



## **Desenvolvimento de filmes bioactivos a partir do quitosano**

**Cláudia Maria dos Santos Cordeiro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Co – Orientador: Professora Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa

**Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Isabel Maria Rôla Coelho, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Lisboa, 2010

Quero agradecer ao meu orientador, Doutor Vitor Alves, por todo o apoio, interesse, dedicação e esclarecimento prestado durante toda a realização deste trabalho.

Obrigado à minha co-orientadora, professora Doutora Isabel de Sousa, pelo apoio e entusiasmo revelado ao longo do trabalho.

Agradeço à minha colega e amiga Ana Isabel pelo apoio, compreensão e companheirismo ao longo de todo o trabalho experimental.

Agradeço à minha família, particularmente aos meus pais que me apoiaram e ajudaram sempre no que conseguiram e, inevitavelmente, aos meus sobrinhos Romeu e Xavier, por me conseguirem animar nas alturas de mais trabalho.

Por fim, agradeço ao meu namorado, Tiago, por todo o apoio, paciência e compreensão ao longo deste tempo.

MUITO OBRIGADO, a concretização deste trabalho não seria possível sem o apoio de todos.

## Resumo

Realizou-se um desenho de experiências para obter filmes a partir de quitosano, com incorporação de um reticulante (Etileno glicol diglicidil eter), nisina e glicerol. As variáveis independentes estudadas foram a concentração de quitosano (0,7-2,3%), a concentração de ácido acético (0,3-3%) e razão molar de reticulante/polímero (0-4 moles). Verificou-se que, apesar de ter havido um efeito significativo das variáveis independentes isoladamente nas propriedades dos filmes, não se observou qualquer efeito de interação entre elas. Foram também produzidos filmes com uma formulação de mistura de quitosano e gelatina de peixe com diferentes proporções dos dois polímeros, bem como filmes com dupla camada.

Nos ensaios reológicos às soluções filmogénicas, concluiu-se que o reticulante não actuou quando adicionado à solução, tendo reagido somente durante o processo de secagem. Verificou-se que o valor dos módulos conservativo e dissipativo, bem como a viscosidade, aumentou com o aumento da concentração de quitosano.

Os filmes obtidos eram bastante hidrofílicos. Apesar dos valores serem ainda relativamente elevados, observou-se uma menor absorção de água e solubilidade em água e ácido, para valores centrais de razão molar reticulante/polímero. Relativamente às propriedades mecânicas dos filmes, a tensão de ruptura foi afectada positivamente pela diminuição do pH e pelo aumento da razão molar reticulante/polímero, enquanto que, o alongamento na ruptura só foi afectado pela concentração de quitosano.

As propriedades mecânicas dos filmes de mistura e com dupla camada aproximaram-se das dos filmes de quitosano, à medida que a proporção deste polímero na mistura aumentou.

**Palavras-chave** – Quitosano, filmes comestíveis, filmes bioactivos, filmes com dupla camada.

## Abstract

An experimental design to obtain films from chitosan was elaborated with the incorporation of crosslinker (ethylene glycol diglycidylether), nisin and glycerol. The independent variables were chitosan concentration (0,7-2,3%), acetic acid concentration (0,3-3%) and molar ratio of crosslinking/polymer (0-4). Although there was a significant effect of the single independent variables on the films properties determined throughout the study, no interaction between them was noticed. Chitosan and gelatin blend films were also produced with different proportions, as well as bi-layered films.

The rheology of the filmogenic solutions showed that crosslinking only takes place during film formation, and not when the crosslinking agent was added to the solution. We observed that the value of the storage and loss modulus as well as the viscosity, increased with concentration of chitosan.

The films obtained were very hydrophilic. Even though the values were relatively high, there was less water absorption capacity and solubility in water and in acid, for central values of molar ratio crosslinker/polymer. Regarding the mechanical properties of the films, the tensile strength was positively affected by the decrease of pH and the increase of molar ratio crosslinker/polymer, whereas, the elongation at rupture was only affected by the chitosan concentration.

As expected, the higher the proportion of chitosan on blend and bi-layer films the closer they resembled the straight for waned chitosan films in what mechanical behavior is concerned.

**Keywords:** Chitosan, edible films, bioactive packaging, by-layer films.

## Extended Abstract

An experimental design was carried out to obtain films from chitosan, where chitosan concentration, acetic acid concentration and molar ratio crosslinker/polymer were the independent variables in this study. In addition, chitosan and gelatin blend films and bi-layer films were produced with different proportions of the two polymers. The effect of the independent variables on the rheological properties of filmogenic solutions, and on mechanical, hygroscopic and water vapor permeability properties of the films, was studied. It was shown that, when there was a significant effect of single independent variables on films properties, no effect of their interactions was observed.

The rheology of filmogenic solutions showed that storage and loss modulus, increased with the frequency applied. These results indicate that crosslinking did not occur significantly in the solution itself. It was also observed that chitosan concentration affects positively the value of the modulus and viscosity.

It can be concluded that the chitosan films produced are very hydrophilic and have a relatively high solubility and water absorption capacity (20-50% and 1-6 gH<sub>2</sub>O/gsolids, respectively).

Films with crosslinking showed lower solubility than the films without crosslinking. The solubility of the films decreased with the increase of the concentration of chitosan and it was lower for the central values of molar ratio crosslinking/polymer. It was observed that, in general, the water absorption capacity of the films is higher in acid solution than in water. In acid solutions, this property increases with the increase of the concentration of chitosan and acetic acid.

Water vapor permeability (WVP) decreased with the increase of the concentration of chitosan and of the pH. Regarding the effect of the crosslinker, the films without crosslinking revealed a lower WVP. It seems that, the hydrophilic nature of the crosslinker and its chemical structure (PEG chain with ten carbons), increased the space between polymer chains facilitating water diffusion.

Extension and puncture testes showed that tensile strength at rupture was positively affected by the decrease of the pH and the increase of molar ratio crosslinking/polymer, whereas, the elongation at rupture was only affected by the chitosan concentration.

Oscillatory testes done on the chitosan and fish gelatin blend solutions showed that the value of the storage and loss moduli increased with the frequency applied. Once again, it could be concluded that crosslinking only reacts during film formation, and not when it was added to the solution. It was also observed that the value of the moduli in oscillatory testes, and solution viscosity were positively affected by chitosan proportion.

During temperature sweep tests done on the chitosan and fish gelatin blend solutions, it was concluded that, increasing the proportion of chitosan in the blend solution caused a decrease in the gelation and the fusion temperatures. Chitosan is interfering with the ability of gelatine molecules to create interactions between them to form a gel.

It was found that the solubility in water and in acid solutions, among blend films, and bi-layer films, did not change significantly. The mixture of fish gelatin (blend and bi-layer films) with chitosan caused an increase in solubility, and a decrease of the water absorption capacity of the resulting films, when comparing with films prepared only with chitosan..

With the extension and puncture tests, we can conclude that, both blend and bi-layer films, have lower tensile strength and a higher elongation with increasing proportion of chitosan.

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1 QUITOSANO .....   | 1         |
| 1.1.1 <i>Características físico-químicas do quitosano</i> .....   | 2         |
| 1.1.2 <i>Modo de acção do quitosano</i> .....   | 3         |
| 1.1.3 <i>Produção de quitosano</i> .....  | 3         |
| 1.1.4 <i>Aplicação do quitosano</i> .....   | 4         |
| 1.2. MOTIVAÇÃO E OBJECTIVOS .....   | 5         |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>7</b>  |
| 2.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES .....   | 7         |
| 2.1.1 <i>Filmes produzidos a partir de quitosano</i> .....  | 8         |
| 2.1.2 <i>Filmes produzidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe</i> .....   | 10        |
| 2.1.3 <i>Filmes com dupla camada de quitosano e de gelatina de peixe</i> .....  | 11        |
| 2.2 ANÁLISE REOLÓGICA DAS SOLUÇÕES .....  | 12        |
| 2.3 DETERMINAÇÃO DA ESPESSURA DOS FILMES .....  | 13        |
| 2.4 APARÊNCIA E ALTERAÇÃO DA COR .....  | 14        |
| 2.5 PROPRIEDADES HIGROSCÓPICAS .....  | 15        |
| 2.5.1 <i>Isotermas de adsorção de água</i> .....  | 15        |
| 2.5.2 <i>Capacidade de absorção de água e Solubilidade</i> .....  | 16        |
| 2.6 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA .....   | 17        |
| 2.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS .....  | 19        |
| 2.7.1 <i>Teste de extensão</i> .....  | 19        |
| 2.7.2 <i>Teste de perfuração</i> .....  | 21        |
| 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA E AJUSTES .....   | 22        |
| <b>3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b> .....  | <b>23</b> |
| 3.1 FILMES OBTIDOS A PARTIR DE QUITOSANO .....  | 23        |
| 3.1.1 <i>Formulações à base de quitosano</i> .....  | 23        |
| 3.1.2 <i>Análise reológica das soluções</i> .....   | 23        |
| Testes oscilatórios .....   | 23        |
| Curvas de escoamento .....  | 28        |
| 3.1.3 <i>Aparência dos filmes obtidos</i> .....   | 33        |
| 3.1.4 <i>Alteração da cor</i> .....   | 34        |
| 3.1.5 <i>Propriedades higroscópicas</i> .....   | 36        |
| Isotermas de adsorção de água .....   | 36        |
| Solubilidade e Capacidade de absorção de água .....   | 38        |
| 3.1.6 <i>Permeabilidade ao vapor de água</i> .....  | 44        |
| 3.1.7 <i>Propriedades mecânicas</i> .....   | 46        |
| Teste de extensão .....   | 46        |
| Teste de perfuração .....   | 50        |
| 3.2 FILMES COM DUPLA CAMADA DE QUITOSANO E GELATINA E PEIXE E FILMES OBTIDOS A PARTIR DA MISTURA DE QUITOSANO E GELATINA DE PEIXE ..... | 52        |
| 3.2.1 <i>Formulações à base de quitosano e gelatina de peixe</i> .....  | 53        |
| 3.2.2 <i>Análise reológica das soluções para obtenção de filmes de mistura de quitosano e gelatina de peixe</i> .....                   | 53        |
| 3.2.3 <i>Aparência dos filmes obtidos</i> .....   | 58        |
| 3.2.4 <i>Alteração da cor</i> .....   | 60        |
| 3.2.5 <i>Propriedades higroscópicas</i> .....   | 60        |
| Solubilidade .....  | 60        |
| Capacidade de absorção de água .....  | 61        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.6 Permeabilidade ao vapor de água ..... | 62        |
| 3.2.7 Propriedades mecânicas .....          | 63        |
| Teste de Extensão.....                      | 63        |
| Teste de Perfuração .....                   | 64        |
| <b>4. CONCLUSÕES .....</b>                  | <b>66</b> |
| <b>5. TRABALHO FUTURO .....</b>             | <b>69</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>                | <b>70</b> |
| <b>7. ANEXOS.....</b>                       | <b>74</b> |

# 1. Introdução

Hoje em dia, o recurso a produtos minimamente processados, prontos a consumir, e preferencialmente isentos de conservantes, tem vindo a aumentar. Tal facto tem contribuído para o desenvolvimento de filmes com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Dutta *et al.*, 2009) e com a capacidade para controlar a permeabilidade à água, aos gases, aos aromas e transporte de solutos (Pranoto *et al.*, 2005).

As embalagens activas, com recurso a polímeros funcionais e adição de substâncias activas, permitem obter melhores propriedades e métodos mais efectivos de qualidade alimentar (Dutta *et al.*, 2009; Pranoto *et al.*, 2005).

Estes filmes são um dos meios mais promissores na destruição ou inibição de microrganismos patogénicos ou prejudiciais para os alimentos (Dutta *et al.*, 2009), bem como uma alternativa mais ecológica às embalagens de plástico comuns.

Um exemplo dum biopolímero, que permite a obtenção de revestimentos e embalagens activas biodegradáveis, é o quitosano.

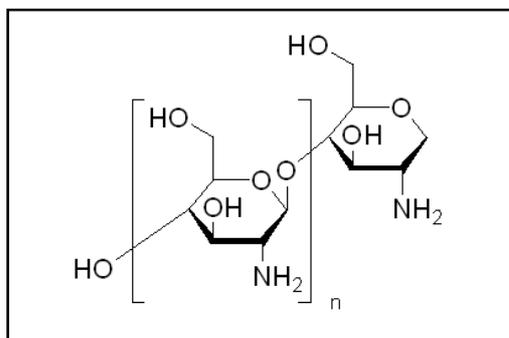
## 1.1 Quitosano

O quitosano, ou *poli(1,4)-2-amido-2-desoxi-β-D-glucose*, é um biopolímero linear, do tipo polissacárido, obtido a partir da deacetilação da quitina. A quitina é o segundo polissacárido mais abundante da natureza, e está naturalmente presente no exosqueleto de crustáceos, paredes celulares de fungos e outros materiais biológicos (Arvanitoyannis *et al.*, 1998; Kolodziedska *et al.*, 2006; McCloskey *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2004).

Tem-se verificado que o quitosano, para além de ser natural e biodegradável, não é tóxico, é biocompatível, biofuncional, renovável e obtido a baixo custo. Além disso, possui características antimicrobianas e antifúngicas (Arvanitoyannis *et al.*, 1998; Kittur *et al.*, 1998; Pranoto *et al.*, 2005). Tudo isto, juntamente com a sua carga positiva e capacidade para formar filmes, confere-lhe um elevado grau de importância (Arvanitoyannis *et al.*, 1998; Pranoto *et al.*, 2005). Essa importância vai também de encontro às questões ambientais e económicas, já que, por exemplo, as carapaças de crustáceos, que são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, e considerados muitas vezes poluentes, podem ser usados como fonte de quitosano, diminuindo o impacto ambiental causado pela acumulação destas carapaças (Azevedo *et al.*, 2007).

