, dessa forma, prevenir ou inibir o crescimento de microorganismos deterioradores ou patogênicos (Buonocore *et al.*, 2003). Além de proteger o produto embalado dos mais frequentes mecanismos de deterioração, esta transformação visa atender às crescentes exigências dos consumidores em relação à segurança alimentar e produtos minimamente processados (Han, 2005).

A natamicina é um antimicótico poliênico, ativo contra uma grande variedade de fungos e seu uso é autorizado pela legislação como aditivo alimentar, principalmente em queijos e embutidos cárneos. Este antimicrobiano tem sido incorporado em filmes de diversos biopolímeros, como metilcelulose e alginato, e estudos de liberação apontam resultados satisfatórios, superando aditivos tradicionalmente utilizados, como o sorbato de potássio (da Silva, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Esta pesquisa tem como objetivo geral confeccionar filmes ativos à base de pectina de baixo teor de metoxilação, puros e em combinação com alginato de sódio, reticulados com íons cálcio e caracterizá-los em relação à aparência, atributos físico-químicos, resistência mecânica e controle de liberação de natamicina. Esses filmes serão confeccionados segundo metodologia desenvolvida pelo LEPPbio/FEQ/UNICAMP para filmes de alginato de cálcio e conterão glicerol como plastificante.

2.2 Objetivos específicos

- a) Confeccionar filmes de pectina simples e filmes compostos de pectina e alginato em diversas proporções e avaliar as propriedades em relação às diferentes formulações.
- b) Determinar o efeito da concentração dos íons cálcio utilizados durante o pré-tratamento e na reticulação complementar do 2º estágio nos atributos funcionais dos filmes.
- c) Determinar o efeito do tempo de imersão dos filmes na solução reticuladora do 2º estágio e a concentração de plastificante nos atributos funcionais dos filmes.
- d) Selecionar formulações representativas de filmes confeccionados segundo 2.2.b e 2.2.c, complementar sua caracterização físico-química e realizar ensaios de liberação de natamicina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Filmes e coberturas biodegradáveis

Apesar de ser uma tecnologia emergente, a utilização de filmes ou coberturas comestíveis em alimentos não é uma prática recente. Na China, desde o século XII, frutas cítricas como laranjas e limões eram revestidas por uma camada de cera para retardar a desidratação e resistir ao transporte por longas distâncias. No século XVI, o recobrimento de diversos produtos com gordura animal, principalmente carnes, já era uma prática bastante comum na Europa, visando aumentar a resistência dos alimentos contra a deterioração (Baldwin *et al.*, 1997). Comercialmente, a utilização de coberturas comestíveis tem sido explorada desde 1930 para revestimento de frutas e vegetais frescos, com o objetivo de melhorar a aparência (brilho e cor), retardar a perda de umidade e controlar o amadurecimento (Debeaufort *et al.*, 1998).

Coberturas ou recobrimentos recebem esta denominação quando a solução polimérica é aplicada diretamente sobre o produto, cobrindo a sua superfície com uma película aderente a ela. Filmes são produzidos em separado, constituindo estruturas independentes que poderão ser aplicados envolvendo o produto ou separando diferentes partes dentro do produto (Tharanathan, 2003). Os filmes podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis em função da quantidade e da natureza dos constituintes utilizados na sua produção (Shih, 1996).

Os filmes biodegradáveis confeccionados a partir de recursos naturais são utilizados com o intuito de manter ou melhorar a qualidade e a durabilidade dos alimentos e ao mesmo tempo substituir parcialmente as embalagens sintéticas à base de derivados do petróleo, reduzindo o impacto ambiental e o uso de recursos não-renováveis (Kester e Fennema, 1986). Para que possam ser considerados biodegradáveis, os materiais devem ser decompostos por microorganismos, levando à formação de compostos mais simples como água, metano e dióxido de carbono (Krochta e De Mulder-Johnston, 1997).

Em sistemas alimentícios, os filmes podem atuar especificamente controlando a migração de água, a permeabilidade a gases, a migração lipídica e, ainda, podem conter aditivos como antioxidantes e antimicrobianos, os quais visam retardar a taxa de deterioração e prolongar a vida de prateleira (McHugh e Krochta, 1994; Kester e Fennema, 1986).

Um dos métodos mais utilizados para a formação de biofilmes é o *casting*, que compreende o preparo de uma solução filmogênica da macromolécula, aplicação dessa solução em um suporte ou molde adequado seguida de secagem sob condições controladas (Tharanathan, 2003). Entre outros métodos que também podem ser empregados na confecção de filmes, encontram-se as técnicas tradicionais do processamento de plásticos flexíveis, como a extrusão, co-extrusão e laminação (Debeaufort *et al.*, 1998; Lacroix e Tien, 2005). O processo de formação de filmes, independente da técnica empregada, geralmente envolve associações intra e intermoleculares ou ligações cruzadas entre cadeias formando uma rede tridimensional semi-rígida que promove a resistência estrutural (Kester e Fennema, 1986; Tharanathan, 2003).

Por serem utilizados tanto como embalagens como componentes dos alimentos, os filmes devem permanecer estáveis e manter suas propriedades funcionais durante o tempo de uso desejado. Também devem cumprir alguns requisitos específicos, como boas propriedades de barreira (permeabilidades ao vapor de água, ao O₂ e ao CO₂), eficiência mecânica (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas e sensoriais adequadas, além de possuir baixo custo de matéria-prima e de fabricação (Debeaufort *et al.*, 1998).

As características e as propriedades funcionais do filme são influenciadas diretamente pelo tipo de biopolímero usado (conformação, massa molecular e distribuição de cargas), pelo método e condições utilizadas durante a confecção do filme (pH, concentração de biopolímero e tratamento térmico da solução) e também pelas condições ambientais (umidade relativa e temperatura) (Cuq *et al.*, 1996).

3.2 Matérias-primas utilizadas na fabricação de biofilmes

A formulação de uma matriz filmogênica com apropriado poder coesivo requer o uso de pelo menos um componente com habilidade de formar uma estrutura contínua pelas interações entre as moléculas quando submetidas ao tratamento físico ou químico. Este componente é, na maioria das vezes, um polímero de cadeia longa e alta massa molecular. (Debeaufort *et al.*, 1998; Guilbert *et al.*, 1996).

As principais biomoléculas utilizadas na preparação dos filmes e coberturas podem ser classificadas em três categorias: os polissacarídeos e seus derivados (alginatos, pectinas, quitosanas e amidos), as proteínas (glúten, gelatina e zeína) e os lipídeos (ceras, ácidos graxos

e resinas) (Andrade *et al.*, 2008; Kester e Fennema, 1986). Outros aditivos, como plastificantes, ajustadores de pH e agentes reticulantes, são geralmente combinados com os biopolímeros para modificar as propriedades físicas e a funcionalidade dos filmes (Han e Gennadios, 2005). Cada categoria de biomoléculas apresenta características funcionais distintas e a escolha da substância formadora de filme torna-se função do objetivo, da natureza do produto e do método de aplicação (Debeaufort *et al.*, 1998).

Os polissacarídeos, conhecidos como hidrocolóides, geralmente, apresentam boas propriedades mecânicas e permeabilidade seletiva ao dióxido de carbono e ao oxigênio. São largamente utilizados na indústria de alimentos como espessantes, agentes de suspensão e gelatinização, emulsificantes e estabilizantes. O alginato e a pectina destacam-se pelo seu emprego em diversos sistemas alimentícios graças à capacidade de formarem géis por meios químicos, diferindo dos outros nos quais os géis são formados termicamente (Andrade *et al.*, 2008). Os hidrocolóides, porém, apresentam pobre barreira à umidade por suas características hidrofílicas. Esta característica faz com que os filmes empregados em alimentos com alta atividade de água, apresentem a tendência de intumescer, dissolver e se desintegrar (Kester e Fennema, 1986). Contrariamente, os filmes elaborados com lipídios são resistentes à transferência de água devido à característica hidrofóbica, mas tendem a ser muito quebradiços e opacos, refletindo em baixa resistência mecânica (Tharanathan, 2003).

Tendo em vista as vantagens e desvantagens dos diferentes materiais, a combinação dos mesmos pode ser utilizada para melhorar as propriedades funcionais dos filmes. Os polímeros combinados podem interagir química e fisicamente, resultando em filmes compostos com propriedades adequadas a um produto específico (Shih, 1996). Os filmes compostos também podem oferecer significativos benefícios econômicos pela substituição parcial de um componente de alto custo da formulação (García *et al.*, 2004). Entre filmes compostos de polissacarídeos, muitos dos trabalhos encontrados na literatura abordam a formação de complexos polieletrólíticos, formados a partir de polímeros de cargas opostas como, por exemplo, quitosana e pectina (Hiorth *et al.*, 2004; De Yao *et al.*, 1996; Hoagland e Parris, 1996) e quitosana e alginato (Yan *et al.*, 2001).

3.3 Pectina

A pectina constitui um grupo complexo de polissacarídeos aniônicos que ocorre em diversas espécies vegetais, principalmente nas paredes celulares e nas camadas intercelulares das plantas terrestres. Geralmente, encontra-se associada à celulose, hemicelulose e lignina em frutos e tecidos jovens e macios, contribuindo para a manutenção da estrutura, textura e sustentação das plantas (May, 1999).

Entre as diversas fontes comerciais de pectina existentes, destacam-se o bagaço das frutas cítricas (25% da matéria seca) e o bagaço seco da maçã (15-18% da matéria seca), nos quais a extração é conduzida sob condições ácidas ou básicas com posterior deslignificação pelo tratamento com cloreto de sódio (Marudova *et al.*, 2004; Thakur *et al.*, 1997).

A aplicação mais conhecida desta matéria-prima é como agente espessante e gelificante na produção de diversos alimentos como geléias, sucos de frutas e produtos lácteos (Thakur *et al.*, 1997). Entretanto, características como biocompatibilidade e a não-toxicidade também permitem que a pectina esteja sendo crescentemente utilizada nas áreas farmacêutica e biotecnológica, com destaque para o uso em sistemas de liberação controlada de princípios ativos (Liu *et al.*, 2007).

Quimicamente, a pectina apresenta-se como um complexo heterogêneo e sua composição, assim como o alginato, varia com a fonte, com as condições em que a planta esteve exposta e com as condições aplicadas durante sua separação e purificação.

Suas moléculas são constituídas de uma cadeia principal linear de resíduos do ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas do tipo α (1,4), cujos grupos carboxílicos podem estar parcialmente esterificados por metoxilas (Figura 3.1). As cadeias de resíduos galacturonato são, porém, interrompidas por unidades de L-ramnose, às quais estão ligadas cadeias laterais, formadas por açúcares neutros. Estas cadeias laterais são responsáveis pela união das moléculas da pectina à matriz da parede celular vegetal e sua presença depende principalmente da fonte e do método de extração utilizado. Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das pectinas, outros açúcares como D-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-fucose, também podem ser encontrados em proporções variáveis (Cardoso *et al.*, 2003; Walkeström *et al.*, 2003; Willats *et al.*, 2006).

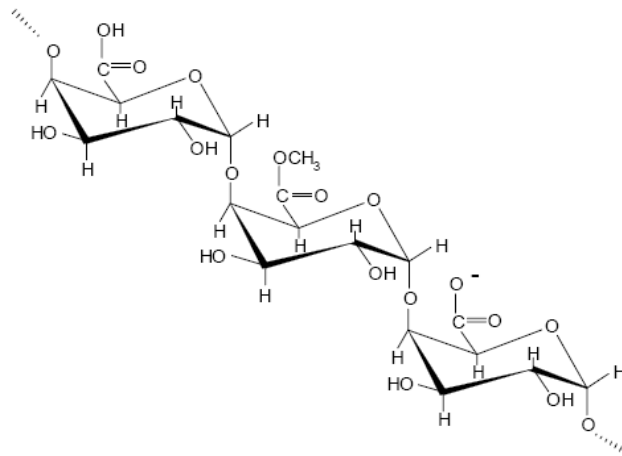


Figura 3.1. Estrutura química da cadeia da pectina (Hourdet e Muller, 1991).

O teor de metoxilação (TM) ou grau de esterificação (DE) é utilizado como critério para a classificação comercial das pectinas e corresponde à proporção dos grupos de ácido galacturônico metilados presentes na molécula de pectina. O teor de metoxilação varia com a idade e a localização dentro do tecido da planta, método de extração, conteúdo de açúcares neutros e possui importante influência sobre as propriedades da pectina, especialmente a solubilidade e as características gelificantes e formadoras de filme (Liu *et al.* 2007).

As pectinas são classificadas como pectinas de alto teor de metoxilação (ATM), quando possuem acima de 50% de seus grupos carboxílicos esterificados, e como pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM), quando 50% ou menos de seus grupos estão esterificados (Figura 3.2). As pectinas BTM são obtidas a partir da pectina ATM isolada pelo controle do processo de desesterificação em meio homogêneo na presença de álcool, com ácido ou amônia (Axelos e Thibault, 1991). Quando o processo de desesterificação é realizado com amônia, alguns grupos metil éster são substituídos por grupos amidas, resultando em pectinas BTM com grau de amidação (May, 1999).

Os mecanismos de associação e gelificação são diferentes para os dois tipos de pectinas. As pectinas ATM apresentam predominantemente interações intermoleculares por pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas. A gelificação é normalmente observada em pH ácido (< 3,5) e na presença de altas concentrações de açúcares (Walkeström *et al.*, 2003). O pH ácido provoca a protonação dos grupos carboxílicos, diminuindo a repulsão eletrostática entre as cadeias e aumentando a formação de pontes de hidrogênio. Já a adição de açúcares diminui a atividade de água, aumentando as interações hidrofóbicas entre os grupos éster metílicos.

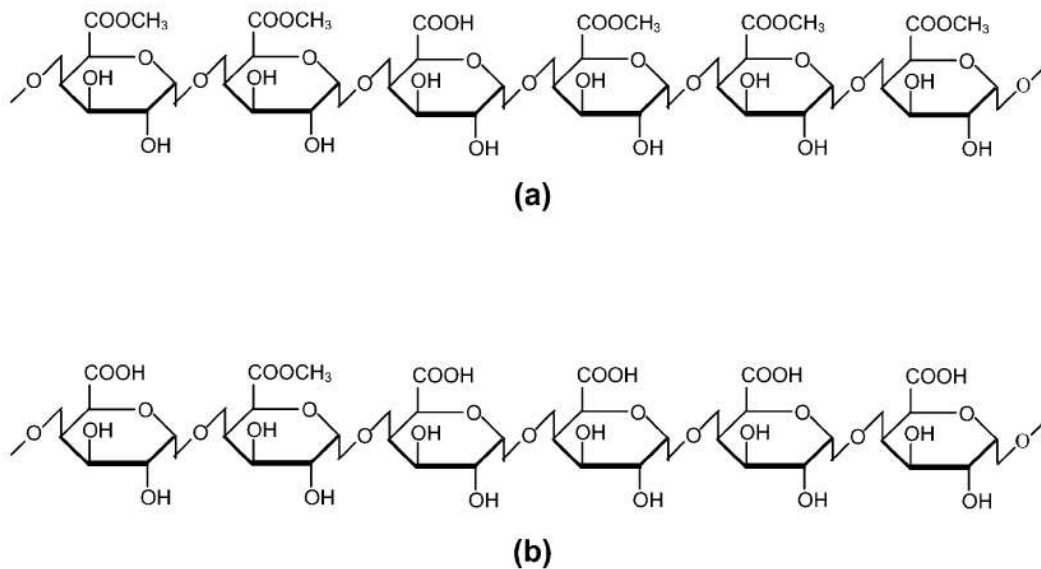


Figura 3.2. Estruturas da pectina de alto teor de metoxilação (a) e de baixo teor de metoxilação (b) (Tharanathan, 2003).

As pectinas BTM podem formar géis estáveis e termo-reversíveis na ausência de açúcar sendo, desta forma, muito empregadas na produção de alimentos dietéticos e de baixas calorias (Axelos e Thibault, 1991; Iglesias e Lozano, 2004). Cobrem ampla faixa de pH (2,8 a 6,0) e de conteúdo de sólidos solúveis (10 a 70%), porém requerem a presença de íons bivalentes como o cálcio, de modo que pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas passam a ser predominantes nas associações intermoleculares.

Segundo Liu *et al.* (2007), a grande diversidade das características moleculares gera dificuldades no controle da qualidade do isolamento e purificação das pectinas, resultando em baixa reprodutibilidade dos trabalhos envolvendo este polissacarídeo. Duas amostras de pectina com o mesmo grau de esterificação, porém com diferentes padrões de distribuição podem apresentar importantes diferenças nas propriedades reológicas (Zsivánovits *et al.*, 2005; Willats *et al.*, 2006).

3.4 Alginato

O alginato é um carboidrato coloidal hidrofílico presente na parede celular e nos espaços intercelulares de várias espécies de algas marinhas marrons (classe *Phaeophyceae*). Nestas plantas, as moléculas de alginato são responsáveis pela força e flexibilidade

necessárias para o crescimento no ambiente marítimo e podem compreender até 40% da matéria seca (Onsøyen, 1999). Alginatos também podem ser obtidos por fermentação utilizando bactérias como *Pseudomonas* e *Azotobacter* e difere do ácido alginico presente nas algas apenas por ser mais acetilado (Garcia-Cruz *et al.*, 2008).

Os alginatos são polímeros lineares de alta massa molecular compostos de resíduos do ácido α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M) associados por ligações glicosídicas do tipo (1-4) e distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia (Draget *et al.*, 1997). Estes monômeros podem ser organizados em cadeias consecutivas de resíduos G, de resíduos M, ou cadeias com resíduos alternados de M e G, conforme ilustrado na Figura 3.3.

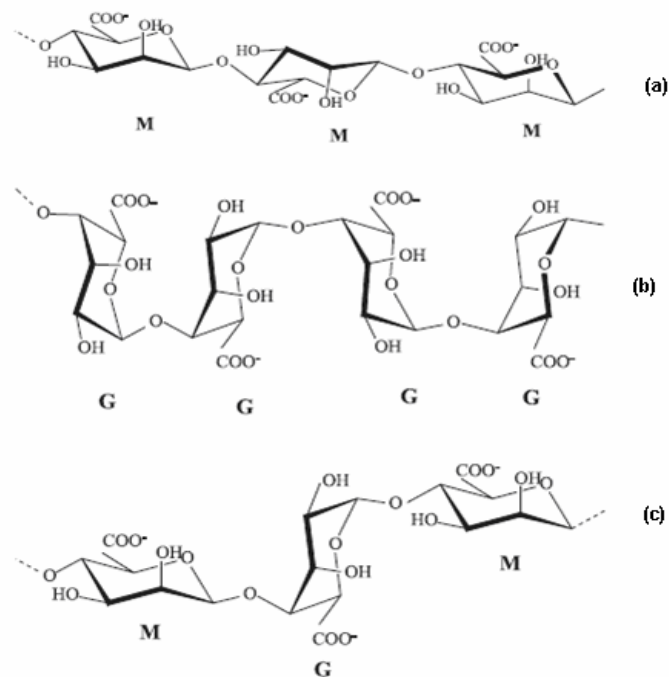


Figura 3.3. Composição de alginatos: (a) cadeia de resíduos de ácido manurônico; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e gulurônicos alternados (Onsøyen, 1999).

O tipo de alga de onde o alginato é extraído determina a estrutura sequencial e a quantidade relativa de cada tipo de resíduo, podendo ser encontrados alginatos com diferentes proporções de unidades M e G. A Tabela 3.1 apresenta as variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e ácido galacturônico (G) em alginatos produzidos pelas fontes mais

comuns de algas: *Macrocystis Pyrifera*, encontrada na costa pacífica das Américas, e *Laminaria hyperboria*, proveniente da Europa e Japão (Clare, 1993).

Tabela 3.1. Proporção de blocos M e G em diferentes espécies de algas pardas.

| ALGA | % M | % G | % MG |
|--------------------------------------|------|------|------|
| <i>Macrocystis Pyrifera</i> (alto M) | 21,6 | 17,7 | 41,7 |
| <i>Laminaria hyperboria</i> (alto G) | 38,4 | 20,7 | 41,0 |

Uma das mais importantes propriedades dos alginatos, responsável por grande número de aplicações, é a sua capacidade de formação de géis termoestáveis na presença de cátions divalentes, principalmente o cálcio (Andrade *et al.*, 2008). Entretanto, as diferenças estruturais entre os tipos de alginato são determinantes nas propriedades do gel que será formado (Ertesvåg e Valla, 1998), pois esta capacidade de formação de géis está diretamente ligada à quantidade e ao tamanho dos blocos G presente na molécula (Draget *et al.*, 1997).

Os alginatos poli-G são mais reativos com os íons Ca^{++} , pois estas cadeias apresentam formato retorcido que favorece a presença de cavidades adjacentes, nas quais se situam os íons cálcio (Andrade *et al.*, 2008). Géis com maior quantidade de blocos G são duros e costumam apresentar alto valor de tensão na ruptura e grande estabilidade térmica, enquanto que o aumento dos blocos M favorece a formação de géis macios, flexíveis e com poros pequenos. Os blocos MG tendem a formar cadeias flexíveis e são mais solúveis em valores baixos de pH (Draget *et al.*, 1997; Onsøyen, 1999).

Comercialmente, o alginato é encontrado principalmente na forma de sal, como o alginato de sódio, potássio e amônio, e possui inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, bebidas e farmacêutica por suas propriedades coloidais espessantes, emulsificantes, estabilizantes e gelificantes, além de ser biocompatível e não tóxico (Ertesvåg e Valla, 1998). Nos últimos anos, a tecnologia dos géis de alginato também tem sido desenvolvida para a imobilização, encapsulação e para outros propósitos na biotecnologia (Onsøyen, 1999).

Existe um número limitado de trabalhos relatando características físico-químicas, mecânicas e higroscópicas de filmes de alginato reticulados com íons cálcio. A maior parte deles utiliza um filme de alginato de sódio e realizam a reticulação por difusão de Ca^{++} nessa matriz (Olivas e Barbosa-Canovas, 2008; Russo *et al.*, 2007; Rhim, 2004; Pavlath *et al.*, 1999).

Em um trabalho recente, Lima *et al.* (2007) reticularam o filme de alginato de sódio com formaldeído, entretanto, as propriedades dos filmes assim obtidos foram inferiores aos reticulados com cálcio.

3.5 Gelificação e reticulação da pectina e alginato

Os filmes que utilizam alginato e pectina como matéria-prima apresentam a tendência de formarem filmes com alta tensão na ruptura, porém com pouca resistência à água devido a suas características hidrofílicas. No entanto, essas propriedades podem ser melhoradas, pois a pectina e o alginato fazem associações do tipo cadeia-cadeia, formando géis fortes e insolúveis com a adição de cátions divalentes. Essa característica é responsável pelo grande campo de aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica, biotecnológica e no tratamento de efluentes (Fang *et al.*, 2008).

O processo de reticulação das cadeias do alginato e pectina pode ser conduzido basicamente por dois métodos. Os íons podem ser adicionados diretamente à solução filme-formadora com posterior secagem em um molde ou, podem também, ser difundidos para a matriz de um filme já formado.

Diversos trabalhos reportam que o primeiro método é limitado e não promove aumento da barreira protetora à água. Pavlath e Robertson (1999) confeccionaram filmes de alginato por *casting* e testaram a reticulação com diferentes métodos e diferentes íons (Al, Ca, Cu, Fe e Zn). Quando adicionaram os íons diretamente na solução filme-formadora, todos os filmes apresentaram-se frágeis, opacos e solúveis. Os autores ainda ressaltaram a importância de conduzir a reticulação em altas temperaturas para que a solução apresente uma viscosidade adequada. Outro fator limitante do processo de reticulação por inclusão dos íons à solução é a concentração, pois com pequenos incrementos de concentração pode ocorrer a formação de gel impedindo o *casting*. Neste mesmo trabalho, a reticulação por imersão promoveu grande redução da solubilidade, sendo que o cálcio mostrou-se o reticulante mais efetivo, fornecendo melhores resultados com menores concentrações.

Rhim (2004) também estudou filmes de alginato reticulados com íons cálcio pelos dois métodos e verificou a grande superioridade dos filmes reticulados por imersão, principalmente na solubilidade em água e resistência mecânica. Segundo este autor, a reação de reticulação

por adição é tão instantânea que não permite a formação de uma estrutura homogênea e contínua na matriz do filme.

Segundo Pavlath e Robertson (1999), no processo de reticulação por imersão existe uma relação competitiva entre a dissolução do filme e a reticulação, de forma que a concentração da solução iônica deve ser suficiente para que a difusão seja predominante. Esse comportamento é acentuado, sobretudo, porque a ausência de íons cálcio na estrutura formada inicialmente faz com que o processo de dissolução seja intenso e rápido, causando alterações irreversíveis na matriz polimérica.

Frente a isto, Zactiti e Kieckbusch (2005) combinaram dois métodos de reticulação, e os filmes foram confeccionados por uma seqüência de inclusão e difusão para formar filmes de alginato com boas propriedades de barreira e mecânicas. Em um processo de dois estágios, confeccionaram primeiramente filmes contendo os íons na solução polimérica, estágio chamado de pré-reticulação, e posteriormente, após a secagem, impregnavam este mesmo filme com uma solução mais concentrada de cálcio. Como estes filmes já possuíam um grau de reticulação, ao serem imersos na solução, a relação competitiva entre a dissolução e a difusão seria amenizada.

Assim como Pavlath e Robertson (1999), Allen *et al.* (1963) também classificaram o cálcio como agente reticulante mais efetivo e, tradicionalmente, este íon é o mais utilizado na fabricação de gel. Estudos utilizando ferro e zinco como reticulantes para o alginato e pectina mostraram que era necessária uma grande concentração destes para que se obtivessem resultados equivalentes ao cálcio (Pavlath e Robertson, 1999). Outros cátions divalentes como Mn^{+2} e Mg^{+2} possuem pouca habilidade para induzir associações cadeia-cadeia e a gelificação de polímeros como o alginato e a pectina BTM (Fang *et al.*, 2008). Entretanto, Zsizanovits *et al.* (2005) determinaram para filmes de pectina BTM, que tanto o Ca^{+2} quanto Mg^{+2} agem positivamente sobre o intumescimento.

A gelificação induzida pelo cálcio é resultado de interações deste íon com blocos guluronatos e galactouronatos no alginato e na pectina, respectivamente. Na pectina BTM a afinidade das cadeias com o cálcio aumenta com a diminuição do grau de esterificação e com o aumento da concentração do polímero (Cardoso *et al.*, 2003). A presença de amidação nas pectinas melhora a tolerância e a reatividade, tornando a pectina mais sensível aos íons cálcio, sendo necessária menor quantidade desses íons para a formação do gel (Axelos e Thibault, 1991).

A conformação em dupla hélice de seqüências de guluronatos do alginato facilita a interação entre as cadeias. Estudos de difração de raio-X mostram que as zonas de junção formadas pelos pares dessas cadeias helicoidais criam cavidades com o formato de losango que podem ser preenchidas por cátions, fortalecendo a interação desses resíduos. Dessa forma, os géis de alginato-Ca são descritos em termos do modelo conhecido como “caixa de ovos” pela semelhança com que os íons cálcio permanecem ligados à cadeia do polissacarídeo, conforme esquematizado na Figura 3.4 (Braccini e Pérez, 2001).

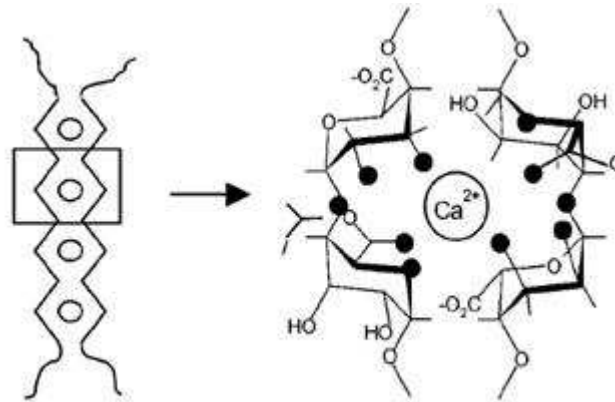


Figura 3.4. Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” para o alginato (Braccini e Pérez, 2001).

O modelo “caixa de ovos” tem sido transposto para descrever também a formação de géis de pectina-cálcio, mas a validade dessa adaptação ainda não foi confirmada por meio de informações estruturais. Essa analogia está baseada, sobretudo, na grande similaridade das estruturas, uma vez que a seqüência dos ácidos α -D-galacturônico da pectina é praticamente imagem especular das regiões de ácidos α -D-gulurônico no alginato (Figura 3.5), e no mesmo comportamento do cálcio em contato com os dois polímeros (Braccini e Pérez, 2001). A principal diferença estaria associada ao fato da cavidade formada pelo arranjo das cadeias da pectina não apresentar o tamanho adequado para a acomodação dos íons cálcio (Braccini e Pérez, 2001; Fang *et al.*, 2008).

Ao contrário dos alginatos, as pectinas não possuem um padrão de distribuição em blocos. As pectinas BTM são usualmente produzidas por desesterificação da pectina ATM para obter habilidade gelificante com cálcio e este processo de desesterificação química e, em alguns casos, o procedimento de amidação, resultam em resíduos livres de ácido galacturônico distribuídos aleatoriamente ao longo da cadeia. Um padrão de distribuição aleatório poderia

introduzir defeitos durante a formação das estruturas caixas de ovos, e poderia, também, suprimir a dimerização. Desta forma, géis pectina BTM-cálcio seriam descritos de forma mais adequada por um modelo “caixa de ovos deformada” (Fang *et al.*, 2008).

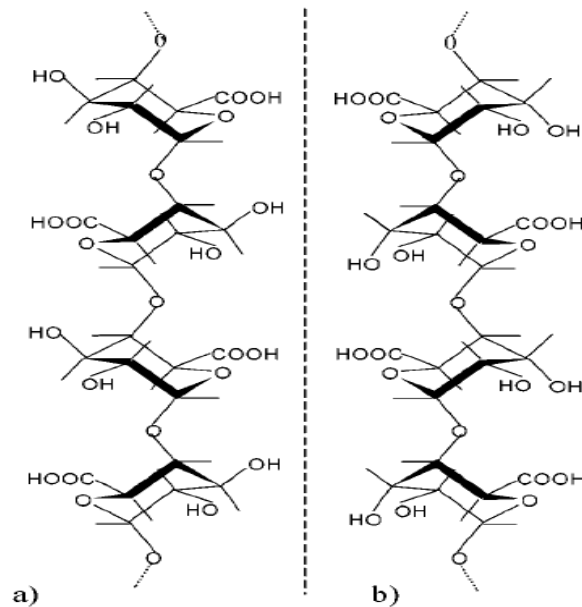


Figura 3.5. Representação das cadeias a) pectina e b) alginato (Braccini e Pérez, 2001).

Nas pectinas BTM, o aumento da concentração de cálcio promove o aumento da força do gel até que uma situação ótima seja atingida. Neste ponto, o gel é forte e elástico. Além deste nível de cálcio o gel torna-se quebradiço, turvo e propenso a sinérese devido às ligações excessivas entre as moléculas, causando contração e aproximação (Siguemoto, 1993). A força do gel também é bastante influenciada pelo pH. Em valores muito baixos ($< 3,0$), as cargas nas cavidades das zonas de junção são neutralizadas pelos íons hidrogênio, podendo ocorrer agregação e precipitação da pectina (Axelos e Thibault, 1991).

3.6 Filmes simples à base de pectina

Existem vários estudos sobre a formação e aplicação de coberturas ou cápsulas de géis de pectina em alimentos ou fármacos, e que, por serem em forma de uma película, são também denominados de filmes. Alguns desses trabalhos, entretanto, produzem filmes independentes para poder determinar características físicas, sobretudo a permeabilidade ao vapor de água (PVA) (Batista, 2004) e intumescimento (Sriamornsak e Kennedy, 2008). Outras

pesquisas avaliam a produção de filmes com pectina ATM, que não necessitam de cálcio para a reticulação, como por exemplo, Maftoonazad *et al.* (2007).

A literatura registra poucas referências sobre a confecção e caracterização de filmes simples de pectina BTM, reticulados com cálcio e contendo plastificante. Um trabalho interessante é de 60 anos atrás, e que estudou o PVA desses filmes sem plastificante (Schultz *et al.*, 1949). Mais recentemente, Kang *et al.* (2005), usando um processo sofisticado, irradiaram a solução filmogênica (à base de pectina e glicerol), formaram o filme que então foi submetido a uma reticulação com cálcio. Em um procedimento ainda mais elaborado, Sriamornsak e Kennedy (2006) reticularam o gel de pectina (e, separadamente, de alginato) pela difusão de cálcio através de uma membrana de diálise. Em trabalhos com filmes de pectina BTM sem reticulação, Parris *et al.* (1995) avaliaram o efeito da adição de diversos plastificantes sobre a PVA e, Batista *et al.* (2005), o efeito da adição de ácidos graxos sobre as propriedades dos filmes de pectina BTM. Pavlath e Robertson (1999) determinaram as propriedades mecânicas e de solubilidade em água de filmes de pectina reticulados com diferentes cátions e sem plastificantes.

3.7 Filmes compostos: alginato e pectina

Na tecnologia de biofilmes, uma exploração mais recente tem sido a fabricação de filmes compostos pelo uso combinado de diversos polissacarídeos, proteínas e lipídios compatíveis, com o objetivo de melhorar suas características (Guilbert *et al.*, 1996). Biofilmes compostos podem então ser desenvolvidos para que sejam aproveitadas as vantagens de cada um dos componentes puros. No entanto, as propriedades mecânicas e de barreira de biofilmes compostos dependem das características e compatibilidade dos biopolímeros envolvidos (García *et al.*, 2004).

Misturas contendo apenas alginatos e pectinas podem formar géis sinérgicos em valores baixos de pH (< 4,0) e em condições nas quais nenhum dos dois compostos puros formariam gel, isto é, na ausência de cálcio e em altas atividades de água (Walkeström *et al.*, 2003). A interação sinérgica entre alginato e pectina é descrita como uma associação heterogênea dos blocos G do alginato e das regiões esterificadas da pectina. Em geral, géis mais fortes são obtidos com alginatos ricos em blocos G e pectinas ATM.

O alginato e a pectina reticulam com o cálcio, formando estruturas moleculares semelhantes e apesar do grande número de estudos sobre esses géis (Walkeström *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2007), pesquisas sobre a fabricação de filmes auto-sustentáveis com esses dois hidrocolóides são limitadas a poucos trabalhos. Da Silva *et al.* (2009) avaliaram a influência do plastificante glicerol sobre as propriedades dos filmes de pectina e alginato (1:1) reticulados com cálcio. Em outro trabalho, Lambrech *et al.* (2009) produziram blendas de pectina BTM e alginato (1:1) sem reticulação e sem plastificante e concluíram que estas apresentavam menor permeabilidade ao vapor de água e estrutura menos porosa do que os respectivos filmes puros.

3.8 Plastificantes

A formação de um filme polimérico envolve forças coesivas que dependem de propriedades como massa molecular, polaridade e estrutura da cadeia e podem resultar em filmes muito quebradiços. No entanto, esta limitação pode ser superada pela adição de um plastificante à formulação, de forma a diminuir as forças intermoleculares, aumentando a mobilidade das cadeias e melhorando a flexibilidade e o alongamento do filme (Sothornvit e Krochta, 2005).

Os plastificantes comumente utilizados em biofilmes são monossacarídeos, oligossacarídeos (glicose, frutose e sacarose), polióis (glicerol e sorbitol) e lipídios (ácidos graxos e tensoativos). Estas substâncias apresentam moléculas pequenas que podem ser facilmente incorporadas entre as cadeias poliméricas, provocando mudanças na temperatura de transição vítrea e, conseqüentemente, nas propriedades físicas, químicas e mecânicas (McHugh e Krochta, 1994).

A principal desvantagem resultante da utilização dos plastificantes hidrofílicos é o enfraquecimento da barreira ao vapor de água dos filmes. O aumento no conteúdo de plastificante pode resultar no aumento na permeabilidade devido à diminuição das forças intermoleculares que permitem a passagem de gases. Desta forma, o plastificante deve ser utilizado em uma quantidade que permita a otimização das propriedades mecânicas com um aumento mínimo na permeabilidade (Sothornvit e Krochta, 2005).

A escolha do plastificante adequado a ser utilizado na formulação depende principalmente da compatibilidade com o polímero e o solvente. Deve apresentar baixa volatilidade, não-toxicidade e ser miscível de forma a não haver separação de fases durante o

processo de secagem. Uma boa compatibilidade, geralmente, é obtida quando o plastificante e o polímero possuem estruturas químicas similares (Guilbert *et al*, 1986; Sothornvit e Krochta, 2005).

A literatura registra muitos trabalhos em que são avaliadas as propriedades de diversos filmes em relação à adição de plastificantes.

Parris *et al.* (1995) estudaram a influência do tipo de plastificante sobre a resistência mecânica e permeabilidade ao vapor de água em filmes puros de alginato e pectina. Foi verificado que a menor permeabilidade foi obtida para os filmes preparados com sorbitol como plastificante, seguido do glicerol e do lactato de sódio. No entanto, os filmes utilizando sorbitol eram mais rígidos e quebradiços, enquanto que os de glicerol e lactato se mostraram mais elásticos.

Em outro trabalho com filmes à base de proteína de soro de leite, McHugh e Krochta (1994) avaliaram o efeito do glicerol e do sorbitol sobre as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao oxigênio. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da permeabilidade ao oxigênio foi maior ao ser aumentada a concentração de glicerol em relação ao sorbitol e que ambos plastificantes causaram o aumento do alongamento dos filmes.

O efeito de diferentes plastificantes sobre as propriedades mecânicas e permeabilidade ao oxigênio foi avaliado em filmes compostos de β -lactoglobulinas. Os filmes confeccionados com glicerol e polietilenoglicol mostraram-se mais eficientes quanto às propriedades mecânicas (Sothornvit e Krochta, 2001) e os filmes contendo sacarose e sorbitol foram os melhores quanto à permeabilidade ao oxigênio (Sothornvit e Krochta, 2000).

Os ácidos graxos com comprimentos de cadeia carbônica de seis a dez carbonos também podem fornecer efeito plastificante aos filmes (Pommet *et al.*, 2003). Nos estudos realizados por Batista (2004), foi verificado que a adição de 18% de ácido láurico e esteárico às formulações aumentou significativamente o alongamento dos filmes de pectina BTM. Entretanto, apesar da hidrofobicidade dos ácidos graxos, houve também aumento significativo da permeabilidade ao vapor de água.

3.9 Caracterização dos filmes

3.9.1 Espessura

O controle da espessura é um parâmetro de grande importância, pois influencia diretamente outras propriedades funcionais dos biofilmes e é fundamental para a análise da repetibilidade e validação das comparações. Quando a técnica *casting* é utilizada na confecção dos filmes, a uniformidade da espessura pode ser obtida pela fixação do volume ou da massa de solução vertida sobre as placas de secagem.

Nas pesquisas de Cuq *et al.* (1996a) com filmes de proteína miofibrilar, a tensão na ruptura mostrou uma relação diretamente proporcional à espessura dos filmes. Este comportamento estaria relacionado ao aumento das interações intermoleculares nos filmes de maior espessura. Já as propriedades de barreira são afetadas de forma diferente pela espessura. Park e Chinnan (1995) verificaram que a permeabilidade aos gases O₂ e CO₂ diminui e a permeabilidade ao vapor de água aumenta linearmente com o aumento de espessura dos filmes devido a tensões internas provocadas pela alteração da estrutura dos filmes. Martin-Polo *et al.* (1992) também estabeleceram uma relação linear entre a espessura e permeabilidade ao vapor de água em filmes de metilcelulose adicionados de compostos hidrofóbicos.

Algumas condições utilizadas durante o processo de confecção podem modificar a espessura dos filmes. Um estudo realizado com filmes de glúten de trigo, avaliando diferentes temperaturas de secagem (20, 50 e 80°C), revelou que a espessura reduziu significativamente com o aumento da temperatura de secagem (Kayseriliuğlu *et al.*, 2003).

A espessura também mostrou ser influenciada pelo método de reticulação. Rhim (2004) preparou filmes de alginato de cálcio reticulados pela adição do CaCl₂ à solução filmogênica e pela imersão dos filmes na solução iônica. Os filmes resultantes do último método apresentaram menor espessura, podendo ter ocorrido devido à solubilização do alginato na solução iônica durante a imersão. Os resultados do trabalho também mostraram que a espessura aumentou com o aumento da concentração de cálcio na solução de imersão, indicando que um maior grau de reticulação diminui a solubilização dos filmes.

Dependendo do polissacarídeo, os filmes podem apresentar diferentes espessuras para a mesma quantidade e concentração. Os filmes de pectina, por exemplo, tendem a ser

mais finos do que os filmes de alginato, pois alcançam um arranjo molecular mais compacto, fato atribuído à menor massa molecular da pectina em relação ao alginato (Sriamornsak e Kennedy, 2008).

3.9.2 Solubilidade em água

O conhecimento da solubilidade em água é importante, uma vez que serve de parâmetro para a definição das possíveis aplicações. Proteções e embalagens para indústria alimentícia exigem que os biofilmes sejam insolúveis em meio aquoso de forma a atuar como barreira protetora à transferência de umidade do meio externo e manter a integridade de produtos com alta atividade de água.