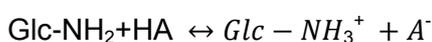
### 1.1.1 Características físico-químicas do quitosano

O quitosano, cuja fórmula geral é  $[C_6H_{11}O_4N]_n$  (Figura 1), é constituído por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e, em maior proporção, 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose unidas por ligações glucosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ .



**Figura 1** - Fórmula geral do quitosano

O quitosano é uma base fraca, insolúvel em água e solventes orgânicos, e apenas solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos ou inorgânicos ( $pH < 6$ ) (Azevedo *et al.*, 2007; Sinha *et al.*, 2004). Este facto, deve-se às propriedades hidrofílicas das unidades glucosaminas ( $Glc-NH_2$ ) que adquirem cargas positivas a  $pH$  abaixo de 6, e conduzem ao equilíbrio (Almeida, 2009; Dutta *et al.*, 2009):



As propriedades, quer das soluções, quer dos filmes de quitosano dependem muito das características da própria molécula, como o grau de acetilação e peso molecular, o tamanho das partículas, a viscosidade e a densidade. Mas além disso, também os restantes compostos da solução (tipo e concentração de ácido, presença de proteínas, lípidos, iões, etc) e as próprias condições ambientais (temperatura e humidade relativa), podem influenciar as soluções e os filmes obtidos a partir do quitosano (Begin & Van Calsteren, 1999; Kurita, 2001; Monteiro *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2004; Zheng & Zhu, 2003; Zivanovic, *et al.*, 2005). De acordo com No *et al.* (2002), soluções de quitosano de baixo grau de acetilação e um peso molecular de 28 a 1671 KDa demonstraram um forte poder antimicrobiano, principalmente contra bactérias Gram (+), embora o tipo de ácido usado condicione a força de tensão do filme (Begin & Van Calsteren, 1999; Zivanovic *et al.*, 2005). Quer a flexibilidade do filme, quer a espessura aumentam com o aumento do peso molecular do ácido usado como solvente, enquanto que, a resistência do filme aumenta com

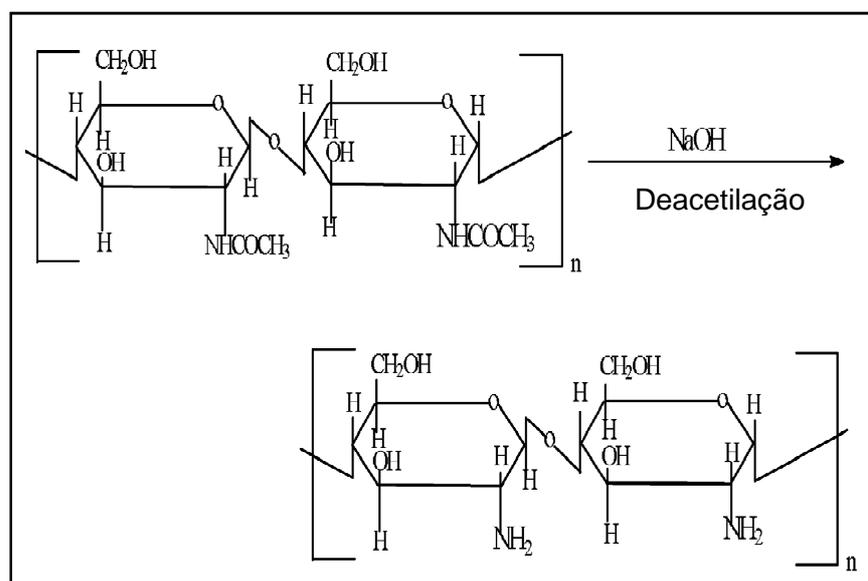
o aumento do peso molecular do quitosano (Begin & Van Calsteren, 1999; Zivanovic *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Modo de acção do quitosano

Uma das razões a que se deve o carácter antimicrobiano do quitosano é a existência de cargas positivas nos aminoácidos, capazes de interagir com as cargas negativas das membranas celulares dos microrganismos. Esta união altera o normal funcionamento da membrana, provocando a inibição da síntese de proteínas, o derrame de constituintes intracelulares e inibindo o transporte de nutrientes para o interior da célula (Duta *et al.*, 2008; Haloppa *et al.*, 2006; Pranoto *et al.*, 2005).

### 1.1.3. Produção de quitosano

O quitosano é obtido convencionalmente pela deacetilação da quitina (Figura 2), através do tratamento com soluções alcalinas entre 40 a 50% (maioritariamente hidróxido de sódio). Com a deacetilação da quitina por tratamento alcalino, é obtido, rapidamente, um grau de acetilação até 25-15% (Almeida, 2009).



**Figura 2** - Representação esquemática do processo de deacetilação da quitina para a produção de quitosano (Adaptado de Majeti *et al.*, 2000)

A Figura 2 representa esquematicamente a produção de quitosano como resultado da deacetilação da quitina em hidróxido de sódio durante 1 a 3 horas, a  $120^\circ\text{C}$  (Majeti *et al.*, 2000).

A deacetilação causa alterações nas propriedades químicas e físicas da quitina (Monteiro *et al.*, 1999). Como consequência disso, o polímero resultante obtém uma amina primária (-NH<sub>2</sub>) no carbono 2, que reage facilmente e permite a obtenção de muitos compostos derivados, confere melhor solubilidade e reactividade, e torna o quitosano num polieletrólito (Hirano, 1996; Monteiro *et al.*, 1999).

#### 1.1.4. Aplicação do quitosano

O quitosano, é um biopolímero bastante versátil, e que tem vindo a ser requisitado por várias áreas, quer da indústria alimentar, quer em agricultura, farmácia biomédica e cosmética, sob a forma de filmes, fibras, etc.

Na área alimentar têm sido realizados diversos estudos para explorar as capacidades do quitosano. Por isso tem-se verificado a sua utilidade como agente antimicrobiano (bactericida e fungicida), o seu papel importante na indústria de filmes alimentares para controlar a transferência de solutos, a libertação de substâncias antimicrobianas, antioxidantes e nutrientes, reduzir a pressão parcial de oxigénio, controlar a taxa de respiração e o escurecimento enzimático em frutos (Shaidi *et al.*, 1999). Contribui ainda para uma boa qualidade nutricional, visto que baixa os níveis de colesterol e diminui a absorção de lípidos, contribui para uma dieta rica em fibra, e pode ser incluído nos alimentos para bebés, e como aditivo na pecuária e aquacultura (Shaidi *et al.*, 1999). O quitosano é capaz de participar na recuperação de materiais sólidos dos efluentes resultantes do processamento de alimentos através, por exemplo, da sua afinidade para flocular devido à sua carga positiva. Tem ainda um papel importante na purificação da água uma vez que é capaz de recuperar metais, pesticidas, fenóis e compostos policlorados bifenilicos (PCB's), e remover corantes (Shaidi *et al.*, 1999). Pode ter ainda outras utilizações como na cromatografia e imobilização de enzimas (Shaidi *et al.*, 1999).

Num estudo recente, Zivanovic *et al.* (2005), constataram que a aplicação de filmes de quitosano em produtos cárneos reduz a contagem de microrganismos patogénicos. No mesmo estudo verificou-se que esta redução é ainda mais acentuada pelo uso de óleos essenciais, sendo por isso uma boa opção de uso em embalagens activas de prevenção e controlo de patogénicos em produtos alimentares (Zivanovic *et al.*, 2005).

Pranoto *et al.* (2005) verificaram que o quitosano tem um excelente potencial para ser misturado com outros agentes antimicrobianos, e aumentar o seu potencial bioactivo. O caso da incorporação de óleo de alho em filmes de quitosano, apesar de deixar um odor

desfavorável nos filmes, produz características desejáveis como o aumento na eficiência antimicrobiana, funcionando como uma barreira física e antimicrobiana à contaminação alimentar, e afectando moderadamente as características mecânicas e propriedades físicas (Pranoto *et al.*, 2005).

Kołodziejska & Piotrowska (2007) estudaram o efeito do reticulante transglutaminase em filmes de quitosano e de gelatina de peixe. Com este estudo foi reforçada a ideia da aptidão destes filmes para material de embalagem, visto que esta mistura permite diminuir a solubilidade dos filmes, mesmo em pH ácido e a altas temperaturas (Kołodziejska & Piotrowska, 2007). Também em estudos efectuados por Kittur *et al.* (1998), constatou-se que os filmes de quitosano apresentam uma permeabilidade moderada ao vapor de água, e uma baixa permeabilidade ao oxigénio, e apresentando, no que respeita às propriedades mecânicas, características idênticas aos plásticos comerciais (Kittur *et al.*, 1998).

Também a área farmacêutica e biomédica tem investido em estudos neste polímero. Sinha *et al.* (2004) realizaram um estudo que incidiu na investigação de microsferas de quitosano como potencial transportador de fármacos, e verificaram que este ajuda na dissolução dos mesmos e pode melhorar a sua biodisponibilidade (Sinha *et al.*, 2004).

Num estudo realizado por Cárdenas *et al.* (2008) foi demonstrado que os filmes de quitosano têm uma boa capacidade para controlar a maioria das bactérias hospitalares que normalmente infectam as queimaduras, e que, o próprio peso molecular do quitosano faz variar a actividade bacteriocida (Cárdenas *et al.*, 2008).

Foram ainda realizados outros estudos, no âmbito das aplicações biomédicas, e constatou-se que o quitosano pode ser usado como pele artificial, como anti-coagulante do sangue, anti-trombogénico e hemostático (Majeti *et al.*, 2000).

## **1.2. Motivação e objectivos**

Com o desenvolvimento da indústria alimentar e aumento de estudos para produzir novas opções de conservação dos alimentos, o quitosano e a sua capacidade para formar filmes tem vindo a ganhar importância. Com base nisto, o objectivo deste trabalho incide na produção de filmes a partir do quitosano e optimização dos mesmos com recurso a reticulante (etileno glicol diglicidil éter), plastificante (glicerol) e um agente antimicrobiano (nisina).

Pretende-se a produção de filmes bioactivos e resistentes, com uma menor solubilidade e capacidade para absorção de água, menor permeabilidade ao vapor de água, melhores

propriedades mecânicas e que a alteração de cor provocada pelos filmes seja mínima. Além disso, pretende-se que as soluções filmogénicas apresentem propriedades reológicas melhoradas. Para atingir este objectivo recorreu-se ao uso de reticulante, à adição de plastificante para obtenção de filmes flexíveis, e a incorporação de um agente antimicrobiano de modo a complementar as propriedades antimicrobianas intrínsecas do quitosano.

O reticulante (EX810) utilizado não é considerado aditivo alimentar. Apesar disso, tem sido utilizado na medicina em excertos de pele e outros procedimentos, o que levou a considerar a possibilidade da sua utilização em produtos alimentares.

Efectuou-se um desenho experimental onde varia a proporção de reticulante, de quitosano e de ácido acético, para poder estudar as características do filme e a influência dos seus constituintes nas características do filme e solução filmogénica.

As soluções que originaram cada um dos filmes obtidos foram reologicamente testadas para estudar as suas propriedades viscoelásticas e fluidificantes.

Após a obtenção dos filmes, estudaram-se também as propriedades higroscópicas (Isotermas de adsorção, solubilidade e capacidade de absorção de água), permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas (Extensão e perfuração) e a cor.

Na segunda parte deste trabalho, foram realizados filmes de mistura de quitosano e gelatina de peixe, e filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe, para perceber se as propriedades dos filmes são melhoradas com a adição de gelatina de peixe, e qual a proporção relativa destes polímeros que confere melhores propriedades. Além disso, comparou-se as propriedades entre os filmes com dupla camada e os de mistura de quitosano e gelatina de peixe.

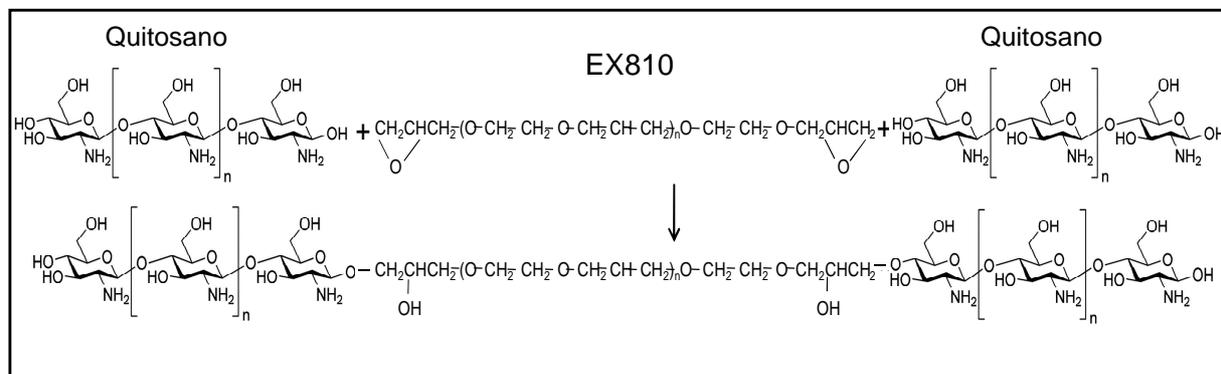
## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Preparação dos filmes

Preparam-se filmes de três maneiras distintas, tendo sempre como matriz principal o quitosano (massa molecular média 190-310 KDa, grau de deacetilação de 75-85%, Aldrich referência 448877). Para tal foram realizados filmes obtidos a partir de formulações de quitosano, filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe (Lapi Gelatine, gelatina proveniente de uma mistura de espécies de peixes de água quente, massa molecular média de 150 KDa) e filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe.

Os polímeros foram dissolvidos numa solução de ácido acético diluído. A utilização de um ácido é necessária para dissolver o quitosano, para além de que, ao baixar o pH, permite a actuação da nisina, agente antimicrobiano usado, que só actua a pH baixo. De acordo com um estudo efectuado por Pintado *et al.* (2009), usando concentrado de proteína de soro de leite, o ácido málico, relativamente ao ácido acético, demonstra melhores propriedades antimicrobianas, permite a obtenção de soluções com melhores propriedades reológicas e filmes com melhores propriedades mecânicas. Neste trabalho, em testes preliminares em que se usou o ácido málico como solvente do quitosano, foram obtidos filmes com manchas brancas, com deficiente integridade física, muito frágeis e demasiado extensíveis. Por esta razão, optou-se pelo uso do ácido acético.

Como reticulante foi usado o etileno glicol diglicidil eter (EX810 - massa molecular unitária de 526 Da, Aldrich referência 475696). Este polietileno glicol pode ser usado como agente reticulante uma vez que os seus grupos funcionais epoxi reagem com os grupos hidroxilo (OH) do quitosano (Figura 3), tornando-o insolúvel em meio ácido (Tomihata & IKkada, 1997) e obtendo filmes resistentes.



**Figura 3** – Representação de uma possível reacção de reticulação do quitosano com o EX810.

Em todas as soluções foi adicionado glicerol (20% da massa total do(s) polímero(s)). O glicerol é um plastificante que confere elasticidade ao filme, sendo capaz de interpor-se entre as cadeias dos polímeros e diminuir as forças que as mantêm coesas (Mohanty *et al.*, 2005).

Neste trabalho, as características antimicrobianas dos filmes produzidos, não foram estudadas. Apesar disso, optou-se pela adição de um agente antimicrobiano, a nisina, para perceber se existe influência deste composto nas propriedades do filme, caso em trabalhos futuros se pertenda fazer o estudo das características antimicrobianas destes filmes. A nisina (Nisaplin, Danisco, PD 202506-3.10 EN, Beaminster, UK) foi adicionada à solução filmogénica com uma concentração de 50 UI, por ml de solução filmogénica. A nisina é um péptido produzido pelo *Lactococcus lactis lactis*, que só actua em meio ácido, e que tem tido um importante papel na indústria alimentar, onde é usado como conservante natural para suprimir microrganismos em queijos, carne, cacau e vegetais (Belitz, 1987; Jung, 1991; Pranoto *et al.*, 2005). A vantagem do uso da nisina é que esta é completamente hidrolisada pelas proteases do tracto digestivo dos humanos, não constituindo perigo para as bactérias Gram negativas da flora intestinal. Estudos realizados por Pintado *et al.* (2009, 2010) indicam que a incorporação de 50 UI/ml de nisina em filmes obtidos a partir de isolados proteicos de soro e acidificados com ácidos orgânicos aumenta a zona de inibição antimicrobiana, indicando um efeito sinérgico entre o ácido e a nisina.

### 2.1.1 Filmes produzidos a partir de quitosano

O planeamento de experiências foi efectuado segundo um desenho experimental do tipo composto central rotativo. Neste estudo, as variáveis independentes correspondem à concentração de quitosano, concentração de ácido acético e razão molar de reticulante/polímero (Tabela 1). As variáveis dependentes das soluções filmogénicas correspondem ao valor do módulo conservativo e do módulo dissipativo obtido nos testes oscilatórios e ao valor da viscosidade no patamar newtoniano. As variáveis dependentes, dos filmes obtidos, dizem respeito ao valor da solubilidade, ao valor da capacidade de absorção de água, à permeabilidade ao vapor de água, ao valor da tensão de ruptura, do alongamento na ruptura e do módulo de Young obtido nos testes de extensão, e ao valor da tensão de perfuração, da deformação de ruptura e do alongamento na ruptura obtido nos testes de perfuração.

**Tabela 1** – Desenho experimental usado para a preparação de soluções de quitosano (A preto são os pontos factoriais, a azul os ponto centrais e a verde os pontos extremos)

| Solução | Concentração de quitosano (% p/p) | Concentração de ácido acético (% p/p) | Moles de EX810 / mole de quitosano |
|---------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| QEX1+N  | 1,00                              | 0,90                                  | 1,19                               |
| QEX2+N  | 2,00                              | 0,90                                  | 1,19                               |
| QEX3+N  | 1,00                              | 2,50                                  | 1,19                               |
| QEX4+N  | 2,00                              | 2,50                                  | 1,19                               |
| QEX5+N  | 1,00                              | 0,90                                  | 3,19                               |
| QEX6+N  | 2,00                              | 0,90                                  | 3,19                               |
| QEX7+N  | 1,00                              | 2,50                                  | 3,19                               |
| QEX8+N  | 2,00                              | 2,50                                  | 3,19                               |
| QEX9+N  | 1,50                              | 1,70                                  | 2,00                               |
| QEX10+N | 1,50                              | 1,70                                  | 2,00                               |
| QEX11+N | 1,50                              | 1,70                                  | 2,00                               |
| QEX12+N | 1,50                              | 1,70                                  | 2,00                               |
| QEX13+N | 0,66                              | 1,70                                  | 2,00                               |
| QEX14+N | 2,34                              | 1,70                                  | 2,00                               |
| QEX15+N | 1,50                              | 0,35                                  | 2,00                               |
| QEX16+N | 1,50                              | 3,05                                  | 2,00                               |
| QEX17+N | 1,50                              | 1,70                                  | 0,00                               |
| QEX18+N | 1,50                              | 1,70                                  | 4,00                               |

O desenho de experiência realizado (Tabela 1) permite comparar os/as diferentes soluções/filmes, perceber se existe influência de cada um dos factores (concentração de quitosano, concentração de ácido e razão molar reticulante/polímero) nas variáveis de resposta, e se as propriedades reológicas, mecânicas e de barreira ao vapor de água são melhoradas.

As soluções foram preparadas dissolvendo o quitosano na solução diluída de ácido acético e deixando-se a agitar toda a noite. Depois foi adicionado o reticulante (excepto na solução QEX17+N) e deixou-se a agitar durante duas horas para homogeneizar bem a mistura. Passado este tempo adicionou-se o glicerol e a nisina, deixou-se a agitar 30 minutos, e findo este tempo, a solução foi centrifugada a 12000 rpm durante 1 hora, para separar as partículas de quitosano insolúveis.

Para obtenção dos filmes, transferiu-se para caixas de acrílico (área aproximada de 750 cm<sup>2</sup>) uma determinada massa de solução para obter filmes com uma espessura entre 50 a 80µm. Foi efectuada a secagem numa estufa com humidade e temperatura controladas (Temperatura de 22°C e Humidade relativa de 50%) por cerca de 48 horas, havendo a formação de um filme.

### 2.1.2 Filmes produzidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe

Foram preparadas soluções de quitosano e gelatina de peixe, em que se fez variar a proporção de cada um destes polímeros na concentração de polímero total na solução (Tabela 2).

**Tabela 2** – Soluções de mistura de quitosano e gelatina de peixe.

| Solução           | Proporção de quitosano (massa de quitosano/massa de polímero total) (%) | Proporção de Gelatina de Peixe (massa de gelatina/ massa de polímero total) (%) |
|-------------------|---|---|
| <b>MGQ(75/25)</b> | 25  | 75  |
| <b>MQG(50/50)</b> | 50  | 50  |
| <b>MQG(75/25)</b> | 75  | 25  |

As soluções foram preparadas dissolvendo o quitosano na solução diluída de ácido acético (1,7%) e deixaram-se a agitar toda a noite. Depois foi adicionada massa de gelatina de peixe correspondente à solução preparada, e colocou-se a agitar durante uma hora a 70°C. Findo este tempo, acrescentou-se o reticulante EX810 (2 moles por mole de quitosano mais 2 moles por mole de gelatina de peixe), homogeneizou-se e por fim, foi adicionado o glicerol e a nisina. Depois de homogeneizada, a solução foi centrifugada a 12000 rpm durante uma hora, para separar as partículas de quitosano insolúveis.

Para obtenção dos filmes, transferiu-se para caixas de acrílico (área aproximada de 750 cm<sup>2</sup>) uma determinada massa de solução para obter filmes com uma espessura entre 50 a 80µm. Foi efectuada a secagem numa estufa com humidade e temperatura controladas (Temperatura de 22°C e Humidade relativa de 50%) por cerca de 48 horas, havendo a formação de um filme.

### 2.1.3 Filmes com dupla camada de quitosano e de gelatina de peixe

Para obter os filmes com dupla camada foram preparadas isoladamente soluções filmogénicas de quitosano (Ponto central do desenho experimental da Tabela 1) e soluções filmogénicas de gelatina de peixe (Tabela 3).

**Tabela 3** – Concentração de quitosano, de ácido acético e razão molar de EX810 das soluções de quitosano e soluções de gelatina de peixe usadas para a preparação dos filmes com dupla camada.

| Solução                             | Concentração de polímero (% da massa total) | Concentração de ácido acético (% da massa total) | Moles de EX810 / mole de quitosano |
|-------------------------------------|---|--|------------------------------------|
| <b>Solução de quitosano</b>         | 1,5   | 1,7  | 2                                  |
| <b>Solução de gelatina de peixe</b> | 5   | 1,7  | 2                                  |

Para a obtenção do filme com dupla camada, a formulação de quitosano foi colocada sobre o filme obtido previamente a partir da formulação de gelatina de peixe.

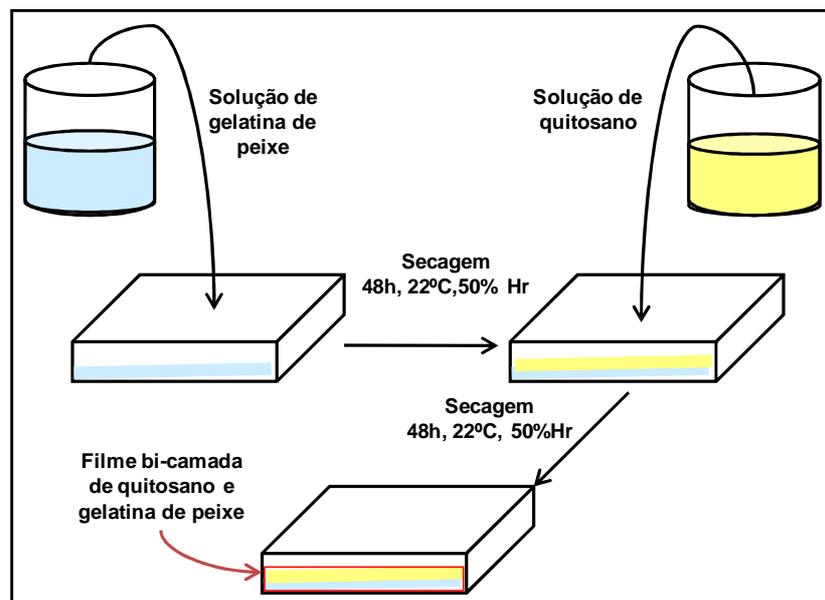
A Tabela 4 indica a percentagem que cada uma das camadas (camada de quitosano e camada de gelatina de peixe) representa na espessura do filme final obtido.

**Tabela 4** – Proporção da camada de filme de quitosano e da camada de filme de gelatina de peixe no filme com dupla camada obtido.

| Solução            | Proporção da camada de quitosano (% da espessura do filme total) | Proporção da camada de Gelatina de Peixe (% da espessura do filme total) |
|--------------------|--|--|
| <b>BLGQ(75/25)</b> | 25   | 75   |
| <b>BLGQ(50/50)</b> | 50   | 50   |
| <b>BLQG(75/25)</b> | 75   | 25   |

Dissolveu-se a gelatina de peixe em ácido acético (1,7%) e agitou-se a 70°C durante uma hora. Depois disto acrescentou-se o reticulante (2 moles de EX810 por 1 mole de gelatina de peixe), homogeneizou-se e adicionou-se o glicerol e a nisina. Para a obtenção da primeira camada de filme, transferiu-se para uma caixa de acrílico (área aproximada de 750 cm<sup>2</sup>) uma massa de solução determinada para que a proporção da camada obtida esteja de acordo com a Tabela 4. Foi efectuada a secagem numa estufa com humidade e temperatura controladas (Temperatura de 22°C e Humidade relativa de 50%) por cerca de 48 horas, havendo a formação de uma camada de filme (Figura 4).

Posteriormente, dissolveu-se o quitosano numa solução de ácido acético a 1,7% e deixou-se a agitar durante a noite. Depois adicionou-se o reticulante (2 moles de EX810 por 1 mole de quitosano), o glicerol e a nisina, e a solução final foi centrifugada a 12000 rpm durante uma hora. Para a obtenção da segunda camada de filme, transferiu-se para a caixa de acrílico, sobre a camada de filme de gelatina de peixe, uma massa de solução determinada para que a proporção da camada obtida esteja de acordo com a Tabela 4. Foi efectuada a secagem numa estufa com humidade e temperatura controladas (Temperatura de 22°C e Humidade relativa de 50%) por cerca de 48 horas, havendo a formação do filme com dupla camada (Figura 4).