Filmes com alta solubilidade podem ser interessantes na aplicação de produtos que exigem hidratação prévia ao consumo, como sopas instantâneas, ou como coberturas de sementes agrícolas que necessitem de rápida germinação (Batista, 2004).

O alginato e a pectina são polissacarídeos altamente higroscópicos e se desintegram rapidamente em água (Shih, 1996). A adição de compostos com natureza hidrofóbica como os ácidos graxos seria uma alternativa para superar esta limitação, porém se estes não forem corretamente incorporados à matriz filmogênica, podem facilitar a solubilização pela exposição da matriz do hidrocolóide ou ainda causar danos às propriedades óticas e mecânicas (Batista, 2004).

A baixa solubilidade também pode ser alcançada pelo processo de reticulação dos polissacarídeos com íons divalentes. As fortes ligações tridimensionais formadas pelo processo de reticulação dificultam a separação das cadeias impedindo a penetração do solvente através do filme. Zactiti e Kieckbusch (2006) conseguiram reduzir a solubilidade dos filmes de alginato para menos de 5%, ao realizar a reticulação com íons cálcio.

Altos valores de solubilidade em água para filmes contendo glicerol podem estar relacionados à evaporação do plastificante durante o ensaio gravimétrico em estufa à 105°C. Em um estudo que avaliou diferentes condições e temperaturas de secagem de géis de alginato, foi verificado que o processo de secagem em temperaturas de 60°C resultavam em filmes mais finos e com menor elasticidade em relação aos filmes secos em temperaturas mais baixas, indicando uma possível perda de glicerol nesta temperatura (da Silva *et al.*, 2010).

3.9.3 Grau de intumescimento

Quando uma matriz ou um filme é imerso em água, o intumescimento ocorre até que a força osmótica que fortalece a reticulação da rede polimérica seja balanceada pela força elástica dos segmentos deformados do polímero. Esta força elástica dos segmentos é inversamente proporcional à capacidade do intumescimento do filme (Kim *et al.*, 2002).

No momento em que os filmes entram em contato com o meio aquoso, vários processos ocorrem simultaneamente. A superfície do filme é umedecida pelo meio e as moléculas são hidratadas, lentamente desagregadas e os filmes intumescem. A expansão do filme devido à penetração de água é limitada pela rigidez intrínseca do polissacarídeo, pela extensão do grau de reticulação e por associações intra ou intermoleculares. Uma redução da extensão da reticulação teria a tendência de reduzir das forças retrativas, aumentando a quantidade de água sorvida (Sriamornsak e Kennedy, 2008).

Sriamornsak e Kennedy (2008) realizaram um estudo avaliando o intumescimento de filmes de alginato e pectina, concluindo que o último apresenta um intumescimento maior e mais lento. Os filmes de alginato atingiram o equilíbrio de hidratação em aproximadamente 2 horas, enquanto que os de pectina levaram o dobro do tempo para atingir o equilíbrio. Os autores também verificaram que os filmes de pectina apresentaram a metade do teor de cálcio do que os filmes de alginato, o que explicaria o maior intumescimento. Com um baixo grau de reticulação, a interação das cadeias não permite uma estruturação eficiente (Sriamornsak e Kennedy, 2008).

Neste mesmo trabalho, os filmes confeccionados com a pectina com grau de amidação apresentaram um grau de intumescimento (GI) maior do que a pectina sem amidação devido à presença dos grupos amida, que induzem a uma redução dos grupos carboxílicos livres para a ligação com os íons cálcio.

O grau de intumescimento também é uma propriedade importante na predição do comportamento de filmes que serão utilizados em liberação controlada, pois modificações na estrutura da matriz polimérica causadas pelo intumescimento influenciarão na difusividade do antimicrobiano através do filme (Zactiti, 2004).

3.9.4 Propriedades mecânicas

Para que os produtos acondicionados em embalagens de biofilmes, ou até mesmo os alimentos contendo coberturas não percam a proteção pelo manuseio, transporte ou armazenamento, é necessário que os materiais tenham resistência à ruptura e alongamento adequados. Estas medidas são importantes na caracterização dos biofilmes, pois fornecem informações sobre a magnitude das forças intermoleculares envolvidas na estabilização da matriz polimérica e sobre quantidade de energia que o material é capaz de absorver antes do rompimento (Robertson, 1993).

As propriedades mecânicas podem ser avaliadas pelo teste de tração, onde a força aplicada ao filme é registrada à medida que este é deformado a uma velocidade constante. Uma curva característica de tensão na ruptura *versus* deformação de filmes flexíveis revela que inicialmente existe uma resistência crescente à solicitação de tração, a qual provoca o alongamento. A partir de um certo ponto, é possível alongar o filme sem que este responda com um aumento de resistência até que ocorra sua ruptura (Oliveira *et al.*, 1996).

Vários fatores afetam diretamente as propriedades mecânicas, como a natureza do material filmogênico e a coesão da estrutura da matriz polimérica, que está relacionada com a distribuição e concentração inter e intramolecular na estrutura filmogênica (Cuq *et al.*, 1996b). Em nível macroscópico, as propriedades dependem da formulação, como a adição de plastificantes e concentração de biopolímero, metodologia de confecção, reticulação e modo de aplicação.

Materiais diferentes exibem padrões de tração diferentes. Os polissacarídeos apresentam elevada resistência à tração e pouco alongamento, já as proteínas possuem moderada resistência à tração e elevado alongamento. Essas diferenças podem ocorrer devido a diferenças na estrutura molecular. As cadeias polissacarídicas são essencialmente lineares enquanto que as protéicas possuem uma estrutura complexa (Chen, 1995).

Macleod *et al.* (1997) estudaram as propriedades mecânicas e de permeabilidade de filmes de pectina e etilcelulose para aplicação em sistemas de liberação de fármacos. Foi observado que o aumento da quantidade de pectina nos filmes provocou a diminuição da resistência à tração e do alongamento, tornando os filmes mais rígidos e quebradiços. Os resultados mostraram que existe uma quantidade limite de pectina que pode ser utilizada para obter um filme com resistência mecânica satisfatória.

Rhim (2004), ao avaliar as propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio pelos dois métodos de reticulação, verificou que os filmes reticulados por imersão apresentaram aumento na resistência mecânica e diminuição do alongamento na ruptura. Estes resultados seriam conseqüência do processo lento de reticulação por imersão, que favorece uma reticulação homogênea. No caso da incorporação do sal à solução, a reticulação é instantânea e se não forem adotados cuidados no controle da reação, forma-se uma estrutura não homogênea.

Em um estudo com filmes de pectina confeccionados pelo método combinado de imersão em solução contendo CaCl_2 com irradiação gama foi verificado que na ausência de irradiação, a tensão na ruptura aumentou com o aumento da concentração de CaCl_2 e que o alongamento diminuiu (Kang *et al.*, 2005).

A influência da adição de plastificantes sobre as características mecânicas dos filmes está evidenciada no trabalho de Coffin e Fishman (1994), em que filmes a base de pectina e amido adicionados de glicerol sofreram redução na resistência à tração e aumento no alongamento. Em 1948, Schultz e colaboradores já haviam observado esta tendência de diminuição da força com o aumento da concentração do plastificante em filmes de pectina.

Um parâmetro importante a ser monitorado durante a realização dos ensaios mecânicos é a umidade relativa. Altas umidades relativas no ambiente promovem um aumento de umidade no filme e conseqüentemente um efeito plastificante, levando a uma diminuição significativa na força de ruptura devido a mudanças conformacionais na estrutura molecular (Cuq *et al.*, 1996). Neste caso, a água funciona como um plastificante.

3.9.5 Permeabilidade ao vapor de água

Muitos efeitos indesejáveis nos produtos alimentícios como o crescimento de microrganismos, alterações de cor, sabor e textura e ressecamento são ocasionados devido ao ganho ou a perda de umidade (Oliveira *et al.*, 1996). Para esses alimentos a embalagem deve funcionar como uma barreira à passagem de vapor d'água, de modo a lhes assegurar a estabilidade.

Essa característica de barreira pode ser avaliada pela taxa de permeabilidade ao vapor de água, definida como a taxa de transmissão de vapor de água através de um filme de

espessura conhecida, por unidade de área, induzida por um gradiente de pressão parcial de vapor d'água entre as superfícies do material (Debeaufort *et al.*, 1998).

Uma das formas de se avaliar a taxa de permeabilidade ao vapor de água de filmes é através do método gravimétrico, o qual é baseado no aumento de peso de um material higroscópico colocado no interior de uma cápsula impermeável e isolado do meio ambiente pelo material de embalagem, cuja taxa de permeabilidade se deseja conhecer. A cápsula é colocada em um ambiente com umidade relativa e temperatura constante e o ganho de peso da cápsula ao longo do tempo é usado para calcular a taxa de permeabilidade através do material (Oliveira *et al.*, 1996).

A transferência de água em materiais poliméricos ocorre através da difusão molecular. Este processo envolve três etapas: a absorção na matriz polimérica; a migração através dos poros formados na cadeia polimérica e posterior dessorção a partir da outra superfície do filme (Kester e Fennema, 1986).

Entre os fatores que afetam a permeabilidade ao vapor de água nos biofilmes destacam-se a natureza do material permeante, o plastificante, o grau de reticulação, a polaridade e as interações entre as cadeias poliméricas (Kester e Fennema, 1986). Pesquisas realizadas por Guilbert *et al.* (1986) demonstraram que o aumento da cristalinidade, da densidade ou massa molecular resultava em diminuição da permeabilidade.

A estrutura molecular das matrizes poliméricas também é um parâmetro de grande influência nas propriedades de barreira. Segundo McHugh e Krochta (1994), filmes com baixa permeabilidade são obtidos a partir de matrizes formadas por cadeias poliméricas lineares simples, pois atingem um maior empacotamento. A presença de cadeias laterais na matriz conduz a um aumento nos espaços livres facilitando a difusão do permeante.

Em trabalhos como o de Parris *et al.* (1995), a permeabilidade ao vapor de água de filmes confeccionados a partir da pectina, que possui cadeias ramificadas, mostrou-se superior aos filmes de alginato, cuja cadeia é linear.

Outros estudos verificaram que o aumento no grau de reticulação dos filmes é eficaz na melhora das propriedades de barreira. Pavlath *et al.* (1999) reportaram que a PVA de filmes de pectina com imersão em 5% de CaCl_2 foi três vezes menor do que aqueles sem o

tratamento. Filmes de alginato imersos em soluções de diferentes concentrações de CaCl_2 apresentaram melhores resultados com maiores graus de reticulação (Rhim, 2004).

3.9.6 Temperatura de transição vítrea

A temperatura de transição vítrea (T_g) corresponde ao valor médio da faixa de temperatura que, durante o aquecimento do material polimérico de uma temperatura muito baixa, para valores mais altos, permite que as cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade (Canevarolo, 2004).

As propriedades dos filmes são fortemente dependentes da temperatura de transição vítrea e, por isso, esse fenômeno tem despertado muito interesse na tecnologia de filmes (Mendieta-Taboada *et al.*, 2008). Abaixo da T_g o polímero não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação à outra por mudanças conformacionais. Neste estado, o material é caracterizado como duro, vítreo e quebradiço. Por outro lado, em temperaturas acima da T_g o material é macio e borrachento (Canevarolo, 2004; Mendieta-Taboada *et al.*, 2008).

A técnica de análise dinâmico-mecânica (DMA) é muito utilizada na determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) permitindo a determinação de transições secundárias, que estão relacionadas à relaxação de grupos ou parte de grupos laterais da cadeia polimérica e, também, da temperatura de fusão dos cristais (T_m) de polímeros parcialmente cristalinos (Lucas *et al.*, 2001).

Dentre as propriedades visco-elásticas determinadas neste teste, estão o módulo de armazenamento (E'), o módulo de perda (E'') e o ângulo de fase, normalmente calculado como $\tan \delta$. O módulo de armazenamento representa a energia mecânica armazenada no sistema (porque a resposta do sólido é elástica) por ciclo, enquanto que o módulo de perda representa a energia dissipada por ciclo, que pode ser atribuída ao movimento de longos segmentos da cadeia principal, ou a relaxações de segmentos laterais resultantes, por exemplo, de rotações em torno de ligações.

A tangente de perda, também denominada de fricção interna ou amortecimento, expressa a capacidade de um material em converter energia mecânica em calor, e é considerado muito útil na caracterização de sistemas poliméricos. Pode ser calculado pela

razão entre a energia interna dissipada por ciclo e a energia potencial máxima armazenada durante o ciclo (Equação 3.1).

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (3.1)$$

Quanto mais facilmente uma cadeia se move, menor é a energia necessária para que o polímero passe do estado rígido ou vítreo para o estado elastomérico. Assim, materiais mais rígidos irão apresentar valores de $\tan \delta$ menores e, do mesmo modo, materiais mais flexíveis vão apresentar valores de $\tan \delta$ maiores. (Lucas *et al.*, 2001).

A Figura 3.6 ilustra o comportamento observado em uma curva típica de uma análise dinâmico-mecânica.

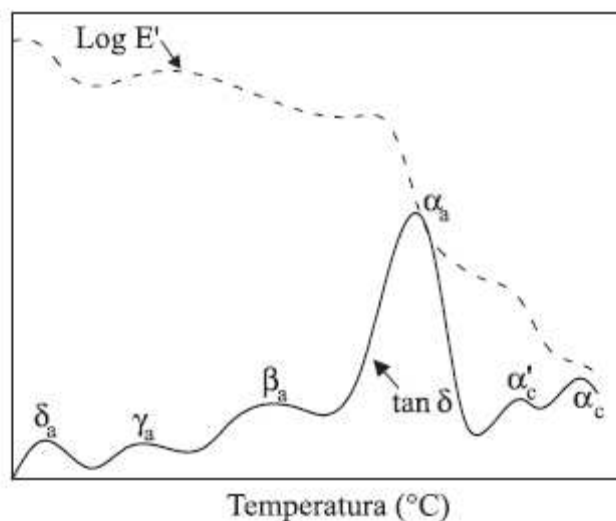


Figura 3.6. Representação gráfica do comportamento térmico dinâmico-mecânico com as curvas E' e $\tan \delta$, incluindo-se as relaxações primárias e secundárias (Mendieta-Taboada *et al.*, 2008).

As transições que ocorrem nas moléculas podem ser divididas em transições na fase amorfa e transições que na fase cristalina. As relaxações primárias são descritas pela letra grega α . A relaxação acentuada da fase amorfa, representada por um pico intenso, refere-se à temperatura de transição vítrea e é denominada por α_a e a temperatura de fusão cristalina é representada por α_c (Lucas *et al.*, 2001).

Movimentos menos significativos que ocorrem principalmente abaixo da temperatura de T_g são denominados de relaxações secundárias sendo comumente representadas pelas letras δ , β , γ . Estas relaxações referem-se a movimentos de grupos ou parte de grupos laterais da cadeia polimérica quando a cadeia principal não apresenta movimento (Mendieta-Taboada *et al.*, 2008).

O valor da T_g é governado principalmente pela composição química e pela presença de plastificantes e, secundariamente pelas características estruturais, como: ramificações da cadeia, ligações cruzadas e cristalinidade (Rogers, 1985).

Segundo Rodolfo Jr. (2006), a temperatura de transição vítrea diminui com a presença de plastificante porque estes atuam entre as cadeias poliméricas afastando-as uma das outras, sendo que este afastamento reduz as forças de atração intermolecular secundárias, aumentando a mobilidade das cadeias, ou seja, “lubrificando-as”. Esta “lubrificação” molecular reduz o nível energético necessário para dar mobilidade às cadeias, conseqüentemente reduzindo a temperatura de transição vítrea do polímero. Este autor exemplifica que a temperatura de transição vítrea que ocorre a 80°C para o PVC rígido (não-plastificado) reduz para 60, 10 e -30 °C quando a concentração de plastificante é aumentada para 10, 30 e 50%, respectivamente.

Este comportamento também fica evidenciado no estudo de Fishman e Coffin (1998), que produziram blendas de pectina e polivinilalcool e determinaram uma T_g de 43°C. Ao adicionarem glicerol (30%) este valor foi reduzido para -27°C. Os filmes simples de pectina com glicerol apresentaram T_g de -33°C.

O conhecimento da temperatura de transição vítrea dos filmes biodegradáveis ajuda na escolha das melhores condições de armazenamento, sendo esperado que a permeação a gases e ao vapor de água através dos filmes seja maior acima da T_g , onde as cadeias dos polímeros estão em maior movimento (Rogers, 1985). A determinação da temperatura de transição vítrea também é importante para os filmes antimicrobianos, pois abaixo desta, praticamente não há difusão inviabilizando a liberação do agente ativo.

3.10 Filmes ativos antimicrobianos

Nas últimas décadas vários países têm desenvolvido sistemas inovadores de embalagens ativas capazes de interagir de forma desejável com os alimentos (Rooney, 1995).

Além de proteger o produto embalado dos mais freqüentes mecanismos de deterioração, esta transformação visa atender às crescentes exigências dos consumidores em relação à segurança alimentar e produtos minimamente processados (Han, 2005).

As embalagens ativas são aquelas que, além de promover uma barreira ao ambiente externo, exercem alguma função específica complementar na preservação de alimentos. Exemplos tradicionais de embalagens ativas envolvem sistemas de liberação de aromas e sabores, agentes antimicrobianos e antioxidantes, reguladores de umidade interna e absorvedores de oxigênio. Portanto, com base no conhecimento da degradação de alimentos e das condições de estocagem é possível especificar as propriedades das embalagens ativas de maneira a se controlar o ambiente ao redor do produto, aumentar sua vida-de-prateleira e melhorar as características sensoriais (Rooney, 1995).

O objetivo destes sistemas em embalagens alimentícias é a transferência do agente ativo incorporado na matriz polimérica para o alimento, de maneira a manter uma concentração predeterminada na superfície do composto ativo na superfície por um determinado tempo, e dessa forma, prevenir ou inibir o crescimento de microorganismos deterioradores ou patogênicos no alimento (Buonocore *et al.*, 2003). A tecnologia de liberação controlada tem suas raízes na indústria farmacêutica e vem sendo investigada e utilizada em outras áreas, tais como de fertilizantes e alimentos (Pothakamury e Barbosa-Canovas, 1995).

As embalagens antimicrobianas são consideradas promissoras uma vez que o ingrediente antimicrobiano não faz parte da formulação do alimento, o que poderia comprometer as características sensoriais do mesmo. Além do comprometimento sensorial, quando os aditivos são aplicados diretamente na superfície dos produtos, pode ocorrer difusão do conservante para o interior do alimento, reduzindo a concentração na superfície, onde os processos de deterioração geralmente têm início, diminuindo sua eficácia antimicrobiana (Kester e Fennema, 1986). Outra vantagem observada é que esse tipo de sistema permite eliminar a etapa de esterilização química, simplificando o processo de assepsia da embalagem.

Diversos produtos têm sido utilizados para controle microbiológico em alimentos com destaque para os ingredientes antimicrobianos químicos. Estes ingredientes possuem, em geral, limites máximos de concentração devido aos possíveis riscos provocados pelo seu consumo, estabelecidos de acordo com o produto no qual o ingrediente será aplicado. Benzoato de sódio e sorbato de potássio são muito utilizados como agentes antimicrobianos para inibir o desenvolvimento de mofo, levedo e bactéria em produtos alimentícios e são aceitos

pela legislação (Han, 2005). Para aplicações em filmes de alginato, o sorbato, entretanto, apresenta uma série de problemas, como uma fácil lixiviação. Durante as etapas de confecção do filme ele forma sais insolúveis com o cálcio, que se depositam na superfície e não produz efeito antimicótico em ensaios com culturas de microorganismos representativos (da Silva, 2009).

As propriedades físicas e mecânicas dos materiais de embalagem são afetadas pela incorporação dos agentes antimicrobianos. Se o agente for compatível com os materiais de embalagem, uma quantidade significativa pode ser empregada mantendo a integridade de suas propriedades. Entretanto, um excesso de agente antimicrobiano que não é capaz de ser incorporado ao material formará heterogeneidades que podem diminuir a força física e a integridade mecânica (Han, 2005).

O projeto de um sistema de embalagem ativa requer um compromisso entre a tecnologia de liberação controlada e cinética de crescimento microbiano. Quando a taxa de migração do agente é lenta demais para manter a concentração acima da concentração mínima inibitória, o microorganismo pode crescer instantaneamente, antes da liberação do agente antimicrobiano (Rooney, 2005).

3.11 Natamicina

A natamicina (Figura 3.7) é um antimicótico poliênico, produzida pela fermentação da bactéria *Streptomyces natalensis*, ativa contra uma grande variedade de fungos filamentosos e leveduriformes, incluindo os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cândida*. Seu uso é autorizado pela legislação brasileira como aditivo para preservação de alimentos sendo empregada, principalmente, no controle de crescimento fúngico na superfície de queijos, produtos cárneos e salsichas (Danisco, 2009). De acordo com a Resolução nº 28 da Anvisa (Brasil, 2001), o uso da natamicina é permitido no limite máximo de 1mg/dm² e deve estar ausente em 2 mm de profundidade em queijos e 5mm em embutidos e produtos cárneos.

A natamicina possui alta massa molar (665,73 g/mol) e baixa solubilidade em água (0,0520mg/mL). Apresenta maior estabilidade na forma de pó e na ausência de calor e luz. A estabilidade é afetada, principalmente, pelo pH (abaixo de 5 e acima de 9), por exposição à radiação UV, luz solar, altas temperaturas (principalmente acima de 100°C) e por oxidantes

químicos. A ingestão oral de natamicina em doses superiores a 300 mg/dia pode ocasionar náuseas, vômitos e diarreia (Pedersen, 1992; Sullof, 1999).

Entre as principais vantagens da natamicina destacam-se a não migração para o interior dos alimentos quando aplicada na superfície; boa relação custo-benefício, visto que existe alta eficiência com baixas concentrações (1-20 ppm); possível aplicação em produtos fermentados, pois não tem ação contra bactérias e baixa influência sobre o sabor, aroma e cor do produto alimentício (Danisco, 2009).

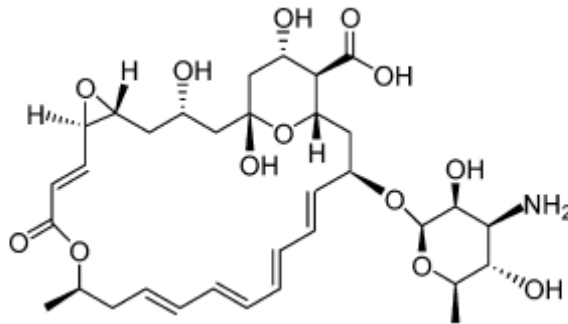


Figura 3.7. Estrutura química da natamicina (Chen *et al.*, 2008).

Oliveira *et al.* (2007) elaboraram filmes de celulose incorporados com diferentes concentrações de natamicina e avaliaram o seu efeito contra o fungo *Penicillium roqueforti* na superfície de queijos do tipo gorgonzola. Resultados satisfatórios foram obtidos para a inibição fúngica com filmes contendo 2 e 4% de natamicina. Os autores observaram que a quantidade de natamicina liberada para manter a atividade no queijo foi inferior à quantidade máxima permitida por legislação e, também, inferior à quantidade encontrada no queijo controle (produzido com imersão em solução de natamicina).

Filmes de celulose com natamicina também foram avaliados por Pires *et al.* (2008) e mostraram-se efetivos *in vitro* contra *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp., indicando potencial aplicação como embalagem ativa para queijos muzzarela. Em outro estudo, a natamicina foi capaz de prevenir o crescimento de mofo durante um período de dois meses em queijos do tipo Kashar (Var *et al.*, 2006). Pintado *et al.* (2010) demonstraram o efeito inibitório de filmes de proteína do soro de leite contendo ácido maleico, nisina e natamicina sobre microorganismos patogênicos e deteriorantes da superfície do queijo, como *L. monocytogenes*, *Ps. aeruginosa*, *Y. lipolytica* e *P. commune*.

No trabalho de Türe *et al.* (2009), foram avaliadas as propriedades físicas de filmes de glúten de trigo e de metilcelulose incorporados com natamicina e não foram observadas mudanças consideráveis nas propriedades mecânicas e na permeabilidade ao vapor de água que pudesse afetar as aplicações. Os mesmos autores, em outro trabalho utilizando os mesmos biopolímeros, relataram que a concentração inibitória mínima foi de 2 e 1 mg de natamicina por 10g de solução filmogênica contra o *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti*, respectivamente (Türe *et al.* 2008).

A maioria dos estudos relata o uso da natamicina em queijos e produtos cárneos, uma vez que ela é permitida para esta classe de alimentos, mas também já foram realizados trabalhos onde o antimicrobiano é utilizado na superfície de frutas. Cong *et al.* (2007) utilizaram a natamicina como cobertura de superfície de melão Hami para armazenamento à temperatura ambiente. Os autores observaram significativa eficácia no controle dos dois principais agentes causadores da podridão desta fruta, o *Fusarium* e a *Alternaria*. Neste mesmo trabalho, a aplicação da natamicina em combinação com filmes de quitosana e cera de polietileno diminuiu a intensidade da deterioração e a perda de peso durante a armazenagem.

3.12 Transporte de substâncias ativas em filmes poliméricos

A liberação de um agente ativo ocorre devido à difusão através da matriz polimérica, que por definição corresponde a um processo de transferência de massa de moléculas individuais de uma substância através de um movimento aleatório e associado a um gradiente de concentração. A difusão pode ser vista como um processo no qual a concentração tende a se igualar em todos os pontos do sistema com o passar do tempo.

Quando um soluto se move através de uma matriz polimérica, a força motriz para transferência de massa é a diferença de concentração. Conseqüentemente, a difusividade e a solubilidade do soluto são as duas principais interações que governam a taxa de transporte ou liberação no sistema matricial específico e podem ser aplicados para estimar o perfil de concentração de uma substância ativa no filme (Han, 2000).

Para processos de difusão de massa em regime permanente, com concentrações constantes com o tempo, a equação que correlaciona o fluxo de difusão com o gradiente de concentração é a Equação 3.2, conhecida como Primeira Lei de Fick (Cussler, 1997).

$$j = -D \frac{dC}{dz} \quad (3.2)$$

Onde: j é o fluxo da substância ativa no filme ($\text{g}/\text{cm}^2.\text{s}$), D é a difusividade da substância ativa (cm^2/s) e dC/dz é o gradiente de concentração da substância ativa no filme ($\text{g}.\text{cm}^{-3}/\text{cm}$).

Entretanto, a maioria das situações práticas envolvendo difusão, bem como a difusão de um princípio ativo incorporado em um filme, ocorre em condições transientes. Neste tipo de difusão, tanto o fluxo quanto o gradiente de concentração numa dada posição, variam com o tempo. Como resultado, ocorre um acúmulo ou esgotamento do componente que se encontra em difusão. Este processo é descrito pela 2ª Lei de Fick (Eq. 3.3).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (3.3)$$

Os métodos de regime transiente, conhecidos como ensaios de liberação ou migração, medem a taxa de difusão enquanto o soluto se difunde para dentro ou para fora da matriz em uma solução bem agitada. O filme é imerso em água (ou outro sorvedouro) e o aumento de concentração do agente antimicrobiano é monitorado periodicamente para se calcular a fração de massa liberada (M_t/M_∞) com o tempo (Han, 2000). A equação diferencial (3.3) pode ser integrada, e quando se considera a difusividade e a espessura do filme constantes e que a transferência do soluto ocorre pelas duas faces do filme obtém-se a massa total de soluto transferido em um intervalo de tempo de 0 a t através da Equação 3.4 (Cussler, 1997).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 D}{\delta^2} t\right) \quad (3.4)$$

Onde M_∞ é a massa de soluto que seria liberada em um tempo infinito e δ é a espessura do filme.

Para a identificação do mecanismo envolvido no processo de difusão de um sistema plano, deve-se plotar a curva de liberação nos instantes iniciais ($M_t/M_\infty < 0,60$), conhecido como Modelo da Lei da Potência descrito pela Equação 3.5.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.5)$$

Neste modelo, k é uma constante associada às características estruturais e geométricas dos dispositivos e n é o expoente que define o mecanismo de liberação. O valor do expoente de liberação (n), calculado por esta equação, está relacionado ao tipo de liberação apresentado pela matriz. Quando o valor de n for igual a unidade ($n=1$), a taxa de liberação do agente ativo é independente do tempo, correspondendo a uma cinética de ordem zero, também conhecida como transporte caso-II. Neste caso a liberação é controlada pelo intumescimento e desestruturação do filme. Quando n for igual a 0,5 o mecanismo de liberação é controlado por difusão e tem-se um transporte Fickiano do tipo I. Valores de n entre 0,5 e 1,0 podem ser considerados como um indicador para a superposição dos fenômenos de difusão e relaxação (transporte anômalo) (Siepmann e Peppas, 2001).

Para mecanismos de difusão Fickiana ($n=0,5$), o coeficiente de difusão pode ser calculado pela Equação 3.6 chamada de Modelo de Sólido Semi-infinitos e também conhecida como solução de tempo curtos.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\delta^2 \pi}} \quad (3.6)$$

Pesquisas no LEPPbio indicam que a solução da 2ª Lei de Fick válida para tempos curtos ($M_t/M_p < 0,6$) pode ser ajustada aos resultados obtidos, fornecendo com boa precisão e valor da difusividade efetiva (D_{ef}) do soluto no filme. Valores de D_{ef} de $1,65 \cdot 10^{-11}$ cm²/s foram encontrados para a difusão da natamicina em filmes de alginato reticulados com Ca⁺⁺ (da Silva, 2009)

Segundo George e Thomas (2001), a difusão em polímeros é dependente do volume livre e da mobilidade das cadeias poliméricas. A mobilidade das cadeias é afetada pela extensão de insaturações, grau de reticulação, grau de cristalinidade e natureza dos substituintes. A temperatura de transição vítrea de polímeros também exerce grande influência na difusão. Polímeros com baixa temperatura de transição vítrea possuem grande mobilidade das cadeias quando utilizados em temperatura ambiente e, portanto terão alta difusividade.

Zactiti e Kieckbusch (2006) observaram que o aumento do grau de reticulação em filmes de alginato contendo sorbato de potássio diminui a mobilidade do soluto, diminuindo o valor da difusividade em água.

O elevado intumescimento que ocorre nos primeiros minutos dos filmes de contato com a água pode afetar os resultados de difusividade, principalmente das determinações por tempos curtos. O modelo ideal para os cálculos seria um modelo que associasse a difusão do líquido ao intumescimento da matriz e a difusão do agente ativo. Buonocore *et al.* (2003), desenvolveram um modelo matemático levando em consideração estes fatores e obtiveram bons resultados para filmes de polivinilálcool contendo lisozima, nisina e benzoato de sódio como agentes antimicrobianos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

Para a confecção dos filmes, foi utilizado alginato de sódio de média viscosidade (Sigma, EUA) extraído de algas *Macrocystis Pyrifera* e, portanto, com alto conteúdo de blocos M. A pectina de baixo teor de metoxilação (30%), parcialmente amidada (19%), do tipo GENU[®] LM-101 e obtida a partir de frutas cítricas foi cedida pela Cp Kelco (Limeira, Brasil).

4.2 Reagentes

Como plastificante, foi utilizado o glicerol (Synth, Diadema, Brasil), e como agente reticulante, foi utilizado o cloreto de cálcio dihidratado, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Alemanha).

4.3 Agente antimicrobiano

O agente antimicrobiano para elaboração dos filmes ativos foi a natamicina cedida pela Danisco (Dinamarca).

4.4 Processo de confecção dos filmes

A elaboração dos filmes seguiu o método composto de dois estágios desenvolvido para a elaboração de filmes de alginato de cálcio por Zactiti e Kieckbusch (2005) com adaptações para o caso da pectina.

Foram confeccionados filmes simples de pectina e filmes compostos de pectina e alginato em cinco diferentes proporções conforme está apresentado na Tabela 4.1.

A quantidade total de biopolímero adicionada à solução filmogênica foi mantida em 6g (1,5%) a fim de que os filmes pudessem ser comparados aos filmes simples de alginato já desenvolvidos com esta concentração em outros trabalhos realizados pelo grupo de pesquisas (Zactiti, 2004; da Silva, 2009).

Tabela 4.1. Proporções de pectina e alginato utilizadas em cada formulação.

| Formulação | Pectina (%) | Alginato (%) |
|------------|-------------|--------------|
| FC1 | 100 | 0 |
| FC2 | 90 | 10 |
| FC3 | 70 | 30 |
| FC4 | 50 | 50 |
| FC5 | 30 | 70 |
| FC6 | 10 | 90 |

No primeiro estágio, glicerol na quantidade de 0,6 g/g de biopolímero foi solubilizado em 400 mL de água destilada por 15 minutos com agitação mecânica de 900 rpm (Tecnal, modelo TE-139, Piracicaba, Brasil). Em seguida, adicionou-se 6g de biopolímero, mantendo-se a agitação por 1 hora para completa dissolução. A solução foi aquecida a 70°C e pré-reticulada com a adição de 30 mL de solução de CaCl₂ a uma vazão de 1mL/min por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo 77120-70, EUA). Durante o processo de pré-reticulação, a solução foi mantida na temperatura de 70°C por meio de uma manta aquecedora (Fisaton, modelo 67, São Paulo, Brasil). A solução pré-reticulada ainda quente foi então transferida em alíquotas de 50g para placas de acrílico (15 cm x 15 cm x 1 cm), que foram mantidas em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 099EV, São Paulo, Brasil) a 40°C durante um período de 20 horas. Após este período os filmes foram retirados dos suportes e armazenados durante 48 horas em ambiente a 25°C e 52% de umidade relativa.

Para todas as formulações, a massa de solução vertida sobre os moldes foi fixada em 50g, pois em ensaios preliminares testando diversas alíquotas de solução foi verificado que esta era a menor quantidade utilizada que resultava em filmes finos, fáceis de retirar das placas e com boa manuseabilidade. Filmes confeccionados com quantidades menores eram de difícil manipulação e também muito difíceis de serem retirados das placas sem que houvesse rupturas, especialmente quando somente a pectina era utilizada como matéria-prima. Essa aplicação de 50g corresponde a 0,222 g/cm² de placa ou, aproximadamente, 5 mg de sólidos mais glicerol/cm².

No segundo estágio, os filmes obtidos na primeira etapa foram imersos em 50 mL de solução de cloreto de cálcio com glicerol durante diferentes períodos de tempo. Os filmes foram colocados sobre placas de acrílico e secos em um túnel com circulação de ar a temperatura ambiente (Figura 4.1) e umidade relativa superior a 60%. Durante este processo,

hastes de metal foram utilizadas para fixar as bordas dos filmes e evitar o enrugamento durante a secagem.



Figura 4.1. Túneis com exaustão de ar utilizados na secagem dos filmes no 2º estágio.

Foram avaliadas diferentes concentrações de cálcio no 1º estágio (0,6, 0,8, 1,0, 1,2 e 1,4% m/v) e também no 2º estágio (4, 5, 6, 7 e 8% m/v). A concentração de glicerol na solução reticuladora final foi estudada na faixa de 1 a 7% m/v e também foram estudados diferentes tempos de imersão (10, 20 e 30 minutos), visando o conhecimento da influência destes parâmetros e a obtenção de filmes com características funcionais adequadas.

As quantidades equivalentes em mg Ca^{2+} /g biopolímero para as concentrações de cloreto de cálcio dihidratado utilizadas na solução pré-reticuladora (30 mL) estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ utilizadas em 30 mL da solução pré-reticuladora e equivalência em mg Ca^{2+} /g biopolímero presente na solução filme formadora.

| % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | mg Ca^{2+} /g biopolímero |
|---|------------------------------------|
| 0,6 | 8,16 |
| 0,8 | 10,88 |
| 1,0 | 13,60 |
| 1,2 | 16,32 |
| 1,4 | 19,04 |

Na confecção de filmes ativos, a natamicina foi adicionada à solução filmogênica durante o 1º estágio, após a pré-reticulação, na concentração de 4% em relação à quantidade total de biopolímero, seguindo recomendação de da Silva (2009). Após a adição, a solução

ainda foi mantida em aquecimento e sob agitação durante 10 minutos. A solução foi vertida sobre as placas nas quantidades de 50, 60 e 70g, a fim de se obter filmes com diferentes espessuras para os ensaios de difusividade. Nesta etapa, para melhor comparação dos resultados, também foram confeccionados filmes simples de alginato, cuja formulação foi denominada de FC7.

O fluxograma simplificado apresentado na Figura 4.2 retrata o procedimento realizado para a obtenção e acondicionamento final dos filmes, indicando as variações nas formulações estudadas.

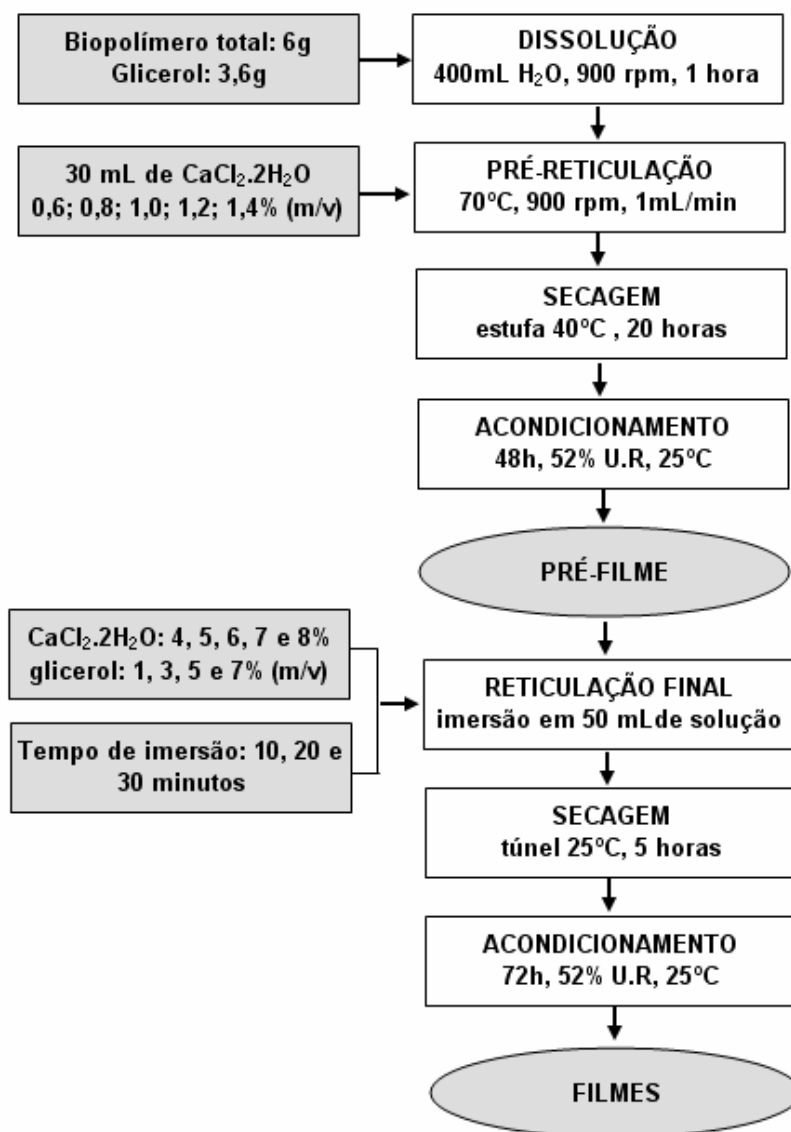


Figura 4.2. Fluxograma do processo de obtenção dos filmes.

4.5 Caracterização dos filmes

Todas as amostras de filme permaneceram por 72 horas em ambiente a 25°C e 52% de umidade relativa para uma equilibração e homogeneização antes de serem caracterizados. Inicialmente, os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual, conteúdo de umidade, solubilidade em água, espessura, permeabilidade ao vapor de água, grau de intumescimento e resistência mecânica.

As características de filmes obtidas por formulações que satisfizeram requisitos mínimos de solubilidade, PVA e flexibilidade foram reavaliadas, buscando-se confirmação estatística dos dados. Além das características citadas, esses filmes foram submetidos a observações microscópicas de sua microestrutura (MEV), a determinação da temperatura de transição vítrea, quantificação do teor de cálcio e da cor e opacidade.

4.1.4 Aspecto visual

Foram realizadas avaliações subjetivas, considerando os aspectos visuais e táteis para selecionar as formulações mais promissoras. Apenas os filmes que apresentaram homogeneidade (ausência de partículas), continuidade (ausência de rupturas ou regiões quebradiças), flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e manuseio foram selecionados, a fim de não comprometer os resultados das análises posteriores.

4.1.5 Espessura, δ

A espessura dos filmes foi obtida pela média aritmética dos valores de dez medidas aleatórias em diferentes pontos do filme, utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo, modelo MDC-25S, resolução 0,001 mm, Japão).

4.1.6 Conteúdo de umidade, w

O conteúdo de umidade de filmes foi determinado em triplicata por gravimetria em estufa a vácuo (Lab-Line, Squaroid, EUA) a 105°C por 24 horas.