**Figura 4** – Esquema de produção de filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe

## 2.2 Análise reológica das soluções

A cada uma das soluções filmogénicas, foram realizados testes para estudo das propriedades de viscosidade e viscoelasticidade das formulações de polímero, 24h após a adição de reticulante. Para tal, recorreu-se a um reómetro de tensão controlada (RheoStress RS75, HAAKE, Alemanha) com cone e prato (ângulo 2° e diâmetro 35mm).

Cada uma das amostras foi colocada em quantidade suficiente sobre o prato (cerca de 1 ml), e coberta com uma camada de parafina líquida para evitar a evaporação de água da amostra.

Foram realizados testes de varrimento de tensões entre 0,01 a 1000 Pa para uma frequência fixa de 1Hz, testes de varrimento de frequências entre 0,01 a 100 Hz com uma

tensão fixa de 1 Pa, e curvas de escoamento da solução variando a taxa de deformação entre 0,1 e 700 s<sup>-1</sup>.

A viscosidade no patamar newtoniano pode calcular-se a partir do ajuste das curvas de escoamento ao modelo de Cross. Uma vez que, nas curvas de escoamento realizadas a viscosidade do segundo patamar newtoniano não é atingida, assume-se que a viscosidade aparente e a viscosidade no patamar newtoniano são muito superiores à viscosidade do segundo patamar newtoniano. Assim sendo, esta pode desprezar-se, e utilizar uma simplificação do modelo de Cross (Equação (1)):

$$\eta a = \frac{\eta_0}{1+(\lambda \cdot \dot{\gamma})^m} \quad (1)$$

Em que:

$\eta a$  – Viscosidade aparente (Pa.s);

$\eta_0$  – Viscosidade no patamar newtoniano (Pa.s);

$\lambda$  – Constante de tempo (s);

$\dot{\gamma}$  – Velocidade de corte (s<sup>-1</sup>);

$m$  – Constante adimensional relacionada com o expoente da lei de potência ( $m = n - 1$ ).

Tal como as soluções de gelatina de peixe têm a capacidade para formar gel, também as soluções filmogénicas de mistura de quitosano e gelatina de peixe têm essa capacidade. Por isso, às soluções de mistura de quitosano e gelatina de peixe, foram realizados testes de varrimento de temperaturas, fixando a tensão (1 Pa) e a frequência (0,1 Hz), que permitiu obter a temperatura de gelificação e a temperatura de fusão. Um segundo teste de varrimento de temperaturas foi efectuado logo imediatamente a seguir ao primeiro, com a mesma amostra, para verificar se a solução é termicamente reversível.

### 2.3 Determinação da espessura dos filmes

Para determinação da espessura dos filmes recorreu-se a uma craveira electrónica (Mitutoyo Lda., Andover, Reino Unido), com a qual foram realizadas oito medições em locais distintos, em cada um dos filmes obtidos.

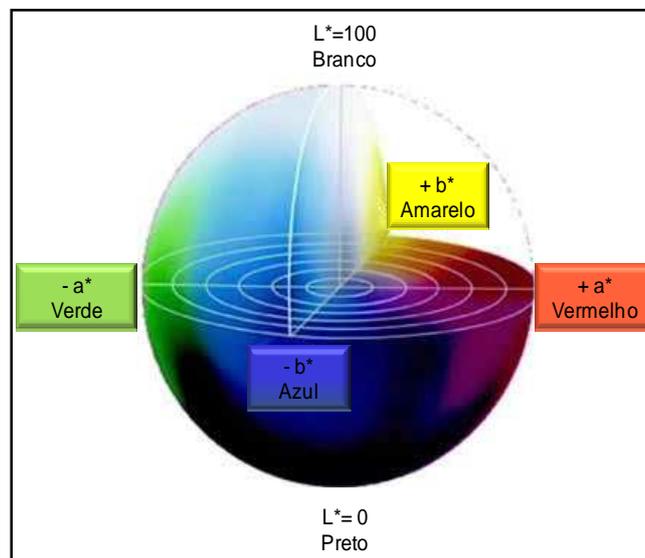
## 2.4 Aparência e alteração da cor

Para a medição da cor, utilizou-se um colorímetro (Minolta CTR-300, USA) que nos fornece parâmetros da cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ).

Foram feitas medições da cor de seis cartolinas (branco, preto, verde, vermelho, amarelo e azul), e de seguida mediu-se a cor dessas cartolinas cobertas com as amostras de filmes obtidos.

O modelo usado foi o CIELAB, que se apoia num modelo proposto pela *Commission Internationale de l'Eclairage* e cuja sua escala de cores baseia-se na teoria das cores opostas. Neste modelo, o  $L^*$  define a luminosidade que varia entre 0 (preto) e 100 (branco), e o  $a^*$  e o  $b^*$ , são componentes cromáticas que variam entre -60 e +60 e que indicam, respectivamente, o valor vermelho/verde e o valor amarelo/azul.

O modelo CIELAB permite especificar estímulos de cor num espaço tridimensional, e pode ser representado esquematicamente (Figura 5) num gráfico cujas coordenadas x, y e z são relativas ao  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ . Enquanto o  $L^*$  pode ser representado no eixo z, os componentes cromáticos do modelo podem ser representados nos eixos x e y, em que o x representa a variação entre verde/vermelho, o y a variação amarelo/azul, e o ponto central é a cor cinzento.



**Figura 5** - Representação esquemática do modelo CIELAB

Do modelo CIELAB podem obter-se outros dois parâmetros, o  $C^*$  e o  $h^0$ , em que o  $C^*$  é a saturação da cor, e o  $h^0$  é a matiz da cor (zona da cor no espaço). A saturação da cor é

dada pela distância euclidiana entre a cromaticidade da cor e o ponto cromático, e o  $h^\circ$  pelo ângulo entre a cor e a origem, a partir das equações:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2)$$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \quad (3)$$

A variação das cores,  $\Delta E$ , é dada pela diferença do  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  de duas cores (Equação (4)). Para valores de  $\Delta E$  baixos, nomeadamente inferior a 10, as diferenças entre as cores são pouco significativas

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (4)$$

Neste trabalho determinou-se a cor de cartolinas coloridos sobrepostas ou não com os filmes preparados. Calculou-se a diferença de cor entre estas duas situações.

## 2.5 Propriedades higroscópicas

### 2.5.1 Isotermas de adsorção de água

As isotermas de adsorção de água são determinadas pelo método gravimétrico a 22°C.

Neste ensaio foram testadas três réplicas de cada um dos filmes de quitosano obtidos. Preparou-se soluções saturadas dos sais Cloreto de lítio, Cloreto de magnésio hexa-hidratado, Nitrato de magnésio hexa-hidratado, Nitrito de sódio, Cloreto de sódio, Brometo de potássio, Cloreto de potássio, Cloreto de bário di-hidratado, Nitrato de potássio, e, com valores de actividade da água ( $a_w$ ) de 0.112, 0.332, 0.534, 0.643, 0.753, 0.809, 0.843, 0.901, 0.936, respectivamente (Lang & Steinberg, 1981).

As amostras de cada filme foram devidamente identificadas, secas numa estufa de vácuo a 40°C durante 48h e depois pesadas para determinar o seu peso seco. Depois deixaram-se a estabilizaram durante quatro semanas a 22°C em câmaras fechadas com as soluções salinas saturadas dos vários sais referidos, para garantir que é atingido o equilíbrio. Esgotado este período, as amostras foram novamente pesadas para determinar a massa de água adsorvida.

Para a obtenção das isotermas de adsorção representou-se a massa de água adsorvida no equilíbrio por massa de sólido seco em função da actividade da água a que os filmes estiveram expostos. Para ajuste das isotermas de adsorção dos filmes foi usado o modelo de GAB e o modelo de Oswin, cujo a equação é (Rodrigues, 2008) :

$$\text{GAB} \quad m_c = \frac{Ck m_m a_w}{[(1 - k a_w)(1 - k a_w C a_w)]} \quad (5)$$

$$\text{Oswin} \quad m_c = c \left( \frac{a_w}{(1 - a_w)} \right)^k \quad (6)$$

Onde:

$m_c$  – Massa de água por massa de sólido seco no equilíbrio;

$m_m$  – Valor da monocamada da humidade;

$a_w$  – Actividade da água;

$k$  – Constante de correcção que considera as propriedades das multicamadas do filme líquido;

$c$  – Constante de Guggenheim e corresponde à diferença de energia entre as moléculas de água ligadas à primeira camada de adsorção e as ligadas às camadas de adsorção seguintes.

## 2.5.2 Capacidade de absorção de água e Solubilidade

Para determinar a solubilidade e capacidade de absorção dos filmes, secaram-se três amostras de cada um dos filmes produzidos numa estufa de vácuo a 40°C durante 48h. Depois de pesadas, as amostras de cada um dos filmes, foram distribuídas por frascos com 14,5 mL de água e frascos com 14,5 mL de ácido acético (1,7%), e aos quais foi previamente adicionado 0,5 ml de solução de azida de sódio (1 ppm) para evitar o crescimento de fungos. As amostras ficaram nestas condições durante 4 dias. Esgotado este tempo recolheu-se cada uma das amostras dos frascos, retirou-se o excesso de água com papel absorvente e foram novamente pesadas para determinar a capacidade de absorção de água, em água e em ácido acético, de cada amostra de filme (7).

$$\text{Capacidade de absorção} = \frac{m_f - m_i}{m_i} \quad (7)$$

Onde:

$m_f$  = Massa do filme depois de estar mergulhado em água ou ácido (g)

$m_i$  = Massa do filme seco (g)

Cada uma das amostras foi colocada novamente a secar a 70°C, durante 24h. Depois deste tempo pesaram-se novamente para determinar a quantidade de filme que ficou na solução. Para obter a solubilidade recorreu-se à equação:

$$\text{Solubilidade} = \frac{m_i - m_{fs}}{m_i} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

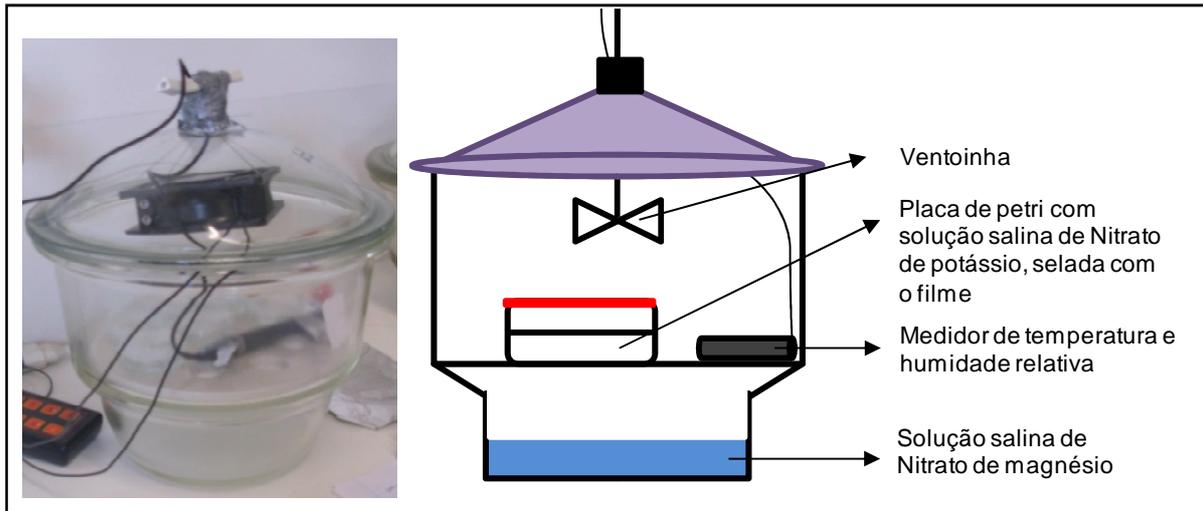
$m_i$  – Massa inicial do filme seco (g)

$m_{fs}$  – Massa do filme seco depois de ter estado mergulhado em água ou ácido (g)

## 2.6 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi medida gravimetricamente.

Cortaram-se três círculos com 50 mm de diâmetro, de cada um dos filmes obtidos. Estas amostras deixaram-se a estabilizar num exsiccador a temperatura e humidade controladas (Temperatura de 22°C e humidade relativa de 50%). Uma semana depois, os filmes foram selados com silicone numa caixa de petri com 5 cm de diâmetro, que já continha 9 mL de solução salina de nitrato de potássio ( $a_w=0,936$ ). As caixas foram então colocadas num exsiccador com uma solução salina de nitrato de magnésio hexa-hidratado ( $a_w= 0,534$ ), previamente equipado com uma ventoinha e um medidor de temperatura e de humidade relativa (Figura 6). A ventoinha promove a circulação do ar dentro do exsiccador minimizando a resistência à transferência de massa acima do filme produzida pela camada de ar (Alves *et al.*, 2010).