4.1.7 Massa solubilizável em água, MS

A solubilidade em água dos filmes foi quantificada segundo método proposto por Irissin-Mangata *et al.* (2001). Inicialmente, a umidade de uma amostra de filme é determinada (105°C/ 24 h) conforme item 4.1.6. Outra amostra do mesmo filme é então imersa em 50 mL de

água destilada e o sistema mantido sob agitação lenta e periódica (150 rpm) a 25 °C por 24 h, utilizando-se um banho de agitação (*Shaker Bath Orbit*, Lab-Line, EUA). Esse segundo filme é seco em estufa a vácuo para determinação da massa não solúvel. Foram realizadas três replicatas. A matéria solubilizada (MS) é expressa em função da massa seca inicial conforme a Equação (4.1).

$$MS = \frac{[m_0(1-\omega)] - m_f}{m_0(1-\omega)} \quad (4.1)$$

Onde: MS é a massa solubilizável em água [g/g filme seco]

m_0 é a massa total inicial de amostra [g]

m_f é a massa não solúvel [g]

ω é a fração de umidade em base úmida [g H₂O/g filme]

4.1.8 Grau de Intumescimento, GI

O grau de intumescimento foi determinado segundo a metodologia proposta por Xu *et al.* (2003). A massa inicial de uma amostra circular de filme de 2,5 cm de diâmetro foi quantificada e imersa em água destilada por diferentes períodos de tempo a fim de conhecer o tempo de estabilização. O filme foi enxugado entre papéis de filtro antes de cada pesagem, tendo-se o cuidado para não pressionar o filme, causando alterações na estrutura, e novamente pesado, determinando-se a massa do filme úmido. O grau de intumescimento (GI) foi calculado em função da massa total inicial da amostra (Equação 4.2). Também foi determinado o aumento da espessura dos filmes após a imersão em água pela razão entre a média das medidas de espessura final ($\bar{\delta}_f$) e inicial ($\bar{\delta}_i$). A análise foi realizada com quatro repetições.

$$GI = \frac{m_u - m_i}{m_i} \quad (4.2)$$

Onde: GI é o grau de intumescimento

m_u é a massa do filme úmido [g]

m_i é a massa total inicial da amostra [g]

4.1.9 Propriedades mecânicas

As análises de tensão na ruptura (TR) e alongamento na ruptura (A) foram realizadas com o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System SMD, Inglaterra), seguindo o método padrão

D-882 (ASTM, 1995b), com separação inicial das garras de 50 cm e com velocidade de 1cm/s. Doze amostras de filmes com dimensões de 10 x 2,54 cm tiveram a espessura pré-determinada pela média aritmética de cinco medidas em pontos aleatórios nos filmes. Um microcomputador foi utilizado para registrar as curvas de tensão-deformação. A tensão na ruptura do filme foi determinada a partir da Equação 4.3, na qual a força máxima no rompimento é dividida pela área da seção transversal (espessura x largura). O alongamento na ruptura foi determinado pela Equação 4.4 que relaciona a distância final da separação das garras pela distância inicial da separação.

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (4.3)$$

$$A = \frac{d}{d_0} \times 100 \quad (4.4)$$

Onde: TR é a tensão na ruptura [MPa]

F_m é a força máxima no rompimento [N]

A_s é a seção transversal da amostra do filme [mm²]

A é o alongamento na ruptura [%]

d é a distância final de separação das garras [cm]

d_0 é a distância inicial de separação das garras [cm].

4.1.10 Permeabilidade ao vapor de água, PVA

A PVA foi determinada gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995a), utilizando-se uma célula de acrílico com um volume interno de 30mL e que dispõe de uma tampa rosqueável com abertura central de 46,24 cm² na qual se fixa o filme. Cloreto de cálcio granulado (Ecibra, São Paulo, Brasil) foi utilizado para preencher o fundo da célula até próximo à borda e ela foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado (Figura 4.3). O fundo desse recipiente continha uma solução saturada de NaCl (Synth, Diadema, Brasil) para manter o ambiente a 75% UR. A variação de massa da célula com o tempo corresponde à taxa de água que permeou pelo filme e que foi usada na equação derivada para calcular a PVA (Equação 4.5).

$$PVA = \frac{G \cdot \delta}{A_e \cdot \Delta P_{H_2O}} \cdot F \quad (4.5)$$

Onde: PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água [(g.mm/m².dia.kPa)].

δ é a espessura do filme [mm].

G é a taxa de massa do sistema [g/dia].

A_e é a área exposta do filme [m²].

ΔP_{H_2O} é a diferença de pressão parcial de vapor da água no ambiente dos dois lados do filme [kPa].

F é um fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o CaCl₂ e o filme. Nas condições de uso, essa correção era maior de 0,99 e foi assumida igual a 1,0 (McHugh *et al.*, 1993).



Figura 4.3. Aparato experimental utilizado para determinação da permeabilidade ao vapor de água.

4.1.11 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi avaliada por meio de um colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Faifax, EUA), utilizando-se os padrões CIELab (Sobral *et al.* 2001). Neste sistema, conforme apresentado na Figura 4.4, são determinados os parâmetros de luminosidade L^* , variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo (+). Os filmes foram dispostos no compartimento do equipamento e foram realizadas três leituras em cada lado do filme com três repetições. A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada de acordo com a Equação 4.6.

$$\Delta E^* = \left[(L^* - L_p^*)^2 + (a^* - a_p^*)^2 + (b^* - b_p^*)^2 \right]^{0.5} \quad (4.6)$$

Onde: L_p^* , a_p^* e b_p^* são os parâmetros de cor do filme padrão utilizado para comparação dos resultados.

Também foi determinado o ângulo Hue (H), que dá a medida da tonalidade, pela Equação 4.7; e o Cromo C, referente à intensidade desta cor pela Equação 4.8.

$$H = \tan^{-1}(b^* / a^*) \quad (4.7)$$

$$C = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (4.8)$$

A opacidade, medida da obstrução da passagem de luz pelo filme, foi determinada seguindo o método Hunterlab (Sobral, 1999), utilizando-se o mesmo equipamento das medidas de cor no modo de transmitância. Por este método, a opacidade (Y) da amostra é calculada como a relação entre a opacidade do filme colocado sobre o padrão preto (Y_p) e a opacidade do filme colocado sobre o padrão branco (Y_b) conforme a Equação 4.9.

$$Y = \left(\frac{Y_p}{Y_b} \right) \cdot 100 \quad (4.9)$$

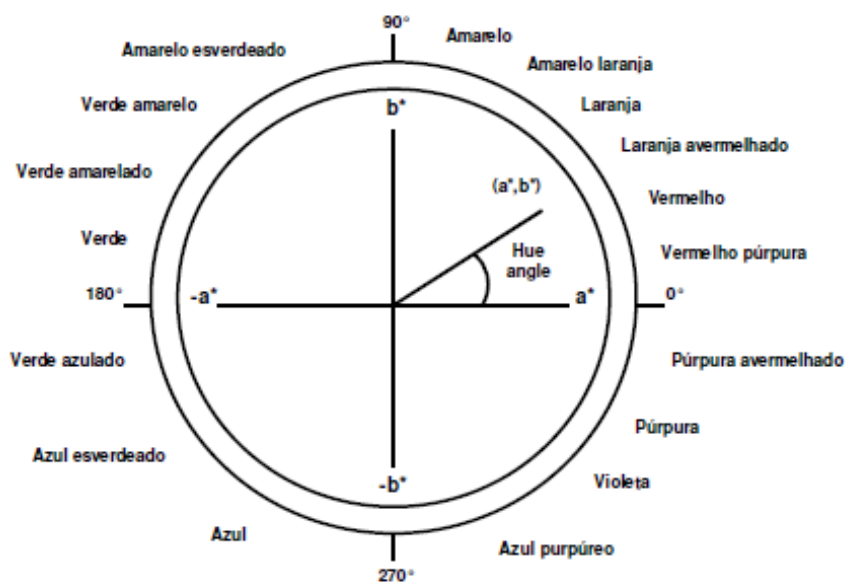


Figura 4.4. Seqüência Hue e orientação do ângulo Hue no diagrama CIE Lab com a seqüência das nuances de cores (Voss, 1992).

4.1.12 Temperatura de Transição Vítrea, T_g

A temperatura de transição vítrea foi determinada utilizando-se um DMA (TA Instruments, modelo 2980, EUA). O equipamento foi utilizado em modo de tensão e com frequência de 1Hz, sendo as amostras fixadas por uma garra tipo filme. A taxa de aquecimento foi de 2 °C/min em uma faixa de -65 a 100°C. A força inicial utilizada foi de 0,5 N e a amplitude de 10µm. As medidas de módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e ângulo de perda ($\tan \delta$) foram obtidos e plotados em função da temperatura para análise das transições térmicas do material. A temperatura de transição vítrea foi determinada no ponto de inflexão da curva do parâmetro $\tan \delta$ em função da temperatura (Cherian *et al.*, 1995).

4.1.13 Microestrutura

Os filmes obtidos nas melhores formulações foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a avaliação da microestrutura da superfície e da seção transversal, utilizando-se um microscópio eletrônico no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da FEQ/UNICAMP (Leica, LEO 440i, Alemanha). Antes das análises, as amostras foram mantidas durante 7 dias em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro.

4.1.14 Teor de cálcio

A concentração de cálcio dos filmes reticulados em diferentes tempos de imersão foi quantificada de acordo com o método descrito por Sriamornsak e Kennedy (2008). Foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin-Elmer, modelo 373, EUA) com queimador de ar-acetileno. Em triplicata, amostras de filmes com aproximadamente 8 mg foram dissolvidas em 10 mL de uma solução de citrato de sódio 2% e diluídas em água deionizada na proporção de 1:25 antes das leituras no equipamento.

4.6 Ensaios de liberação de natamicina em água

Para os ensaios de liberação, foram utilizadas amostras de filmes ativos com dimensões 4 x 4 cm. Foram utilizados recipientes plásticos com tampa contendo 25 mL água destilada que foram dispostos em um banho (*Shaker Bath Orbit*, Lab-Line, EUA) e mantidos sob agitação durante o experimento a fim de diminuir uma possível resistência por convecção de massa. No tempo zero, a amostra de filme foi mergulhada no primeiro recipiente e, após um intervalo de tempo pré-determinado, foi rapidamente transferida para o segundo recipiente, e

assim sucessivamente até o fim da liberação (Zactiti, 2004). Esta análise foi realizada com três repetições.

A concentração do agente antimicrobiano na solução foi determinada por espectrofotometria UV/Vis utilizando um espectrofotômetro (HP, modelo 8453, EUA), equipado com controlador de temperatura HP 89090A e software UV-Visible ChemStation (Oliveira *et al.* 2007). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 290 a 350 nm e a concentração de natamicina foi determinada em terceira derivada pela amplitude do pico em 317 nm e calculada a partir da Equação 4.10, resultante da curva padrão de natamicina (da Silva, 2009).

$$C = -0,0022 \left(\frac{d^3 \text{abs}}{d\lambda^3} \right) \quad (4.10)$$

Onde: C é a concentração de natamicina em ppm;

$d^3 \text{abs} / d\lambda^3$ é a leitura da absorbância em terceira derivada no pico da natamicina.

As frações de massa de natamicina liberadas (M_t/M_∞) foram calculadas e plotadas em função do tempo, sendo que a quantidade liberada em um tempo infinito (M_∞) foi considerada como a massa a partir da qual não houve mais variação considerável. Para soluções em tempos curtos, a difusividade efetiva do agente antimicrobiano foi calculada a partir do ajuste linear da reta obtida ao plotar-se (M_t/M_∞) em função da raiz do tempo, de acordo com a Equação (3.6). Os dados experimentais também foram ajustados ao modelo da Equação (3.4) por regressão não linear, com o uso do *Software Statistica* 6.0 (StatSoft, EUA) utilizando o método de Levenberg-Marquardt.

4.7 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análises de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, o qual foi utilizado para determinar as diferenças significativas das médias, a um nível de probabilidade de 5% ($p < 0,05$). O programa computacional *Statistica* 6.0 (Stasoft, USA) foi utilizado para esses cálculos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos, inicialmente, os resultados obtidos para os filmes simples de pectina e os filmes compostos de pectina e alginato em relação à influência da reticulação no 1º e 2º estágios, influência da concentração de plastificante e do tempo de imersão em solução reticuladora. Definidas as melhores condições para o preparo das formulações, serão apresentados os resultados da caracterização complementar destes filmes como temperatura de transição vítrea e microscopia eletrônica de varredura. Por último, serão apresentadas as caracterizações dos filmes ativos relacionando-as com os filmes sem antimicrobiano, bem como os ensaios de liberação de natamicina.

5.1 Filmes de pectina e pectina/alginato

Devido ao fato dos filmes de alginato de cálcio já possuírem uma metodologia para sua confecção bem desenvolvida no LEPPbio (Zactiti e Kiebusch, 2005) e da grande semelhança entre as estruturas deste biopolímero com a pectina, optou-se neste trabalho, por estudar o comportamento dos filmes simples de pectina frente à reticulação com os íons cálcio e, também, o efeito da mistura dos dois biopolímeros. Uma vez que a pectina é mais abundante, de fácil extração e, portanto, de menor custo, a obtenção de filmes com boas propriedades funcionais utilizando este biopolímero total ou parcialmente, seria de considerável benefício econômico.

As diferentes formulações de pectina e alginato foram avaliadas em relação à quantidade de cálcio incorporada nos dois estágios, tempo de imersão na solução reticuladora e concentração de plastificante. A partir desta avaliação foram determinados os parâmetros mais adequados a serem utilizados para a confecção dos filmes ativos.

5.1.1 Definição da concentração de cálcio na pré-reticulação

Com o intuito de conhecer o comportamento dos filmes frente às pequenas quantidades de cálcio incorporadas à solução durante o 1º estágio, ensaios de reticulação parcial foram realizados com diferentes concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Em sua pesquisa com filmes de alginato de sódio, Turbiano (2007) verificou que a incorporação dos íons cálcio no 1º estágio é um processo importante no auxílio da estruturação final, realizada no 2º estágio. No

entanto, existe um limite para esta adição na solução filmogênica que, se ultrapassado, pode ocasionar gelificação localizada. Somado a isto, é necessário que as soluções sejam suficientemente fluidas e facilmente dispersas sobre os moldes para a secagem, de forma a obter filmes de espessura uniforme.

Inicialmente, os filmes resultantes foram avaliados de forma subjetiva, levando em consideração os aspectos de continuidade (ausência de fraturas ou rupturas após a secagem), aspectos visuais (transparência e ausência de partículas e bolha de ar) além da manuseabilidade. Na solução formadora de filme, foram avaliadas a viscosidade e a ocorrência de pré-gelificação, relacionadas com o espalhamento sobre os moldes de secagem. As características observadas para as diferentes concentrações estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Características observadas com as diferentes concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ testadas na pré-reticulação.

| Concentração $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$ | Características observadas |
|---|--|
| Abaixo de 0,6% | Desprendimento difícil para todas as formulações |
| 0,6% | Manuseio difícil para FC1, FC2 e FC3 |
| 0,8% | Aspectos visuais e de manipulação adequados |
| 1,0% | Aspectos visuais e de manipulação adequados |
| 1,2% | Aspectos visuais e de manipulação adequados |
| 1,4% | Alta viscosidade para FC5 e FC6 e retenção de bolhas para FC1 e FC2. |
| Acima de 1,4% | Alta viscosidade e gelificação localizada para todas as formulações |

* Presente em 30mL adicionados à solução filme-formadora contendo o biopolímero.

Para todas as formulações observou-se que o limite mínimo de cálcio para a formação de filme foi de 0,6% (8,16 mg Ca^{2+} /g biopolímero), pois abaixo desta concentração não houve a formação de uma estrutura independente que pudesse ser removida com facilidade dos moldes, principalmente no caso da pectina.

Para os filmes contendo maior teor de pectina (FC1, FC2 e FC3), observou-se que concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 0,6% (em 30 mL da solução pré-reticuladora) resultavam em

filmes difíceis de manusear, por serem muito aderentes à placa e “pegajosos”. O aumento da concentração de cálcio facilitava o manuseio e o desprendimento dos moldes, porém houve uma grande tendência à formação e retenção de bolhas e ao aumento da viscosidade da solução, principalmente, para as formulações FC5 e FC6. Utilizando-se concentrações acima de 1,4%, as soluções de todas as formulações apresentaram alta viscosidade e pré-gelificação localizada, que impediam a distribuição uniforme sobre os moldes e, portanto, a formação de um filme adequado.

Desta forma, as concentrações que resultaram em soluções adequadas e filmes com boa aparência, homogêneos, transparentes e de fácil manuseio foram 0,8, 1,0 e 1,2% (Figura 5.1).



Figura 5.1. Aspecto do filme de pectina (FC1) pré-reticulado com 30 mL de solução 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Esta limitação na quantidade de cálcio incorporada na solução também foi verificada por Rhim (2004) para filmes de alginato. A quantidade máxima que o autor conseguiu adicionar à solução foi 10,83 mg Ca^{2+} /g alginato, sendo que acima desta ocorria forte gelificação. No presente trabalho, a quantidade máxima de cálcio possível de incorporar foi superior - 19,04 mg/g biopolímero, referente à concentração de 1,4% em 30 mL de solução pré-reticuladora. Da Silva (2009) também determinou 1,4% como concentração limite a partir da qual, ocorria a gelificação da solução formadora de filmes de alginato. Pavlath e Robertson (1999) relataram que à medida que a concentração de cálcio aumentava na solução, aumentava a opacidade e a fragilidade dos filmes de alginato. Outro fato observado pelos autores foi a necessidade de

reticulação em temperaturas acima de 50°C, para que a viscosidade da solução fosse adequada.

Em outro trabalho com filmes de pectina BTM, Batista *et al.* (2005) observaram que para concentrações de biopolímero de 4%, a máxima concentração de CaCl₂ possível de ser adicionada era 0,06% (5,5 mg Ca²⁺/g pectina), pois acima desta ocorriam situações envolvendo a fase gel e ainda sinerése.

A fim de determinar a concentração ótima, foi avaliado o efeito destas três concentrações de cálcio sobre algumas propriedades dos filmes resultantes do 1º estágio e, também, em filmes submetidos à reticulação complementar (2º estágio) pela imersão em uma solução contendo 2% de CaCl₂.2H₂O (m/v) e 3% de glicerol, durante 10 minutos. Estes parâmetros de reticulação complementar (concentração de cálcio, plastificante e tempo de imersão) foram definidos como limites mínimos de um estudo mais abrangente que será apresentado nas seções seguintes de forma individual.

5.1.1.1 Espessura (δ)

Na Tabela 5.2, estão apresentados os resultados obtidos para a medida de espessura dos filmes do 1º e 2º estágios nas três concentrações de cálcio utilizadas durante a pré-reticulação.

Os resultados permitem que a comparação dos resultados seja feita de três formas distintas:

- Entre filmes de mesma formulação e com mesmo tratamento de reticulação (1º ou 2º estágio);
- Entre filmes de mesma formulação e diferentes tratamentos de reticulação;
- Entre as diferentes formulações com mesmo tratamento de reticulação.

Em relação aos filmes de mesma formulação, a análise dos resultados indica que a variação da concentração de cálcio da solução pré-reticuladora não influenciou a espessura dos pré-filmes (1º estágio) e dos filmes reticulados (2º estágio).

Tabela 5.2. Espessura (δ) dos filmes resultantes do 1º estágio e 2º estágio (2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3% de glicerol) confeccionados com diferentes concentrações de cálcio na solução pré-reticuladora (30mL).

| FC | Concentração $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (%) | δ (μm) | |
|-----|--|----------------------------|--------------------------|
| | | 1º estágio | 2º estágio |
| FC1 | 0,8 | 35 ± 2,1 ^{a,A} | 18 ± 1,5 ^{c,B} |
| | 1,0 | 31 ± 1,8 ^{a,A} | 17 ± 1,3 ^{c,B} |
| | 1,2 | 32 ± 1,9 ^{a,A} | 18 ± 1,1 ^{c,B} |
| FC2 | 0,8 | 30 ± 4,2 ^{a,A} | 19 ± 1,9 ^{c,B} |
| | 1,0 | 30 ± 3,5 ^{a,A} | 17 ± 3,1 ^{c,B} |
| | 1,2 | 31 ± 2,8 ^{a,A} | 19 ± 2,7 ^{c,B} |
| FC3 | 0,8 | 29 ± 1,9 ^{a,A} | 21 ± 1,6 ^{bc,B} |
| | 1,0 | 32 ± 2,8 ^{a,A} | 22 ± 0,9 ^{bc,B} |
| | 1,2 | 30 ± 2,9 ^{a,A} | 21 ± 2,8 ^{bc,B} |
| FC4 | 0,8 | 33 ± 2,7 ^{a,A} | 23 ± 1,7 ^{b,B} |
| | 1,0 | 30 ± 4,1 ^{a,A} | 23 ± 2,9 ^{b,B} |
| | 1,2 | 33 ± 3,6 ^{a,A} | 24 ± 2,0 ^{ab,B} |
| FC5 | 0,8 | 33 ± 3,1 ^{a,A} | 26 ± 1,3 ^{a,B} |
| | 1,0 | 33 ± 2,5 ^{a,A} | 25 ± 0,9 ^{a,B} |
| | 1,2 | 35 ± 2,2 ^{a,A} | 25 ± 0,8 ^{a,B} |
| FC6 | 0,8 | 33 ± 4,2 ^{a,A} | 26 ± 3,1 ^{a,B} |
| | 1,0 | 33 ± 2,3 ^{a,A} | 25 ± 3,1 ^{a,B} |
| | 1,2 | 35 ± 1,7 ^{a,A} | 26 ± 1,9 ^{a,B} |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra minúscula em cada coluna e com a mesma letra maiúscula em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Entretanto, é interessante observar que os filmes que receberam o tratamento de reticulação complementar (2º estágio) apresentaram uma redução significativa da espessura, se comparados aos pré-filmes correspondentes. Esta redução foi mais pronunciada nos filmes de pectina (quase 50% de redução).

A diminuição da espessura está relacionada a uma melhor acomodação das cadeias pela reticulação complementar, que resultam em um arranjo macromolecular mais compacto (Sriamornsak e Kennedy, 2008). Esta alteração pode também ter sido causada pelo método de

reticulação utilizado, pois a imersão dos filmes na solução iônica por determinado período de tempo pode levar à solubilização do polissacarídeo. Segundo Pavlath e Robertson (1999), quando os filmes são imersos em uma solução iônica, há uma relação competitiva entre o processo de dissolução e a reticulação do filme. A imersão em uma solução iônica mais concentrada deve proporcionar uma taxa de reticulação superior à de solubilização, impedindo ou dificultando a redução da espessura.

Rhim (2004) observou que os filmes de alginato reticulados por imersão em uma solução contendo 2% de CaCl_2 apresentaram menor espessura do que os filmes reticulados pela adição direta dos íons à solução filme-formadora. Este comportamento foi atribuído à solubilização do filme na solução, pois em concentrações maiores de cálcio, como 7%, esta redução era menos pronunciada.

Efeito contrário a este foi observado por Russo *et al.* (2007), cujos filmes de alginato tiveram a espessura aumentada após a imersão em uma solução com 2% de cálcio e secos em temperatura ambiente a 45% UR. Os autores atribuíram o aumento da espessura ao processo de intumescimento que ocorre ao mesmo tempo que a reticulação. Os íons cálcio seriam introduzidos nos pontos da matriz já intumescida, estabilizando a conformação do filme neste estado.

Em relação às diferentes formulações do 2º estágio, verificou-se uma tendência de aumento da espessura com o aumento da concentração de alginato nas formulações. Mesmo que todas as formulações tenham sido confeccionadas com a mesma alíquota de solução nos moldes (50g), os filmes da formulação FC6 apresentaram-se cerca de 30% mais espessos que a formulação FC1.

Este comportamento pode estar associado às diferenças de massa molecular dos biopolímeros. Segundo Sriamornsak e Kennedy (2008), os filmes de pectina tendem a ser mais finos do que os filmes de alginato porque alcançam um arranjo molecular mais compacto, fato atribuído à menor massa molecular da pectina em relação ao alginato. Estes autores obtiveram filmes de pectina amidada com 0,075 mm de espessura enquanto que os filmes de alginato de média viscosidade, utilizando-se a mesma concentração de polissacarídeo, apresentaram 0,125 mm, equivalente a 40% de aumento de espessura.

5.1.1.2 Conteúdo de umidade (ω) e massa solubilizável (MS)

Na Tabela 5.3, estão apresentados os resultados de conteúdo de umidade dos filmes do 1º e 2º estágios e também a massa solubilizável em água dos filmes do 2º estágios.

Tabela 5.3. Conteúdo de umidade (ω) e massa solubilizável em água (MS) dos filmes resultantes do 1º estágio e 2º estágio (2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3% de glicerol) confeccionados com diferentes concentrações de cálcio na solução pré-reticuladora (30mL).

| FC | Concentração $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\%)$ | ω (%) | | MS (%) |
|-----|---|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | | 1º estágio | 2º estágio | 2º estágio |
| FC1 | 0,8 | 33,29 ± 0,46 ^{a,A} | 17,92 ± 0,63 ^{a,B} | 29,38 ± 0,18 ^a |
| | 1,0 | 36,42 ± 0,34 ^{a,A} | 17,75 ± 0,51 ^{a,B} | 30,68 ± 0,36 ^a |
| | 1,2 | 35,55 ± 0,52 ^{a,A} | 18,01 ± 0,37 ^{a,B} | 31,11 ± 0,19 ^a |
| FC2 | 0,8 | 36,17 ± 0,38 ^{a,A} | 18,14 ± 0,62 ^{a,B} | 27,77 ± 0,64 ^{ab} |
| | 1,0 | 34,73 ± 0,36 ^{a,A} | 17,21 ± 0,94 ^{a,B} | 26,22 ± 1,44 ^b |
| | 1,2 | 34,99 ± 0,54 ^{a,A} | 17,44 ± 0,49 ^{a,B} | 26,19 ± 1,12 ^b |
| FC3 | 0,8 | 29,63 ± 0,71 ^{b,A} | 13,87 ± 0,53 ^{b,B} | 24,03 ± 1,63 ^{bc} |
| | 1,0 | 28,88 ± 0,82 ^{b,A} | 14,38 ± 0,33 ^{b,B} | 23,72 ± 0,95 ^c |
| | 1,2 | 30,37 ± 0,64 ^{b,A} | 14,85 ± 0,38 ^{b,B} | 23,11 ± 0,67 ^c |
| FC4 | 0,8 | 29,24 ± 0,42 ^{b,A} | 14,01 ± 0,55 ^{b,B} | 20,51 ± 0,38 ^d |
| | 1,0 | 29,26 ± 0,29 ^{b,A} | 14,98 ± 0,86 ^{b,B} | 19,59 ± 1,14 ^d |
| | 1,2 | 28,92 ± 0,47 ^{b,A} | 15,37 ± 0,39 ^{b,B} | 20,49 ± 1,14 ^d |
| FC5 | 0,8 | 30,94 ± 0,61 ^{b,A} | 15,29 ± 0,66 ^{b,B} | 21,85 ± 0,92 ^d |
| | 1,0 | 28,61 ± 0,35 ^{b,A} | 14,80 ± 0,78 ^{b,B} | 20,52 ± 0,75 ^d |
| | 1,2 | 27,91 ± 0,53 ^{b,A} | 15,53 ± 0,72 ^{b,B} | 21,68 ± 0,75 ^d |
| FC6 | 0,8 | 29,76 ± 0,52 ^{b,A} | 15,87 ± 0,38 ^{b,B} | 20,83 ± 0,82 ^d |
| | 1,0 | 28,88 ± 0,91 ^{b,A} | 14,55 ± 0,42 ^{b,B} | 19,52 ± 1,12 ^d |
| | 1,2 | 30,27 ± 0,66 ^{b,A} | 15,12 ± 0,45 ^{b,B} | 21,47 ± 1,21 ^d |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra minúscula em cada coluna e com a mesma letra maiúscula em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A análise dos resultados indica que o conteúdo de umidade dos filmes do 1º e 2º estágio não foi influenciada pelas diferentes concentrações de cálcio utilizadas na solução pré-reticuladora. Porém, ao serem submetidos ao tratamento de reticulação complementar, os

filmes de todas as formulações apresentaram redução significativa do conteúdo de umidade. Rhim (2004) também observou este comportamento em filmes de alginato, que tiveram o conteúdo de umidade reduzido cerca de 35% quando reticulados por imersão em solução com cálcio. Esta redução está associada à maior extensão no grau de reticulação obtida por este tratamento, que induz a mudança na hidrofiliabilidade dos filmes, afetando a absorção de umidade. Entre as diferentes formulações observou-se que os filmes FC1 e FC2 apresentaram maior conteúdo de umidade que as demais formulações. Esta tendência foi verificada tanto no 1º quanto no 2º estágio, indicando a maior hidrofiliabilidade da pectina.

Uma das principais desvantagens dos filmes resultantes do 1º estágio, que faz com que seja necessário um tratamento complementar de reticulação, é a dissolução em água. Para todas as formulações estudadas no 1º estágio, a massa solubilizada não pôde ser quantificada experimentalmente, pois os filmes foram totalmente desintegrados após poucos minutos da imersão em água (100% de solubilização), indicando que o baixo grau de reticulação não foi capaz de promover ligações iônicas suficientes para alterar esta propriedade dos filmes. Os resultados de solubilidade obtidos são equivalentes aos de filmes não reticulados, pois normalmente os polissacarídeos como a pectina e o alginato, são altamente higroscópicos e sem uma reticulação efetiva se desintegram rapidamente em água (Shih, 1996).

A completa dissolução de filme de alginato foi observada Rhim (2004) quando estes eram elaborados com pequenas quantidades de cálcio incorporadas à solução filme-formadora. Após completarem a reticulação por imersão com 2% de CaCl_2 , a solubilidade em água baixou para cerca de 16%. Em outro trabalho, filmes de pectina adicionados de ácidos graxos sem reticulação com cálcio foram estudados por Batista *et al.* (2005) e apresentaram 100% de solubilidade em água. Lima *et al.* (2007) também relataram que filmes de alginato de sódio sem o processo de reticulação solubilizam-se totalmente. Pavlath e Robertson (1999) estudaram diversas concentrações de cálcio na adição à solução formadora de filmes de alginato e, para todas elas, houve a completa solubilização em água.

Já os filmes submetidos ao 2º estágio apresentaram grande redução na massa solubilizável e permaneceram íntegros após as 24 horas de imersão em água, confirmando que o processo de reticulação por difusão dos íons cálcio é mais eficiente para promover o aumento das ligações, dificultando a passagem do solvente através das cadeias. As diferentes concentrações de cálcio utilizadas não afetaram a solubilidade dos filmes de mesma formulação, porém, verificou-se uma significativa redução entre as diferentes formulações. A

massa solubilizada da formulação FC1 foi cerca de 30% maior do que os filmes das formulações FC4, FC5 e FC6.

Zactiti e Kieckbusch (2006) prepararam filmes de alginato com os dois estágios de reticulação e obtiveram, no 1º estágio (concentração de 0,4% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), filmes com 100% de solubilidade, enquanto que os filmes submetidos a um tratamento complementar por imersão em solução com 2% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram solubilidade em água de apenas 4,74%. Esta baixa solubilidade dos filmes reticulados pode estar associada ao um intenso processo de lavagem utilizado pelos autores com a finalidade de retirar o excesso de cálcio da superfície.

5.1.1.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (tensão na ruptura e percentual de alongamento) obtidas para os dois tipos de tratamento dos filmes nas diferentes concentrações de cálcio estão apresentadas na Tabela 5.4.

O aumento da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na solução pré-reticuladora de 0,8 para 1% provocou um aumento significativo da tensão na ruptura para os filmes de mesma formulação do 1º estágio e este comportamento manteve-se ao realizar-se a reticulação complementar no 2º estágio, com exceção das formulações FC5 e FC6, que não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Também é possível observar que no 1º estágio os filmes com 1,0% (exceto a formulação FC4) adquiriram, além de maior resistência, mais elasticidade, pois houve o aumento no alongamento dos pré-filmes. Esta tendência, entretanto, não foi observada para os filmes do 2º estágio.

Assim como para a massa solubilizada, foi possível observar o grande efeito provocado pela reticulação complementar nas propriedades mecânicas. Enquanto os filmes do 1º estágio são fracos e elásticos, os filmes resultantes do 2º estágio apresentam valores mais altos de tensão na ruptura e expressiva diminuição do alongamento (aproximadamente 80% de redução). Este comportamento é característico de filmes que sofrem processo de reticulação, pois ocorre o aumento da associação das cadeias de grupos carboxílicos com os íons Ca^{2+} , tornando os filmes mais fortes e rígidos (Pavlath *et al.*, 1999). Como o grau de reticulação dos filmes do 1º estágio é pequeno, há uma maior mobilidade das moléculas que faz com que estes sejam mais elásticos.

Tabela 5.4. Tensão na ruptura (TR) e percentual de alongamento (A) dos filmes resultantes do 1º e 2º estágios (2% CaCl₂.2H₂O e 3% glicerol) confeccionados com diferentes concentrações de cálcio na solução pré-reticuladora (30 mL).

| FC | CaCl ₂ .2H ₂ O (%) | TR (MPa) | | A (%) | |
|-----|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | 1º estágio | 2º estágio | 1º estágio | 2º estágio |
| FC1 | 0,8 | 17,20 ± 2,95 ^{c,B} | 40,19 ± 2,76 ^{f,A} | 17,21 ± 3,60 ^{d,A} | 4,32 ± 0,44 ^{b,B} |
| | 1,0 | 24,89 ± 2,75 ^{b,B} | 51,97 ± 4,88 ^{e,A} | 23,74 ± 0,80 ^{bc,A} | 4,78 ± 0,61 ^{b,B} |
| | 1,2 | 24,23 ± 2,49 ^{b,B} | 50,62 ± 4,02 ^{e,A} | 24,01 ± 1,12 ^{b,A} | 4,33 ± 0,58 ^{b,B} |
| FC2 | 0,8 | 15,71 ± 1,91 ^{cd,B} | 42,43 ± 2,91 ^{f,A} | 15,95 ± 2,99 ^{d,A} | 4,67 ± 0,52 ^{b,B} |
| | 1,0 | 23,68 ± 2,32 ^{b,B} | 53,04 ± 1,32 ^{e,A} | 21,74 ± 1,36 ^{c,A} | 4,39 ± 0,30 ^{b,B} |
| | 1,2 | 15,01 ± 2,49 ^{cd,B} | 55,29 ± 3,17 ^{e,A} | 13,61 ± 1,48 ^{e,A} | 4,21 ± 0,64 ^{b,B} |
| FC3 | 0,8 | 17,08 ± 2,97 ^{c,B} | 65,53 ± 8,06 ^{d,A} | 17,04 ± 1,65 ^{d,A} | 5,25 ± 0,36 ^{ab,B} |
| | 1,0 | 24,28 ± 3,18 ^{b,B} | 78,61 ± 6,18 ^{c,A} | 22,87 ± 2,75 ^{c,A} | 4,48 ± 0,51 ^{b,B} |
| | 1,2 | 22,76 ± 2,15 ^{b,B} | 80,96 ± 8,56 ^{c,A} | 20,23 ± 1,64 ^{c,A} | 4,74 ± 0,23 ^{b,B} |
| FC4 | 0,8 | 11,41 ± 2,50 ^{d,B} | 63,59 ± 7,71 ^{d,A} | 39,72 ± 3,32 ^{a,A} | 4,42 ± 0,39 ^{b,B} |
| | 1,0 | 26,23 ± 3,36 ^{ab,B} | 81,42 ± 5,75 ^{bc,A} | 27,53 ± 2,99 ^{b,A} | 5,27 ± 0,80 ^{ab,B} |
| | 1,2 | 23,44 ± 2,73 ^{b,B} | 80,34 ± 7,21 ^{bc,A} | 15,31 ± 2,02 ^{de,A} | 4,34 ± 0,15 ^{b,B} |
| FC5 | 0,8 | 16,96 ± 3,19 ^{c,B} | 87,13 ± 6,29 ^{b,A} | 14,15 ± 3,05 ^{de,A} | 5,71 ± 0,99 ^{a,B} |
| | 1,0 | 23,30 ± 2,38 ^{b,B} | 90,65 ± 8,43 ^{b,A} | 25,54 ± 1,78 ^{b,A} | 5,66 ± 0,84 ^{ab,B} |
| | 1,2 | 20,05 ± 1,35 ^{bc,B} | 87,89 ± 9,05 ^{b,A} | 24,66 ± 1,45 ^{b,A} | 5,13 ± 0,57 ^{ab,B} |
| FC6 | 0,8 | 20,31 ± 2,77 ^{bc,B} | 98,21 ± 5,70 ^{a,A} | 17,36 ± 3,52 ^{d,A} | 6,05 ± 0,64 ^{a,B} |
| | 1,0 | 29,26 ± 3,76 ^{a,B} | 100,46 ± 7,90 ^{a,A} | 23,29 ± 3,47 ^{bc,A} | 6,11 ± 0,49 ^{a,B} |
| | 1,2 | 24,62 ± 1,89 ^{b,B} | 101,82 ± 8,77 ^{a,A} | 21,91 ± 1,96 ^{c,A} | 5,98 ± 0,63 ^{a,B} |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

Tendência muito semelhante foi verificada por Zactiti e Kieckbusch (2006), cujos filmes de alginato com a reticulação complementar com 2% de CaCl₂.2H₂O aumentaram a TR de 23,11 para 85,67 MPa e diminuíram o alongamento de 27,35 para 4,08%.

Em outro trabalho, filmes de alginato reticulados pela incorporação do cálcio (0,03gCa²⁺/g alginato) à solução apresentaram TR de 38,8 MPa e alongamento de 10,5%. Para filmes reticulados por imersão em 5% de CaCl₂, a TR aumentou para 85,9 MPa e o alongamento baixou para 3,8% (Rhim, 2004).

Em termos absolutos, entretanto, esses dados devem ser comparados entre si com cuidado, pois a presença de glicerol ou lavagem do filme afetará significativamente os valores.

Em filmes sintéticos geralmente são observados altos valores para o alongamento e valores mais baixos para a tensão na ruptura. McHugh e Krochta (1994) citam em seu trabalho que filmes de polietileno de baixa densidade possuem TR de apenas 13 MPa enquanto que o alongamento pode atingir até 500%. Semelhantemente, Gennadios *et al.* (2003) obtiveram filmes de proteína de soro de leite com TR de 0,7 MPa e alongamento de 229%.

Os resultados obtidos para o alongamento destes filmes são baixos e podem significar uma grande limitação para a aplicação como embalagens se comparados aos filmes sintéticos. Diversos trabalhos sobre biofilmes também reportam valores baixos para esta propriedade como Batista (2004), que obteve 2,93% de alongamento para filmes de pectina BTM com 0,066 mm de espessura confeccionados com 5,5 mg Ca^{2+} /g pectina e sem plastificante. Mamani (2009) obteve filmes elaborados com pectina de alto teor de metoxilação com 51,05 MPa e 2,62% de alongamento. Para a concentração de CaCl_2 de 5% e 2,5% de glicerol (1g/g bioplímero), Kang *et al.* (2005) obtiveram filmes de pectina de 0,17 μm de espessura com tensão na ruptura de apenas 0,193 MPa e alongamento de 2,6%.

Parris *et al.* (1995) encontraram um valor de tensão na ruptura de apenas 11,1 MPa e 5% de alongamento para os filmes de alginato com glicerol. Apesar de utilizarem condições semelhantes de temperatura (25°C) e umidade relativa (50%) na equilibração dos filmes, outros fatores como a concentração de biopolímero e de glicerol e a ausência de reticulação influenciam os resultados.

Os resultados de resistência mecânica no 2º estágio também indicam a superioridade das formulações com elevado teor de alginato, que apresentaram maior tensão na ruptura e maior alongamento.

Inicialmente, existia a premissa de que os filmes confeccionados com a pectina apresentassem maior elasticidade do que os filmes de alginato. Como a pectina possui uma cadeia menos linearizada devido à suas ramificações, ao ser reticulada ela poderia manter uma certa mobilidade nas cadeias levando a uma maior flexibilidade. Essa perspectiva, porém, não foi confirmada pelo exposto acima. No 1º estágio, o alongamento foi de modo geral, equivalente em todas as formulações e no 2º estágio, os filmes com pectina apresentaram-se mais frágeis como um todo. A tensão na ruptura dos filmes FC6 foi o dobro da TR observada nos filmes FC1 e o alongamento também foi maior. Segundo Braccini e Perez (2001), as zonas de junção

formadas pelos pares das cadeias da pectina não possuem o tamanho adequado para acomodar os íons cálcio de forma tão eficiente como o alginato e, por consequência, não se atinge uma alta coesividade das cadeias.

De acordo com Fishman e Coffin (1995), o baixo alongamento da pectina está relacionado ao fato de suas moléculas estarem quase completamente estendidas tanto em solução quanto no estado sólido. Assim, a extensão do material não ocorre por desenrolamento como em polímeros enrolados ao acaso, mas por deslizamento das cadeias uma após a outra que pode conduzir a uma fratura antecipada do material.

Como os filmes confeccionados com a concentração de 0,8% de cálcio na pré-reticulação apresentaram um comportamento inferior em termos de propriedades mecânicas, optou-se por fixar a concentração de 1% (equivalente a 13,60 mg Ca^{2+} /g biopolímero) como sendo a concentração ótima de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a ser utilizada durante o preparo da solução formadora do pré-filme. Apesar dos filmes confeccionados com 1,2% também apresentarem boas propriedades, a seleção levou em consideração a melhor viscosidade da solução e menor probabilidade de retenção de bolhas para as formulações com maior teor de pectina.