**Figura 6** - Montagem experimental utilizada para medir a permeabilidade ao vapor de água.

A permeabilidade ao vapor de água é calculada segundo a equação (Alves *et al*, 2010):

$$PVA = \frac{N_A \times \delta}{\Delta P} \quad (9)$$

Onde:

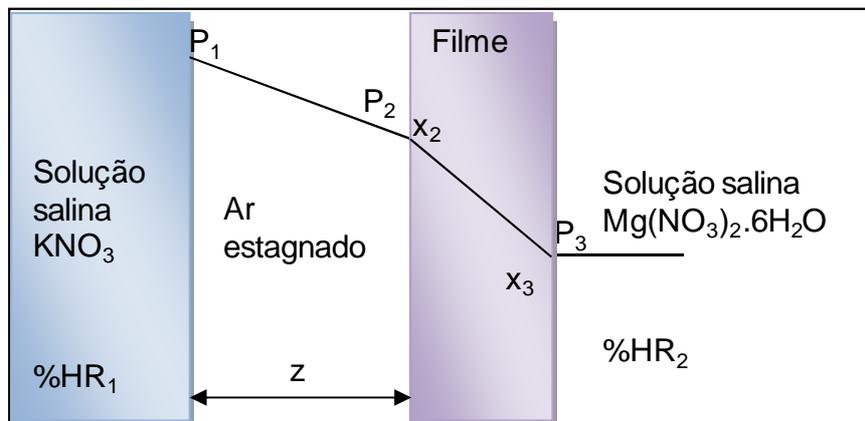
**PVA** – Permeabilidade ao vapor de água ( $\text{mol.m/m}^2.\text{s.Pa}$ );

**$N_A$**  – Fluxo molar de vapor de água ( $\text{mol/m}^2.\text{s}$ );

**$\delta$**  – Espessura do filme (m);

**$\Delta P$**  – Força motriz efectiva expressa como diferença de pressão em ambos os lados do filme (Pa) e  **$\Delta P = P_2 - P_3$** .

O transporte de vapor de água durante o ensaio está representado na Figura 7.



**Figura 7** – Representação esquemática do processo de transporte de vapor de água através do filme (adaptado de Alves *et al*, 2010).

Como o valor de  $P_2$  é desconhecido, é necessário o uso das equações (10) e (11) para a sua determinação. Neste caso tem-se em conta que, no estado estacionário, o fluxo de água medido é igual ao fluxo de água através do ar estagnado (Alves *et al.*, 2010).

$$N_A = \frac{P}{RTz} D_{A\text{-ar}} \ln \left( \frac{P-P_2}{P-P_1} \right) \quad (10)$$

Onde:

$P$  – Pressão atmosférica (Pa)

$R$  – Constante dos gases perfeitos ( $\text{m}^3 \cdot \text{Pa} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ );

$T$  – Temperatura (K);

$z$  – Distância entre o filme e a solução (m);

$D$  – Coeficiente de difusão de vapor de água em ar ( $\text{m}^2/\text{s}$ );

$P_i$  – Pressão parcial de vapor de água em contacto com a solução e o filme (Pa).

$$P_1 = a_{wi} \times P^* \quad (11)$$

Onde:

$a_{wi}$  - Actividade da água;

$P^*$  - Pressão de vapor de água quando pura (Pa).

A partir da humidade relativa média durante o ensaio, é possível obter a pressão parcial à superfície do filme ( $P_3$ ) através da equação:

$$P_3 = a_{w3} \cdot p^* = \% HR \cdot \frac{p^*}{100} \quad (12)$$

## 2.7 Propriedades mecânicas

### 2.7.1 Teste de extensão

Para este ensaio cortaram-se 15 réplicas de 20x70 mm de cada um dos filmes obtidos que foram estabilizadas num exsiccador a 50% de humidade relativa e 22°C, durante uma semana.

As amostras foram testadas num texturómetro com força máxima de 25 kg (TA-XT2 da *Stable Micro System*, UK). A amostra foi fixa pelas extremidades numa sonda de gancho de tracção e esticada até à sua ruptura, a uma velocidade constante de 0,5 mm/s (Figura 8).



**Figura 8** – Texturómetro a realizar um teste de extensão

Com este teste, obtém-se a força exercida em função da distância e do tempo, o que nos permite calcular a força na ruptura e a deformação na ruptura. Assim, é possível calcular a tensão de ruptura ( $\sigma$ ), o módulo de Young (E) e o alongamento na ruptura (%).

A tensão de ruptura é a força exercida sobre a área da secção recta do filme, no momento da quebra do filme (Equação (13)).

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (13)$$

Em que:

$\sigma$  – Tensão de ruptura ( $\text{N/m}^2$ )

F – Força de ruptura (N)

S – Área da secção recta do filme ( $\text{m}^2$ )

O alongamento na ruptura é um indicador da flexibilidade e elasticidade do filme, e é expresso como a percentagem de variação do comprimento da amostra em relação ao comprimento inicial. É determinado pelo alongamento no momento em que há quebra do filme, em função do seu comprimento inicial (Equação (14)).

$$\varepsilon = \frac{l_f - l_i}{l_i} \times 100 \quad (14)$$

Em que:

$\varepsilon$  – Alongamento na ruptura (%)

$l_f$  – Alongamento final (mm)

$l_i$  – Alongamento inicial (mm)

O módulo de Young indica-nos a resistência do filme à deformação, e é obtido através da Equação (15)

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (15)$$

Em que:

$E$  – Módulo de Young (N/m<sup>2</sup>)

$\sigma$  – Tensão de ruptura (N/m<sup>2</sup>)

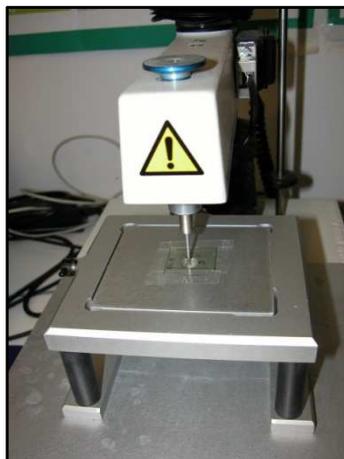
$\varepsilon$  – Deformação (-)

Neste estudo, o valor do módulo de Young foi obtido a partir das curvas de tensão de ruptura em função da deformação (Anexo IIII).

### 2.7.2 Teste de perfuração

Para os testes de perfuração foram usadas 5 réplicas de 30x30 mm de cada um dos filmes obtidos, e estabilizadas da mesma forma que as amostras do teste de extensão.

Neste ensaio utilizou-se um texturómetro de força inferior ao referido anteriormente (TA XT Plus Texture analyser, força máxima de 5 kg) onde foi montada uma plataforma com um orifício (diâmetro de 10 mm), e uma sonda de inox com 2 mm de diâmetro (Figura 9). A amostra de filme foi fixa na plataforma sobre o orifício, e pressionada na zona central pela sonda, a uma velocidade constante de 0,5 mm/s, até perfurar.



**Figura 9** – Texturómetro a realizar um teste de perfuração

A partir deste teste obtém-se a força exercida para perfurar o filme, em função da distância percorrida e do tempo. Pela leitura dos gráficos é possível obter a força de perfuração, e a partir desta, a tensão de perfuração pela equação:

$$\sigma_p = \frac{F_p}{S} \quad (16)$$

Em que:

$\sigma_p$  – Tensão de perfuração (N/m<sup>2</sup>)

$F_p$  – Força de perfuração (N)

$S$  – Área da secção recta da sonda (m<sup>2</sup>)

A partir deste teste também é possível obter a deformação que é calculada a partir da Equação (16) (Anexo IIII).

$$\varepsilon = \frac{L-l_i}{l_i} \times 100 \quad (17)$$

Em que:

$\varepsilon$  – Deformação (%)

$L$  – Alongamento na perfuração (mm)

$l_i$  – Distância inicial (mm)

## 2.8 Análise estatística e ajustes

O tratamento estatístico foi efectuado com recurso ao programa *Statsoft Statistica* v7.0.61.0 EN, por comparação das 18 amostras de filmes de quitosano.

Os ajustes foram realizados utilizando o *software Scientist*.

### 3. Apresentação e discussão de resultados

#### 3.1 Filmes obtidos a partir de quitosano

##### 3.1.1 Formulações à base de quitosano

As soluções filmogénicas de quitosano obtidas tinham uma cor amarelada, e consistiam num líquido tanto mais viscoso e mais amarelado quanto maior a concentração de quitosano na solução. O pH das formulações de quitosano foi de  $3,91 \pm 0,53$  (Anexo I).

##### 3.1.2 Análise reológica das soluções

###### Testes oscilatórios

Para a análise reológica das soluções filmogénicas, o primeiro passo, foi fazer um varrimento de tensão para verificar qual a zona de viscoelasticidade linear. Para tal, realizou-se o teste com uma frequência constante de 1 Hz, o qual nos permitiu obter uma representação gráfica do módulo conservativo ou módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo dissipativo ou módulo viscoso ( $G''$ ).

As curvas obtidas para as soluções de quitosano estão representadas na Figura 10. Para quaisquer amostras de filme de quitosano, a solução que lhe deu origem revelou curvas idênticas.

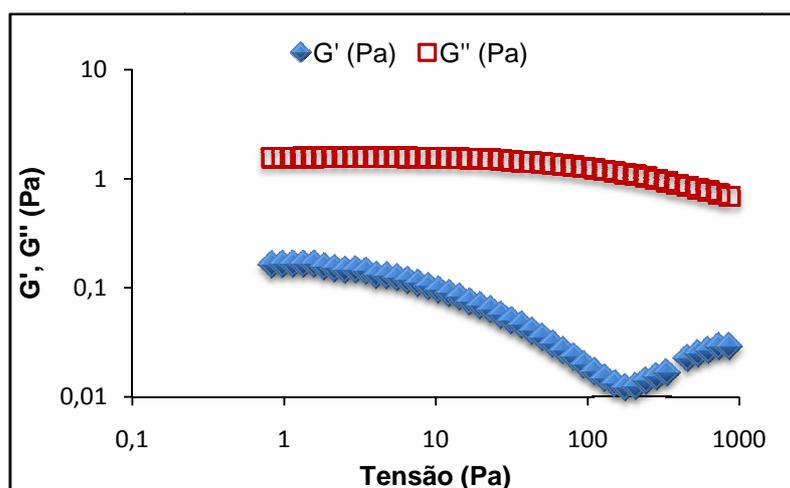
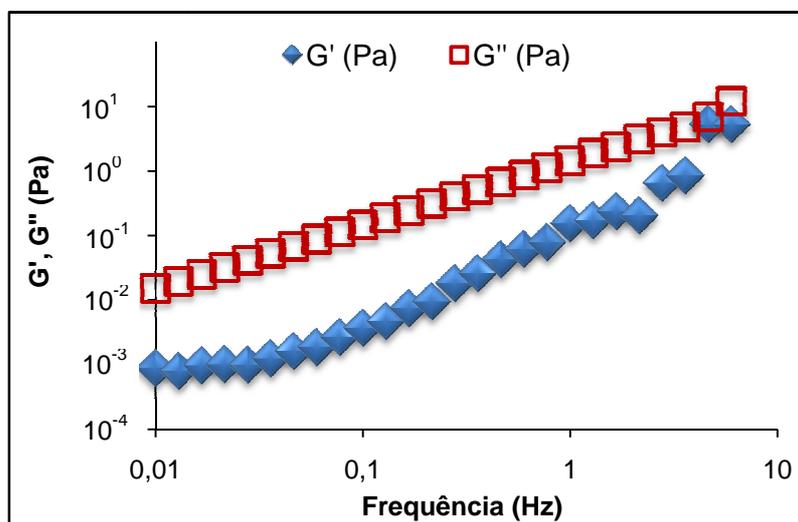


Figura 10 – Ensaio de varrimento de tensão da solução QEX10+N.

O  $G'$  (módulo conservativo) é constante desde 0,84 Pa até uma tensão de 1,57 Pa, enquanto que, o  $G''$  (módulo dissipativo) é constante até uma tensão de 14,24 Pa. Assim sendo, e de modo a garantir que todos os ensaios são realizados numa zona viscoelasticidade linear, optou-se por uma tensão de 1 Pa na realização dos testes oscilatórios.

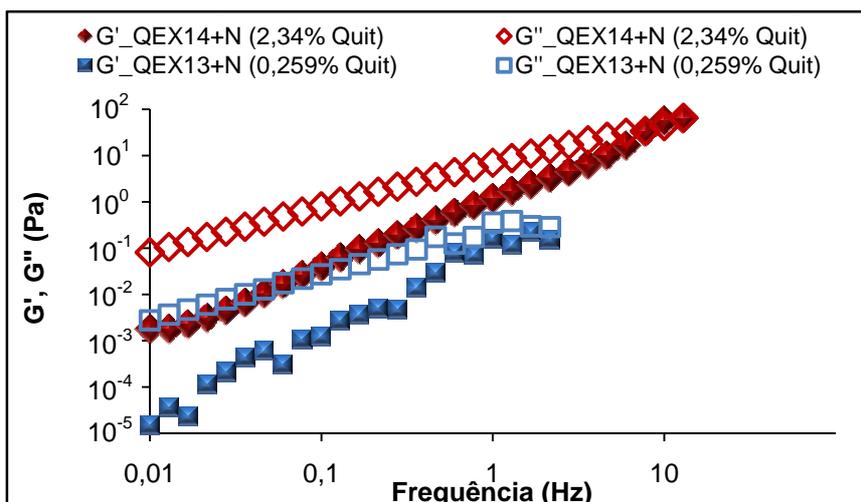
Também nos ensaios de varrimento de frequência, todas as soluções que deram origem aos filmes de quitosano (indicadas na Tabela 1), revelaram curvas semelhantes, cujo valor do módulo conservativo e do módulo dissipativo aumenta com o aumento da frequência. A curva de todas as soluções também revelou valores de  $G''$ , a baixas frequências, superiores aos de  $G'$ . Isto significa que a natureza viscosa do fluido prevalece sobre a natureza elástica. A Figura 11 representa a curva resultante do ensaio de varrimento de frequências, e que corresponde a um ponto central do desenho experimental (Tabela 1).