5.1.1.4 Grau de intumescimento

A partir desta seleção, os filmes do 2º estágio confeccionados na concentração selecionada (1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) durante o 1º estágio e reticulados com 2% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3% de glicerol e 10 minutos de imersão em um tratamento posterior, foram submetidos ao ensaio de absorção de água.

Os testes de intumescimento foram realizados em água e o tempo de estabilização foi determinado pelas curvas de absorção de água dos filmes em diferentes tempos até 60 minutos. O tempo de estabilização corresponde ao tempo a partir do qual não há mais absorção de solvente pelo filme. As curvas dos filmes nas diferentes formulações estão dispostas na Figura 5.2.

Nas curvas de intumescimento, verificou-se uma grande redução da quantidade de água absorvida com o aumento da proporção de alginato. O grau de intumescimento máximo variou de 0,61 para a Formulação FC6 a 5,54 para a formulação FC1. É possível observar que as formulações FC1, FC2 e FC3 atingiram o equilíbrio em aproximadamente 20 minutos, sendo que após este tempo praticamente não houve alteração nos valores do intumescimento. Para as demais formulações, o equilíbrio foi atingido em 5 minutos, sendo que aproximadamente

85% do grau de intumescimento de equilíbrio foi atingido no primeiro minuto de imersão em água.

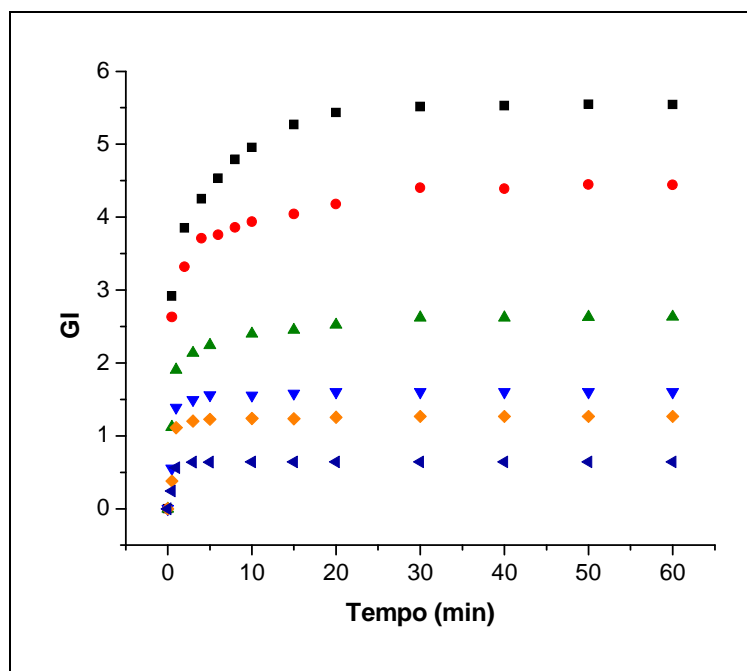


Figura 5.2. Curvas de grau de intumescimento (GI) dos filmes FC1 (■), FC2 (●), FC3 (▲), FC4 (▼), FC5 (◆) e FC6 (◄).

Como a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ utilizada na reticulação complementar foi baixa (2%), a rede tridimensional formada não é tão efetiva. Dessa forma, ocorre a difusão de moléculas de solvente para o interior dos filmes que se acomodam na fase polimérica provocando uma mudança no arranjo espacial das cadeias com o conseqüente aumento do volume, que é o intumescimento (Lucas *et al.*, 2001).

A natureza hidrofílica da pectina faz com esta presente, geralmente, altos valores para o grau de intumescimento. Filmes de pectina BTM reticulados de forma diferente por Sriamornsak e Kennedy (2008) apresentaram um GI em água de aproximadamente 4,0. Uma vez que o intumescimento é influenciado pela extensão da reticulação, pode-se esperar que os filmes contendo maior teor de alginato, que são capazes de ligar-se de forma mais eficiente aos íons cálcio, apresentem menor intumescimento e maior resistência mecânica (Braccini e Perez, 2001; Fang *et al.*, 2008). A capacidade dos filmes de alginato e pectina de intumescer é facilitada pelos grupos carboxílicos, que se associam fortemente às moléculas de água. Um aumento no grau de reticulação diminui a disponibilidade destes grupos e, conseqüentemente, a hidroflicidade do sistema.

5.1.2 Definição do tempo de imersão na solução reticuladora do 2º estágio

Com o objetivo de avaliar e definir o tempo de imersão na solução reticuladora, necessário para se obter filmes com boas propriedades de barreira e mecânicas, foram testados três diferentes tempos de contato dos filmes com a solução durante o segundo estágio (10, 20 e 30 minutos). Os filmes foram confeccionados com 30mL de uma solução 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e a solução na qual estes eram imersos no 2º estágio continha 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol. O tempo de contato dos filmes com a solução deve ser suficiente para que todas as zonas de junção disponíveis sejam reticuladas, promovendo ligações efetivas que resultem em filmes fortes e resistentes.

A concentração de cálcio na solução do 2º estágio foi aumentada em relação aos ensaios anteriores (2%) porque, sendo esta concentração relativamente baixa, poderia haver a solubilização do filme durante os ensaios em períodos longos de imersão, prejudicando os resultados e a avaliação correta do melhor tempo. Desta forma, optou-se por realizar os experimentos com uma concentração de 5% (m/v) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na solução reticuladora.

Os filmes resultantes dos ensaios com os diferentes tempos foram caracterizados e os resultados para a espessura, conteúdo de umidade, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água se encontram dispostos na Tabela 5.5.

O aumento no tempo de imersão não provocou a diminuição da espessura, entre filmes de mesma formulação, indicando que não houve solubilização do biopolímero na solução iônica ou maior acomodação das cadeias em nível macromolecular que pudesse reduzir a espessura.

O conteúdo de umidade variou de 15,20 a 23,15% e não apresentou uma tendência definida. Exceto para as formulações FC1 e FC2, não foram observadas variações com o aumento do tempo de imersão na solução. Os valores de umidade obtidos estão próximos aos valores geralmente observados em biofilmes. Filmes de alginato confeccionados por Rhim (2004) apresentaram conteúdo de umidade entre 15,7 e 17,7%. Também para filmes de alginato, da Silva *et al.* (2009) obtiveram filmes com 14% de umidade (reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol).

Tabela 5.5. Espessura, conteúdo de umidade, massa solubilizável em água e PVA dos filmes reticulados com 30 mL de solução 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e por imersão por tempos diferentes em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol no 2º estágio.

| FC | Tempo (min) | δ (μm) | ω (%) | MS (%) | PVA ($\text{g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$) |
|-----|-------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| FC1 | 10 | $20 \pm 2,8^c$ | $18,00 \pm 1,38^c$ | $31,11 \pm 0,58^a$ | $2,68 \pm 0,12^{bc}$ |
| | 20 | $19 \pm 2,2^c$ | $15,36 \pm 1,37^d$ | $24,88 \pm 0,36^b$ | $2,31 \pm 0,16^c$ |
| | 30 | $20 \pm 2,1^c$ | $15,20 \pm 1,34^d$ | $25,38 \pm 1,19^b$ | $2,42 \pm 0,37^c$ |
| FC2 | 10 | $21 \pm 3,8^c$ | $21,96 \pm 1,10^b$ | $23,14 \pm 0,89^b$ | $3,45 \pm 0,99^a$ |
| | 20 | $22 \pm 2,1^c$ | $25,72 \pm 0,86^a$ | $19,44 \pm 1,25^{cd}$ | $3,87 \pm 0,49^a$ |
| | 30 | $22 \pm 3,2^c$ | $26,25 \pm 1,25^a$ | $19,45 \pm 0,61^{cd}$ | $3,86 \pm 0,35^a$ |
| FC3 | 10 | $25 \pm 2,5^b$ | $18,04 \pm 1,41^c$ | $21,57 \pm 1,30^c$ | $2,91 \pm 0,58^b$ |
| | 20 | $24 \pm 1,6^{bc}$ | $18,84 \pm 1,12^c$ | $18,10 \pm 1,22^d$ | $3,09 \pm 0,24^{ab}$ |
| | 30 | $24 \pm 1,2^{bc}$ | $18,25 \pm 1,23^c$ | $18,25 \pm 0,88^d$ | $3,02 \pm 0,29^{ab}$ |
| FC4 | 10 | $24 \pm 1,8^{bc}$ | $19,72 \pm 0,48^{bc}$ | $16,12 \pm 0,79^{de}$ | $2,96 \pm 0,56^b$ |
| | 20 | $25 \pm 2,7^b$ | $18,57 \pm 1,11^c$ | $17,21 \pm 1,13^d$ | $2,94 \pm 0,19^b$ |
| | 30 | $25 \pm 1,7^b$ | $19,47 \pm 0,52^c$ | $15,06 \pm 0,92^e$ | $2,85 \pm 0,13^b$ |
| FC5 | 10 | $27 \pm 1,2^a$ | $22,87 \pm 0,91^b$ | $21,39 \pm 1,17^c$ | $3,36 \pm 0,26^a$ |
| | 20 | $27 \pm 2,0^a$ | $22,19 \pm 0,41^b$ | $15,86 \pm 1,19^e$ | $3,23 \pm 0,24^{ab}$ |
| | 30 | $26 \pm 4,7^{ab}$ | $22,65 \pm 0,32^b$ | $13,95 \pm 1,18^{ef}$ | $3,36 \pm 0,38^a$ |
| FC6 | 10 | $27 \pm 2,1^a$ | $21,55 \pm 1,26^b$ | $18,53 \pm 0,78^d$ | $3,39 \pm 0,22^a$ |
| | 20 | $27 \pm 2,8^a$ | $22,28 \pm 1,25^b$ | $15,31 \pm 1,22^e$ | $3,62 \pm 0,16^a$ |
| | 30 | $27 \pm 1,9^a$ | $20,10 \pm 1,10^{bc}$ | $18,26 \pm 1,23^d$ | $3,54 \pm 0,17^a$ |

Média \pm desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Já a massa solubilizada diminuiu ao aumentar o tempo de imersão de 10 para 20 minutos para todas as formulações exceto a FC4, indicando que a maior exposição pode promover ligações mais efetivas que melhoram a barreira à água. O tempo de exposição aos íons cálcio deve ser suficiente para promover fortes ligações entre as cadeias poliméricas, resultando em alta coesividade. Em tempos de imersão superiores a 10 minutos, as ligações

dos íons cálcio podem ter sido mais efetivas, diminuindo a difusão de moléculas de solvente para o interior dos filmes que se acomodam na fase polimérica, provocando o aumento do volume (Lucas *et al.*, 2001).

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes confeccionados com a mesma formulação também não apresentou diferenças significativas entre os três tratamentos de imersão e observou-se que valores mais baixos foram obtidos para os filmes simples de pectina (FC1), provavelmente devido à menor espessura destes.

Krochta e de Mulder-Johnston (1997) qualificaram os filmes de acordo com uma faixa de valores para a permeabilidade ao vapor de água, classificando os filmes como pobres (10 a 100 g.mm/m².dia.kPa), moderados (0,10 a 10 g.mm/m².dia.kPa) ou bons (0,01 a 0,10 g.mm/m².dia.kPa). De acordo com esta classificação, todos os filmes na faixa estudada apresentam moderada barreira ao vapor de água.

Os resultados obtidos para a PVA apresentaram-se melhores do que os obtidos por Parris *et al.* (1995), que também verificaram a superioridade dos filmes de alginato. Estes autores confeccionaram filmes de pectina BTM com glicerol (70/30) com espessuras entre 0,06 e 0,08 mm com 76,56 g.mm/m².dia.kPa. Quando o polissacarídeo utilizado era o alginato, os filmes apresentaram PVA de 56,4 g.mm/m².dia.kPa. Além da maior espessura, que influencia diretamente na propriedade, as diferentes condições de temperatura e umidade relativa podem ter contribuído para este resultado. Além disso, os autores não utilizaram agentes reticulantes. Este mesmo trabalho ressalta a dificuldade em obter filmes hidrofílicos com propriedades semelhantes às dos filmes sintéticos. Filmes de polietileno, por exemplo, com 0,008 mm de espessura possuem PVA de apenas 0,05 g.mm/m².dia.kPa (Parris *et al.*, 1995).

Batista (2004), ao adicionar ácidos graxos em diferentes proporções aos filmes de pectina, obteve PVA em torno de 6,0 g.mm/m².dia.kPa. Em outro trabalho, filmes de pectina de alto teor de metoxilação com espessura de 0,022 mm apresentaram PVA de 6,77 g.mm/m².dia.kPa (Mamani, 2009).

Zactiti e Kieckbusch (2006) obtiveram filmes de alginato reticulados com 5% de CaCl₂.2H₂O no 2º estágio com PVA de 4,69 g.mm/m².dia.kPa, porém a espessura destes era de 0,095mm, mais que o triplo da espessura utilizada no presente trabalho.

Na Tabela 5.6, estão apresentados os resultados obtidos para o grau de intumescimento (GI), para a relação entre a espessura final e a espessura inicial após o contato

com a água (δ_f/δ_i), tensão na ruptura e alongamento dos filmes reticulados nos diferentes tempos de imersão.

Tabela 5.6. Grau de intumescimento (GI), relação entre as espessuras após a absorção (δ_f/δ_i), e propriedades mecânicas dos filmes reticulados com 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e por imersão por tempos diferentes em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol no 2º estágio.

| <i>FC</i> | <i>Tempo (min)</i> | <i>GI (gH₂O/g filme)</i> | δ_f/δ_i | <i>TR (MPa)</i> | <i>A (%)</i> |
|------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| FC1 | 10 | 4,87 ± 0,11 ^a | 5,56 ± 0,26 ^a | 47,65 ± (9,47) ^d | 5,57 ± 1,67 ^a |
| | 20 | 4,24 ± 0,22 ^a | 5,35 ± 0,88 ^a | 70,79 ± (7,04) ^c | 4,86 ± 0,59 ^{ab} |
| | 30 | 4,38 ± 0,39 ^a | 5,12 ± 0,31 ^a | 54,85 ± (5,51) ^d | 5,06 ± 0,66 ^{ab} |
| FC2 | 10 | 3,15 ± 0,26 ^b | 4,30 ± 0,72 ^b | 61,36 ± (5,66) ^c | 5,29 ± 0,72 ^{ab} |
| | 20 | 3,49 ± 0,19 ^b | 4,88 ± 0,31 ^{ab} | 61,32 ± (2,80) ^c | 4,56 ± 0,65 ^b |
| | 30 | 3,30 ± 0,23 ^b | 4,31 ± 0,25 ^b | 54,49 ± (1,65) ^c | 5,69 ± 0,43 ^a |
| FC3 | 10 | 1,84 ± 0,17 ^c | 3,52 ± 0,28 ^{bc} | 91,79 ± (5,81) ^b | 5,30 ± 0,59 ^{ab} |
| | 20 | 1,74 ± 0,08 ^c | 3,34 ± 0,04 ^c | 87,96 ± (9,93) ^b | 4,71 ± 0,81 ^b |
| | 30 | 1,42 ± 0,14 ^{cd} | 2,92 ± 0,18 ^c | 85,79 ± (9,61) ^b | 4,81 ± 0,64 ^b |
| FC4 | 10 | 1,36 ± 0,068 ^d | 2,91 ± 0,14 ^c | 96,63 ± (11,52) ^b | 5,23 ± 0,75 ^{ab} |
| | 20 | 1,37 ± 0,045 ^d | 2,65 ± 0,49 ^c | 94,53 ± (3,43) ^b | 5,17 ± 0,86 ^{ab} |
| | 30 | 1,30 ± 0,18 ^d | 2,62 ± 0,24 ^c | 94,30 ± (11,93) ^b | 5,89 ± 0,89 ^a |
| FC5 | 10 | 0,96 ± 0,049 ^{de} | 2,35 ± 0,010 ^{cd} | 111,47 ± 10,89 ^{ab} | 5,87 ± 0,28 ^a |
| | 20 | 1,12 ± 0,031 ^d | 2,63 ± 0,078 ^c | 116,19 ± 14,39 ^a | 5,21 ± 0,76 ^a |
| | 30 | 1,03 ± 0,052 ^{de} | 2,47 ± 0,13 ^{cd} | 102,36 ± 12,83 ^b | 5,08 ± 0,62 ^{ab} |
| FC6 | 10 | 0,79 ± 0,014 ^e | 2,06 ± 0,038 ^d | 120,09 ± 12,77 ^a | 6,00 ± 0,40 ^a |
| | 20 | 0,77 ± 0,068 ^e | 2,01 ± 0,12 ^d | 122,62 ± 12,72 ^a | 5,97 ± 0,63 ^a |
| | 30 | 0,67 ± 0,022 ^e | 1,80 ± 0,11 ^d | 128,24 ± 14,75 ^a | 5,46 ± 0,67 ^a |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os valores do grau de intumescimento e do aumento da espessura correspondem a um equilíbrio após a imersão dos filmes em água destilada com agitação magnética por 20

minutos. De acordo com as curvas obtidas na Figura 5.2, um tempo de permanência dos filmes em água de 20 minutos garante que todas as formulações tenham atingido o equilíbrio e não haja mais alteração no grau de intumescimento.

Os diferentes tempos de imersão não ocasionaram mudanças significativas no grau de intumescimento e na relação de espessura dos filmes de mesma formulação. Ao permanecerem em contato com a água, os filmes simples de pectina (FC1) aumentam 4 vezes a sua massa original, enquanto que os filmes com 90% de alginato (FC6) não chegam a dobrar sua massa inicial.

A partir dos valores de tensão na ruptura encontrados, verifica-se que o tempo de imersão influenciou os filmes de pectina (FC1), pois foi encontrado um aumento significativo da tensão na ruptura ao aumentar o tempo de imersão de 10 para 20 minutos e uma diminuição ao aumentar para 30 minutos.

Comportamento muito semelhante de redução de TR com o aumento do tempo foi verificado por Pavlath e Robertson (1999) para filmes de alginato. Na imersão em 5% de CaCl_2 , os autores observaram que aumentando o tempo de 5 para 15 minutos, a TR aumentou de 41,11 para 62,43 MPa, porém após 30 minutos, ela diminuiu novamente para 47,95 MPa. Esta tendência também foi observada quando a reticulação foi realizada com outros íons, como zinco, porém o trabalho não apresenta uma explicação para este comportamento.

Sartori *et al.* (1997) verificaram, para filmes com diferentes tipos de alginato imersos em solução de 0,8% de CaCl_2 , que o processo de troca iônica é muito rápido, e que mais da metade da conversão entre o sódio e o cálcio ocorrem nos primeiros 30 segundos, sendo que após 30 minutos praticamente não há mais variação no conteúdo de íons cálcio. Em outro trabalho semelhante, Roger *et al.* (2006) relatam que mais da metade da conversão acontece nos primeiros 5 minutos e após 10 minutos, a concentração de cálcio no filme permanece constante. Nos instantes iniciais, todos os sítios ativos presentes nas cadeias do alginato estão disponíveis, já em tempos maiores, há uma resistência da difusão devido às ligações já existentes, fazendo com que o processo seja mais lento nos instantes finais. Al-Musa *et al.* (1999) também citam em seu trabalho que a reação de reticulação do alginato com o cálcio é rápida e não apresenta efeito em imersões acima de 30 minutos.

Em outro trabalho com filmes de alginato, foi estudada a PVA em diferentes tempos de imersão (0, 1, 3, 5, 10 e 20 minutos) em solução aquosa de cálcio (1:9), e foi verificado que os

melhores valores foram obtidos com 3 minutos de imersão. Acima deste tempo, houve aumento do valor da PVA que foi atribuído ao prevaecimento do processo de solubilização sobre a reticulação (Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008). Da Silva (2009), ao estudar os efeitos do tempo de imersão em conjunto com outras variáveis determinou que 30 minutos era o tempo de imersão necessário para que os filmes apresentem boas propriedades mecânicas e de barreira.

Levando em consideração o comportamento observado para os filmes de pectina, no presente trabalho, o tempo de imersão de 20 minutos foi selecionado como tempo ótimo para a reticulação dos filmes.

5.1.3 Definição da concentração de glicerol na solução reticuladora do 2º estágio

Para o estudo do efeito da concentração de plastificante na solução reticuladora, os filmes foram confeccionados com 30 mL de solução contendo 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio. O tempo de imersão utilizado foi de 20 minutos, conforme definido no Item 5.1.2. Foram estudadas as concentrações de glicerol de 1, 3, 5 e 7% (m/v) na solução de imersão do 2º estágio. O limite máximo a ser estudado foi definido em ensaios preliminares que mostraram que em concentrações acima de 7% não havia uma incorporação eficiente do plastificante e os filmes apresentavam aspecto oleoso, por uma possível separação de fases.

Os resultados das medidas de espessura, conteúdo de umidade, solubilidade em água e PVA dos filmes de pectina confeccionados em diferentes tempos de imersão e concentrações de glicerol durante a reticulação final estão apresentados na Tabela 5.7. Nesta análise, o teste de Tukey foi realizado com o objetivo de comparar o efeito do glicerol nas medidas de cada formulação individualmente, ou seja, as diferentes formulações dos filmes não foram comparadas entre si, a fim de simplificar a visualização.

Todos os filmes apresentaram-se transparentes, homogêneos, sem zonas de opacidade e de fácil desprendimento das placas. Não foi observada presença de rupturas ou regiões quebradiças em nenhuma das formulações estudadas. Quanto à concentração de glicerol, os filmes elaborados com maior quantidade de plastificante (> 3%) apresentaram maior maleabilidade e, portanto, maior facilidade de manuseio do que os filmes de baixa concentração.

Tabela 5.7. Espessura, conteúdo de umidade, massa solubilizável em água e PVA dos filmes reticulados com 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e por imersão por 20 minutos em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e diferentes concentrações de glicerol no 2º estágio.

| FC | C_{glicerol} (%) | δ (μm) | ω (%) | MS (%) | PVA (g.mm/m².d.KPa) |
|------------|---|---|--|----------------------------|---|
| FC1 | 1 | 18 ± 0,9 ^a | 17,69 ± 0,22 ^c | 24,41 ± 0,24 ^c | 2,62 ± 0,42 ^c |
| | 3 | 19 ± 1,5 ^a | 16,88 ± 0,35 ^c | 25,01 ± 0,39 ^c | 2,45 ± 0,30 ^c |
| | 5 | 19 ± 1,8 ^a | 21,55 ± 0,18 ^b | 34,74 ± 0,12 ^b | 4,39 ± 0,26 ^b |
| | 7 | 18 ± 1,3 ^a | 28,42 ± 0,44 ^a | 45,96 ± 0,45 ^a | 6,01 ± 0,36 ^a |
| FC2 | 1 | 21 ± 3,0 ^a | 27,27 ± 0,16 ^a | 21,18 ± 0,38 ^c | 3,20 ± 0,08 ^b |
| | 3 | 22 ± 2,1 ^a | 25,72 ± 0,86 ^a | 20,02 ± 0,55 ^c | 3,87 ± 0,49 ^a |
| | 5 | 22 ± 2,7 ^a | 26,65 ± 0,22 ^a | 27,16 ± 0,19 ^b | 3,85 ± 0,16 ^a |
| | 7 | 23 ± 5,3 ^a | 25,80 ± 0,19 ^a | 33,54 ± 0,42 ^a | 3,76 ± 0,22 ^a |
| FC3 | 1 | 20 ± 2,2 ^a | 17,22 ± 0,19 ^b | 11,17 ± 0,25 ^d | 2,61 ± 0,18 ^b |
| | 3 | 23 ± 1,6 ^a | 18,54 ± 0,13 ^b | 18,10 ± 1,22 ^c | 3,09 ± 0,24 ^a |
| | 5 | 23 ± 1,8 ^a | 23,67 ± 0,33 ^a | 23,25 ± 0,13 ^b | 3,26 ± 0,24 ^a |
| | 7 | 24 ± 2,9 ^a | 22,29 ± 0,26 ^a | 34,27 ± 0,38 ^a | 3,01 ± 0,28 ^a |
| FC4 | 1 | 22 ± 2,2 ^a | 22,80 ± 0,71 ^a | 12,85 ± 0,19 ^c | 2,78 ± 0,11 ^b |
| | 3 | 24 ± 2,9 ^a | 21,54 ± 0,24 ^a | 17,05 ± 0,14 ^b | 2,94 ± 0,19 ^b |
| | 5 | 25 ± 4,4 ^a | 22,41 ± 0,19 ^a | 19,86 ± 0,12 ^{ab} | 3,08 ± 0,59 ^{ab} |
| | 7 | 25 ± 3,9 ^a | 21,79 ± 0,26 ^a | 21,57 ± 0,31 ^a | 3,48 ± 0,27 ^a |
| FC5 | 1 | 26 ± 4,4 ^a | 20,95 ± 0,59 ^a | 18,39 ± 0,12 ^b | 3,17 ± 0,75 ^{bc} |
| | 3 | 26 ± 2,1 ^a | 22,19 ± 0,41 ^a | 16,12 ± 0,15 ^b | 3,09 ± 0,18 ^c |
| | 5 | 31 ± 3,9 ^a | 19,32 ± 0,29 ^a | 22,76 ± 0,18 ^a | 3,25 ± 0,22 ^b |
| | 7 | 29 ± 3,0 ^a | 21,75 ± 0,38 ^a | 21,86 ± 0,31 ^a | 3,49 ± 0,92 ^a |
| FC6 | 1 | 26 ± 2,1 ^a | 19,11 ± 0,14 ^a | 18,40 ± 0,12 ^b | 3,31 ± 0,10 ^c |
| | 3 | 27 ± 2,7 ^a | 22,28 ± 1,25 ^a | 15,72 ± 0,18 ^c | 3,54 ± 0,11 ^{bc} |
| | 5 | 28 ± 3,6 ^a | 19,89 ± 0,86 ^a | 21,54 ± 0,20 ^b | 3,72 ± 0,13 ^{ab} |
| | 7 | 31 ± 3,9 ^a | 21,62 ± 0,11 ^a | 27,99 ± 0,65 ^a | 3,86 ± 0,24 ^a |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em filmes com mesma formulação indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Para a maioria das formulações, o conteúdo de umidade não foi alterado com o aumento da concentração do glicerol. Somente os filmes FC1 e FC3 tiveram o conteúdo de umidade aumentado com o aumento da concentração de plastificante de 3 para 5%. Um aumento significativo da massa solubilizada foi observado com a variação dos níveis de glicerol. O plastificante pode ser o responsável pelos altos valores obtidos, pois além de diminuir as forças coesivas afastando as cadeias poliméricas, é facilmente lixiviado, por tratar-se de uma substância altamente solúvel em água.

Zactiti (2004) observou um aumento na massa solubilizada em água em filmes de alginato ao aumentar a concentração de glicerol de 0,7 para 5%. Em outro trabalho, com filmes compostos de alginato e pectina na proporção 1:1, a mudança de nível de 5 para 7% de glicerol elevou a massa solubilizada de 20 para 24%, valor semelhante ao da Formulação FC4. Os autores também verificaram que a presença de 15% de plastificante resultou em filmes com 37% de massa solubilizada (da Silva *et al.*, 2009). Para filmes de caseinato de sódio, o aumento da concentração de glicerol em duas vezes ocasionou o aumento da massa solubilizada em quase o dobro do valor inicial (Shou *et al.*, 2005). Altos valores para esta propriedade também foram encontrados por Kang *et al.* (2005), que obtiveram 59,82% de massa solubilizada para filmes de pectina contendo glicerol (1g/g biopolímero) reticulados por imersão em solução de CaCl_2 (5%).

O efeito do plastificante nas propriedades de barreira dos filmes também ficou evidente nos resultados da permeabilidade ao vapor de água, tendo sido verificado um aumento significativo da PVA com o aumento da concentração de glicerol. Os filmes de natureza hidrofílica, como os de pectina e alginato de sódio, costumam apresentar pobre barreira à transferência de água, o que é amenizado pela formação de fortes redes tridimensionais com os íons cálcio. Entretanto, o plastificante utilizado para melhorar a flexibilidade dos filmes, exerce grande influência negativa sobre as propriedades de barreira, pois há uma redução das forças intermoleculares com o conseqüente aumento do volume livre e dos movimentos das cadeias, facilitando a permeação (Sothornvit e Krochta, 2005).

O aumento da PVA com o aumento da concentração de glicerol na formulação também foi observado para filmes de caseinato de sódio (Shou *et al.*, 2005) e para filmes de proteína de soro de leite, porém para estes a solubilidade não foi afetada (Sothornvit e Krochta, 2000).

Na Tabela 5.8, estão apresentados os resultados da influência do plastificante sobre o intumescimento e propriedades mecânicas dos filmes.

Tabela 5.8. Grau de intumescimento (GI) e propriedades mecânicas dos filmes reticulados com 30 mL de solução com 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e por imersão por 20 minutos em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e diferentes concentrações de glicerol no 2º estágio.

| FC | C_{glicerol} (%) | GI (gH₂O/g filme) | δ_f / δ_i | TR (MPa) | A (%) |
|------------|---|---|---|-----------------------------|---------------------------|
| FC1 | 1 | 4,57 ± 0,23 ^a | 5,32 ± 0,27 ^a | 55,77 ± 2,72 ^a | 4,36 ± 0,94 ^c |
| | 3 | 4,15 ± 0,12 ^{ab} | 5,48 ± 0,45 ^a | 63,81 ± 6,87 ^a | 4,86 ± 0,59 ^c |
| | 5 | 4,52 ± 0,37 ^{ab} | 5,87 ± 0,40 ^a | 48,35 ± 5,15 ^b | 6,02 ± 0,25 ^b |
| | 7 | 3,58 ± 0,21 ^b | 5,68 ± 0,19 ^a | 20,45 ± 0,58 ^c | 14,14 ± 0,51 ^a |
| FC2 | 1 | 3,46 ± 0,12 ^a | 5,43 ± 0,40 ^a | 72,83 ± 6,17 ^a | 3,74 ± 0,45 ^c |
| | 3 | 3,49 ± 0,19 ^a | 4,88 ± 0,31 ^a | 61,14 ± 3,83 ^b | 4,56 ± 0,65 ^b |
| | 5 | 3,78 ± 0,15 ^a | 4,88 ± 0,18 ^a | 47,78 ± 3,38 ^c | 4,78 ± 0,62 ^b |
| | 7 | 2,96 ± 0,45 ^b | 4,44 ± 0,16 ^a | 45,74 ± 8,83 ^c | 5,81 ± 0,20 ^a |
| FC3 | 1 | 1,75 ± 0,27 ^a | 3,72 ± 0,25 ^a | 97,12 ± 10,71 ^a | 3,76 ± 0,41 ^c |
| | 3 | 1,74 ± 0,08 ^a | 3,41 ± 0,12 ^a | 83,44 ± 8,23 ^b | 3,96 ± 0,44 ^{bc} |
| | 5 | 1,80 ± 0,11 ^a | 3,51 ± 0,025 ^a | 78,22 ± 5,05 ^c | 4,37 ± 0,72 ^b |
| | 7 | 1,44 ± 0,052 ^b | 2,96 ± 0,16 ^b | 60,23 ± 5,34 ^d | 5,51 ± 0,74 ^a |
| FC4 | 1 | 1,42 ± 0,14 ^a | 2,89 ± 0,02 ^a | 114,04 ± 8,05 ^a | 4,63 ± 0,22 ^c |
| | 3 | 1,44 ± 0,22 ^a | 2,66 ± 0,32 ^a | 94,16 ± 4,29 ^b | 4,68 ± 0,53 ^c |
| | 5 | 1,16 ± 0,15 ^b | 2,65 ± 0,27 ^a | 82,34 ± 11,84 ^c | 6,26 ± 0,34 ^b |
| | 7 | 1,14 ± 0,056 ^b | 2,56 ± 0,16 ^a | 67,81 ± 7,84 ^d | 7,48 ± 0,45 ^a |
| FC5 | 1 | 1,03 ± 0,10 ^{ab} | 2,42 ± 0,15 ^{ab} | 120,74 ± 6,76 ^a | 4,94 ± 0,48 ^b |
| | 3 | 1,10 ± 0,055 ^a | 2,59 ± 0,11 ^a | 118,67 ± 6,29 ^a | 5,21 ± 0,76 ^b |
| | 5 | 0,95 ± 0,029 ^{bc} | 2,21 ± 0,09 ^{bc} | 73,97 ± 7,28 ^b | 6,34 ± 0,32 ^a |
| | 7 | 0,86 ± 0,021 ^c | 2,11 ± 0,03 ^c | 80,34 ± 3,56 ^b | 6,41 ± 0,39 ^a |
| FC6 | 1 | 0,84 ± 0,059 ^a | 2,15 ± 0,16 ^a | 121,16 ± 7,88 ^a | 6,16 ± 0,28 ^b |
| | 3 | 0,80 ± 0,073 ^a | 2,01 ± 0,12 ^a | 120,37 ± 11,59 ^a | 5,97 ± 0,63 ^b |
| | 5 | 0,72 ± 0,090 ^{ab} | 2,15 ± 0,09 ^a | 93,97 ± 4,45 ^b | 8,53 ± 0,46 ^a |
| | 7 | 0,69 ± 0,053 ^b | 2,06 ± 0,16 ^a | 87,44 ± 6,92 ^b | 8,65 ± 0,33 ^a |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em filmes com mesma formulação indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O aumento da concentração de glicerol na solução reticuladora ocasionou redução nos valores de grau de intumescimento e ganho de espessura. Este comportamento é contrário ao esperado, pois os plastificantes tendem a diminuir a coesividade das cadeias. Entretanto, esta alteração pode ter sido ocasionada pela liberação do glicerol presente nos filmes na água utilizada nos ensaios de intumescimento.

A elasticidade melhorou significativamente com o aumento dos níveis de glicerol e foi observada uma relação inversa entre a tensão na ruptura e o alongamento, pois os filmes contendo 7% de glicerol apresentaram a maior elasticidade e, também, a menor tensão na ruptura. Este comportamento é comum, pois a incorporação do plastificante modifica a organização tridimensional das cadeias com o intuito, justamente, de melhorar a mobilidade das moléculas. Entretanto, há a redução das forças coesivas fazendo com que os filmes mais elásticos sejam menos resistentes.

O aumento da elasticidade e a diminuição da TR com a incorporação de glicerol também foi verificada em filmes de pectina com amido e em filmes de caseinato de sódio por Coffin e Fishman (1994) e Shou *et al.* (2005), respectivamente. Neste último, foi relatado que a diminuição da TR com o aumento da concentração de plastificante segue uma tendência linear.

Comportamento bem peculiar foi obtido por McHugh e Krochta (1994), que observaram que em filmes à base de proteína do soro de leite, se a concentração de glicerol for duplicada a TR cai para a metade e o alongamento aumenta cerca de 6 vezes.

Em outro trabalho, com filmes de alginato reticulados por imersão em formaldeído e contendo sorbitol como plastificante, também foi observada a diminuição da TR com o aumento da concentração de plastificante (de 56 para 48 MPa), mas contrariamente ao comportamento típico, houve diminuição também no alongamento de 4 para 1,8% (Lima *et al.*, 2007).

A partir da avaliação dos resultados, a concentração de 3% de glicerol na solução reticuladora foi definida como a concentração ideal, por deixar os filmes mais flexíveis sem prejudicar as demais propriedades.

5.1.4 Definição da concentração de cálcio na solução reticuladora do 2º estágio

O processo de reticulação é a etapa mais importante na confecção dos filmes de alginato e pectina. O estudo preliminar do efeito da pré-reticulação mostrou que há uma

limitação na quantidade de cálcio que pode ser adicionada à solução filmogênica e, essa quantidade limite, não é capaz de reticular efetivamente as cadeias suprimindo os efeitos da alta higroscopicidade destes filmes, como a alta solubilidade e PVA. A segunda etapa da metodologia adotada para a confecção dos filmes consiste na imersão dos pré-filmes em uma solução com concentração mais alta de cloreto de cálcio, permitindo, pela difusão, a reticulação mais uniforme e efetiva.

Os efeitos da concentração de cálcio na solução reticuladora foram avaliados nas propriedades dos filmes simples e compostos. Foram estudadas as concentrações de 4, 5, 6, 7 e 8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (m/v) na solução reticuladora que também continha 3% de glicerol, determinada nos ensaios do Item 5.1.3. Os filmes ficaram totalmente imersos durante 20 minutos em cada solução.

Os resultados de caracterização para espessura, conteúdo de umidade e solubilidade e PVA dos filmes nas diferentes condições estão apresentados na Tabela 5.9.. Nesta análise, assim como na avaliação da concentração de plastificante, o teste de Tukey foi feito com o objetivo de comparar o efeito de cálcio nas medidas de cada formulação individualmente, sem analisar as diferentes formulações entre si.

Foi observado que as propriedades dos filmes perderam em qualidade quando imersos em solução contendo níveis elevados de cálcio, principalmente 7 e 8%. Pelo aumento da espessura e pela alta solubilidade destes filmes, supõe-se que em concentrações elevadas pode haver uma reticulação instantânea com o bloqueio da superfície, o que impede uma reticulação homogênea no interior. Dessa forma, o filme ficaria com a estrutura polimérica densa e reticulada na superfície e ainda aberta e parcialmente reticulada no interior do filme, prejudicando suas propriedades mecânicas e de barreira. O excesso de cálcio também pode ficar acumulado na superfície, sendo liberado durante os ensaios de solubilidade em água, contabilizado como perda de massa.

Remuñan-Lopez e Bodmeier (1997) confeccionaram filmes de alginato reticulados por imersão em diversas concentrações de CaCl_2 durante 60 minutos. Foi verificado que em altas concentrações de cálcio houve aumento da permeabilidade ao vapor de água, do grau de intumescimento e diminuição da resistência mecânica dos filmes. Os autores atribuíram este comportamento à rápida reticulação da superfície que dificulta a difusão dos íons para dentro do filme e ressaltam que o tempo de imersão em soluções reticuladoras contendo altas concentrações de cálcio deveria ser maior.

Tabela 5.9. Espessura, conteúdo de umidade, massa solubilizável em água e PVA dos filmes em diferentes concentrações de cálcio no 2º estágio (3% glicerol, 20 minutos de imersão).

| FC | CaCl₂.2H₂O (%)[*] | δ (μm) | ω (%) | MS (%) | PVA (g.mm/m².d.KPa) |
|------------|---|------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| FC1 | 4 | 18 ± 1,7 ^c | 15,87 ± 0,65 ^c | 23,02 ± 0,49 ^d | 2,68 ± 0,11 ^{bc} |
| | 5 | 19 ± 0,9 ^{bc} | 16,54 ± 0,59 ^{bc} | 24,53 ± 0,54 ^{cd} | 2,31 ± 0,16 ^c |
| | 6 | 22 ± 3,0 ^b | 19,55 ± 0,35 ^b | 26,38 ± 0,28 ^c | 3,28 ± 0,27 ^b |
| | 7 | 22 ± 1,3 ^b | 18,57 ± 0,42 ^b | 37,52 ± 0,59 ^b | 3,16 ± 0,11 ^b |
| | 8 | 27 ± 3,8 ^a | 24,01 ± 0,66 ^a | 44,01 ± 0,29 ^a | 4,61 ± 0,34 ^a |
| FC2 | 4 | 22 ± 2,0 ^d | 17,11 ± 1,93 ^c | 19,17 ± 0,52 ^d | 3,82 ± 0,11 ^c |
| | 5 | 24 ± 2,1 ^{cd} | 21,73 ± 0,53 ^{ab} | 20,02 ± 0,55 ^d | 3,88 ± 0,20 ^c |
| | 6 | 26 ± 1,9 ^{bc} | 17,43 ± 1,88 ^c | 29,21 ± 1,05 ^c | 4,61 ± 0,51 ^b |
| | 7 | 28 ± 3,4 ^b | 18,92 ± 2,44 ^{bc} | 35,29 ± 1,25 ^b | 5,73 ± 1,46 ^a |
| | 8 | 32 ± 3,7 ^a | 24,72 ± 0,72 ^a | 40,41 ± 2,80 ^a | 6,49 ± 0,66 ^a |
| FC3 | 4 | 24 ± 1,9 ^c | 15,28 ± 0,42 ^b | 26,19 ± 1,09 ^b | 3,21 ± 0,17 ^b |
| | 5 | 24 ± 1,2 ^c | 18,84 ± 1,21 ^a | 18,68 ± 1,45 ^c | 3,09 ± 0,24 ^b |
| | 6 | 25 ± 1,6 ^c | 14,65 ± 0,34 ^b | 25,40 ± 1,45 ^b | 2,91 ± 0,28 ^b |
| | 7 | 27 ± 3,2 ^b | 15,51 ± 1,86 ^b | 26,79 ± 1,53 ^b | 4,05 ± 0,82 ^a |
| | 8 | 31 ± 6,8 ^a | 20,21 ± 0,99 ^a | 33,83 ± 1,95 ^a | 4,63 ± 0,87 ^a |
| FC4 | 4 | 23 ± 3,5 ^b | 18,99 ± 0,67 ^a | 15,65 ± 1,10 ^c | 3,08 ± 0,27 ^b |
| | 5 | 25 ± 3,1 ^{ab} | 18,57 ± 1,13 ^a | 16,92 ± 1,97 ^{bc} | 2,94 ± 0,19 ^b |
| | 6 | 25 ± 2,2 ^{ab} | 20,97 ± 1,34 ^a | 18,61 ± 1,76 ^b | 3,45 ± 0,21 ^a |
| | 7 | 26 ± 4,0 ^a | 19,74 ± 0,59 ^a | 20,24 ± 1,86 ^b | 3,97 ± 0,42 ^a |
| | 8 | 26 ± 2,7 ^a | 19,50 ± 0,38 ^a | 27,87 ± 1,51 ^a | 3,43 ± 0,31 ^a |
| FC5 | 4 | 27 ± 2,3 ^a | 22,57 ± 2,82 ^{ab} | 15,57 ± 1,81 ^b | 2,93 ± 0,34 ^a |
| | 5 | 28 ± 2,9 ^a | 19,32 ± 0,27 ^b | 16,89 ± 0,74 ^b | 3,23 ± 0,24 ^a |
| | 6 | 27 ± 1,8 ^a | 23,88 ± 1,54 ^a | 16,21 ± 2,29 ^b | 3,31 ± 0,20 ^a |
| | 7 | 29 ± 1,9 ^a | 23,12 ± 0,84 ^{ab} | 21,60 ± 0,19 ^a | 3,03 ± 0,24 ^a |
| | 8 | 30 ± 1,6 ^b | 21,05 ± 0,98 ^{ab} | 20,48 ± 1,74 ^a | 3,08 ± 0,31 ^a |
| FC6 | 4 | 28 ± 1,5 ^b | 20,34 ± 0,89 ^{ab} | 16,54 ± 0,99 ^b | 3,05 ± 0,10 ^b |
| | 5 | 28 ± 3,7 ^b | 19,89 ± 0,86 ^{ab} | 16,10 ± 1,85 ^b | 3,62 ± 0,16 ^{ab} |
| | 6 | 31 ± 2,9 ^a | 20,51 ± 0,38 ^a | 17,92 ± 1,19 ^b | 3,70 ± 0,20 ^{ab} |
| | 7 | 31 ± 2,7 ^a | 20,52 ± 0,41 ^a | 20,84 ± 1,34 ^a | 3,56 ± 0,18 ^{ab} |
| | 8 | 31 ± 2,1 ^a | 18,10 ± 0,86 ^b | 21,75 ± 2,36 ^a | 3,99 ± 0,47 ^a |

* Concentração de CaCl₂.2H₂O na solução reticuladora do 2º estágio. Médias com a mesma letra em filmes com mesma formulação indicam que não há diferença significativa (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey. Média ± desvio padrão das repetições.