**Figura 11** - Ensaio de varrimento de frequência da solução QEX11+N.

Na Figura 9 pode verificar-se que os valores do módulo  $G''$  são superiores aos do módulo  $G'$ , e para frequências superiores (7 Hz), os módulos cruzam-se. Este é o comportamento típico de soluções de macromoléculas, em que não ocorreu nenhum processo de estruturação forte (como gelificação). Deste modo, pode concluir-se que o agente reticulante não deverá ter ainda actuado.

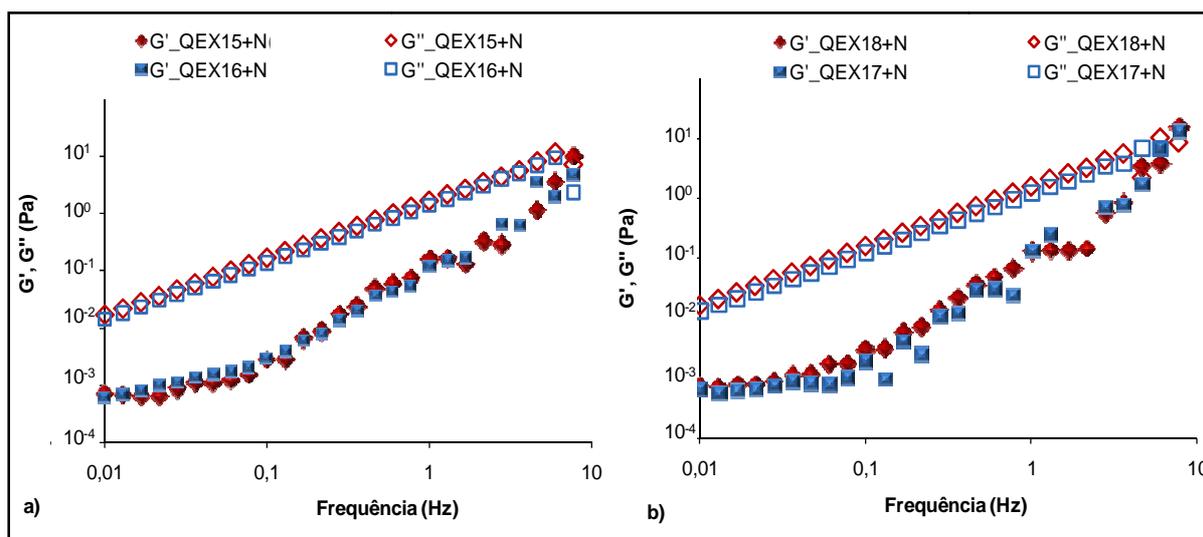
A Figura 12 representa as curvas resultantes do ensaio de varrimento de frequência das soluções com maior e com menor concentração de quitosano (QEX14+N e QEX13+N, respectivamente). É visível que os módulos ( $G'$  e  $G''$ ) são maiores quanto maior é a concentração de polímero.



**Figura 12** - Ensaio de frequência da amostra QEX14+N (máxima concentração de polímero) e da amostra QEX13+N (mínima concentração de polímero).

No teste de varrimento de frequências da solução com maior concentração de polímero (QEX14+N) nota-se uma aproximação consistente dos módulos  $G'$  e  $G''$ , a uma frequência de 10 Hz. Já na solução com menor concentração (QEX13+N), a partir de 0,77 Hz, os módulos evoluem a uma distância muito próxima, embora nunca se cheguem efectivamente a cruzar.

A Figura 13 representa as curvas resultantes do ensaio oscilatório realizado às soluções com maior e com menor concentração de ácido acético (Figura 13 **a**), e às soluções com maior e com menor razão molar de reticulante/polímero (Figura 13 **b**).



**Figura 13** – Teste oscilatório: **a)** da solução QEX16+N e da solução QEX15+N; **b)** da solução QEX17+N e da solução QEX18+N.

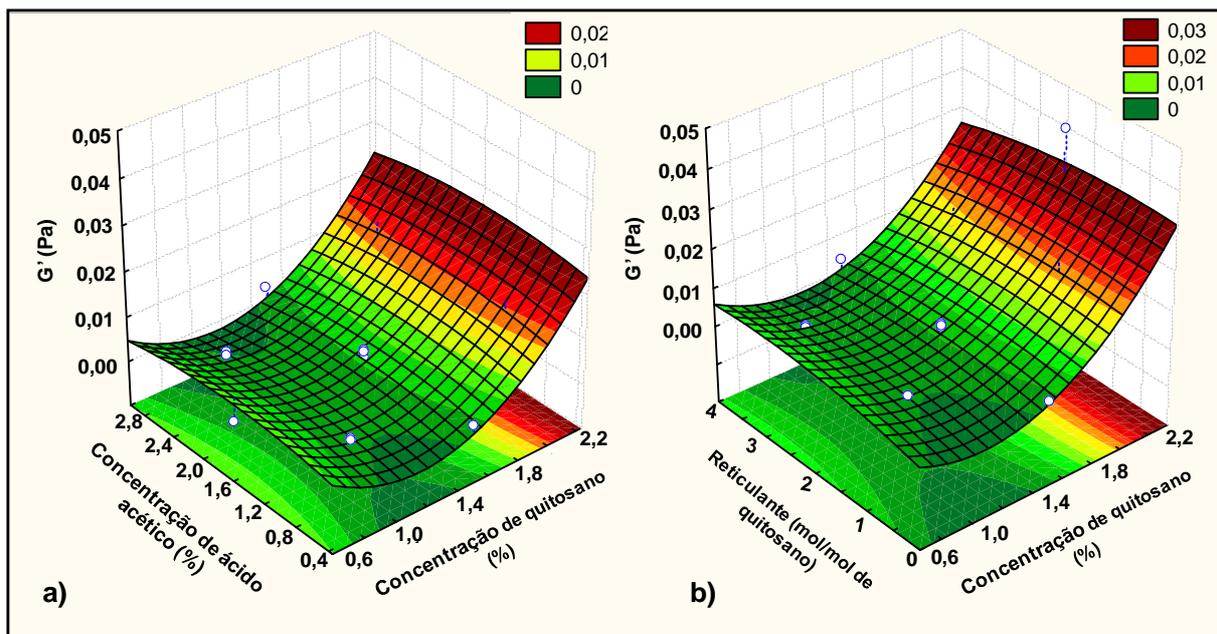
Na Figura 13 verifica-se que, tanto as formulações com concentrações extremas de ácido (Figura 13 **a**) como as formulações com razões molares extremas de reticulante (Figura 13 **b**), apresentam curvas dos módulos  $G'$  e  $G''$  praticamente sobrepostas, e cujo cruzamento dos módulos ocorre à mesma frequência, 8 Hz. As propriedades viscoelásticas da solução filmogénica não são à partida afectadas para estes dois parâmetros.

A análise estatística realizada (Tabela 5), vem confirmar que, a 0,1 Hz, a concentração de polímero (contribuição linear e contribuição quadrática) afecta significativamente o valor do módulo  $G'$ .

**Tabela 5** - Tabela ANOVA com o *p-value* relativo à influência de cada um dos factores no valor de  $G'$  e a 0,1 Hz e equações que melhor traduzem as superfícies de resposta (CP – Concentração de polímero, AA – Concentração de ácido acético, R – Razão molar do reticulante).

| Factor          | <i>p-value</i>  |
|-----------------|---|
| (1) CP (L)      | <b>0,0006</b>   |
| CP (Q)          | <b>0,0071</b>   |
| (2) AA (L)      | 0,8673  |
| AA (Q)          | 0,5736  |
| (3) R (L)       | 0,7801  |
| R (Q)           | 0,5942  |
| 1L by 1L        | 0,6639  |
| 2L by 3L        | 0,7054  |
| R-sqr           | 0,8610  |
| R-Adj           | 0,7220  |
| <b>Equações</b> | $G' = 0,016 - 0,046CP + 0,021CP^2 - 0,001*2,089CP - 0,01$ |
|                 | $G' = 0,016 - 0,046CP + 0,021CP^2 - 0,0067$               |

Na Figura 14, e conforme já foi referido na análise à tabela 5, o valor do módulo  $G'$  a uma frequência de 0,1 Hz, é afectado significativamente pela concentração de quitosano na solução.



**Figura 14** – Gráfico de superfície do módulo  $G'$ : **a)** em função da concentração de quitosano e da concentração de ácido acético; **b)** em função da concentração de quitosano e da razão molar de reticulante/polímero

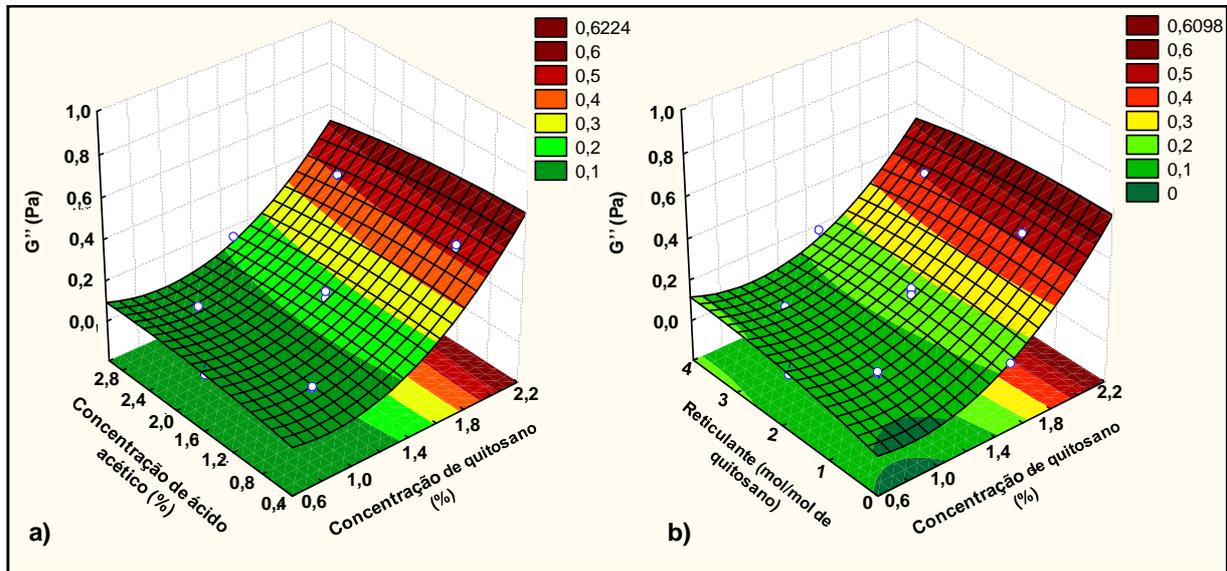
Pela análise da Figura 14, conclui-se que existe um aumento significativo do módulo conservativo com o aumento da concentração de quitosano na solução. Tal como se conclui a partir dos valores de *p-value*, tanto a concentração de ácido acético como a razão molar de reticulante/polímero na solução não revelam efeito significativo nos valores do módulo  $G'$ .

Na Tabela 6, verifica-se que, a 0,1 Hz, a concentração de polímero (contribuição linear e contribuição quadrática) afecta significativamente o valor do módulo  $G''$ .

**Tabela 6** - Tabela ANOVA com o *p-value* relativo à influência de cada um dos factores no valor de  $G''$  a 0,1 Hz e equações que melhor traduzem as superfícies de resposta (CP – Concentração de polímero, AA – Concentração de ácido acético, R – Razão molar do reticulante).

| Factor          | <i>p-value</i>                                    |
|-----------------|---|
| (1) CP (L)      | 0,000001  |
| CP (Q)          | 0,000500  |
| (2) AA (L)      | 0,435876  |
| AA (Q)          | 0,586922  |
| (3) R (L)       | 0,872443  |
| R (Q)           | 0,492467  |
| 1L by 1L        | 0,388062  |
| 1L by 2L        | 0,364272  |
| R-sqr           | 0,970   |
| R-Adj           | 0,939   |
| <b>Equações</b> | $G''=0,084-0,474CP+0,33CP^2-0,033*2,089CP+0,135$  |
|                 | $G''=0,084-0,474CP+0,323CP^2-0,039*1,697CP-0,115$ |

Na Figura 15 pode observar-se a evolução do módulo  $G''$  com a concentração de quitosano, ácido acético e razão molar de reticulante/polímero.

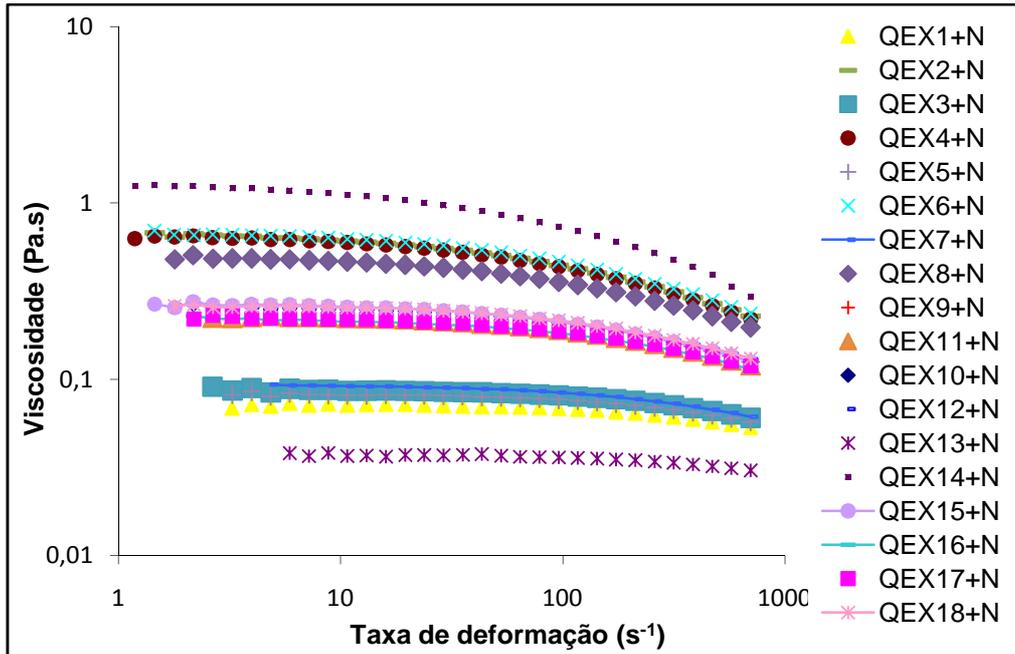


**Figura 15** – Gráfico de superfície do módulo  $G''$ : **a)** em função da concentração de quitosano e concentração de ácido acético: **b)** em função da concentração de quitosano e razão de reticulante.

Na Figura 15 pode observar-se que existe um aumento do valor do módulo  $G''$  com o aumento da concentração de quitosano na solução. Os valores de  $G''$  também não são significativamente afectados nem pela concentração de ácido acético, nem pela quantidade de reticulante na solução.

### Curvas de escoamento

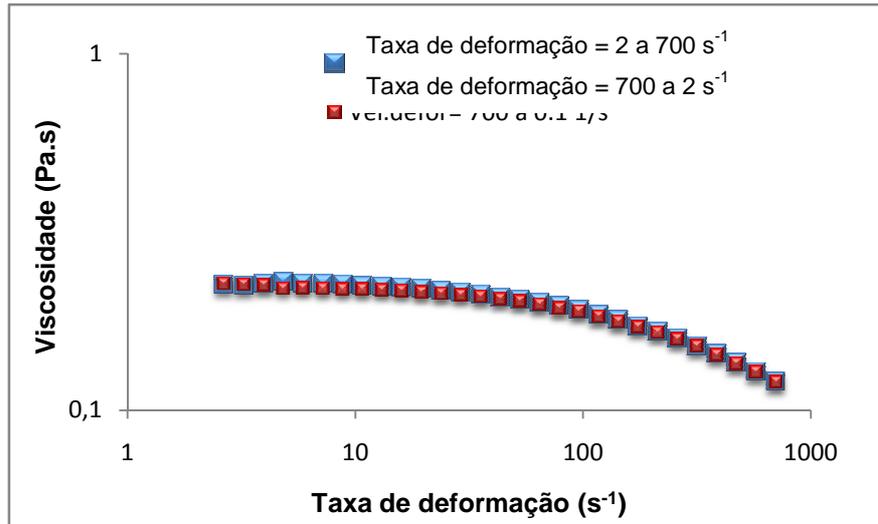
Na Figura 16 pode observar-se as curvas de escoamento de todas as formulações de quitosano apresentadas na Tabela 1.



**Figura 16** - Curvas de escoamento de todas as soluções de quitosano

Fazendo uma análise à Figura 16, verificam-se dois comportamentos distintos. A curva com valores de viscosidade mais baixos (corresponde à formulação QEX13+N) apresenta um comportamento praticamente Newtoniano. Depois à medida que vai aumentando a viscosidade, também aumenta o efeito reofluidificante nas curvas de escoamento. Também se pode observar através desta análise que, quanto maior a concentração de quitosano na solução, maior a viscosidade e maior o efeito reofluidificante. Isto indica que, a estrutura interna do fluido é mais resistente ao escoamento, e portanto é necessária uma maior energia de deformação para alterar a sua estrutura, quanto maior for a concentração de quitosano na solução.

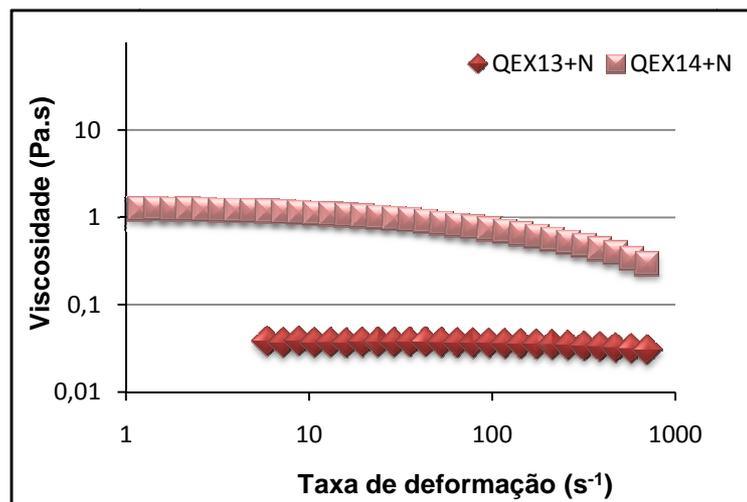
A Figura 17 representa as curvas de escoamento realizadas a um ponto central do desenho de experiências da tabela 1, em que a mesma amostra foi submetida a valores crescentes de taxas de deformação, e de seguida, a valores decrescentes de taxas de deformação.



**Figura 17** - Curvas de escoamento da solução QEX11+N.

Ao observar a Figura 17, verifica-se a sobreposição das curvas de escoamento. O facto de existir esta sobreposição das curvas (Taxa de deformação = 2 a 700 s<sup>-1</sup> e Taxa de deformação = 700 a 2 s<sup>-1</sup>) indica que, a viscosidade da solução é recuperada, mesmo tendo sido submetida a valores elevados de taxa de deformação. Na Figura 17 também é possível observar que a viscosidade diminui com a taxa de deformação, por isso, pode dizer-se que se trata de um fluido reofluidificante.

A Figura 18 permite comparar isoladamente as curvas de escoamento da solução com maior concentração de quitosano (QEX14+N) e com menor concentração (QEX13+N).



**Figura 18** - Curva de escoamento da solução QEX14+N (maior concentração de quitosano) e QEX13+N (menor concentração de quitosano).

Na Figura 18 verifica-se que a curva obtida a partir da solução QEX13+N é praticamente linear ao longo das taxas de deformação a que a solução foi submetida, apenas para taxas de deformação próximas de  $700 \text{ s}^{-1}$ , a viscosidade diminui ligeiramente. Já a solução QEX14+N produz uma curva de escoamento que revela nitidamente um comportamento reofluidificante, e cujos valores de viscosidade diminuem visivelmente com o aumento da taxa de deformação.

A partir do ajuste das curvas de escoamento, ao modelo de Cross (Equação (1)), pôde calcular-se a viscosidade no patamar newtoniano ( $\eta_0$ ) e os restantes parâmetros (Tabela 7). O  $\eta_0$  é uma estimativa da viscosidade da solução filmogénica no início da secagem.

**Tabela 7** – Parâmetros da viscosidade das soluções de quitosano

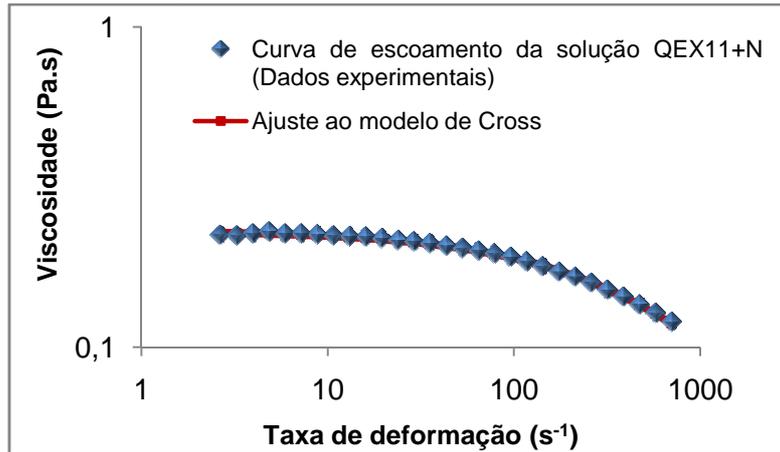
| Solução | $\eta_0$ (Pa.s)                 | $\lambda$ (s) | m         | R        |         |
|---------|---------------------------------|---------------|-----------|----------|---------|
| QEX1+N  | 1% Quit / 0,9% AA / 1,19 EX810  | 0,072*        | 0,0005*** | 0,978*** | 0,9998  |
| QEX2+N  | 2% Quit / 0,9% AA / 1,19 EX810  | 0,690**       | 0,0042**  | 0,658**  | 0,9999  |
| QEX3+N  | 1% Quit / 2,5% AA / 1,19 EX810  | 0,088**       | 0,0006*** | 0,827*** | 0,9999  |
| QEX4+N  | 2% Quit / 2,5% AA / 1,19 EX810  | 0,666*        | 0,0040**  | 0,682**  | 0,9999  |
| QEX5+N  | 1% Quit / 0,9% AA / 3,19 EX810  | 0,083*        | 0,0006*** | 0,854*** | 0,9999  |
| QEX6+N  | 2% Quit / 0,9% AA / 3,19 EX810  | 0,693*        | 0,0037**  | 0,697**  | 0,9999  |
| QEX7+N  | 1% Quit / 2,5% AA / 3,19 EX810  | 0,094*        | 0,0006**  | 0,781**  | 0,99999 |
| QEX8+N  | 2% Quit / 2,5% AA / 3,19 EX810  | 0,507**       | 0,0028**  | 0,684**  | 0,9999  |
| QEX9+N  | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,257*        | 0,0014**  | 0,756**  | 0,9999  |
| QEX10+N | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,263*        | 0,0016**  | 0,740**  | 0,9999  |
| QEX11+N | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,231*        | 0,0013**  | 0,757**  | 0,9999  |
| QEX12+N | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,263**       | 0,0015**  | 0,727**  | 0,9998  |
| QEX13+N | 0,659% Quit / 1,7% AA / 2 EX810 | 0,038**       | 0,0003*** | 0,900*** | 0,9999  |
| QEX14+N | 2,34% Quit / 1,7% AA / 2 EX810  | 1,305*        | 0,0072**  | 0,701**  | 0,9999  |
| QEX15+N | 1,5% Quit / 0,35% AA / 2 EX810  | 0,267*        | 0,0015**  | 0,765**  | 0,9999  |
| QEX16+N | 1,5% Quit / 3% AA / 2 EX810     | 0,225*        | 0,0013**  | 0,710**  | 0,9999  |
| QEX17+N | 1,5% Quit / 1,7% AA             | 0,229*        | 0,0013**  | 0,734**  | 0,9999  |
| QEX18+N | 1,5% Quit / 1,7% AA / 4 EX810   | 0,271**       | 0,0018**  | 0,737**  | 0,9998  |

\* Erro associado de 0,32 a 0,93%

\*\* Erro associado de 1,0 a 6,4%

\*\*\* Erro associado de 10,4 a 33,4%

A Figura 19 apresenta a curva de escoamento referente à solução QEX11+N (ponto central do desenho experimental da Tabela 1) ajustada ao modelo de Cross.



**Figura 19** - Representação gráfica do ajuste do Modelo de Cross aos dados experimentais da solução QEX11+N.

É possível concluir, a partir da Figura 19, que o modelo de Cross descreve muito bem os resultados experimentais.

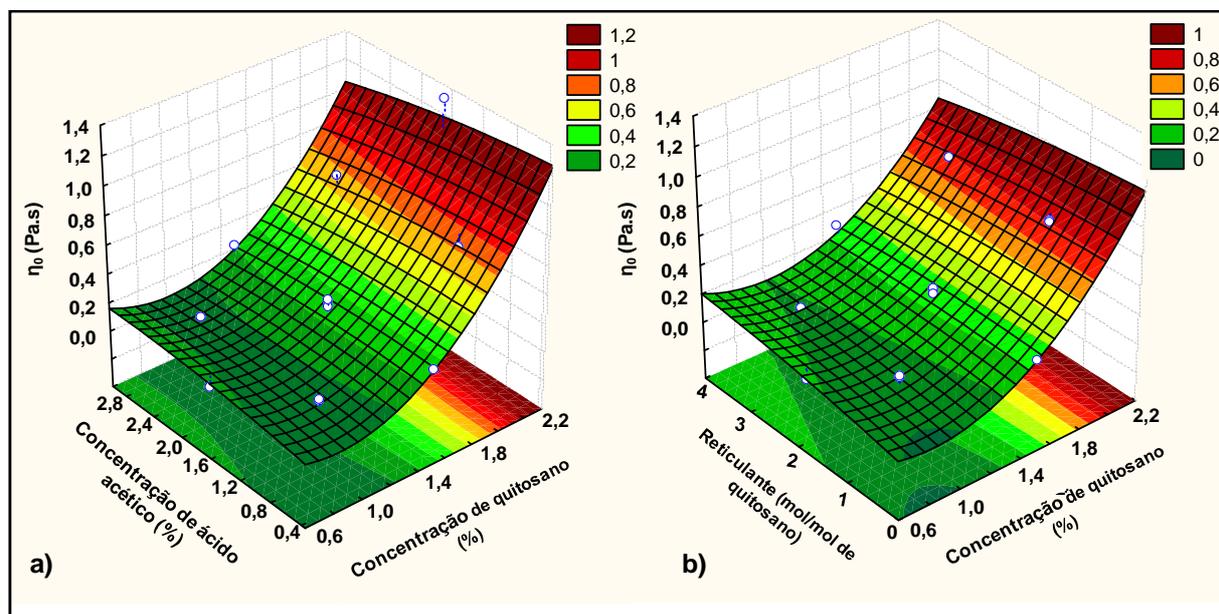
A Tabela 8 indica-nos os *p-values* obtidos com a análise estatística realizada ao efeito da concentração de polímero, de ácido acético e razão molar de reticulante/polímero no valor da viscosidade no patamar newtoniano ( $\eta_0$ ).