Segundo Draget *et al.* (1997), o processo de difusão muitas vezes conduz a uma reticulação não uniforme, com alta concentração na superfície e diminuição gradual no centro do filme. Entretanto, é ressaltado que, para o caso do alginato, a máxima homogeneidade pode ser alcançada quando são utilizadas altas concentrações de agentes gelificantes.

Em relação à permeabilidade ao vapor de água, também constatou-se um aumento deste coeficiente nos níveis mais altos de cálcio. Somente a formulação FC5 não foi influenciada por esta variação. Este comportamento pode ser atribuído à espessura, que foi maior nas concentrações mais altas de cálcio. Rhim (2004) e Zactiti e Kieckbusch (2006) estudaram diversas concentrações de cálcio na solução reticuladora e não observaram diferenças significativas na PVA dos filmes de alginato.

Na Tabela 5.10, estão apresentados os resultados do grau de intumescimento e das propriedades mecânicas dos filmes imersos nas diferentes soluções de cloreto de cálcio.

O grau de intumescimento e a relação entre a espessura diminuíram com o aumento da concentração de cálcio, mas tendo em vista que todas as outras propriedades foram prejudicadas com o tratamento mais intenso, a melhora da absorção de água não poderia ser associada a uma reticulação mais efetiva. Durante o tempo de ensaio de intumescimento, 20 minutos, é possível que não tenha havido tempo de romper a barreira superficial criada com a reticulação heterogênea. Corroborando a hipótese de reticulação superficial em altas concentrações, a tensão na ruptura aumentou ao passar a concentração de 4 para 5%, reduzindo significativamente nas concentrações elevadas. Com a redução da TR, o alongamento sofreu o aumento somente nas formulações com maior teor de pectina FC1, FC2 e FC3.

Zactiti e Kieckbusch (2006), ao avaliarem as concentrações de 2, 3, 4, 5 e 7% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em filmes de alginato, verificaram que a tensão na ruptura foi beneficiada com o aumento da concentração de 5% (134,64 MPa) para 7% (160,26 MPa). As demais propriedades como alongamento e massa solubilizada não sofreram alteração com os diferentes tratamentos. Em filmes de pectina BTM, Kang *et al.* (2005) comparou a imersão em solução contendo 5 e 10% de CaCl_2 e também observaram o aumento na tensão na ruptura de 193 para 230 kPa e também a diminuição da solubilidade em água. Porém, ao utilizar outros tratamentos combinando irradiação gama (10 e 30 kGy) para induzir o *crosslinking* entre as cadeias, os autores observaram redução significativa da tensão na ruptura e também aumento do conteúdo de solubilidade e PVA.

Tabela 5.10. Grau de intumescimento e propriedades mecânicas dos filmes em diferentes concentrações de cálcio no 2º estágio (3% glicerol, 20 minutos de imersão).

| FC | CaCl₂.2H₂O (%)[*] | GI (g H₂O/g filme) | δ_f/δ_i | TR (MPa) | A (%) |
|------------|---|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| FC1 | 4 | 5,28 ± 0,53 ^{ba} | 6,26 ± 0,87 ^{ba} | 53,51 ± 5,24 ^b | 3,72 ± 0,46 ^c |
| | 5 | 4,24 ± 0,22 ^b | 5,35 ± 0,88 ^b | 65,49 ± 5,52 ^a | 4,66 ± 0,44 ^{bc} |
| | 6 | 3,11 ± 0,06 ^c | 3,75 ± 0,69 ^c | 61,64 ± 8,41 ^a | 5,32 ± 0,90 ^{ab} |
| | 7 | 3,21 ± 0,05 ^c | 3,74 ± 0,55 ^c | 50,46 ± 7,21 ^b | 5,04 ± 0,62 ^b |
| | 8 | 3,46 ± 0,15 ^c | 3,25 ± 0,51 ^c | 36,17 ± 6,32 ^c | 5,99 ± 0,22 ^a |
| FC2 | 4 | 3,39 ± 0,46 ^{ab} | 5,27 ± 0,01 ^b | 62,63 ± 3,36 ^a | 3,68 ± 0,24 ^b |
| | 5 | 3,49 ± 0,19 ^a | 4,88 ± 0,31 ^b | 61,32 ± 2,80 ^a | 4,56 ± 0,51 ^b |
| | 6 | 2,70 ± 0,27 ^{bc} | 4,17 ± 0,61 ^{bc} | 48,46 ± 6,99 ^b | 5,24 ± 0,43 ^a |
| | 7 | 2,13 ± 0,32 ^{cd} | 3,72 ± 0,45 ^{cd} | 50,91 ± 4,40 ^b | 4,80 ± 0,44 ^{ab} |
| | 8 | 1,70 ± 0,17 ^d | 3,01 ± 0,14 ^d | 41,29 ± 3,02 ^b | 4,38 ± 0,36 ^b |
| FC3 | 4 | 1,69 ± 0,11 ^{ab} | 3,51 ± 0,22 ^{ab} | 81,83 ± 6,04 ^a | 3,85 ± 0,27 ^b |
| | 5 | 1,74 ± 0,08 ^{ab} | 3,34 ± 0,04 ^{bc} | 83,44 ± 8,06 ^a | 4,68 ± 0,84 ^{ab} |
| | 6 | 1,49 ± 0,21 ^{bc} | 3,11 ± 0,24 ^d | 81,68 ± 6,16 ^a | 4,36 ± 0,79 ^b |
| | 7 | 1,41 ± 0,10 ^{bc} | 3,26 ± 0,16 ^c | 57,46 ± 7,15 ^b | 5,21 ± 0,79 ^a |
| | 8 | 1,18 ± 0,13 ^c | 2,61 ± 0,36 ^d | 47,98 ± 7,93 ^b | 5,48 ± 0,67 ^a |
| FC4 | 4 | 1,41 ± 0,08 ^a | 3,49 ± 0,26 ^a | 82,56 ± 5,02 ^{bc} | 4,87 ± 0,46 ^a |
| | 5 | 1,27 ± 0,10 ^{ab} | 3,22 ± 0,24 ^{ab} | 94,53 ± 3,43 ^a | 4,68 ± 0,53 ^a |
| | 6 | 0,99 ± 0,06 ^b | 2,80 ± 0,24 ^{bc} | 85,72 ± 3,30 ^{ab} | 4,33 ± 0,56 ^a |
| | 7 | 1,26 ± 0,12 ^{ab} | 3,42 ± 0,24 ^a | 78,69 ± 6,89 ^{bc} | 4,74 ± 0,47 ^a |
| | 8 | 1,10 ± 0,10 ^b | 2,49 ± 0,16 ^c | 71,10 ± 6,93 ^c | 4,15 ± 0,32 ^a |
| FC5 | 4 | 1,11 ± 0,05 ^a | 2,76 ± 0,06 ^{ab} | 98,17 ± 8,19 ^b | 5,00 ± 0,97 ^a |
| | 5 | 0,94 ± 0,01 ^b | 2,60 ± 0,11 ^{bc} | 116,64 ± 8,68 ^a | 5,21 ± 0,76 ^a |
| | 6 | 0,73 ± 0,04 ^d | 2,16 ± 0,16 ^d | 93,63 ± 4,37 ^{bc} | 4,92 ± 0,77 ^a |
| | 7 | 0,85 ± 0,05 ^c | 2,44 ± 0,04 ^c | 91,87 ± 5,58 ^c | 5,00 ± 0,93 ^a |
| | 8 | 0,67 ± 0,02 ^d | 2,06 ± 0,13 ^d | 90,86 ± 3,36 ^c | 4,92 ± 0,66 ^a |
| FC6 | 4 | 0,89 ± 0,03 ^a | 2,51 ± 0,07 ^{ab} | 102,95 ± 9,02 ^{bc} | 4,95 ± 1,41 ^a |
| | 5 | 0,75 ± 0,07 ^{ab} | 2,23 ± 0,12 ^{bc} | 126,41 ± 5,66 ^a | 5,97 ± 0,63 ^a |
| | 6 | 0,65 ± 0,05 ^b | 1,93 ± 0,07 ^c | 91,94 ± 4,26 ^c | 5,10 ± 0,33 ^a |
| | 7 | 0,70 ± 0,12 ^b | 2,08 ± 0,24 ^{bc} | 91,81 ± 2,21 ^c | 4,86 ± 0,41 ^a |
| | 8 | 0,67 ± 0,08 ^b | 2,18 ± 0,19 ^{bc} | 94,05 ± 7,10 ^c | 4,90 ± 0,51 ^a |

* Concentração de CaCl₂.2H₂O na solução reticuladora do 2º estágio. Médias com a mesma letra em cada coluna de cada formulação indicam que não há diferença significativa (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey. Média ± desvio padrão das repetições.

Pavlath e Robertson (1999) relataram que os filmes de alginato imersos em uma concentração de 10% de CaCl_2 necessitaram de 60 minutos para atingir o valor máximo de TR, enquanto que para uma concentração de 5%, 15 minutos foram suficientes.

Com estes resultados, tem-se que o limite de concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que pode ser empregado na solução reticuladora para que ocorra melhoria nas propriedades funcionais é 5%. Ressalta-se que este limite é ideal para um tempo de imersão de 20 minutos e que conclusões mais precisas acerca de altas concentrações devem ser acompanhadas de ensaios em tempos de imersão mais longos.

5.1.5 Caracterização complementar

A seleção definitiva das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, glicerol e tempo de imersão considerou o aspecto visual, conteúdo de umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, grau de intumescimento, resistência à tração e alongamento dos filmes formados. As formulações confeccionadas com 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e imersos por 20 minutos em solução de 2º estágio contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol, satisfizeram os requisitos mínimos para estes atributos e foram submetidas a uma caracterização complementar. Estes filmes foram avaliados em relação ao conteúdo de cálcio, temperatura de transição vítrea e microestrutura, cujos resultados estão apresentados nos subitens seguintes.

5.1.5.1 Conteúdo de cálcio

As amostras das seis formulações dos filmes foram submetidas à espectroscopia de absorção atômica, a fim de quantificar o conteúdo de cálcio efetivamente presente nos filmes. Os resultados obtidos foram comparados aos dos pré-filmes do 1º estágio e estão apresentados na Tabela 5.11.

O conteúdo de cálcio não apresentou diferença significativa entre os pré-filmes, obtidos do 1º estágio. Este comportamento era esperado, uma vez que foi utilizada a mesma concentração de cálcio para todos os filmes, e a incorporação era feita diretamente na solução filmogênica. Já para os filmes do 2º estágio, o conteúdo de cálcio variou entre as formulações, onde os menores valores foram obtidos para os filmes de pectina e os maiores para os filmes com as maiores proporções de alginato. Esses resultados ratificam o comportamento superior

encontrado para os filmes FC5 e FC6 e corroboram a hipótese de que o modelo “caixa de ovos” de reticulação se aplica de forma mais eficiente às cadeias do alginato.

Tabela 5.11. Conteúdo de cálcio nos filmes do 1º e 2º estágios.

| Formulação | Conteúdo de cálcio ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ filme seco) | |
|------------|--|--------------------|
| | 1º estágio | 2º estágio |
| FC1 | $0,39 \pm 0,003^a$ | $2,26 \pm 0,057^a$ |
| FC2 | $0,41 \pm 0,001^a$ | $2,99 \pm 0,056^b$ |
| FC3 | $0,41 \pm 0,003^a$ | $3,97 \pm 0,021^c$ |
| FC4 | $0,38 \pm 0,002^a$ | $4,11 \pm 0,035^c$ |
| FC5 | $0,39 \pm 0,002^a$ | $4,85 \pm 0,066^d$ |
| FC6 | $0,42 \pm 0,003^a$ | $5,20 \pm 0,047^d$ |

Média \pm desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Srimornsak e Kennedy (2008) determinaram um conteúdo de cálcio de $1,137 \mu\text{mol}/\text{mg}$ filme seco para filmes de pectina de baixo teor de metoxilação amidada. Este valor é cerca de duas vezes inferior ao obtido. Entretanto, o método de reticulação foi diferente do utilizado neste trabalho. Os autores ainda ressaltam que a pectina amidada diminui os grupos carboxílicos livres que poderiam ser ligados aos íons cálcio. Desta forma, a pectina amidada apresenta um conteúdo de cálcio inferior à pectina sem amidação e também em relação a outros polissacarídeos de cadeia linear como o alginato. Assim como neste trabalho, os filmes de alginato apresentaram o dobro do conteúdo de cálcio, $2,06 \mu\text{mol}/\text{mg}$ filme seco.

Outro fator que altera a reatividade com os íons cálcio é a ocorrência de cadeias laterais na pectina, como a ramnose. Estas regiões ramificadas possuem dimensões que dificultam a orientação molecular necessária para desenvolver as zonas de junção pelos monômeros de ácido galacturônico (Axelos e Thibault, 1991).

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por da Silva *et al.* (2009). Filmes de pectina, alginato e pectina/alginato (1:1) reticulados com 3% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 5% de glicerol no 2º estágio apresentaram conteúdo de cálcio de 2,25, 3,29 e $4,35 \mu\text{mol}/\text{mg}$ filme seco, respectivamente.

5.1.5.2 Temperatura de transição vítrea

A temperatura de transição vítrea (T_g) foi determinada para os filmes simples de pectina e para as cinco misturas de pectina e alginato. Nas Figuras 5.3 a 5.8, estão apresentados os resultados do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e tangente de perda ($\tan \delta$).

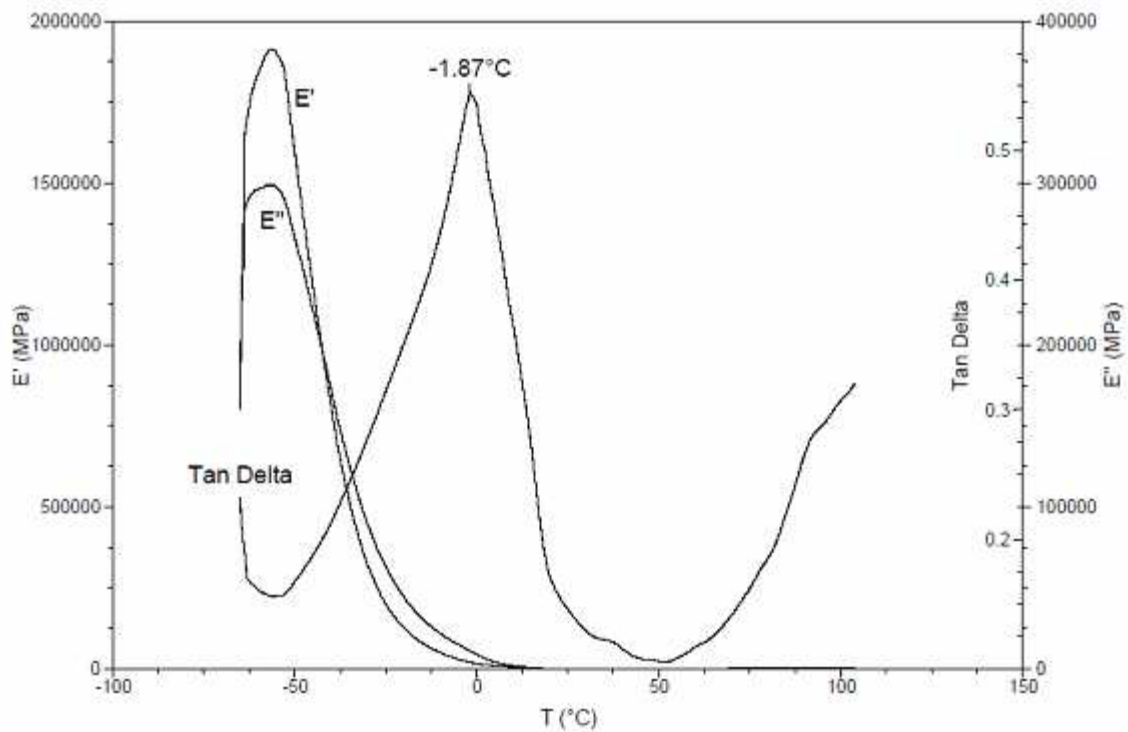


Figura 5.3. Registro da análise termomecânica de filmes simples de pectina (FC1).

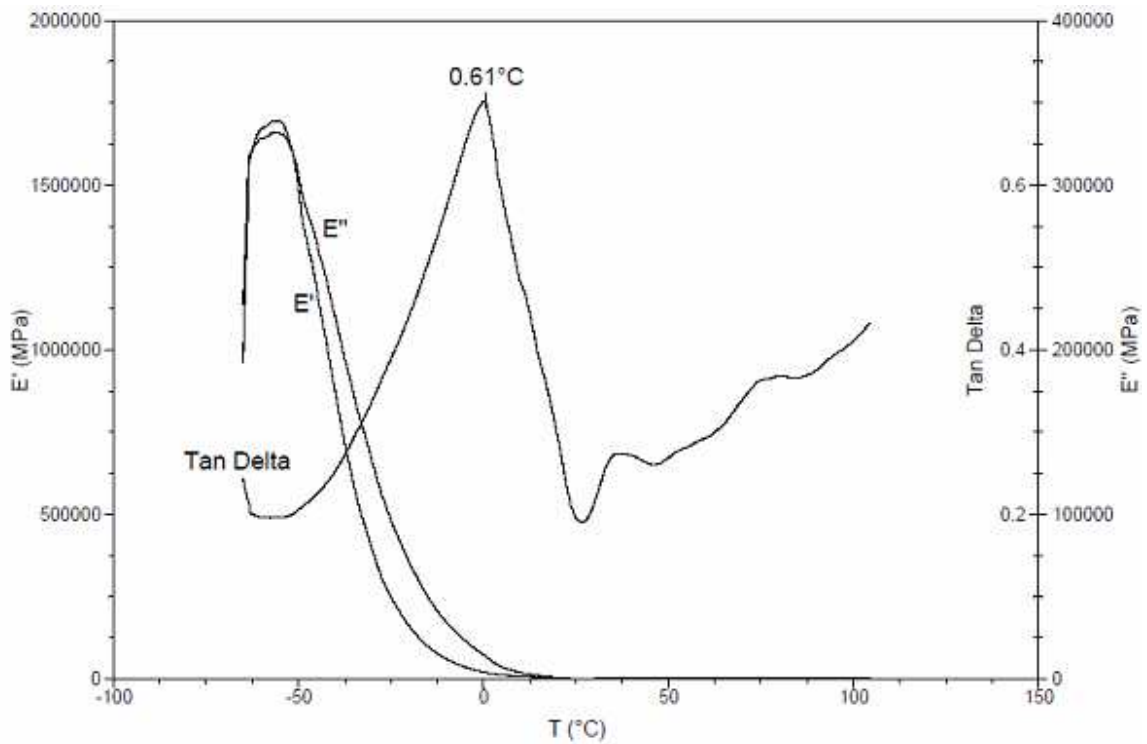


Figura 5.4. Registro da análise termomecânica de filmes com 90% de pectina e 10% de alginato (FC2).

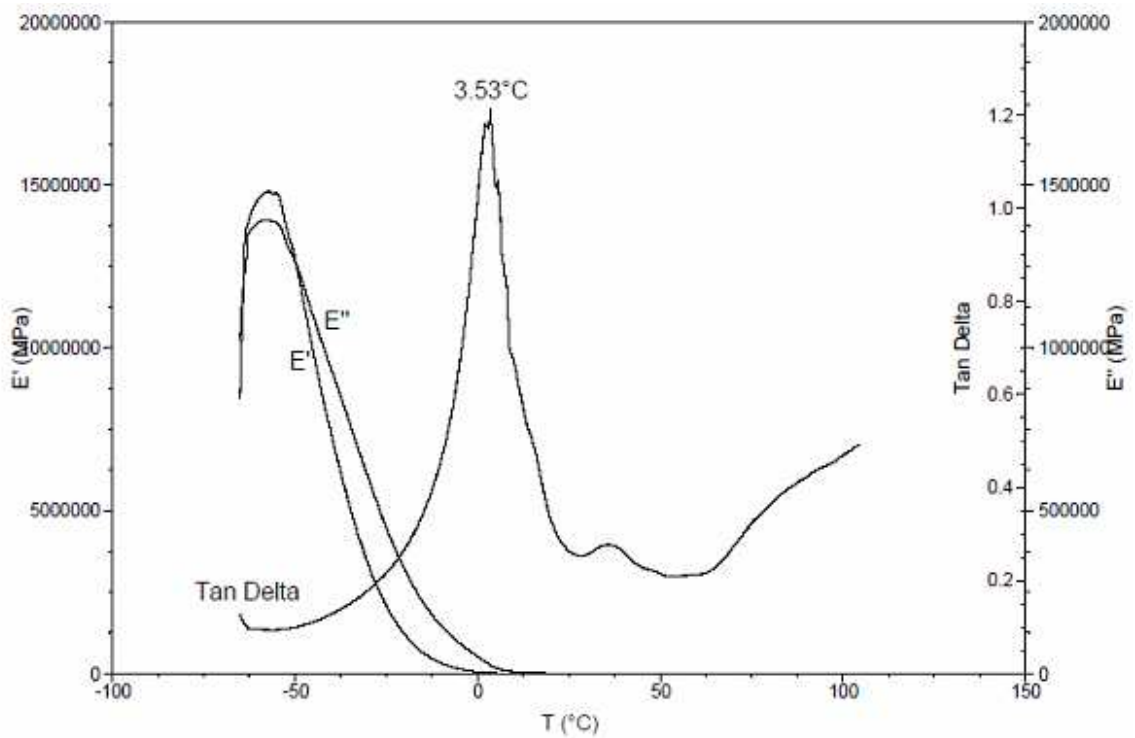


Figura 5.5. Registro da análise termomecânica de filmes com 70% de pectina e 30% de alginato (FC3).

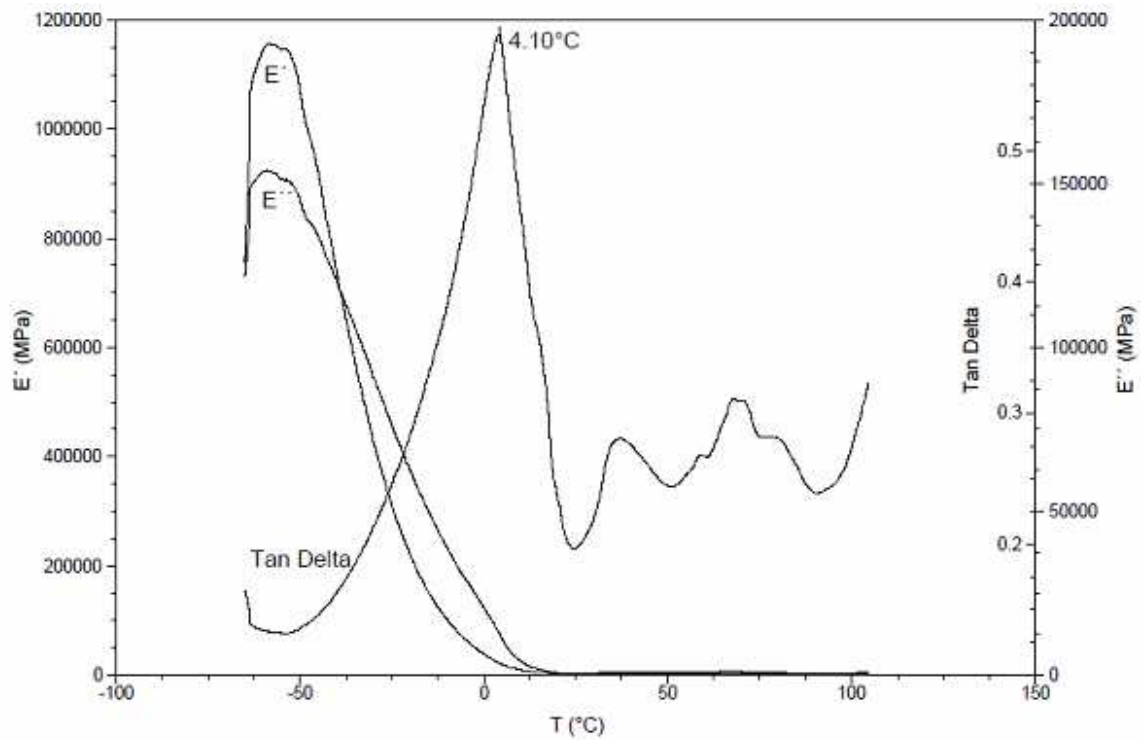


Figura 5.6. Registro da análise termomecânica de filmes com 50% de pectina e 50% de alginato (FC4).

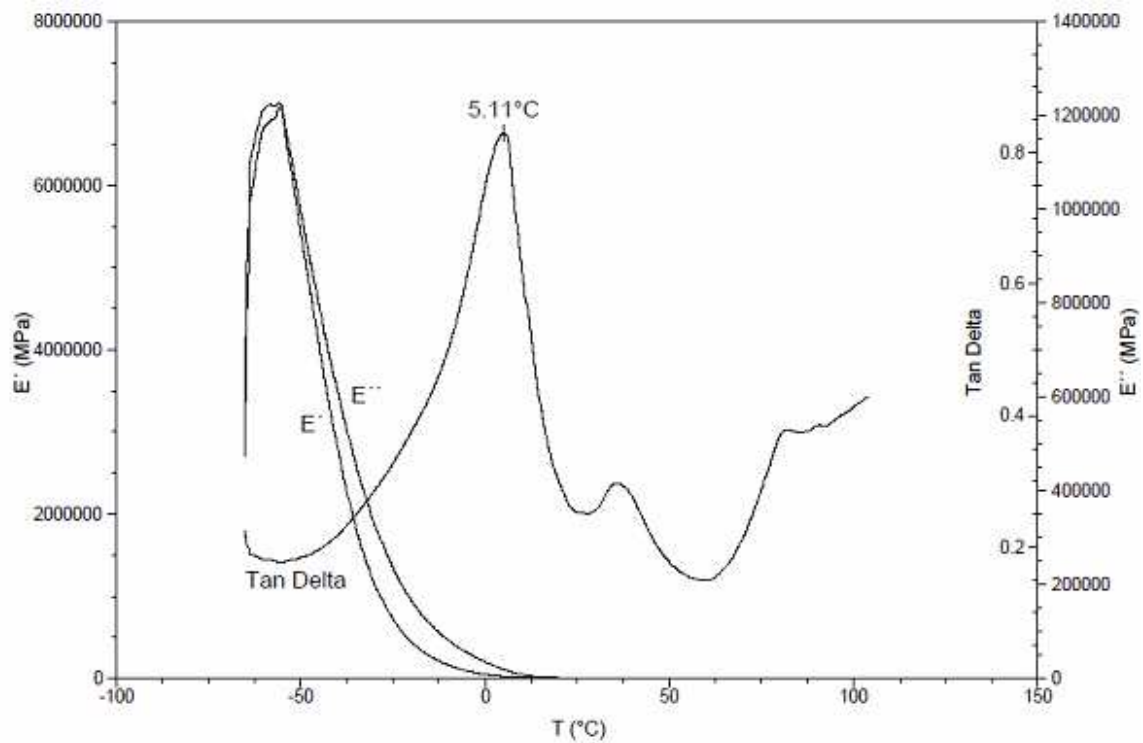


Figura 5.7. Registro da análise termomecânica de filmes com 30% de pectina e 70% de alginato (FC5).

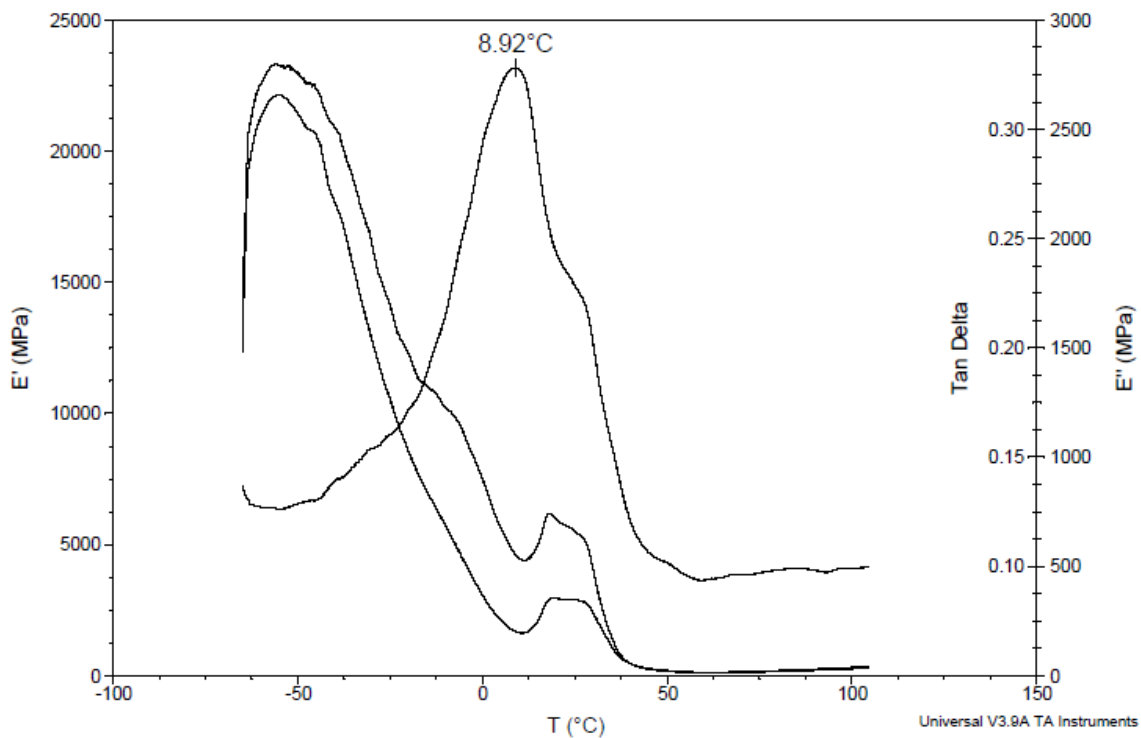


Figura 5.8. Registro da análise termomecânica de filmes com 10% de pectina e 90% de alginato (FC6).

Na Tabela 5.12 estão apresentados os valores dos picos principais nas curvas obtidas e que, se assume, corresponde a T_g das seis formulações.

Tabela 5.12. Temperaturas de transição vítrea para as diferentes formulações.

| Formulação | T_g (°C) |
|------------|------------|
| FC1 | -1,87 |
| FC2 | 0,61 |
| FC3 | 3,53 |
| FC4 | 4,10 |
| FC5 | 5,11 |
| FC6 | 8,92 |

Na Figura 5.3, referente ao filme simples de pectina, é possível observar um pico bem definido de temperatura (-1,87°C), indicando a boa miscibilidade entre o biopolímero e o plastificante. A presença de apenas um pico em $\tan \delta$ significa que o filme forma um sistema

homogêneo, isto é, que do ponto de vista físico-químico, o biopolímero misturado com o plastificante constitui uma única fase (Mendieta-Taboada *et al.*, 2008).

Um pico bem definido também foi observado para os filmes compostos sendo que o valor da T_g aumentou com o aumento da concentração de alginato na formulação. Para sistemas de dois componentes que apresentem completa miscibilidade, apenas uma T_g é observada e a posição desta dependerá de sua composição (Lucas *et al.*, 2001). O pico de $\tan \delta$ move-se do valor da T_g de um componente puro para o valor da T_g do outro componente puro, em função da composição da mistura.

Os filmes da formulação FC6 apresentaram T_g menor que os valores geralmente encontrados para filmes de alginato puro, estando de acordo com a teoria de que sistemas miscíveis apresentam uma única T_g intermediária ao valor dos polímeros puros e mais próxima do valor do componente presente em maior proporção. Neste trabalho, a T_g do alginato puro também foi determinada (apresentada no Apêndice A) e o valor encontrado é 14,65°C. Valor muito próximo a este foi verificado por Zactiti (2004), que obteve filmes de alginato reticulados com 5% de CaCl_2 com uma T_g de 15,39°C e por Santana (2010) que obteve 10,36°C. Russo *et al.* (2007) obtiveram uma T_g para filmes de alginato de sódio de 15°C, porém após a reticulação por imersão em 2% de CaCl_2 este valor baixou para -13°C. Não foram encontrados trabalhos na literatura relatando o estudo das propriedades dinâmico-mecânica de filmes de pectina BTM e nem de misturas de pectina e alginato. Fishman e Coffin (1997) obtiveram uma T_g de -33°C para filmes de pectina de alto grau de metoxilação utilizando glicerol como plastificante (70:30).

Também, são observados picos de menor intensidade acima da temperatura de transição vítrea para as formulações FC2, FC3, FC4 e FC5. O primeiro pico situado em 38°C e o segundo próximo a 70°C. Acima da T_g , as moléculas adquirem maior mobilidade e, quando atingem uma determinada temperatura denominada de cristalização (T_c), elas constituem fases metaestáveis e conseguem se organizar na forma de cristais. O aquecimento acima da T_c resulta no surgimento de um pico endotérmico correspondente à temperatura de fusão ou melting (T_m), que está relacionada a um movimento significativo das cadeias moleculares devido à desestruturação dos cristais pelo aumento da temperatura (Lucas *et al.* 2001). Estas temperaturas de T_c e T_m referem-se, respectivamente, aos picos de α'_c e α_c ilustrados na Figura 3.6 (Capítulo 3).

A ocorrência destas transições é comumente verificada em polímeros sintéticos. O polipropileno, por exemplo, apresenta uma T_g de 5°C, e acima desta são observados picos em

T_c de 90°C e T_m de 170°C (Lucas *et al.*, 2001). Muitas vezes, estas transições não são verificadas porque as temperaturas nas quais ocorrem a cristalização e a fusão estão acima da faixa de temperatura utilizada na varredura.

Era esperado que os filmes com maiores proporções de alginato apresentassem menores valores de T_g , pois estes alcançaram maior grau de reticulação que conseqüentemente diminui a mobilidade das cadeias. Além disso, o alginato possui a cadeia mais linearizada do que a pectina, que também diminui a mobilidade. Entretanto, o valor da T_g é governado primeiramente pela composição química e pela presença de plastificantes e, secundariamente pelas características estruturais, como ramificações da cadeia, ligações cruzadas e cristalinidade (Rogers, 1985). A estrutura complexa da pectina com a presença de diversos componentes como açúcares neutros pode ter predominado nesta propriedade fazendo com que sua T_g seja baixa.

De forma geral, os valores de T_g encontrados para o filme simples e para os filmes compostos estão de acordo com a temperatura utilizada para os ensaios de difusão dos filmes ativos (25°C). Para todas as formulações, o experimento será realizado acima da temperatura de T_g , onde existe maior mobilidade das cadeias e haverá difusão. Da Silva (2009) verificou que a presença do agente ativo natamicina não altera significativamente a T_g dos filmes de alginato e alginato com quitosana.

5.1.5.3 Microestrutura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada em diversos estudos envolvendo biofilmes como uma ferramenta que permite correlacionar as propriedades físico-químicas com a estrutura morfológica, sendo possível visualizar imperfeições, presença de poros e separações de fase. As micrografias da superfície e da seção transversal (fratura) dos filmes simples e compostos estão apresentadas nas Figuras 5.9 a 5.14.

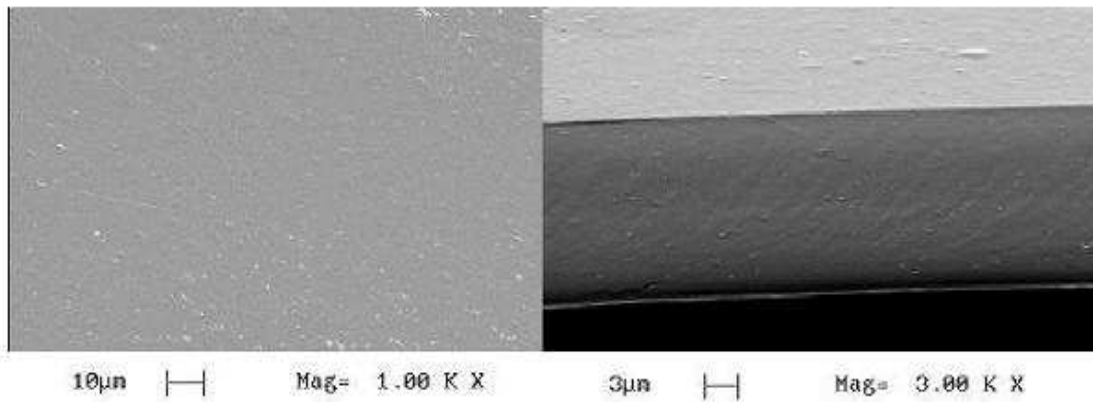


Figura 5.9. Micrografia da superfície e seção transversal dos filmes de pectina puros FC1 por MEV.

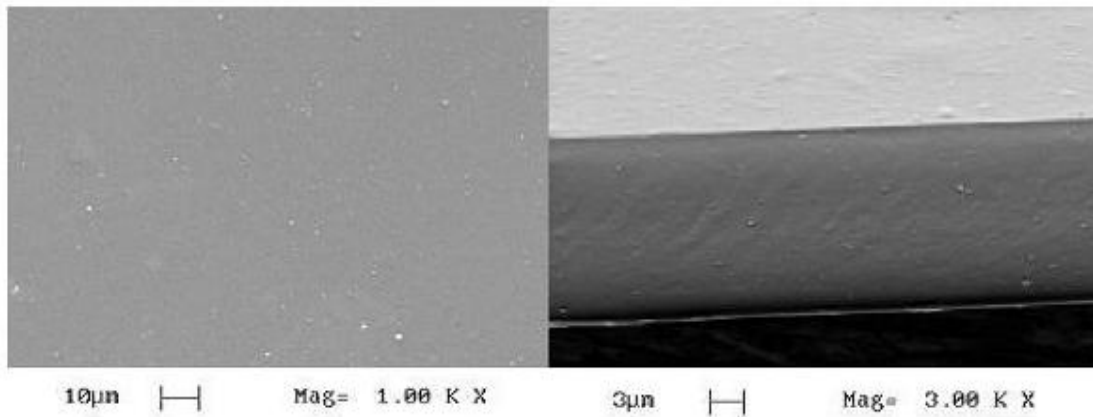


Figura 5.10. Micrografia da superfície e seção transversal dos filmes com 90% de pectina e 10% de alginato FC2 por MEV.

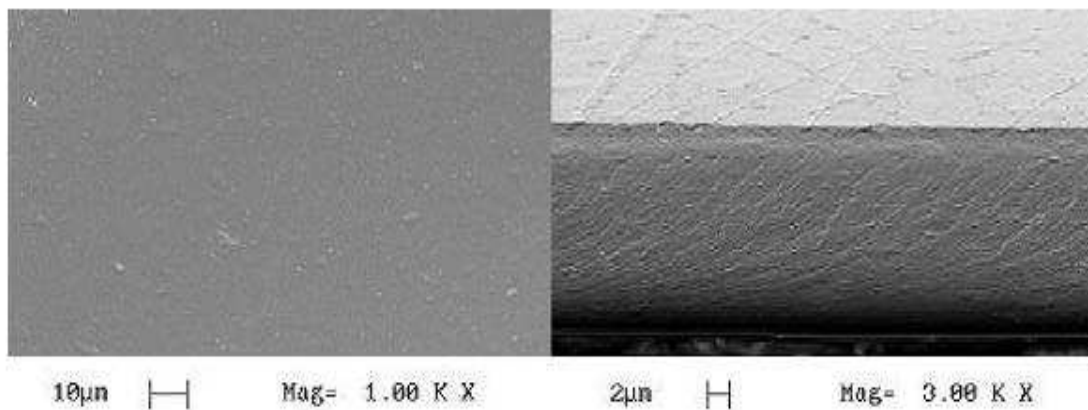


Figura 5.11. Micrografia da superfície e seção transversal dos filmes com 70% de pectina e 30% de alginato FC3 por MEV.

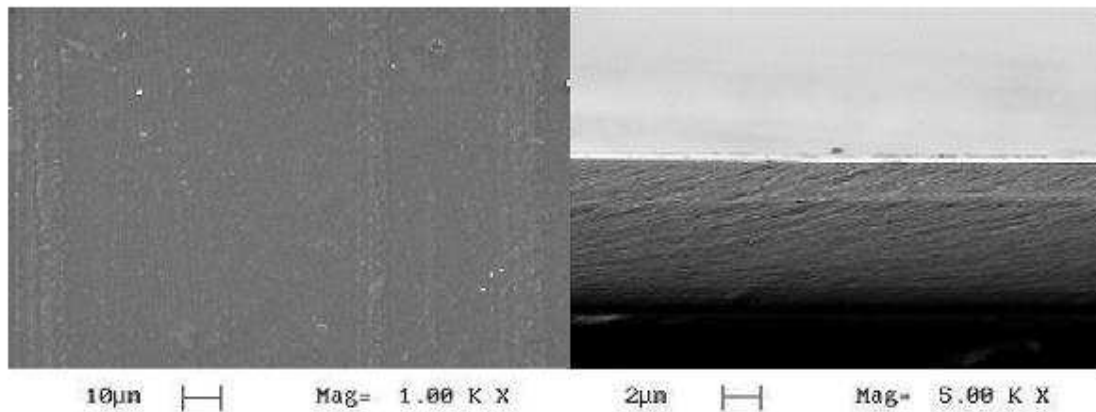


Figura 5.12. Micrografia da superfície e seção transversal dos filmes com 50% de pectina e 50% de alginato FC4 por MEV.

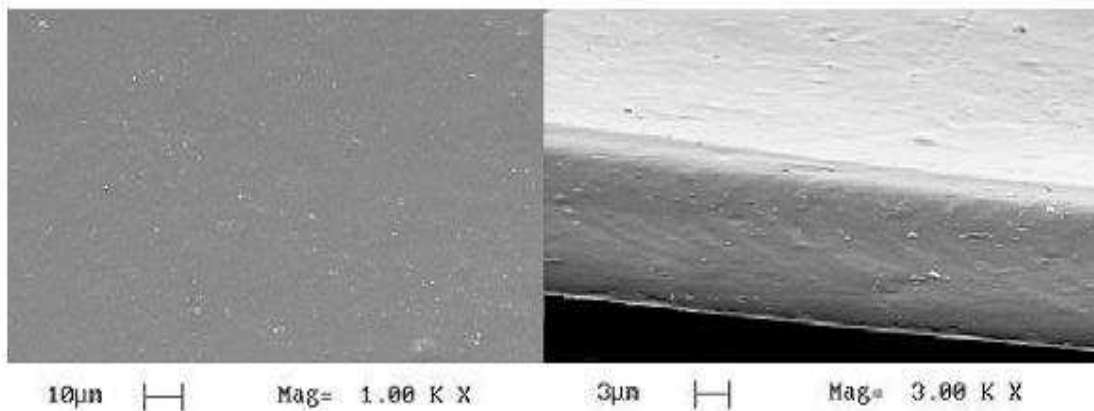


Figura 5.13. Micrografia da superfície e seção transversal dos filmes com 30% de pectina e 70% de alginato FC5 por MEV.

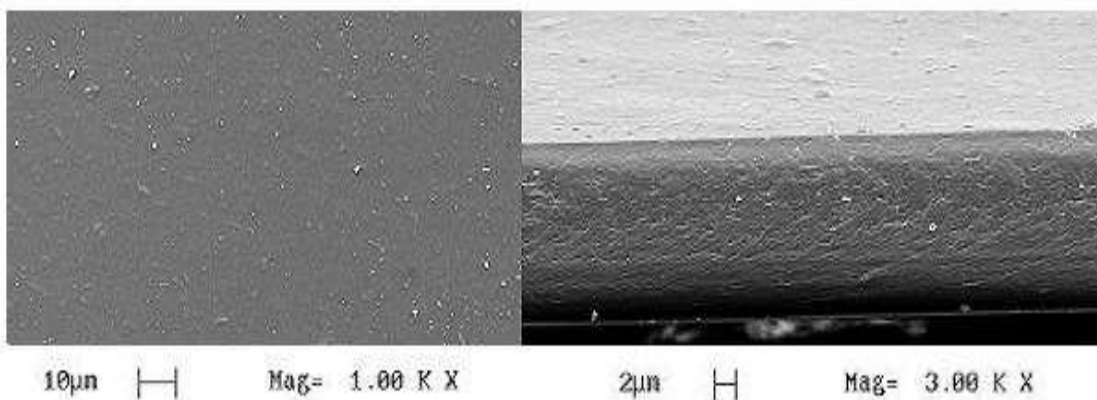


Figura 5.14. Micrografia da superfície e seção transversal dos filmes com 10% de pectina e 90% de alginato FC6 por MEV.

A análise das seções transversais nas micrografias indica, de maneira geral, a existência de uma estrutura bem compactada, sem indícios de separação de fases, concordando com os resultados de temperatura de transição vítrea. Com exceção da formulação FC6, as superfícies mostraram-se lisas e homogêneas. Na micrografia da seção transversal do filme FC3 a presença de ranhuras é devida a defeitos nas placas de acrílico nas quais esse filme foi confeccionado. Na superfície de alguns filmes e também na fratura, principalmente dos filmes FC5 e FC6, diversos pontos brancos são observáveis, que podem estar relacionados ao cálcio em excesso que não foi incorporado na matriz do filmes.

A maioria dos trabalhos com filmes de pectina e alginato relata superfícies e fraturas regulares. Geralmente, uma separação de fases é observada quando há a incorporação de grande quantidade de plastificante ou incorporação de compostos hidrofóbicos como ácidos graxos (Batista *et al.*, 2006). Lambrech *et al.* (2009) estudaram a morfologia de filmes de pectina BTM, alginato e a mistura dos dois biopolímeros (1:1) e verificaram que a blenda apresentou menor porosidade do que os respectivos filmes puros.

5.2 Filmes ativos

5.2.1 Caracterização e comparação com os filmes sem natamicina

Para a confecção dos filmes ativos, utilizou-se natamicina como agente antimicrobiano na concentração de 4% em relação à massa total de biopolímero empregada na formulação (0,04g/g biopolímero) segundo da Silva (2009). Inicialmente, tentou-se adicionar a natamicina à água contendo glicerol, para então fazer a solubilização do biopolímero seguido da reticulação parcial. Este procedimento foi realizado com sucesso para as formulações contendo 50% ou mais de alginato e resultaram em filmes com boa aparência e de fácil manuseio. Porém, para as formulações contendo acima de 50% de pectina (FC1, FC2 e FC3), a confecção mostrou-se muito difícil, pois a incorporação da natamicina provocou uma grande formação de espuma na solução filmogênica, resultando em filmes heterogêneos, com a presença de muitas bolhas e de aparência indesejável (Figura 5.15 a).

Frente a isto, só foi possível padronizar a confecção dos filmes ativos para todas as formulações adicionando a natamicina após a reticulação parcial. Estes filmes, de forma geral, apresentaram-se homogêneos e sem imperfeições, porém pouco transparentes conforme pode ser observado na Figura 5.15 b.

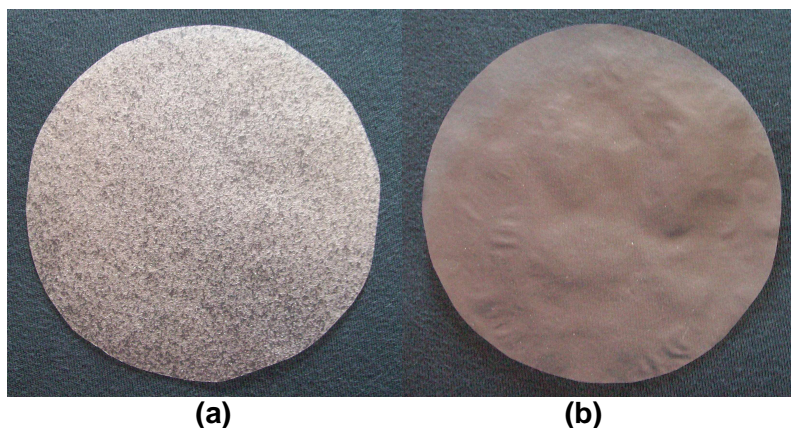


Figura 5.15. Filme de pectina (FC1) com natamicina adicionada antes (a) e após (b) a pré-reticulação com cloreto de cálcio.

Os filmes ativos em que a natamicina foi adicionada após a reticulação parcial foram caracterizados e os resultados comparados com os filmes sem antimicrobiano. Além das 6 formulações já estudadas nas seções anteriores, nesta parte foram confeccionados também, filmes contendo alginato puro (FC7), a fim de se obter uma melhor comparação entre os

resultados. As concentrações de cálcio, plastificante e o tempo de imersão na solução reticuladora do 2º estágio utilizados foram os mesmos já definidos para os filmes simples, ou seja, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3% de glicerol e 20 minutos de imersão.

5.1.1.1 Espessura e permeabilidade ao vapor de água

Na Tabela 5.13 estão apresentados os resultados de espessura e PVA dos filmes confeccionados com e sem natamicina. O teste de Tukey foi realizado comparando os valores de cada propriedade entre as formulações (colunas) e em relação à presença do antimicrobiano (linhas).

Tabela 5.13. Espessura (δ) e PVA dos filmes sem natamicina (0%) e com natamicina (4%) reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol.

| Amostra | δ (μm) | | PVA ($\text{g.mm/m}^2.\text{dia.kPa}$) | |
|---------|----------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|
| | 0% natamicina | 4% natamicina | 0% natamicina | 4% natamicina |
| FC1 | 19 ± 0,9 ^{c,A} | 20 ± 1,1 ^{c,A} | 2,31 ± 0,16 ^{c,A} | 3,37 ± 0,56 ^{c,B} |
| FC2 | 24 ± 2,1 ^{b,A} | 25 ± 2,1 ^{b,A} | 3,88 ± 0,20 ^{a,A} | 4,02 ± 0,56 ^{a,B} |
| FC3 | 24 ± 1,2 ^{b,A} | 22 ± 1,3 ^{b,A} | 3,09 ± 0,24 ^{b,A} | 3,70 ± 0,11 ^{c,B} |
| FC4 | 25 ± 3,1 ^{b,A} | 25 ± 1,9 ^{b,A} | 2,94 ± 0,19 ^{b,A} | 3,89 ± 0,10 ^{b,B} |
| FC5 | 28 ± 2,9 ^{a,A} | 27 ± 2,4 ^{a,A} | 3,23 ± 0,24 ^{b,A} | 3,95 ± 0,49 ^{b,B} |
| FC6 | 28 ± 3,7 ^{a,A} | 28 ± 1,7 ^{a,A} | 3,62 ± 0,16 ^{a,A} | 4,35 ± 0,48 ^{a,B} |
| FC7 | 30 ± 2,2 ^{a,A} | 30 ± 2,1 ^{a,A} | 3,67 ± 0,21 ^{a,A} | 4,11 ± 0,64 ^{ab,B} |

Médias ± desvio padrão das repetições.

Letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

Observa-se que a presença da natamicina não alterou a espessura dos filmes e a tendência de maior espessura para os filmes com mais alginato foi mantida. Porém, um aumento significativo da permeabilidade ao vapor de água foi observado para os filmes ativos, principalmente para a formulação FC1 (45% de aumento). A natamicina pode ter modificado a estrutura do filme prejudicando a reticulação. Com uma reticulação heterogênea, o volume livre das moléculas aumenta facilitando a permeação da água. Apesar do aumento da PVA, os filmes ativos mantiveram valores aceitáveis para esta propriedade.

Zactiti e Kieckbusch (2009) também não observaram diferenças na espessura dos filmes de alginato com a adição de sorbato de potássio como antimicrobiano. Entretanto, ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, o antimicrobiano também não influenciou

a permeabilidade ao vapor de água. Da Silva (2009) observou que a PVA dos filmes de alginato aumentavam somente quando 8% de natamicina era adicionada.

Em filmes de alginato reticulados por imersão com 1% de cálcio, Pranoto *et al.* (2005a) obtiveram PVA de 20,32 g.mm/m².d.kPa e ao incorporar 0,4% de óleo de alho, um agente antimicrobiano natural, o valor aumentou para 30,89 g.mm/m².d.kPa. Limjaroen *et al.* (2003) verificaram que a adição de sorbato de potássio aumentou significativamente a PVA dos filmes de cloreto de polivinilideno e atribuíram o comportamento ao caráter hidrofílico do agente ativo. Em filmes de quitosana, a incorporação de sorbato de potássio ou nisina em altas concentrações provocou o aumento da PVA. Neste caso, os agentes antimicrobianos seriam responsáveis pela perda da compactação da estrutura dos filmes (Pranoto *et al.*, 2005b). Aumento mais pronunciado ainda foi observado por Bertan (2008), cujos filmes de amido, gelatina e glúten, quando adicionados de 2% sorbato de potássio tiveram, sua PVA aumentada em 270%.

5.1.1.2 Grau de intumescimento

Os resultados do grau de intumescimento e relação entre as espessuras antes e após a absorção estão apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Grau de intumescimento (GI) e a relação da espessura ($\bar{\delta}_i/\bar{\delta}_f$) dos filmes sem natamicina (0%) e com natamicina (4%) reticulados com 5% de CaCl₂.2H₂O e 3% de glicerol.

| Amostra | GI (g H ₂ O/g filme) | | $\bar{\delta}_i/\bar{\delta}_f$ | |
|---------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | 0% natamicina | 4% natamicina | 0% natamicina | 4% natamicina |
| FC1 | 4,24 ± 0,22 ^{a,A} | 4,31 ± 0,13 ^{a,A} | 5,35 ± 0,88 ^{a,A} | 5,76 ± 0,51 ^{a,A} |
| FC2 | 3,49 ± 0,19 ^{b,A} | 3,05 ± 0,16 ^{b,A} | 4,88 ± 0,31 ^{a,A} | 4,99 ± 0,11 ^{a,A} |
| FC3 | 1,74 ± 0,08 ^{c,A} | 1,70 ± 0,17 ^{c,A} | 3,34 ± 0,04 ^{b,A} | 3,11 ± 0,29 ^{b,A} |
| FC4 | 1,27 ± 0,10 ^{d,A} | 1,25 ± 0,18 ^{d,A} | 3,22 ± 0,24 ^{b,A} | 3,30 ± 0,29 ^{b,A} |
| FC5 | 0,94 ± 0,01 ^{e,A} | 0,91 ± 0,01 ^{e,A} | 2,60 ± 0,11 ^{c,A} | 2,42 ± 0,059 ^{c,A} |
| FC6 | 0,75 ± 0,07 ^{e,f,A} | 0,82 ± 0,01 ^{e,A} | 2,23 ± 0,12 ^{cd,A} | 1,99 ± 0,05 ^{cd,A} |
| FC7 | 0,63 ± 0,05 ^{f,A} | 0,72 ± 0,08 ^{e,A} | 1,75 ± 0,064 ^{e,A} | 1,88 ± 0,03 ^{d,A} |

Médias ± desvio padrão das repetições.

Letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

O grau de intumescimento e a relação de espessura dos filmes ativos não apresentaram diferenças significativas em relação aos filmes comuns para o tempo de imersão

em 20 minutos, observando-se a mesma tendência da diminuição da absorção em água com o aumento de alginato na proporção.

Esta propriedade é importante, pois as modificações na matriz polimérica causadas pelo intumescimento influenciarão na difusividade da natamicina através do filme e as crescentes espessuras influenciarão a taxa de liberação do soluto. É possível que a elevada absorção de água dos filmes de pectina resulte em um mecanismo de difusão diferente dos obtidos para os filmes de alginato.

Bajpai *et al.* (2006) produziram esferas de alginato e pectina reticulados com cálcio em várias proporções e testaram a liberação de nitrato de potássio em água como modelo para aplicação em agricultura. Os autores verificaram que, independente da quantidade de cálcio utilizada na reticulação, o aumento de pectina na formulação aumentou o grau de intumescimento das esferas e atribuiu este comportamento à maior hidrofiliabilidade da pectina. O aumento da proporção de pectina de 37,5 para 71% elevou o grau de intumescimento de 4,2 para 14.

Zactiti (2004) verificou que o grau de intumescimento dos filmes de alginato aumentava à medida que aumentava a quantidade de sorbato de potássio adicionada. Da Silva (2009) obteve, para filmes de alginato com natamicina, um aumento proporcional ao da formulação FC7, porém ao contrário do presente trabalho, este aumento foi significativo.

5.1.1.3 Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água

Na Tabela 5.15 estão dispostos os resultados do conteúdo de umidade e solubilidade dos diferentes filmes.

O conteúdo de umidade dos filmes ativos apresentou diferenças significativas apenas para as formulações com maior teor de pectina, FC1, FC2 e FC3. Já a massa solubilizada aumentou em todas as formulações, com exceção de FC6 e FC7. Este aumento de massa solubilizada nos filmes ativos pode estar relacionado com a liberação da natamicina durante o período de 24 horas do ensaio em que os filmes permanecem imersos em água sob agitação.

Esta hipótese foi confirmada durante os ensaios de liberação que serão apresentados nas próximas seções, que mostram que os filmes contendo mais alginato possuem uma liberação mais lenta necessitando de cerca de 25 dias para liberar todo o antimicrobiano presente no filme. Já os filmes de alto teor de pectina liberam todo o agente ativo em

aproximadamente 24 horas. Uma menor compatibilidade do agente ativo com a pectina também pode ter dificultado a reticulação desses filmes com os íons cálcio. Com a reticulação deficiente, a difusão da água através das cadeias é facilitada.

Tabela 5.15. Umidade (ω) e massa solubilizável em água (MS) dos filmes sem e com natamicina reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio.

| Amostra | ω (%) | | MS (%) | |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | 0% natamicina | 4% natamicina | 0% natamicina | 4% natamicina |
| FC1 | 16,94 ± 1,05 ^{b,A} | 23,77 ± 1,41 ^{a,B} | 24,53 ± 0,54 ^{a,A} | 45,52 ± 1,79 ^{a,B} |
| FC2 | 21,73 ± 0,53 ^{a,A} | 24,73 ± 1,41 ^{a,B} | 20,02 ± 0,55 ^{b,A} | 31,14 ± 4,25 ^{b,B} |
| FC3 | 18,84 ± 1,21 ^{ab,A} | 24,53 ± 0,25 ^{a,B} | 18,68 ± 1,45 ^{c,A} | 22,37 ± 2,26 ^{c,B} |
| FC4 | 18,57 ± 1,13 ^{ab,A} | 22,48 ± 1,49 ^{ab,A} | 16,92 ± 1,97 ^{c,A} | 25,66 ± 4,76 ^{c,B} |
| FC5 | 19,32 ± 0,27 ^{ab,A} | 19,99 ± 1,57 ^{b,A} | 16,89 ± 0,74 ^{c,A} | 24,69 ± 1,84 ^{c,B} |
| FC6 | 19,89 ± 0,86 ^{a,A} | 22,76 ± 0,58 ^{ab,A} | 16,10 ± 1,85 ^{c,A} | 18,63 ± 2,12 ^{d,A} |
| FC7 | 18,88 ± 0,91 ^{ab,A} | 21,70 ± 0,81 ^{ab,A} | 19,03 ± 1,22 ^{cb,A} | 17,74 ± 1,98 ^{e,A} |

Médias ± desvio padrão das repetições.

Letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

Para os filmes de alginato do estudo de Zactiti e Kieckbusch (2009), a presença de sorbato de potássio dobrou a massa solubilizada em água em relação ao filme sem antimicrobiano. Os autores também atribuíram este comportamento a uma possível lixiviação do antimicrobiano, visto que os ensaios de liberação destes filmes indicaram que o sorbato foi totalmente liberado após poucos minutos de imersão em água. Comportamento semelhante a este também foi obtido por Bertan (2008), para a adição de sorbato de potássio aos filmes de amido, gelatina e glúten.

5.1.1.4 Resistência mecânica

Na Tabela 5.16 estão apresentados os resultados de tensão na ruptura e alongamento na ruptura dos filmes ativos e dos filmes simples sem antimicrobiano.

A tensão na ruptura, assim como a PVA e a solubilidade em água, teve seu valor reduzido significativamente com a adição da natamicina às formulações (média de 16% de redução). Possivelmente, também, devido a uma modificação da estrutura que prejudicou o processo de reticulação com os íons cálcio. Apesar da redução da TR, o alongamento manteve

a mesma tendência dos filmes confeccionados sem o antimicrobiano. Este comportamento é contrário ao esperado uma vez que a diminuição das forças coesivas entre as cadeias aumenta a elasticidade do filme.

A perda da resistência mecânica, porém, não alterou a tendência entre as diferentes formulações, ou seja, os filmes de pectina continuaram mais frágeis que os filmes de alginato.

Tabela 5.16. Tensão na ruptura (TR) e alongamento (A) dos filmes sem e com natamicina reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

| Amostra | TR (MPa) | | A (%) | |
|---------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 0% natamicina | 4% natamicina | 0% natamicina | 4% natamicina |
| FC1 | 65,49 ± 5,52 ^{d,A} | 48,46 ± 5,93 ^{d,B} | 4,66 ± 0,44 ^{a,A} | 4,75 ± 0,37 ^{a,A} |
| FC2 | 61,32 ± 2,80 ^{d,A} | 53,89 ± 2,96 ^{d,B} | 4,56 ± 0,65 ^{a,A} | 5,08 ± 0,86 ^{a,A} |
| FC3 | 83,44 ± 8,06 ^{c,A} | 73,69 ± 4,99 ^{c,B} | 4,68 ± 0,84 ^{a,A} | 5,03 ± 0,64 ^{a,A} |
| FC4 | 94,53 ± 3,43 ^{c,A} | 80,87 ± 7,08 ^{c,B} | 4,68 ± 0,53 ^{a,A} | 4,81 ± 0,45 ^{a,A} |
| FC5 | 116,64 ± 8,68 ^{b,A} | 89,66 ± 8,66 ^{b,B} | 5,21 ± 0,76 ^{a,A} | 5,62 ± 1,29 ^{a,A} |
| FC6 | 126,41 ± 5,66 ^{a,A} | 105,31 ± 5,07 ^{a,B} | 5,97 ± 0,63 ^{a,A} | 5,88 ± 0,81 ^{a,A} |
| FC7 | 122,51 ± 3,27 ^{a,A} | 106,73 ± 4,99 ^{a,B} | 6,59 ± 0,72 ^{b,A} | 6,84 ± 1,09 ^{a,A} |

Médias ± desvio padrão das repetições.

Letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

A perda da resistência mecânica a partir da incorporação de natamicina em filmes de celulose também foi verificada por Pires *et al.* (2008), com redução de 93,86N para 57,27N. Os filmes tornaram-se mais frágeis também na elasticidade que reduziu de 4,54 para 1,69%. Os autores atribuíram a redução à modificação da estrutura polimérica, afetada pelo antimicrobiano.

Em outro estudo, Limjaroen *et al.* (2003) produziram filmes de cloreto de polivinilideno contendo ácido sórbico, sorbato de potássio e nisina e observaram uma redução na tensão na ruptura (aproximadamente 35%) com o aumento da concentração de antimicrobiano. Todavia, assim como no presente trabalho, o alongamento para estes filmes não sofreu alteração. Segundo os autores, os componentes antimicrobianos podem ter criado altas concentrações localizadas de antimicrobiano na estrutura polimérica que resultam na diminuição da tensão na ruptura dos filmes.

Cha *et al.* (2002) também verificaram uma grande redução da resistência à tração e da elasticidade ao compararem filmes de alginato com e sem adição de diversos antimicrobianos e

atribuíram este comportamento à modificação da rede polimérica dos filmes. Para filmes adicionados de nisina, a redução foi de aproximadamente 50%. Pranoto *et al.* (2005b) avaliaram o efeito da adição de sorbato de potássio ou nisina sobre as propriedades mecânicas de filmes de quitosana e verificaram, que para ambos agentes, houve grande redução na tensão na ruptura com aumento no alongamento. A redução da tensão na ruptura chegou a 60% quando altas concentrações de antimicrobiano foram utilizadas. Estes autores ainda verificaram que o efeito foi ainda maior quando maiores concentrações do agente foram utilizadas e salientaram que a incorporação de qualquer outro aditivo que não seja um agente reticulante, geralmente provoca a diminuição da tensão na ruptura.

Contrário a este comportamento, outros trabalhos reportam que a adição de antimicrobiano não provocou alteração nas propriedades mecânicas, como em filmes de alginato com sorbato de potássio (Zactiti e Kieckbusch, 2009) e filmes de metilcelulose com natamicina (Türe *et al.*, 2009).

Segundo Han (2005), a diminuição da força física e da integridade mecânica dos filmes pode ser causada por um excesso de agente antimicrobiano que não é capaz de ser incorporado adequadamente ao material.

5.1.1.5 Cor e opacidade

A cor e opacidade são propriedades de grande importância na aplicação dos filmes como embalagem para alimentos. A opacidade das formulações dos filmes ativos foi determinada e comparada aos filmes confeccionados sem o antimicrobiano, cujos resultados estão apresentados na Figura 5.16.

A partir da análise realizada verificou-se que, para todas as formulações, a incorporação da natamicina aos filmes provocou um grande aumento na opacidade dos filmes (aumento médio de 7 vezes na opacidade). Enquanto a opacidade dos filmes sem natamicina variou entre 4,55 (pectina) e 13,12% (alginato), os filmes ativos apresentaram opacidades entre 46,02 (90/10) e 57,20% (50/50). Os valores obtidos para todas as formulações estão apresentados no Apêndice B.

Nos filmes sem natamicina, observou-se um crescente aumento da opacidade com o aumento da proporção de alginato na formulação. Porém, esta tendência não foi verificada para os filmes ativos, uma vez que a menor opacidade foi obtida para os filmes 90/10 (FC2) e 90/10 (FC6) e a maior para os filmes 50/50 (FC4). Um filme de PVC, comumente utilizado na embalagem de produtos alimentícios, teve sua opacidade determinada em 7%. Este resultado

aponta os filmes simples de pectina e as formulações com até 50% deste biopolímero em sua composição com excelente transparência.

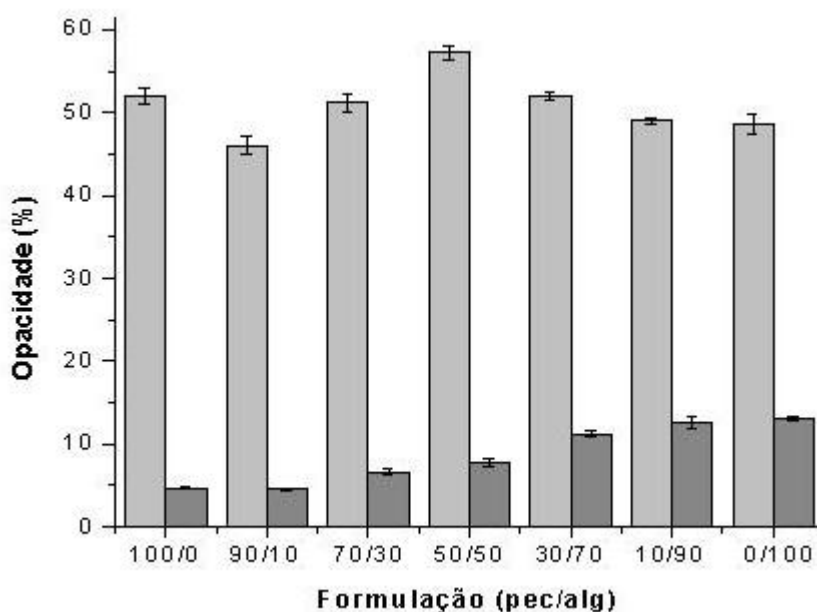


Figura 5.16. Opacidade dos filmes ativos (■) e dos filmes sem natamicina (■) com diferentes proporções de pectina/alginato.

A maior opacidade dos filmes contendo mais alginato pode estar relacionada à maior espessura destes em relação aos filmes com mais pectina. Os resultados de opacidade deste trabalho são semelhantes aos obtidos por da Silva (2009), cujos filmes de alginato puros apresentaram 7% e a adição de natamicina elevou a opacidade para 52%.

A Figura 5.17 mostra uma fotografia comparando os dois tipos de filmes, onde é possível verificar visualmente a maior transparência dos filmes sem antimicrobiano (à esquerda).



Figura 5.17. Foto demonstrando a diferença de opacidade dos filmes.

A maior opacidade verificada nos filmes ativos pode ser explicada pela estrutura química da natamicina, que apresenta simultaneamente em sua molécula, uma fração hidrofílica e outra hidrofóbica, que faz com sua solubilidade em água seja baixa. Vários trabalhos relatam o aumento da opacidade dos filmes devido à adição de substâncias hidrofóbicas como, por exemplo, Yang e Paulson (2000) relataram que a adição de lipídios aos filmes de gelatina torna-os mais opacos e com coloração esbranquiçada. Ozdemir e Floros (2008) observaram um aumento na opacidade de filmes de proteína de soro de leite com adição de cera de abelha, sendo que a adição do antimicrobiano sorbato de potássio promoveu a diminuição da opacidade desses filmes.

Os parâmetros de cor, L^* , a^* e b^* dos filmes estão dispostos na Tabela 5.17, bem como os resultados obtidos no cálculo da diferença total de cor ΔE^* . A diferença total de cor foi calculada para as formulações dos filmes ativos, utilizando-se como padrão os filmes comuns equivalentes.

Tabela 5.17. Parâmetros de cor L^* , a^* e b^* dos filmes com e sem tratamento antimicrobiano e diferença total de cor (ΔE^*) usando como padrão os filmes sem tratamento.

| Amostra | % natamicina | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
|---------|--------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
| FC1 | 0 | 93,50 ± 0,22 ^h | -0,02 ± 0,03 ^f | 1,69 ± 0,02 ^g | 3,23 |
| | 4 | 95,71 ± 0,17 ^a | 0,59 ± 0,02 ^a | 3,97 ± 0,09 ^c | |
| FC2 | 0 | 92,06 ± 0,94 ^l | 0,03 ± 0,01 ^e | 2,18 ± 0,02 ^e | 3,96 |
| | 4 | 95,25 ± 0,10 ^{bc} | 0,51 ± 0,01 ^c | 3,80 ± 0,09 ^d | |
| FC3 | 0 | 94,20 ± 0,44 ^f | -0,03 ± 0,01 ^f | 2,01 ± 0,03 ^f | 2,88 |
| | 4 | 95,42 ± 0,11 ^{ab} | 0,56 ± 0,01 ^b | 4,39 ± 0,07 ^b | |
| FC4 | 0 | 94,12 ± 0,43 ^f | -0,12 ± 0,02 ^h | 2,00 ± 0,13 ^e | 3,35 |
| | 4 | 95,70 ± 0,05 ^a | 0,58 ± 0,01 ^{ab} | 4,48 ± 0,12 ^b | |
| FC5 | 0 | 94,27 ± 0,38 ^{ef} | -0,10 ± 0,02 ^h | 1,81 ± 0,03 ^{fg} | 2,62 |
| | 4 | 95,39 ± 0,11 ^{abc} | 0,50 ± 0,01 ^c | 4,39 ± 0,02 ^b | |
| FC6 | 0 | 93,16 ± 1,66 ^f | -0,03 ± 0,01 ^f | 2,25 ± 0,07 ^e | 3,64 |
| | 4 | 95,06 ± 0,09 ^{cd} | 0,44 ± 0,02 ^d | 4,39 ± 0,04 ^b | |
| FC7 | 0 | 93,99 ± 0,07 ^g | -0,07 ± 0,01 ^g | 2,25 ± 0,07 ^e | 2,76 |
| | 4 | 94,84 ± 0,19 ^{de} | 0,44 ± 0,01 ^d | 4,83 ± 0,16 ^a | |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A análise dos dados revela que todas as formulações contendo natamicina apresentaram um aumento significativo na luminosidade L^* . Este parâmetro representa a qualidade pela qual se distingue uma cor clara de uma cor escura. Em relação ao parâmetro a^* , enquanto todas as formulações com 0% de natamicina apresentaram-se negativas, com tendência para a tonalidade verde, as formulações com 4% foram positivas, tendendo ao vermelho, entretanto, os valores deste parâmetro foram de fraca intensidade. Os resultados do parâmetro b^* indicaram que a natamicina provoca um aumento significativo na tonalidade amarela dos filmes. Em relação aos filmes simples, verificou-se que os filmes das formulações FC1 e FC2 tiveram o parâmetro b^* de menor intensidade que os demais, ou seja, tendendo menos ao amarelo.

A diferença total de cor não apresentou uma tendência muito definida sendo mais pronunciada para a formulação FC2 e FC6. Esta diferença é resultante, principalmente, do parâmetro b^* , cujo aumento foi mais pronunciado, promovendo um ganho de tonalidade amarela nos filmes ativos.

Tendência semelhante foi verificada por Pranoto *et al.* (2005a). A adição do antimicrobiano natural de óleo de alho aos filmes de alginato afetou a aparência dos filmes em relação à transparência e também à cor. Os filmes apresentaram menor luminosidade e tenderam ao amarelo sendo que o parâmetro b^* foi de -3,35 (filme sem antimicrobiano) para 4,65 com a adição do óleo.

Na Tabela 5.18, estão apresentados os resultados para o ângulo Hue e o Cromo dos filmes.

O ângulo Hue dos filmes variou entre 89,33 e 93,52°. Verifica-se, de acordo com o diagrama CIELab (Figura 4.4), que os filmes ativos possuem o ângulo Hue orientado para o 1° quadrante, entre a (+) e o b (+). Os valores indicam que os filmes apresentam-se entre o amarelo-laranja e o amarelo, e com mais intensidade devido ao maior valor do croma. O croma indica a intensidade da cor representada pelo valor do Hue cujo valor máximo é 16. Já os filmes sem natamicina apresentaram fraca intensidade de cor, representada pelos menores valores do croma, e com a tendência de orientação do ângulo para o 2° quadrante.

Da Silva (2009) obteve características gerais de cor semelhantes para filmes de alginato com natamicina. O ângulo Hue situou-se entre 85,70 e 92,55° e houve um aumento no parâmetro b^* com a incorporação do agente ativo.

Tabela 5.18. Ângulo Hue e Croma dos filmes sem e com natamicina.

| Amostra | % natamicina | Hue | Croma |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------|
| FC1 | 0 | 90,51 ± 0,23 ^d | 1,70 ± 0,02 ^h |
| | 4 | 81,59 ± 0,10 ⁿ | 4,06 ± 0,09 ^d |
| FC2 | 0 | 89,33 ± 0,29 ^g | 2,28 ± 0,21 ^f |
| | 4 | 82,41 ± 0,03 ^l | 3,78 ± 0,09 ^e |
| FC3 | 0 | 90,57 ± 0,28 ^f | 2,01 ± 0,03 ^g |
| | 4 | 82,17 ± 0,07 ^m | 4,10 ± 0,07 ^d |
| FC4 | 0 | 93,29 ± 0,09 ^b | 2,27 ± 0,85 ^f |
| | 4 | 82,63 ± 0,04 ^k | 4,58 ± 0,12 ^b |
| FC5 | 0 | 93,52 ± 0,29 ^a | 1,79 ± 0,03 ^h |
| | 4 | 83,51 ± 0,04 ^j | 4,41 ± 0,02 ^c |
| FC6 | 0 | 90,67 ± 0,12 ^e | 2,27 ± 0,07 ^f |
| | 4 | 84,15 ± 0,06 ⁱ | 4,42 ± 0,04 ^c |
| FC7 | 0 | 91,65 ± 0,17 ^c | 2,22 ± 0,06 ^f |
| | 4 | 84,61 ± 0,09 ^h | 4,65 ± 0,16 ^a |

Média ± desvio padrão das repetições.

Médias com a mesma letra em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

5.1.1.6 Microestrutura

As micrografias da superfície e da seção transversal dos filmes ativos de pectina, alginato e suas misturas estão apresentadas nas Figuras 5.18 a 5.24.

Observa-se que a incorporação da natamicina aos filmes provocou grande alteração na superfície, onde são encontrados grânulos e cristais de natamicina depositados nos mesmos. Nas micrografias das fraturas, também são verificadas superfícies irregulares e descontinuidade. Já se havia constatado visualmente que os filmes ativos eram menos transparentes e apresentavam a superfície levemente áspera. Isto pode ter sido ocasionado pela baixa solubilidade da natamicina à solução filme-formadora e esta modificação na estrutura corrobora com a diminuição da resistência mecânica dos filmes ativos.

Entre as diferentes formulações, nota-se que os filmes de alginato (FC7) apresentaram estrutura mais homogênea e regular do que os demais filmes. Também, a presença dos cristais

parece ser de menor intensidade nesta formulação, indicando uma melhor incorporação da natamicina nestes filmes.

Como já foi informado, durante o processo de confecção dos filmes, foi verificado que havia uma grande dificuldade em produzir filmes de pectina adicionados de natamicina. Dificuldades encontradas com a pectina não foram observadas nos filmes de alginato e formulações contendo maior proporção deste biopolímero. As micrografias confirmam que a natamicina é mais compatível com o alginato do que com a pectina.

Estruturas cristalinas também foram verificadas por Türe *et al.* (2008) em filmes de glúten contendo natamicina e por Pires *et al.* (2008) quando era feita a adição de natamicina, nisina ou a combinação dos dois agentes em filmes de metilcelulose. Filmes de cloreto de polivinilideno tiveram sua estrutura modificada com a adição de nisina, sorbato de potássio e ácido sórbico (Limjaroen *et al.*, 2003).

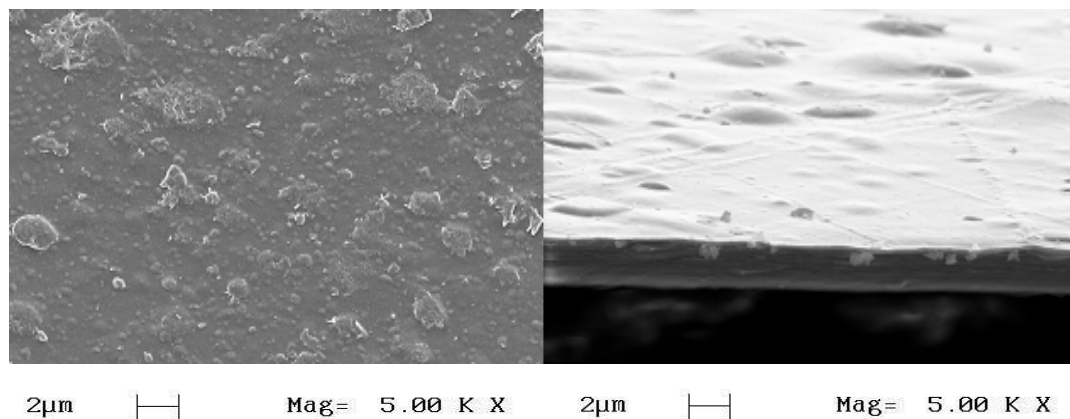


Figura 5.18. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos de pectina FC1.

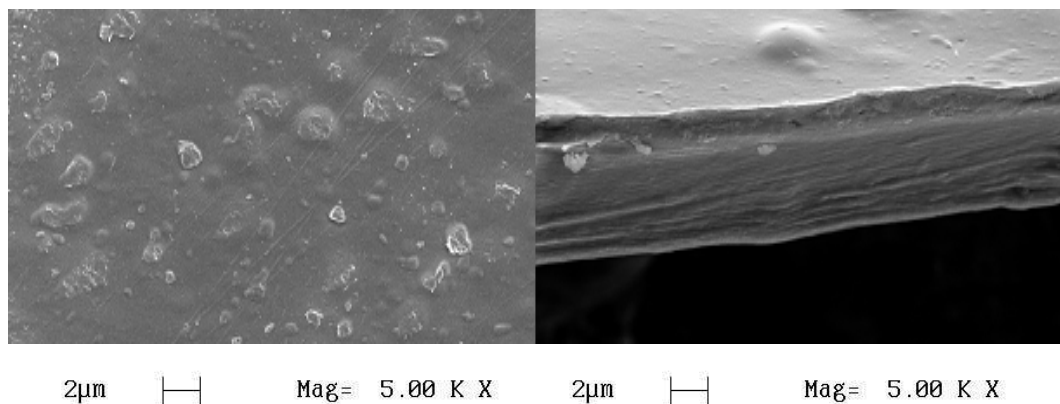
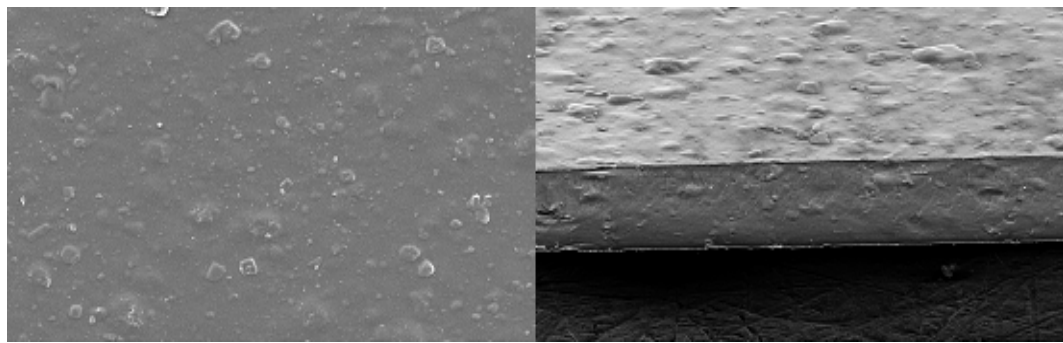
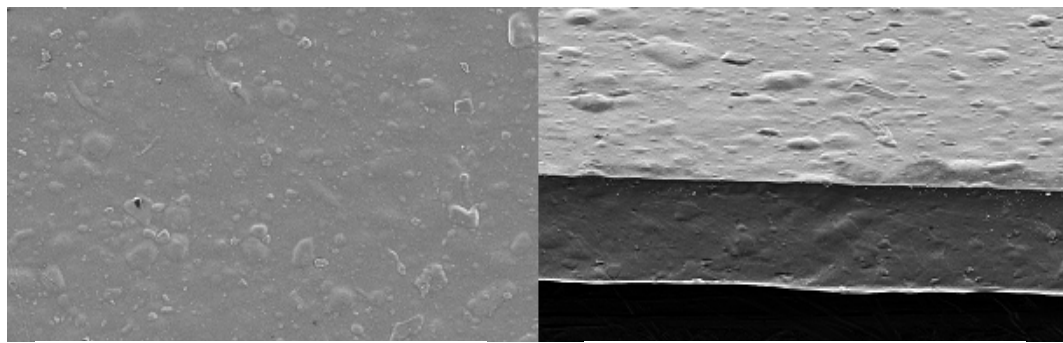


Figura 5.19. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC2.



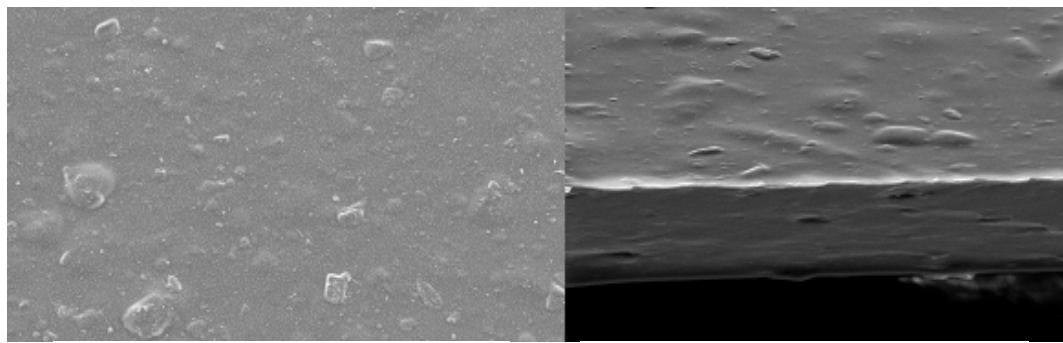
10µm |—| Mag= 1.00 K X 10µm |—| Mag= 1.00 K X

Figura 5.20. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC3.



10µm |—| Mag= 1.00 K X 10µm |—| Mag= 1.00 K X

Figura 5.21. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC4.



10µm |—| Mag= 1.00 K X 10µm |—| Mag= 1.00 K X

Figura 5.22. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC5.

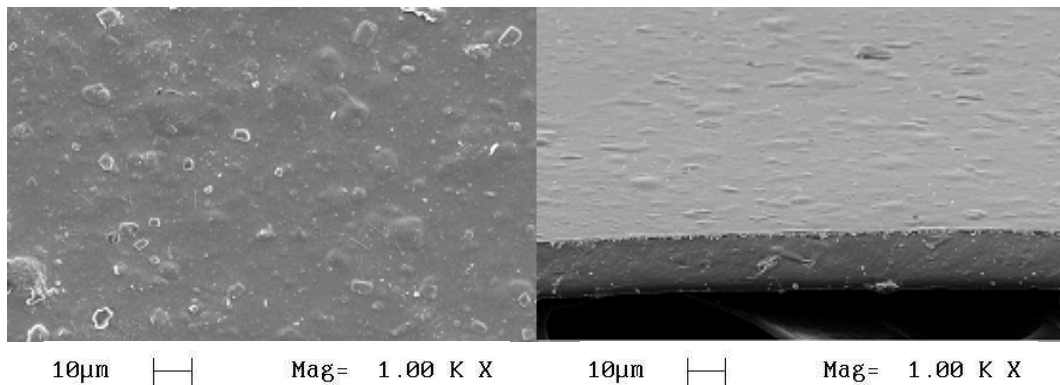


Figura 5.23. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC6.

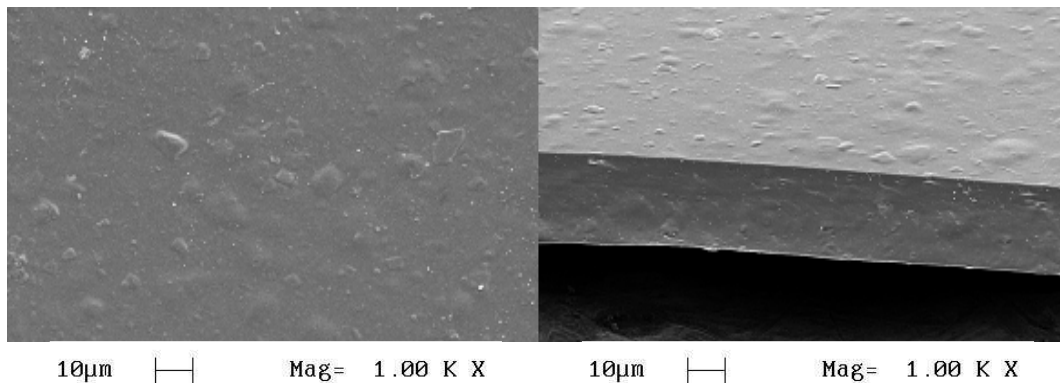


Figura 5.24. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC7.

A Figura 5.25 mostra a micrografia da superfície e fratura de um filme de alginato após o experimento de liberação em água. Verifica-se a presença de pequenas crateras no filme, em locais onde se situavam os cristais que foram dissolvidos na liberação. Observa-se que, mesmo após 25 dias de imersão em água, os filmes mantiveram sua estrutura contínua.

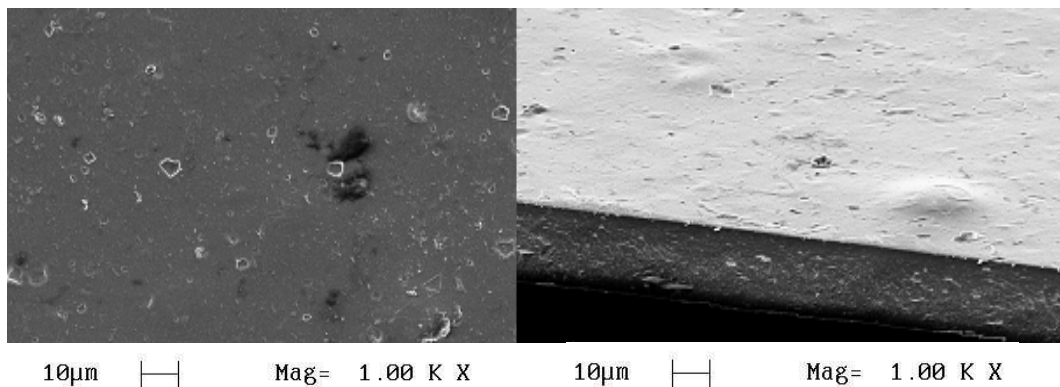


Figura 5.25. Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes ativos FC7 depois dos ensaios de liberação.

5.1.2 Ensaios de liberação de natamicina em água

Os filmes ativos das diferentes formulações foram submetidos aos ensaios de liberação em água a temperatura ambiente (25°C) conforme descrito na Seção 4.4. A fim de avaliar a influência da espessura sobre o mecanismo de difusão do agente ativo, foram confeccionados filmes utilizando três diferentes alíquotas de solução (50, 60 e 70 g) sobre os moldes.

Para a certificação de que toda a massa de natamicina presente no filme havia sido liberada, fez-se a quantificação desta antes do processo de liberação, ou seja, determinou-se a massa total presente em uma amostra de filme com a mesma área das amostras submetidas aos ensaios de liberação em água. Os resultados da massa total presente no filme antes dos experimentos (M_{inicial}), a massa total liberada (M_{∞}) de cada filme bem como suas respectivas espessuras, estão apresentados na Tabela 5.19.

Os dados de espessura antes e após a liberação refletem o grande intumescimento dos filmes de pectina e das formulações com alto teor deste biopolímero. A relação entre as espessuras final e inicial para os filmes de 50g estão de acordo com os resultados obtidos na Tabela 5.14, cujo experimento foi realizado em imersão durante 20 minutos em água. Isto indica que mesmo após todo o tempo em que os filmes estiveram imersos em água, o equilíbrio de intumescimento não foi alterado.

Em relação à massa de natamicina presente nos filmes, observa-se, que mesmo sendo adicionada a mesma quantidade de antimicrobiano em todas as formulações, os filmes com maior conteúdo de pectina apresentaram menor massa no filme. Isto provavelmente pode ter ocorrido devido a uma prévia difusão ainda durante a reticulação do 2º estágio, em que o filme fica imerso na solução aquosa de cloreto de cálcio. Análises no espectrofotômetro da solução resultante da reticulação detectaram a presença de natamicina para as formulações FC1, FC2 e FC3, confirmando que houve difusão durante este tempo. Para as demais formulações, o equipamento não apontou indício de liberação durante este processo. A mesma tendência foi observada entre as diferentes espessuras estudadas.

Verificou-se, ainda, que os valores determinados de massa inicial de natamicina para os filmes antes de serem submetidos à liberação e os valores determinados pelo experimento são muito próximos, indicando que praticamente toda a massa presente no filme foi liberada.

Tabela 5.19. Espessuras inicial e final, relação entre as espessuras e quantidade total de natamicina antes e após o ensaio de liberação.

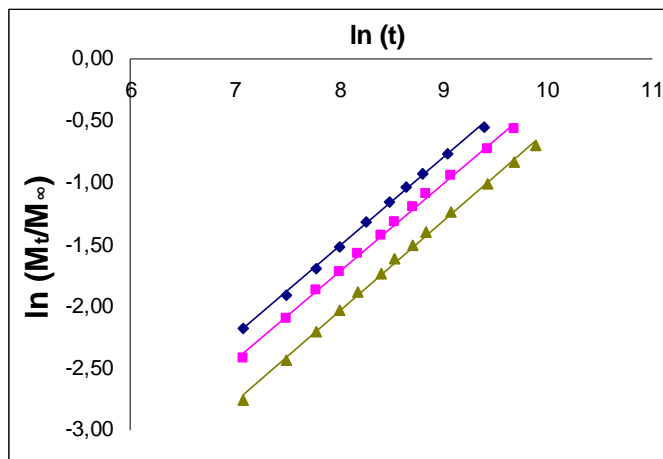
| Filme | Alíquotas (g) | δ_i (μm) | δ_f (μm) | δ_i/δ_f | M_{inicial} (mg) | M_{∞} (mg) |
|-------|---------------|------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|
| FC1 | 50 | $21 \pm 0,8^h$ | $139 \pm 9,4^e$ | 6,62 | $0,74 \pm 0,02^h$ | $0,78 \pm 0,02^h$ |
| | 60 | $29 \pm 0,9^f$ | $200 \pm 11,3^c$ | 6,89 | $1,02 \pm 0,03^{\text{de}}$ | $1,05 \pm 0,03^{\text{de}}$ |
| | 70 | $35 \pm 1,6^{\text{de}}$ | $248 \pm 16,3^a$ | 7,09 | $1,26 \pm 0,06^{\text{bc}}$ | $1,24 \pm 0,03^{\text{bc}}$ |
| FC2 | 50 | $24 \pm 1,4^g$ | $144 \pm 7,0^e$ | 6,00 | $0,83 \pm 0,02^{\text{gh}}$ | $0,84 \pm 0,02^{\text{gh}}$ |
| | 60 | $31 \pm 1,1^f$ | $172 \pm 4,1^d$ | 5,55 | $1,04 \pm 0,01^{\text{def}}$ | $1,02 \pm 0,03^{\text{def}}$ |
| | 70 | $38 \pm 1,4^c$ | $232 \pm 10,2^b$ | 6,10 | $1,35 \pm 0,04^b$ | $1,36 \pm 0,04^b$ |
| FC3 | 50 | $24 \pm 1,1^g$ | $77 \pm 2,7^j$ | 3,21 | $0,82 \pm 0,01^{\text{gh}}$ | $0,86 \pm 0,02^{\text{gh}}$ |
| | 60 | $34 \pm 0,9^{\text{de}}$ | $93 \pm 2,9^{\text{hi}}$ | 2,73 | $1,14 \pm 0,03^{\text{cd}}$ | $1,15 \pm 0,02^{\text{cd}}$ |
| | 70 | $41 \pm 1,1^b$ | $114 \pm 5,1^g$ | 2,78 | $1,36 \pm 0,03^b$ | $1,36 \pm 0,04^b$ |
| FC4 | 50 | $26 \pm 0,7^g$ | $73 \pm 4,1^{\text{jk}}$ | 2,81 | $0,95 \pm 0,02^{\text{fg}}$ | $0,89 \pm 0,01^{\text{fg}}$ |
| | 60 | $34 \pm 1,6^e$ | $84 \pm 4,9^{\text{hij}}$ | 2,47 | $1,11 \pm 0,02^{\text{cd}}$ | $1,17 \pm 0,03^{\text{cd}}$ |
| | 70 | $44 \pm 1,3^a$ | $125 \pm 8,8^f$ | 2,84 | $1,68 \pm 0,04^a$ | $1,73 \pm 0,07^a$ |
| FC5 | 50 | $29 \pm 1,6^f$ | $66 \pm 4,5^{\text{kl}}$ | 2,28 | $1,03 \pm 0,03^{\text{ef}}$ | $0,99 \pm 0,03^{\text{ef}}$ |
| | 60 | $34 \pm 0,9^{\text{de}}$ | $86 \pm 5,7^{\text{hij}}$ | 2,53 | $1,29 \pm 0,02^b$ | $1,32 \pm 0,05^b$ |
| | 70 | $41 \pm 1,1^b$ | $94 \pm 1,6^h$ | 2,29 | $1,58 \pm 0,03^a$ | $1,60 \pm 0,05^a$ |
| FC6 | 50 | $30 \pm 1,0^f$ | $59 \pm 2,9^{\text{lm}}$ | 1,97 | $1,08 \pm 0,03^{\text{de}}$ | $1,10 \pm 0,02^{\text{de}}$ |
| | 60 | $35 \pm 1,0^{\text{de}}$ | $64 \pm 3,7^{\text{kl}}$ | 1,83 | $1,36 \pm 0,02^b$ | $1,31 \pm 0,03^b$ |
| | 70 | $43 \pm 1,1^{\text{ab}}$ | $80 \pm 2,9^{\text{ij}}$ | 1,86 | $1,63 \pm 0,04^a$ | $1,66 \pm 0,06^a$ |
| FC7 | 50 | $31 \pm 1,4^f$ | $50 \pm 0,8^{\text{m}}$ | 1,61 | $1,11 \pm 0,02^{\text{de}}$ | $1,08 \pm 0,03^{\text{de}}$ |
| | 60 | $37 \pm 1,2^{\text{cd}}$ | $64 \pm 1,7^{\text{kl}}$ | 1,73 | $1,31 \pm 0,04^b$ | $1,29 \pm 0,02^b$ |
| | 70 | $44 \pm 1,3^a$ | $77 \pm 2,8^j$ | 1,75 | $1,60 \pm 0,02^a$ | $1,61 \pm 0,06^a$ |

Média \pm desvio padrão de três repetições.

Médias com a mesma letra em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Com o objetivo de avaliar o mecanismo envolvido no processo de difusão, utilizou-se o Modelo da Lei da Potência (Equação 3.5) que relaciona a perda de soluto no período inicial de liberação ($M_t/M_{\infty} < 0,60$) com o tempo. Para todas as formulações, foi plotado o gráfico $\ln(M_t/M_{\infty})$ versus $\ln(t)$. A Figura 5.26 ilustra este tipo de linearização para as três espessuras da formulação FC4. Devido à grande semelhança entre as curvas, os gráficos das demais formulações não foram apresentados. Com a linearização, o expoente difusional n foi obtido a

partir do coeficiente angular das retas enquanto a constante difusional k foi calculada a partir do coeficiente linear.



5.26. Curva $\ln(M_t/M_{\infty})$ vs $\ln(t)$ para filmes FC4 de 50g (◆), 60g (■), 70g (▲).

Os valores do expoente difusional e da constante difusional de todas as formulações estão apresentados na Tabela 5.20.

Todos os ajustes apresentaram coeficiente de correlação R^2 maiores que 0,99, indicando que o Modelo da Lei da Potência representa bem os dados experimentais. Os expoentes difusionais variaram de 0,3371 a 0,8466, sendo que os menores valores foram obtidos nas formulações FC1 e FC2. Verifica-se que, exceto para estas formulações, todas as demais apresentaram um expoente difusional entre 0,5 e 1, característico da difusão anômala, mecanismo no qual a taxa de difusão do solvente e a relaxação das cadeias poliméricas são da mesma ordem de magnitude. O desvio em relação ao comportamento Fickiano indica que o fenômeno de relaxação do polímero é mais proeminente e poderá afetar a liberação da natamicina nos primeiros instantes do processo. Os filmes da formulação FC2 com 70g apresentaram os valores mais próximos do mecanismo de difusão Fickiana ($n=0,5$).

Poucos trabalhos na literatura relatam valores menores que 0,5 para o expoente difusional, como encontrado nas formulações FC1 e FC2. Estes valores indicariam que o principal mecanismo que rege a liberação é a associação de difusão parcial através de uma matriz intumescida e através de poros hidrofílicos (Peppas, 1985 citado por Berwig, 2006). Em um trabalho com blendas de quitosana e metilcelulose para liberação de fármaco foram obtidos valores de n entre 0,1 e 0,48 e o mecanismo foi denominado como quase-Fickiano (Kumari *et al.*, 2009). Em outro estudo de liberação de nitrato de potássio a partir de esferas de alginato e

pectina, os autores também relatam um mecanismo quase-Fickiano quando o expoente difusional foi de 0,35 (Bajpal *et al.* 2006). Deve-se ressaltar para a geometria esférica o comportamento é considerado Fickiano quando o expoente difusional for igual a 0,43 (Siepmann e Peppas, 2001).

Tabela 5.20. Expoente difusional (n) e constante difusional (k) da liberação de natamicina nos diferentes filmes.

| Filme | Alíquotas (g) | n | k (s^{-1}) |
|--------------|----------------------|-----------------------|---|
| FC1 | 50 | 0,5744 | $4,54 \times 10^{-3}$ |
| | 60 | 0,4272 | $1,43 \times 10^{-2}$ |
| | 70 | 0,3371 | $3,44 \times 10^{-2}$ |
| FC2 | 50 | 0,4615 | $1,01 \times 10^{-2}$ |
| | 60 | 0,4047 | $1,59 \times 10^{-2}$ |
| | 70 | 0,4998 | $6,30 \times 10^{-2}$ |
| FC3 | 50 | 0,7183 | $8,43 \times 10^{-4}$ |
| | 60 | 0,7428 | $5,68 \times 10^{-4}$ |
| | 70 | 0,7344 | $5,40 \times 10^{-5}$ |
| FC4 | 50 | 0,7258 | $6,56 \times 10^{-4}$ |
| | 60 | 0,7221 | $5,51 \times 10^{-4}$ |
| | 70 | 0,7392 | $3,50 \times 10^{-5}$ |
| FC5 | 50 | 0,8149 | $1,41 \times 10^{-4}$ |
| | 60 | 0,8243 | $9,22 \times 10^{-5}$ |
| | 70 | 0,8466 | $7,26 \times 10^{-5}$ |
| FC6 | 50 | 0,6191 | $5,08 \times 10^{-4}$ |
| | 60 | 0,7009 | $1,58 \times 10^{-4}$ |
| | 70 | 0,6833 | $1,79 \times 10^{-4}$ |
| FC7 | 50 | 0,6028 | $4,32 \times 10^{-4}$ |
| | 60 | 0,6366 | $2,14 \times 10^{-4}$ |
| | 70 | 0,6038 | $2,66 \times 10^{-4}$ |

Mecanismo de difusão anômalo foi obtido por Zactiti e Kiebusch (2009) para filmes de alginato com sorbato de potássio cujo valor do expoente difusional foi de aproximadamente 0,80. Da Silva (2009) obteve um expoente difusional de 0,608 para os filmes de alginato incorporados com 4% de natamicina. Este valor é próximo ao observado no presente trabalho

para a formulação FC7. Ozdemir e Floros (2001) obtiveram expoente difusional entre 0,55 e 0,86 para liberação de sorbato de potássio em filmes de proteína de soro de leite e cera de abelha.

Em relação à constante k , quanto maior forem os valores, menor é o tempo para liberação do agente ativo. Dessa forma, os resultados obtidos para a constante estão de acordo com os tempos de liberação, pois os maiores valores foram verificados para as formulações FC1 e FC2, que liberaram a natamicina em menor tempo.

Os dados obtidos durante os ensaios de liberação foram ajustados ao modelo de difusão em sólidos semi-infinitos (tempos curtos) a fim de determinar a difusividade nos instantes iniciais de liberação. Para este caso, a liberação segue a cinética de ordem $\frac{1}{2}$ e os valores para a fração de massa liberada deve exibir ajuste linear em função da raiz quadrada de t .

Nas Figuras 5.27 a 5.30, estão apresentados os ajustes das diferentes formulações nas três espessuras ao modelo de sólidos semi-infinitos.

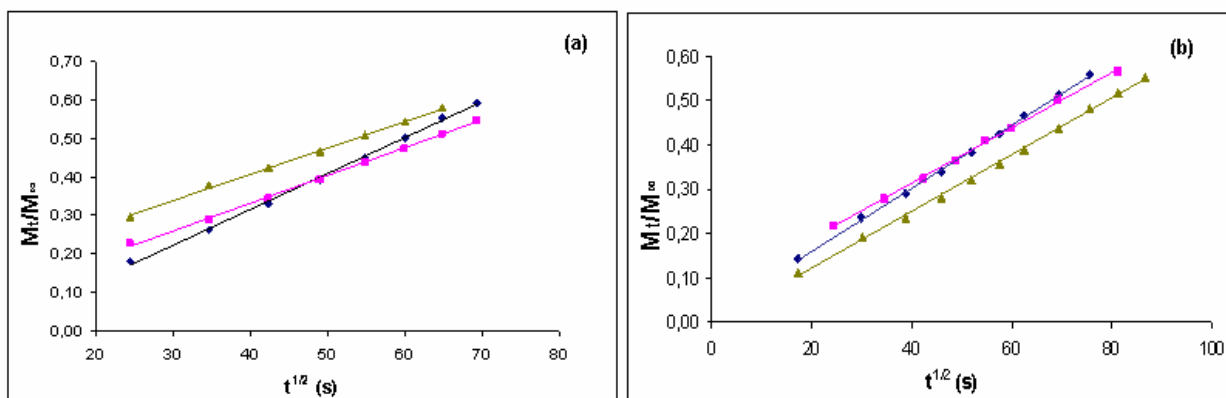


Figura 5.27. Ajuste dos modelos de sólidos semi-infinitos para filmes FC1 (a) e FC2 (b) de filmes de 70g (\blacktriangle), 60g (\blacksquare) e 50g (\blacklozenge).

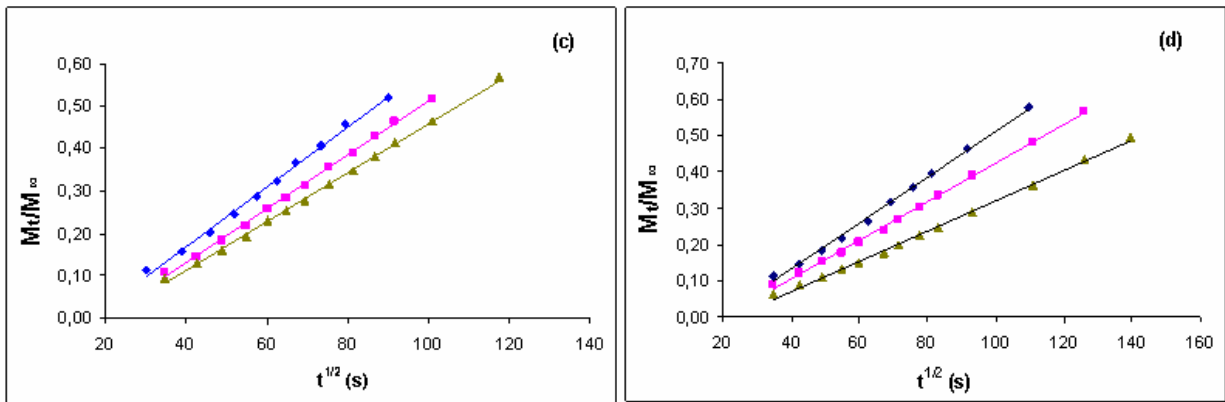


Figura 5.28. Ajuste dos modelos de sólidos semi-infinitos para filmes FC3 (c) e FC4 (d) de 70g (\blacktriangle), 60g (\blacksquare) e 50g (\blacklozenge).

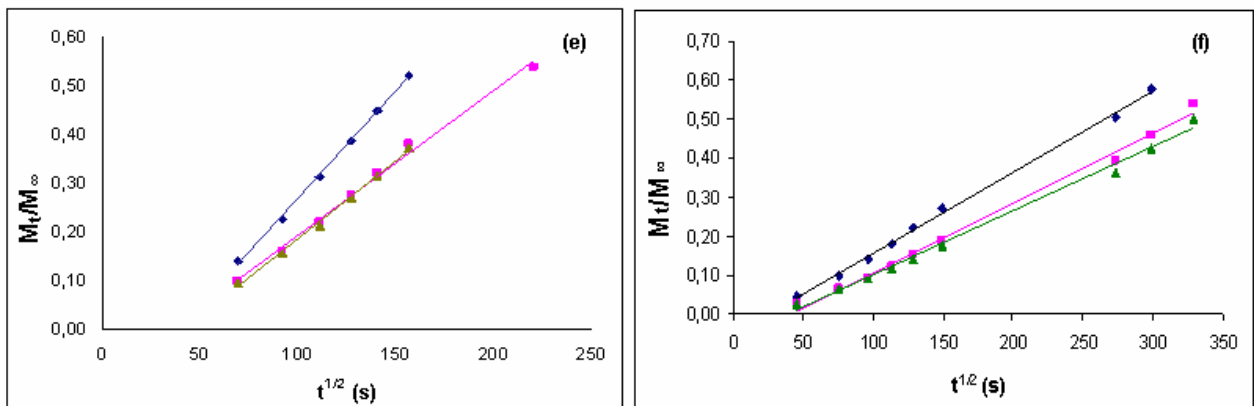


Figura 5.29. Ajuste dos modelos de sólidos semi-infinitos para filmes FC5 (e) e FC6 (f) de 70g (\blacktriangle), 60g (\blacksquare) e 50g (\blacklozenge).

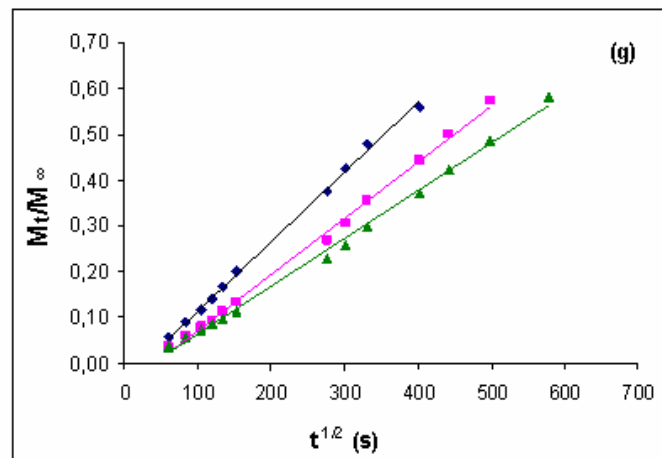


Figura 5.30. Ajuste dos modelos de sólidos semi-infinitos para filmes FC7 (g) de 70g (\blacktriangle), 60g (\blacksquare) e 50g (\blacklozenge).

Os dados experimentais foram também ajustados ao modelo da Equação 3.4 e as curvas para os filmes de 50g estão apresentadas das Figuras 5.31 a 5.34. Os ajustes das formulações nas espessuras de 60 e 70g estão apresentados no Apêndice C.

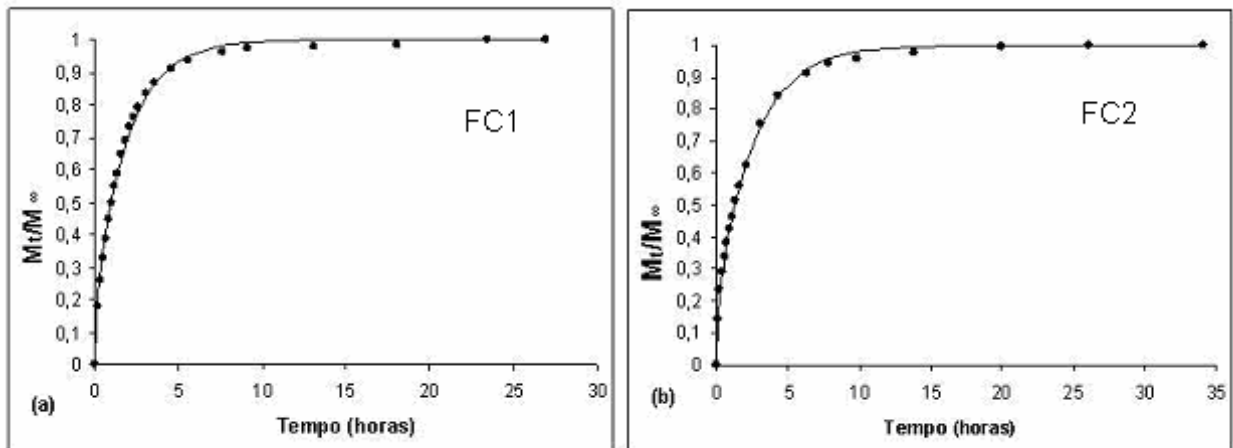


Figura 5.31. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC1 (a) e FC2 (b) de 50g. Valores experimentais (●) e modelo (—).

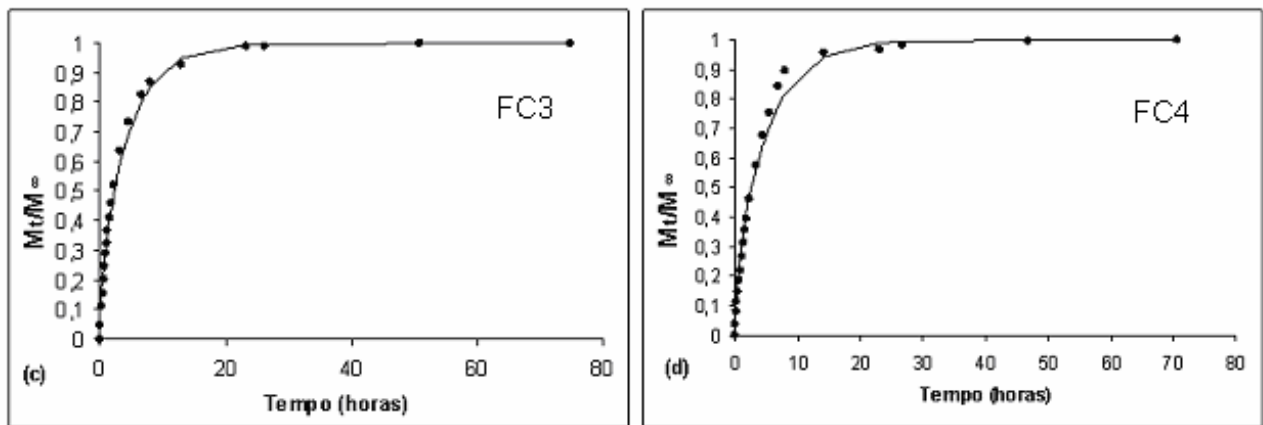


Figura 5.32. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes (c) FC3 e (d) FC4 de 50g. Valores experimentais (●) e modelo (—).

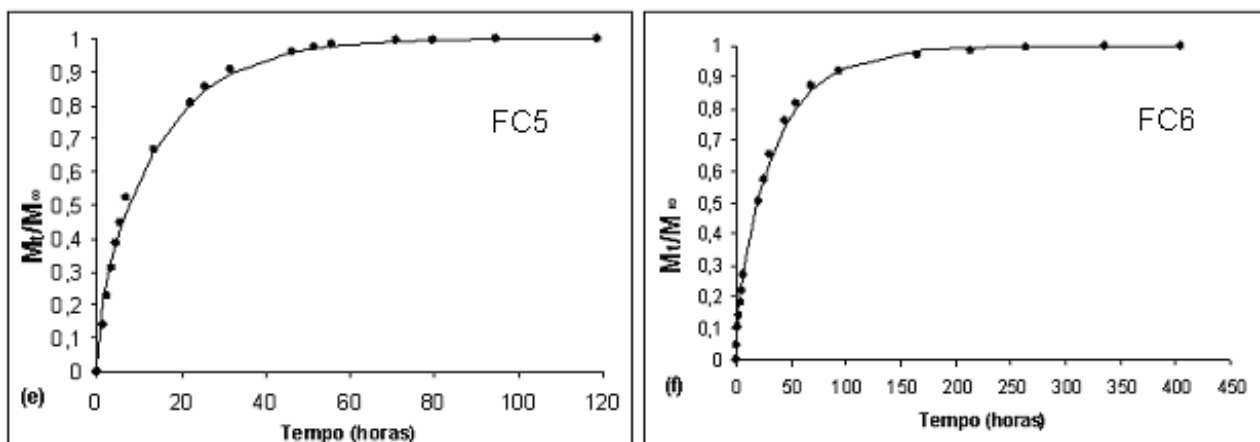


Figura 5.33. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC5 (e) e FC6 (f) de 50g. Valores experimentais (●) e modelo (—).

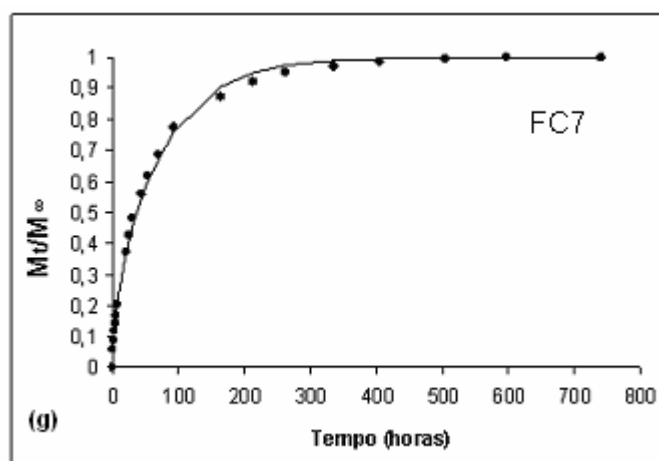


Figura 5.34. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC7 (g) de 50g. Valores experimentais (●) e modelo (—).

Observa-se pelo formato das curvas que o tempo total necessário para a liberação de toda a natamicina presente no filme aumenta à medida que as formulações apresentam maiores proporções de alginato. Enquanto os filmes de pectina (FC1) liberaram o antimicrobiano em menos de 30 horas, os filmes de alginato (FC7) necessitaram de quase 800 horas para que ocorresse a completa liberação. Estes resultados, juntamente com as micrografias, reforçam a hipótese de que a natamicina apresenta maior compatibilidade com o alginato e explicam a tendência de aumento de massa solubilizada com o aumento da pectina na estrutura, conforme já visto na Tabela 5.15. Em relação às diferentes espessuras, não foram

observadas alterações no tempo total de liberação, somente na quantidade total liberada, o que é esperado, pois em uma área maior de filme há maior quantidade de antimicrobiano presente.

A partir das curvas também é possível verificar que para a formulação FC1, 80% da natamicina presente no filme é liberada em menos de 3 horas, já para os filmes de alginato são necessárias cerca de 93 horas para liberar a mesma fração. O tempo total cresceu gradualmente com a presença de alginato para as demais formulações. Apesar desta drástica diferença de tempo entre as formulações, não houve muita diferença entre a fração de tempo ocupada para a liberação. A liberação de 80% da natamicina ocorreu em 12% do tempo total dos filmes de pectina e 15% do tempo total dos filmes de alginato.

Na Tabela 5.21 estão dispostos os resultados obtidos para os cálculos da difusividade pelo modelo dos Sólidos Semi-infinitos e pelo modelo que engloba todos os dados experimentais (Equação 3.4), bem como os respectivos coeficientes de correlação dos ajustes aos modelos.

Os coeficientes de correlação mostram que os ajustes do modelo aos dados experimentais, de forma geral, foram bons e os valores de difusividade encontrados estão próximos aos obtidos por tempos curtos. Os valores mais semelhantes entre os dois métodos foram para os filmes FC2, indicando que o processo de intumescimento teve menor influência da difusividade desta formulação. A espessura dos filmes exerceu grande influência nos cálculos de difusividade sendo que nos dois modelos houve aumento desta com aumento da espessura para todas as formulações. Para os cálculos das difusividades, utilizou-se a espessura final dos filmes, uma vez que o tempo para o equilíbrio do intumescimento é pequeno em relação ao tempo de liberação.

Em relação às diferentes formulações, para os dois modelos, a difusividade diminuiu com o aumento da concentração de alginato na formulação sendo que os valores chegaram a abranger 4 ordens de grandeza quando o modelo da Eq. 3.4 foi utilizado, variando de 10^{-9} cm²/s para a FC1 a 10^{-12} cm²/s para FC7.

Bajpai *et al.* (2006) produziram esferas de alginato e pectina reticulados com cálcio em várias proporções e estudaram a liberação de nitrato de potássio em água. Os autores verificaram, assim como no presente trabalho, que a taxa de liberação aumentou com o aumento da concentração de pectina na formulação. Este comportamento foi atribuído à grande hidrofiliabilidade da pectina, que ao absorver mais água provoca a maior relaxação das cadeias

resultando na maior liberação do agente ativo. Neste trabalho, também foi verificado que o aumento da reticulação com íons cálcio diminuía a taxa de liberação devido à menor relaxação das cadeias.

Tabela 5.21. Difusividades efetivas dos filmes calculadas pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de Sólidos Semi-infinitos (tempos curtos) e ao modelo da Equação 3.4.

| Filme | Alíquota (g) | Tempos curtos | | Modelo | |
|-------|-----------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
| | | D_{ef} (cm ² /s) | R ² | D_{ef} (cm ² /s) | R ² |
| FC1 | 50 | $3,92 \times 10^{-9}$ | 0,9991 | $3,22 \times 10^{-9}$ | 0,9963 |
| | 60 | $4,07 \times 10^{-9}$ | 0,9981 | $4,81 \times 10^{-9}$ | 0,9987 |
| | 70 | $5,74 \times 10^{-9}$ | 0,9989 | $9,53 \times 10^{-9}$ | 0,9869 |
| FC2 | 50 | $2,04 \times 10^{-9}$ | 0,9991 | $2,16 \times 10^{-9}$ | 0,9988 |
| | 60 | $2,18 \times 10^{-9}$ | 0,9993 | $2,75 \times 10^{-9}$ | 0,9934 |
| | 70 | $4,33 \times 10^{-9}$ | 0,9993 | $4,14 \times 10^{-9}$ | 0,9992 |
| FC3 | 50 | $6,09 \times 10^{-10}$ | 0,9980 | $3,62 \times 10^{-10}$ | 0,9914 |
| | 60 | $7,23 \times 10^{-10}$ | 0,9994 | $4,27 \times 10^{-10}$ | 0,9849 |
| | 70 | $9,10 \times 10^{-10}$ | 0,9991 | $5,35 \times 10^{-10}$ | 0,9835 |
| FC4 | 50 | $3,92 \times 10^{-10}$ | 0,9989 | $2,80 \times 10^{-10}$ | 0,9834 |
| | 60 | $4,47 \times 10^{-10}$ | 0,9993 | $3,01 \times 10^{-10}$ | 0,9866 |
| | 70 | $6,12 \times 10^{-10}$ | 0,9989 | $4,11 \times 10^{-10}$ | 0,9835 |
| FC5 | 50 | $1,41 \times 10^{-10}$ | 0,9996 | $7,94 \times 10^{-11}$ | 0,9971 |
| | 60 | $1,56 \times 10^{-10}$ | 0,9982 | $9,30 \times 10^{-11}$ | 0,9952 |
| | 70 | $1,85 \times 10^{-10}$ | 0,9985 | $1,04 \times 10^{-10}$ | 0,9945 |
| FC6 | 50 | $2,86 \times 10^{-11}$ | 0,9992 | $2,58 \times 10^{-11}$ | 0,9979 |
| | 60 | $3,02 \times 10^{-11}$ | 0,9988 | $2,73 \times 10^{-11}$ | 0,9948 |
| | 70 | $3,29 \times 10^{-11}$ | 0,9988 | $3,02 \times 10^{-11}$ | 0,9948 |
| FC7 | 50 | $1,11 \times 10^{-11}$ | 0,9988 | $9,18 \times 10^{-12}$ | 0,9986 |
| | 60 | $1,16 \times 10^{-11}$ | 0,9987 | $9,22 \times 10^{-12}$ | 0,9981 |
| | 70 | $1,18 \times 10^{-11}$ | 0,9982 | $1,09 \times 10^{-11}$ | 0,9982 |

Jaya *et al.* (2009) confeccionaram microcápsulas de alginato e pectina em diversas formulações para liberação de ácido acetilsalicílico e também observaram que as maiores

liberações foram obtidas nas maiores proporções de pectina e que a barreira formada era mais fraca que a de alginato.

Dessa forma, pode-se também associar que os filmes com maior proporção de alginato do presente trabalho, que possuem um maior grau de reticulação, como já demonstrado anteriormente, apresentam menor difusividade porque dificultam a mobilidade da natamicina. Zactiti (2004) observou que a difusividade do sorbato de potássio em água diminuía com o aumento da concentração de cálcio utilizada na reticulação. Seus valores foram da ordem de 10^{-7} cm²/s.

Mesmo com as difusividades mais altas para a pectina, os valores determinados encontram-se abaixo da maioria dos estudos sobre liberação de antimicrobianos em filmes encontrados na literatura. Baixos valores para os coeficientes de difusividade são desejáveis porque estão relacionados ao maior controle da liberação. Para sorbato de potássio, lisozima e ácido sórbico, valores típicos de difusividade são da ordem de 10^{-8} cm²/s (Buonocore *et al.* 2003, Ozdemir e Floros, 2001, Redl *et al.*, 1996). Franssen *et al.* (2004) adicionaram natamicina em filmes de proteína de soro de leite e determinaram difusividade em água em $3,8 \cdot 10^{-10}$ cm²/s. Já a difusividade do sorbato de potássio nesses mesmos filmes aumentou para $9,24 \cdot 10^{-7}$ cm²/s.

Da Silva (2009) obteve uma difusividade da natamicina em água para filmes de alginato muito próxima a da formulação FC7-70, que possui espessura semelhante ($1,639 \times 10^{-11}$ cm²/s). Ao incorporar quitosana na formulação (fração mássica de 0,175) este coeficiente baixou para $0,775 \times 10^{-11}$. Em outro trabalho, esferas de alginato e pectina (50/50) para liberação de nitrato de potássio apresentaram difusividade em água de $0,15 \times 10^{-8}$ cm²/s (Bajpai *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÕES

Os filmes de pectina puros e os filmes de pectina e alginato mostraram-se visualmente atrativos e não apresentaram separações de fases em nenhuma das proporções estudadas. Todas as propriedades analisadas melhoraram com o aumento da concentração de alginato na formulação e, apesar da grande semelhança entre as estruturas, a pectina não é reticulada de forma tão eficiente quanto o alginato.

A reticulação parcial com íons cálcio interfere nas características visuais, de manuseio, e na tensão na ruptura dos filmes sendo que 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13,60 mg Ca^{2+} /g biopolímero) mostrou-se como a concentração mais adequada. A reticulação complementar por meio do tratamento com imersão melhora significativamente as propriedades até um limite máximo de 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (m/v), a partir da qual as mesmas são prejudicadas por uma reticulação não uniforme.

O glicerol, necessário para melhorar a elasticidade dos filmes, afeta diretamente outras propriedades como a tensão na ruptura, solubilidade em água e PVA, existindo um limite de uso, que para os filmes deste trabalho foi de 3%. O tempo de imersão na solução reticuladora influencia, principalmente, o conteúdo de solubilidade em água.

A incorporação da natamicina para a confecção dos filmes ativos influenciou negativamente as propriedades funcionais, sobretudo a opacidade. A pectina mostrou menor compatibilidade com o antimicrobiano e a liberação ocorreu de forma mais eficiente nas formulações contendo mais alginato. As difusividades diminuíram com aumento do conteúdo de alginato e aumentaram com o aumento da espessura dos filmes. Os resultados de difusividade apontam os filmes de alginato puro e os filmes contendo 10% de pectina como candidatos potenciais a embalagens ativas para alimentos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar diferentes concentrações de cálcio no segundo estágio de reticulação em conjunto com diferentes tempos de imersão.
- Avaliar maiores concentrações de pectina na solução filme-formadora.
- Realizar ensaios de liberação de natamicina em um sistema alimentício.
- Modelar o processo de difusão levando em consideração a variação de intumescimento do filme.
- Avaliar a liberação em sistemas com alto teor de gordura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MUSA, S., FARA, D. A., BADWAN, A. A. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 223-232, 1999.

ALLEN, L., NELSON, A. I., STEINBERG, M. P., MCGILL, J. N. Edible corn-carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch-alginate coating. *Food Technology*, v.17, p.1437, 1963.

ANDRADE, S. A. C., GUERRA, T. M. B., RIBEIRO, M. A., GUERRA, N. B. Emprego de revestimentos comestíveis de alginato e pectina de baixa metoxilação em alimentos: Revisão. *B. CEEPA*, v.26, n.1, p.41-50, 2008.

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of material. *Annual Book of ASTM Standards*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, E 96-95, 1995a.

ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. *Annual Book of ASTM Standards*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, D 882, 1995b.

AXELOS, M. A. V., THIBAUT, J. F. The chemistry of low methoxyl pectin. In: WALTER, R. H. *The chemistry and technology of pectin*. San Diego: Academic Press, Inc. p.87-107, 1991.

BAJPAI, J., BAJPAI, A. K., MISHRA, S. Dynamics of controlled release of potassium nitrate from a highly swelling binary biopolymeric blend of alginate and pectin. *Journal of Macromolecular Science*, v.43, p.165-186, 2006.

BALDWIN, E. A., NISPEROS, M. O., HAGENMAIER, R. D., BAKER, R. A. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*, v.51, n.6, p.56-52, 1997.

BATISTA, J. A. *Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de pectina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 137p. Dissertação (Mestrado).

BATISTA J. A., TANADA-PALMU, P. S., GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, p.781-788, 2005.

BERTAN, L. C. *Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 188p. Tese (Doutorado).

BERWIG, E. *Preparação e caracterização de filmes de poliuretano com potencial aplicação na liberação controlada de fármacos*. Florianópolis: Centro e Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. 83p. Dissertação (Mestrado).

BRACCINI, I., PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, v.2, n.4, p.1089-1096, 2001.

- BRASIL. Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001. Aprova a extensão do uso da Natamicina (Pimaricina), como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos. *Diário Oficial da União*, 02 de março de 2001, seção 1, p.15-16.
- BUONOCORE, G. G., DEL NOBILE, M. A., PANIZZA, A., CORBO, M. R. A general approach to describe the antimicrobial release from highly swellable films intended for food packaging applications. *Journal of Controlled Release*, v.90, p.97-107, 2003.
- CANEVAROLO JR., S. V. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: ArtLiber, 2004. 446p.
- CARDOSO, S. M., COIMBRA, M. A. LOPES DA SILVA, J. A. Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca²⁺ networks: a rheological study. *Food Hydrocolloids*, v.17, p.801-807, 2003.
- CHA, D. S., CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, p.223-237, 2004
- CHEN, G-Q., LU, F-P., DU, L-X. Natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus* based on statistical optimization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.5057-5061, 2008.
- CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v.78, n.11, p.2563-2583, 1995.
- CHERIAN, G., GENNADIOS, A., WELLER, C., CHINACHOTI, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: Effect of sucrose, glycerin and sorbitol. *Cereal Chemistry*, v.72, p.1-6, 1995.
- CLARE, K. Algin. In: WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N. *Industrial Gums*. New York: Academic Press. p.105-143, 1993.
- COFFIN, D. R., FISHMAN, M. Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films. *Journal of Applied Polymer Science*, v.54, n.9, p.1311-1320, 1994.
- CONG, F., ZHANG, Y., DONG, W. Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, v.46, p. 71-75, 2007.
- CUQ, B., GONTARD, N., CUQ, J. L., GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, v.61, n.3, p.580-584, 1996a.
- CUQ, B., GONTARD, N., CUQ, J. L., GUILBERT, S. Rheological model for the mechanical properties of myofibrillar protein-based films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.44, p.1116-1122, 1996b.
- CUSSLER, E. L. *Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems*. 2^a ed. New York: Cambridge University Press, 1997. 525 p.
- DA SILVA, M. A. *Confecção e caracterização de filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina como agente antimocótico*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 200p. Tese (Doutorado).

DA SILVA, M. A., BIERHALZ, A. C. K., KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, v.77, p.736-742, 2009.

DA SILVA, M. A., BIERHALZ, A. C. K., KIECKBUSCH, T. G. Effect of the gel membrane drying conditions on physical properties of alginate films. Trabalho submetido ao 17th International Drying Symposium (IDS) Magdeburg, Alemanha (2010).

DANISCO. *Natamax antimicrobials*. Disponível em:
<http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/product%20range/antimicrobials/antimicrobial%20ingredients/natamax%20antimicrobials/natamax_antimicrobials_en.htm> Acesso em: 03 de junho de 2009.

DE YAO, K., LIU, J., CHENG, G. X., LU, X. D., TU, H. L., LOPES DA SILVA, J. A. Swelling behavior of pectin/chitosan complex films. *Journal of Applied Polymer Science*, v.60, p.279-286, 1996.

DEBEAUFORT, F., QUEZADA-GALLO, J-A., VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science*, v.38, n.4, p.299-312, 1998.

DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G., SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.21, p.47-55, 1997.

ERSTVÁG, H., VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, n.1, p.85-91, 1998.

FANG, Y., AL-ASSAF, S., PHILLIPS, G. O., NISHINARI, K., FUNAMI, T., WILLIAMS, P. A. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, v.72, p. 334-341, 2008.

FISHMAN, M. L., COFFIN, D. R. Mechanical, microstructural and solubility properties of pectin/poly(vinyl alcohol) blends. *Carbohydrate Polymers*, v.35, p.195-203, 1998.

FISHMAN, M. L., COFFIN, D. R. Films fabricated from mixtures of pectin and starch. United States Patent 5451673, Washington, D.C., 1995.

FRANSSEN, L. R., RUMSEY, T. R., KROCHTA, J. M. Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science*, v.69, n.5, p.347-350.

GARCIA, M. A., PINOTTI, A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N. E. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, v.56, n.3 p.339-345, 2004.

GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETTI, U., SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. *Química nova*, v.31, p.1800-1806, 2008.

GENNADIOS, A., BRANDENBURG, A. H., WELLER, C. L., TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.41, p.1835-1839, 1993.

GEORGE, S., THOMAS, S. Transport phenomena through polymeric systems, *Progress in Polymer Science*, v.26, p.985-1017, 2001.

- GUILBERT, S., GONTARD, N., GORRIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.29, n.1-2, p.10-17, 1996.
- HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, v.54, n.3, p.56-65, 2000.
- HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. Ed. HAN, J. H. In: *Innovations in Food Packaging*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.80-101, 2005.
- HAN, J. H., GENNADIOS, A. Edible films and coatings: a review. Ed. HAN, J. H. In: *Innovations in Food Packaging*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.239-262, 2005.
- HIORTH, M., THO, I., SANDE, S. A. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.56, p.175-182, 2003.
- HOAGLAND, P. D., PARRIS, N. Chitosan/pectin laminated films. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.1915-1919, 1996.
- HOURDET, D., MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides III, Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis. *Carbohydrate Polymers*, v.16, n 4, p.409, 1991.
- IGLESIAS, M. T., LOZANO, J. E. Extration and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, v.62, p.215-223, 2004.
- IRISSIN-MANGATA, J., BAUDUIN, G., BOUTEVIN, B., GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, v.37, p.1533-1541, 2001.
- JAYA, S., DURANCE, T. D., WANG, R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, v.26, p.143-153, 2009.
- KANG, H. J., JO, C., LEE, N. Y., KWON, J. H., BYUN, M. W. A combination of gamma irradiation and CaCl₂ immersion for a pectin-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymers*, v.60, p.547-551, 2005.
- KAYSERILIOĞLU, B. S., BAKIR, U., YILMAZ, L., AKKAŞ, N. Drying temperature and relative humidity effects on wheat gluten film properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.51, n.4, p.964-968, 2003.
- KESTER, J. J., FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v. 40, n.12, p.47-59, 1986.
- KIM J. H., LEE S. B., KIM, S. J., LEE, Y. M. Rapid temperature/pH response of porous alginate-poly (Nisopropylacrylamide) hydrogels. *Polymer*, n.43, p.7549-7558, 2002.
- KROCHTA, J. M., DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities, *Food Technology*, v.51, n.2, p.61-74, 1997.
- LACROIX, M., TIEN, L. C. Edible films and coatings from non-starch polysaccharides. Ed. HAN, J. H. In: *Innovations and Food Packaging*. Elsevier, 2005.

- KUMARI, K., SHARMA, C., KUNDU, P. P. In-vitro release of metformin hydrochloride from films of chitosan-methylcellulose blends. *Asian Journal of Chemistry*. v.21, n.10, p.148-152, 2009.
- LAMBRECH, M. V. P., SORRIVAS, V., VILLAR, M. A., LOZANO, J. E. Structure and permeability of low-methoxylpectin (LMP)–sodium alginates (NaAlg) films. *Chemical Engineering Transactions*, v.17, p.1765-1770, 2009.
- LIMA, A. M. F., ANDREANI, L., SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. *Química Nova*, v.30, n.4, p.832-837, 2007.
- LIMJAROEM, P., RYSER, E., LOCKHART, H., HARTE, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. *Journal of Plastic Films and Sheeting*, v.19, p.95-109, 2003.
- LIU, L., MARSHALL, L. F., HICKS, K. B. Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*, v.4, p-15-24, 2007.
- LUCAS, E. F., SOARES, B. G., MONTEIRO, E. *Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica*. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p.
- MACLEOD, G. S., FELL, J. T., COLLETT, J. H. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.157, p.53-60, 1997.
- MAFTOONAZAD, N., RAM ASWAMY, H. S.; MARCOTTE, M. Moisture sorption behavior, and effect of moisture content and sorbitol on thermomechanical and barrier properties of pectin based edible films. *International Journal of Food Engineering*, v.3, n.4, art.10, 2007.
- MAMANI, H. N. C. *Produção e caracterização de filmes compostos de metilcelulose, glucomanana, pectina, gelatina e lipídios*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 158p. Tese (Doutorado).
- MARTIN-POLO, M., VOILLEY, A., BLOND, G., COLAS, B., MESNIER, M., FLOQUET, N. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of the physical state. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.40, n.3, p.413-418, 1992.
- MARUDOVA, M., MACDOUGALL, A. J., RING, S. G. Pectin–chitosan interactions and gel formation. *Carbohydrate Research*, v.339, p.1933-1939, 2004.
- MAY, C. D. Pectins. In: IMENSON, A. *Thickening and gelling agents for food*. Cap.11. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional. p.230-260. 1997.
- McHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, n.4, p.841-845, 1994.
- MENDIETA-TABOADA, O., CARVALHO, R. A., SOBRAL, P. J. A. Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis. *Química nova*, v. 31, p. 384-383, 2008.

- OLIVAS, G. I., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate-calcium filmes: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v.41, p.359-366, 2008.
- OLIVEIRA, L. M., ALVES, R. M. V., SARANTÓPOULOS, C. I. G. L., PADULA, M., GARCIA, E. E. C, COLTRO, L. *Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis*. Campinas: CETEA/ITAL, 1996, 202p.
- OLIVEIRA, T. M., SOARES, N. F. F., PEREIRA, R. M., FRAGA, K. F, Development and evaluation of antimicrobial Natamycin – incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science*, v.20, n.2, p.147-153, 2007.
- ONSØYEN, E. Alginates. In: IMENSON, A. *Thickening and gelling agents for food*. Cap.11. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional. p.230-260. 1997.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, v. 47, p.149-155, 2001.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, v. 84, p.116-123, 2008.
- PARK, H. J., CHINNAN, M. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*, v.25, n.4, p.497-507, 1995.
- PARRIS, N., COFFIN, D. R., REMON, F. J., PESSEN, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.1432-1435, 1995.
- PAVLATH, A. E., GOSSET, C., CAMIRAND, W., ROBERTSON, G. H. Ionomeric films of alginic acid. *Journal of Food Science*, v.64, p.61–63, 1999.
- PAVLATH, A. E., ROBERTSON, G. H. Biodegradable polymers vs. recycling: what are the possibilities. *Critical Reviews in analytical Chemistry*, v. 29, p.231-241, 1999.
- PEDERSEN, J.C. Natamycin as a fungicide in Agar Media. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.3, p.1064-1066, 1992.
- PINTADO, C. M. B. S., FERREIRA, M. A. S. S., SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, v. 21, p.240-246, 2010.
- PIRES, A. C. S., SOARES, N. F. F., ANDRADE, N. J., SILVA, L. H. M., CAMILLOTO, G. P., BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, v.21, n.7, p.375-383, 2008.
- POTHAKAMURY, U. R., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v.6, p.397-406, 1995.
- POMMET, M., REDL, A., MOREL, M. H., GUILBERT, S. Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, v.44, p.115-122. 2003.

- PRANOTO, Y., SALOKHE, V. M., RAKSHIT, S. K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, v.38, p.267–272, 2005a.
- PRANOTO, Y., RAKSHIT, S. K., SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.38, p.859-865, 2005b.
- REDL, A., GONTARD, N., GUILBERT, S. Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films, *Journal of Food Science*, v.61, p.116–120, 1996.
- REMUÑÁN-LÓPEZ, C., BODMEIER, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, v. 44, p. 215-225, 1997
- RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.37, n.3, p.323-330, 2004.
- ROBERTSON, G. L. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. In *Food Packaging: Principles and Practice*, New York: Marcel Dekker, p.63-107, 1993.
- RODOLFO JR., A., NUNES, L. R., ORMANJI, W. *Tecnologia do PVC*. São Paulo: Braskem, 2006, 447p.
- ROGER, D., TALBOT, D., BEE, A. Preparation and effect of Ca²⁺ on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 305, p. 221-227, 2006.
- ROGERS, C. E. Permeation of gases and vapors in polymer. In: *Polymer Permeability*. J. Comyn, London: Elsevier Applied Science: p.11-73, 1985.
- ROONEY, M. L. Introduction to active food packaging technologies. Ed. HAN, J. H. In: *Innovations in Food Packaging*. Elsevier, 2005.
- RUSSO, R. MALINCONICO, M. SANTAGATA, G. Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films. *Biomacromolecules*, v.8, p.3193-319, 2007.
- SANTANA, A. A. Influencia de características físicas e químicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscópico de filmes de alginato de cálcio. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 140p. Tese (Mestrado).
- SARTORI, C., FINCH, D.S., RALPH, B., GILDING, K. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR. spectroscopy. *Polymer*, v.38, p.43-51, 1997
- SCHULTZ, T. H., OWENS, H. S., MACLAY, W. D. Pectinate films. *Colloid Science*, v.3, p.53-62, 1948.
- SCHULTZ, T. H., MIERS, J. C., OWENS, H. S., MACLAY, W. D. Permeability of pectinate films to water vapor. *The Journal of Physical Chemistry*, v.53, n.9, p.1320-1330, 1949.

- SHIH, F. F. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chemistry*, v.73, n.3, p.406-409. 1996.
- SHOU, M., LONGARES, A., MONTESINOS-HERRERO, C., MONAHAN, F. J., O'RIORDAN, D. O'SULLIVAN, M. Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.38, p.605-610, 2005.
- SIEPMANN, J., PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p.139-157, 2001
- SIGUEMOTO, A. T. *Propriedades de pectina- Braspectina*. Anais do simpósio sobre hidrocolóides, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1993.
- SOBRAL, P. J. A., HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 15, n.4-6, p.377-382, 2001.
- SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. *Ciência & Engenharia*, v.8, n.1, p.60-67, 1999.
- SRIAMORNSAK, P., KENNEDY, R. A. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. *International Journal of Pharmaceutics*, v.323, p.72-80, 2006.
- SRIAMORNSAK, P., KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, v.358, p.205-213, 2008.
- SOTHORNVIT, R., KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. Ed. HAN, J. H. In: *Innovations in Food Packaging*. Elsevier, 2005.
- SOTHORNVIT, R., KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, v.50, p.149-155, 2001.
- SOTHORNVIT, R., KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p.6298-6302, 2000.
- SULLOF, E.C. *Comparative study of semisynthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of shredded cheddar cheese*. Thesis submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 1999. Disponível em: <<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-120399-111506/unrestricted/thesisetd.pdf>> Acesso em: 30/05/2010.
- TABOADA-MENDEIETA, O., CARVALHO, R.A., SOBRAL, P.J.A. Análise Dinâmico-Mecânica: Aplicações em filmes comestíveis. *Química Nova*, v.31, n.2, p.384-393, 2008.
- THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*. v.14, n.3, p.71-78, 2003.
- THAKUR, B. R., SINGH, R. K., HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.37, p.47-73, 1997.

TURBIANI, F. R. B. *Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Ativos de Alginatos de Sódio Reticulados com Benzoato de Cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007, 126p. Tese (Mestrado).

TÜRE, H., EROĞLU, E., ÖZEN, B., SOYER, F. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.2026-2032, 2008.

TÜRE, H., EROĞLU, E., ÖZEN, B., SOYER, F. Physical properties of biopolymers containing natamycin and rosemary extract. *International Journal of Food Science and Technology*, v.44, p.402-408, 2009.

VAR, I., ERGINKAYA, Z., GUVEN, M., KABAK, B. Effect of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period. *Food Control*, v.17, p.132-136, 2006.

VOSS, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society Colour Chart. *Hortscience*, v.27, n.12, p.256- 260, 1992.

WALKENSTRÖM, P., KIDMAN, S., HERMANSSON, A. M., RASMUSSEN, P. B., HOEGH, L. Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, v.17, n.5, p.593–603, 2003.

WILLATS, W. G. T., KNOX, J. P., MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, v.17, p.97-104, 2006.

XU, J. B., BARTLEY, J. P., JOHNSON, R. A. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water-soluble carbodiimide (WSC). *Journal of Membrane Science*, v.28, n.2, p.131-146, 2003.

YAN, X-L., KHOR, E., LIM, L-Y. Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.58, p.358-365, 2001;

YANG, L., PAULSON, A. T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, v.33, p.571-578, 2000.

ZACTITI, E. M. *Desenvolvimento, caracterização de filmes biodegradáveis de alg inato de cálcio sem e com sorbato de potássio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 154p. Tese (Doutorado).

ZACTITI, E. M., KIECKBUSCH, T. G. Processo de produção de filmes plásticos ativos biodegradáveis de alginato de cálcio de baixa solubilidade. Pedido de Privilégio de Patente. INPI, Prot. 01850064015 - 12/2005.

ZACTITI, E. M., KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, v. 77, p. 462-467, 2006.

ZACTITI, E. M., KIECKBUSCH, T. G. Release of potassium sorbate from active films of sodium alginate crosslinked with calcium chloride. *Packaging Technology and Science*, v.22, p.349-358, 2009.

ZSIVÁNOVITS, G., MARUDOVA, M., RING., S. Influence of mechanical properties of pectin films on charge density and charge density distribution in pectin macromolecule. *Colloid and Polymer Science*, v.284, p.301-308, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Temperatura de transição vítrea do alginato

Na Figura A.1 a estão apresentados os resultados do módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e tangente de perda ($\tan \delta$) para um filme simples de alginato confeccionado com solução pré-reticuladora (30 mL) de 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. No segundo estágio o filme foi imerso em 50 mL de solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3% de glicerol durante 20 minutos.

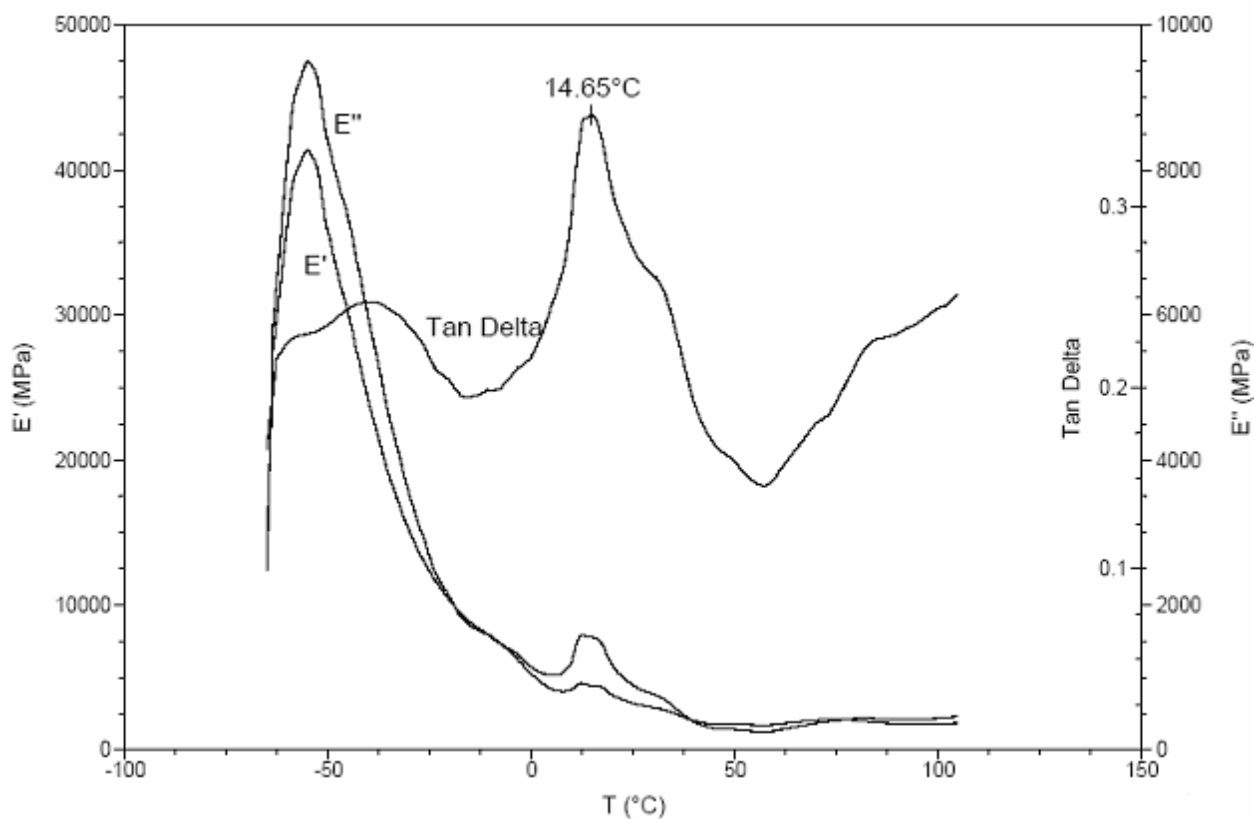


Figura A.1. Registro da análise termomecânica do filme simples de alginato.

APÊNDICE B

Opacidade em modo de transmitância

Os dados de opacidade no modo de transmitância dos filmes ativos e dos filmes sem natamicina estão apresentados na Tabela B.1.

Tabela B.1. Opacidade dos filmes com e sem natamicina

| Amostra | Opacidade | |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 0% natamicina | 4% natamicina |
| FC1 | 4,55 ± 0,06 ^{e,B} | 51,98 ± 0,89 ^{b,A} |
| FC2 | 4,73 ± 0,08 ^{e,B} | 46,02 ± 1,08 ^{d,A} |
| FC3 | 6,67 ± 0,35 ^{d,B} | 51,27 ± 1,09 ^{b,A} |
| FC4 | 7,85 ± 0,48 ^{c,B} | 57,20 ± 0,86 ^{a,A} |
| FC6 | 11,25 ± 0,10 ^{b,B} | 52,02 ± 0,59 ^{b,A} |
| FC6 | 12,56 ± 0,47 ^{a,B} | 49,00 ± 0,47 ^{c,A} |
| FC7 | 13,12 ± 0,06 ^{a,B} | 48,57 ± 0,39 ^{c,A} |

Média ± desvio padrão das repetições.

Letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

APÊNDICE C

As curvas dos ajustes do modelo da Equação 3.4 aos dados experimentais, para as diferentes formulações nas alíquotas de 60 e 70g, estão apresentadas nas Figuras C.1 a C.7.

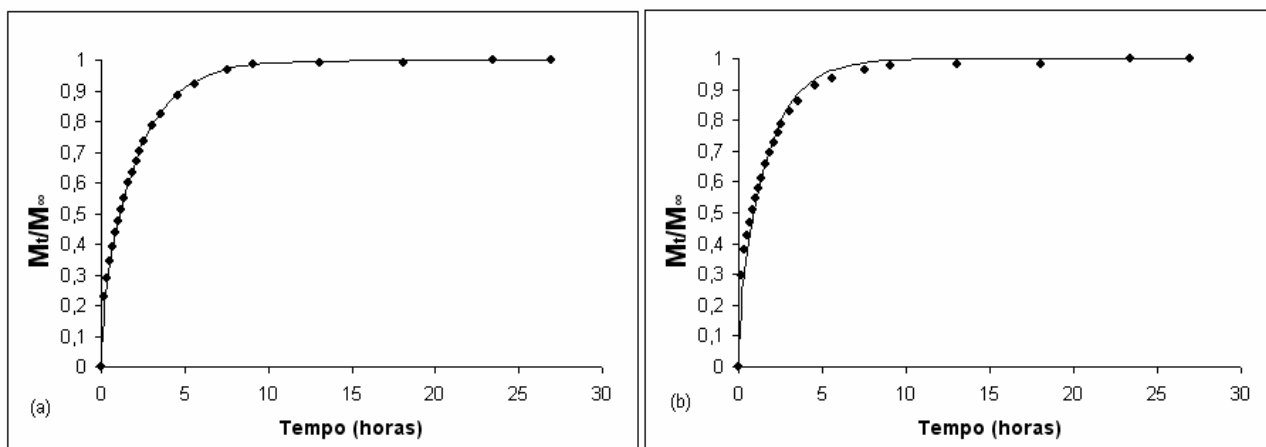


Figura C.1. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC1 de (a) 50g e (b) 60g.

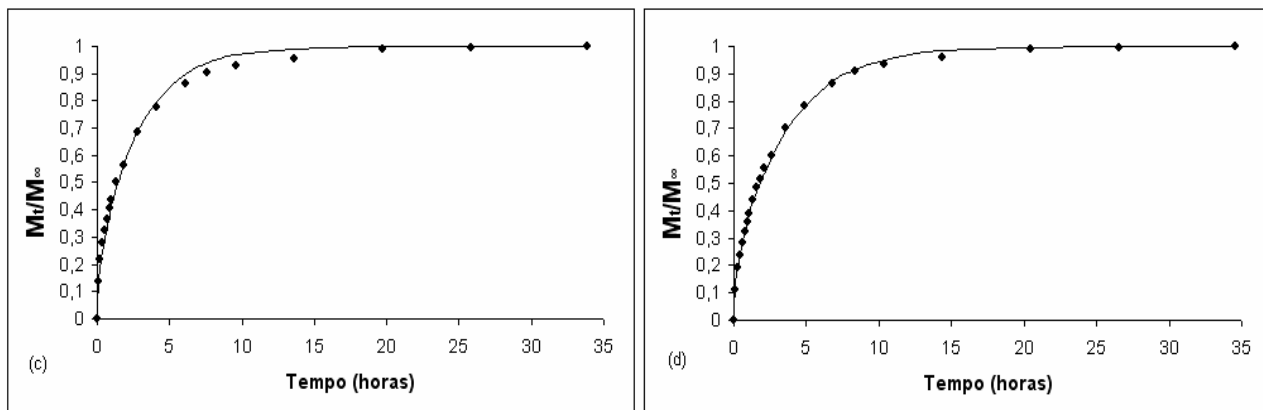


Figura C.2. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC2 de (c) 50g e (d) 60g.

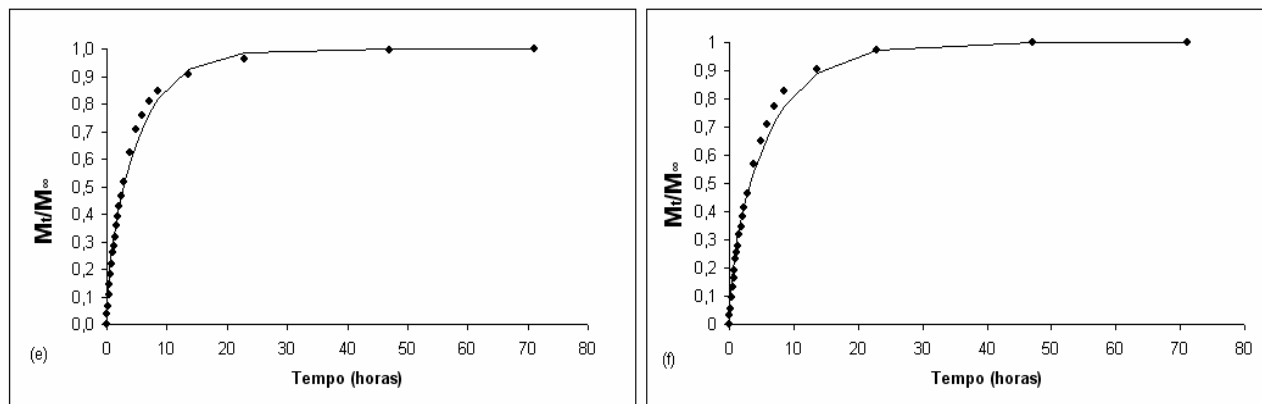


Figura C.3. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC3 de (e) 50g e (f) 60g.

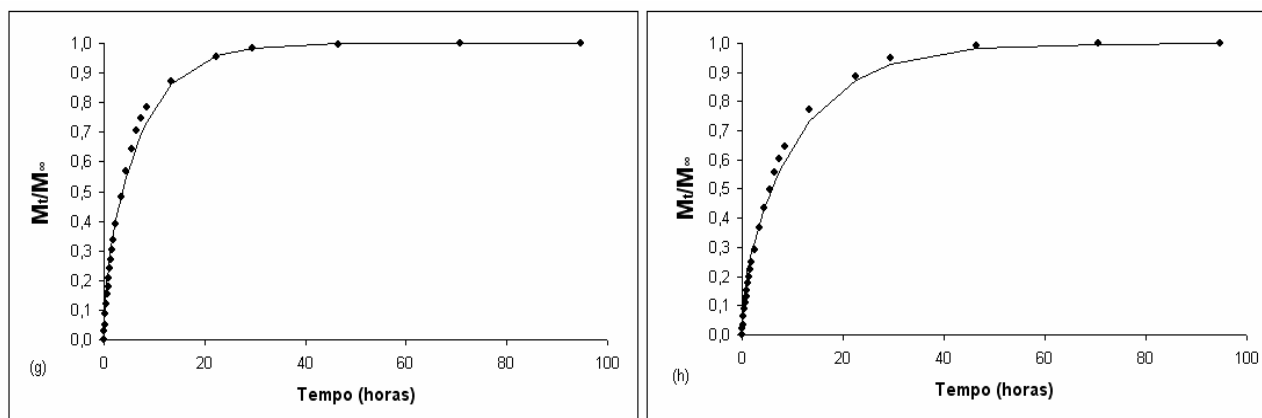


Figura C.4. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC4 de (g) 50g e (h) 60g.

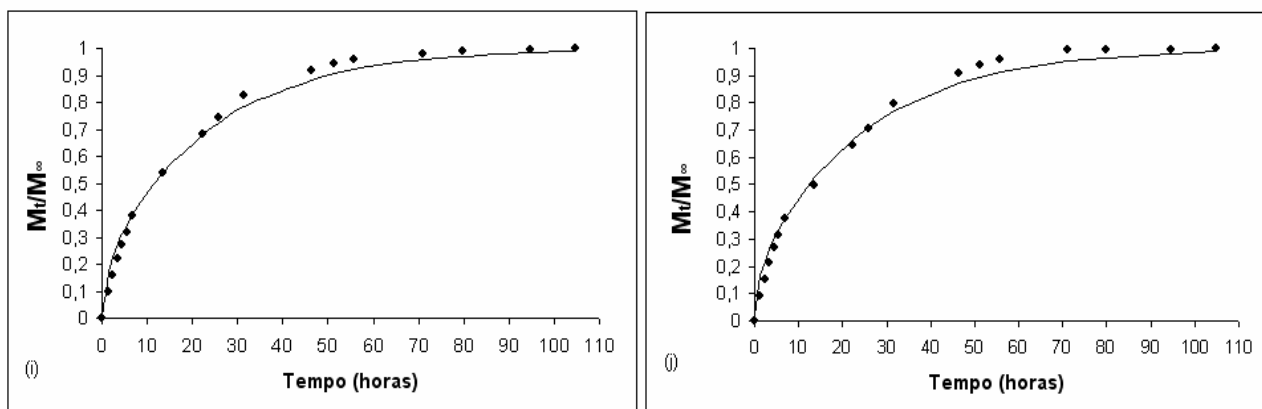


Figura C.5. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC5 de (i) 50g e (j) 60g.

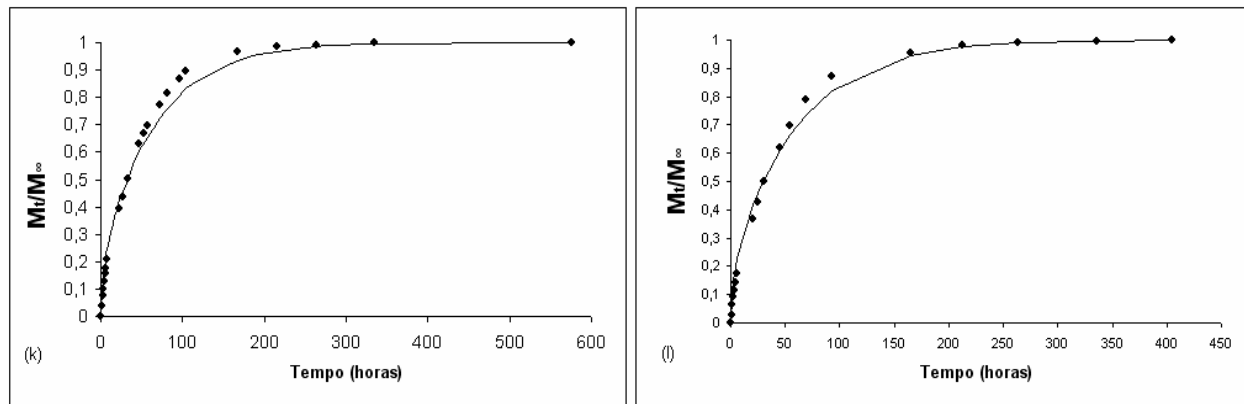


Figura C.6. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC6 de (k) 50g e (l) 60g.

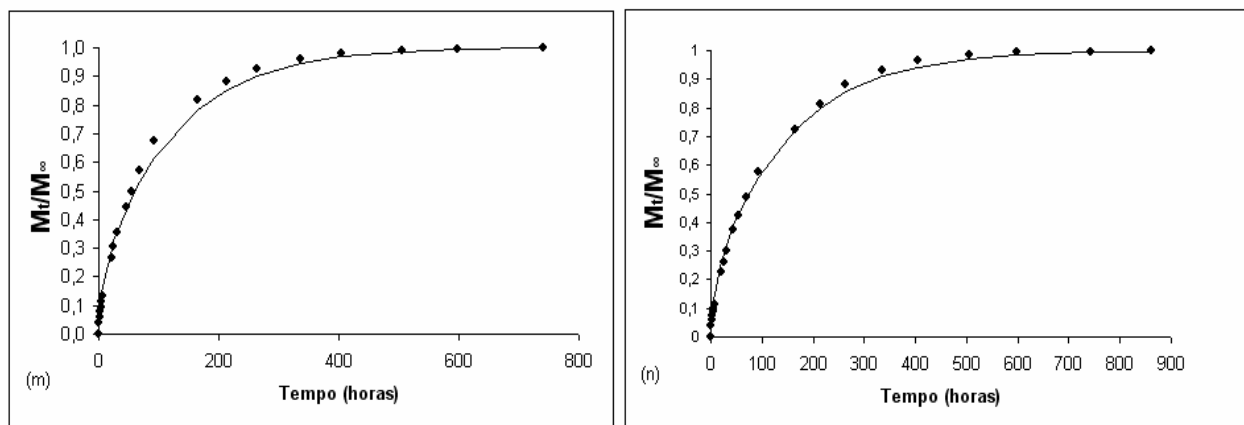


Figura C.7. Fração de natamicina liberada com o tempo para filmes FC7 de (m) 50g e (n) 60g.