**Tabela 8** - Tabela ANOVA com o *p-value* relativo à influência de cada factor no valor da viscosidade no patamar newtoniano e equações que melhor traduzem as superfícies de resposta (CP – Concentração de polímero, AA – Concentração de ácido acético, R – Razão molar do reticulante).

| Factor          | <i>p-value</i>  |
|-----------------|---|
| (1) CP (L)      | <b>0,000000</b>                                       |
| CP (Q)          | <b>0,000132</b>                                       |
| (2) AA (L)      | 0,324753  |
| AA (Q)          | 0,596849  |
| (3) R (L)       | 0,750396  |
| R (Q)           | 0,686078  |
| 1L by 1L        | 0,276886  |
| 1L by 2L        | 0,282762  |
| 2L by 3L        | 0,417247  |
| R-sqr           | 0,98627   |
| R-Adj           | 0,94958   |
| <b>Equações</b> | $\eta_0=0,0601-0,793CP+0,559CP^2+0,058*2,084CP-0,294$ |
|                 | $\eta_0=0,06-0,793CP+0,559CP^2-0,074*1,697CP-0,296$   |

A tabela 7 apoia o que já anteriormente foi verificado pela análise da Figura 18, ou seja, a concentração de quitosano afecta significativamente a viscosidade da solução obtida (contribuição linear e contribuição quadrática).

Os gráficos da Figura 20 representam a evolução da viscosidade no patamar newtoniano ( $\eta_0$ ), com a concentração de quitosano, de ácido acético e de reticulante.

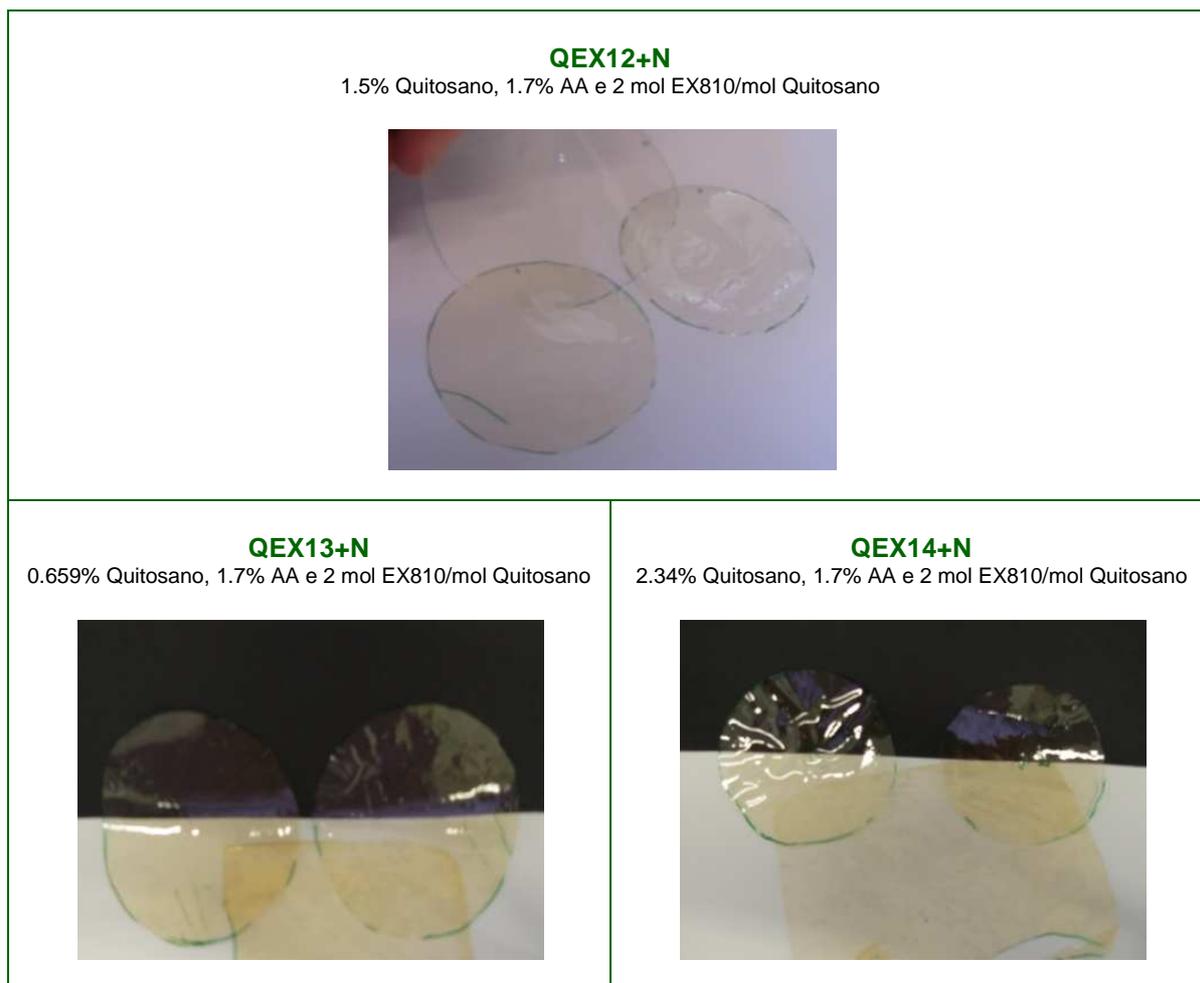


**Figura 20** – Gráfico de superfície relativo à viscosidade no patamar newtoniano ( $\eta_0$ ): **a)** em função da concentração de polímero e da concentração de ácido acético; **b)** em função da concentração de polímero e da razão de reticulante.

Em ambos os gráficos da Figura 20, verifica-se um aumento da viscosidade no patamar newtoniano com o aumento da concentração de quitosano na solução. A concentração de ácido acético e a razão molar de reticulante/polímero não apresentam efeito significativo nos valores de  $\eta_0$ .

### 3.1.3 Aparência dos filmes obtidos.

Todos os filmes de quitosano obtidos apresentavam uma aparência idêntica: filmes transparentes e apenas com uma cor pálida amarelada. Na Figura 21 são apresentados alguns exemplos dos filmes obtidos.



**Figura 21** - Aparência dos filmes de quitosano

### 3.1.4 Alteração da cor

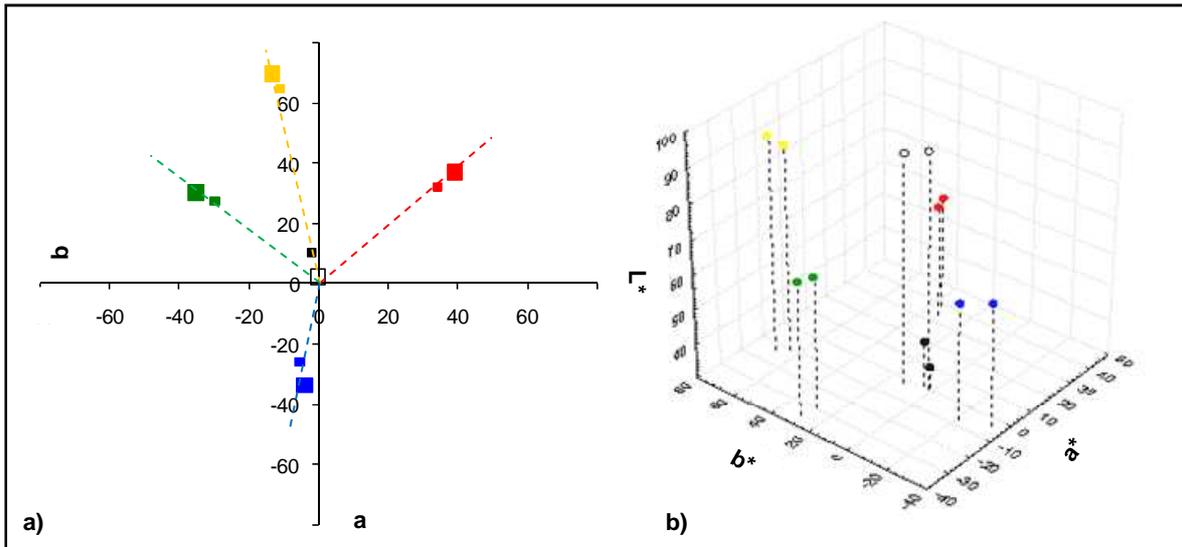
O modelo de cores  $L^*a^*b^*$  permite estudar a diferença de cor provocada pelos filmes nas cartolinas coloridas. A Tabela 9 indica a diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre as cartolinas coloridas com e sem filme de quitosano.

**Tabela 9** – Diferença de cor ( $\Delta E$ ) dos papeis com e sem filme.

|                |                                 | $\Delta E$ |         |      |       |          |       |
|----------------|---------------------------------|------------|---------|------|-------|----------|-------|
| <b>Solução</b> |                                 | Branco     | Amarelo | Azul | Verde | Vermelho | Preto |
| <b>QEX1+N</b>  | 1% Quit / 0,9% AA / 1,189 EX810 | 9          | 6       | 8    | 6     | 7        | 8     |
| <b>QEX2+N</b>  | 2% Quit / 0,9% AA / 1,189 EX810 | 6          | 6       | 8    | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX3+N</b>  | 1% Quit / 2,5% AA / 1,189 EX810 | 7          | 6       | 9    | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX4+N</b>  | 2% Quit / 2,5% AA / 1,189 EX810 | 11         | 6       | 13   | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX5+N</b>  | 1% Quit / 0,9% AA / 3,189 EX810 | 5          | 6       | 7    | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX6+N</b>  | 2% Quit / 0,9% AA / 3,189 EX810 | 6          | 6       | 8    | 6     | 7        | 8     |
| <b>QEX7+N</b>  | 1% Quit / 2,5% AA / 3,189 EX810 | 5          | 6       | 7    | 5     | 7        | 7     |
| <b>QEX8+N</b>  | 2% Quit / 2,5% AA / 3,189 EX810 | 8          | 6       | 10   | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX9+N</b>  | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 7          | 7       | 9    | 7     | 7        | 8     |
| <b>QEX10+N</b> | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 6          | 6       | 9    | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX11+N</b> | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 11         | 6       | 14   | 6     | 6        | 7     |
| <b>QEX12+N</b> | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 9          | 6       | 11   | 6     | 6        | 7     |
| <b>QEX13+N</b> | 0,659% Quit / 1,7% AA / 2 EX810 | 10         | 6       | 11   | 6     | 7        | 7     |
| <b>QEX14+N</b> | 2,34% Quit / 1,7% AA / 2 EX810  | 7          | 6       | 9    | 6     | 7        | 8     |
| <b>QEX15+N</b> | 1,5% Quit / 0,35% AA / 2 EX810  | 8          | 6       | 8    | 6     | 6        | 7     |
| <b>QEX16+N</b> | 1,5% Quit / 3% AA / 2 EX810     | 8          | 5       | 8    | 6     | 6        | 7     |
| <b>QEX17+N</b> | 1,5% Quit / 1,7% AA             | 13         | 6       | 16   | 6     | 6        | 8     |
| <b>QEX18+N</b> | 1,5% Quit / 1,7% AA / 4 EX810   | 5          | 6       | 7    | 6     | 6        | 7     |

É possível concluir, a partir da Tabela 9, que todos os filmes obtidos revelaram alterações de cor passíveis de serem detectáveis pelo olho humano. No entanto, os valores de  $\Delta E$  são bastante baixos ( $\Delta E < 16$ ), concluindo-se que as cores são muito idênticas. Os filmes não alteram significativamente a cor original das cartolinas.

Para uma melhor interpretação dos resultados, a Figura 22 representa graficamente os resultados experimentais do plano  $a^*b^*$  (Figura 22 **a**) e apresenta uma representação gráfica 3D no plano  $a^*b^*L^*$  (Figura 22 **b**) da amostra QEX11+N (ponto central do desenho experimental da Tabela 1).



**Figura 22** - Representação gráfica dos resultados experimentais do plano  $a^*b^*$  (**a**) e representação gráfica 3D no plano  $a^*b^*L^*$  (**b**) da amostra QEX11+N (ponto central).

A Figura 22 **a**) representa graficamente o plano  $a^*b^*$ , e onde se observa com clareza que os pontos com e sem filme em cada uma das cores representadas estão bastante próximos.

Todas as cores com filme apresentaram um valor de C (saturação) inferior ao das cores originais sem filme, excepto a cor branca onde houve um aumento da saturação da cor. Pode-se afirmar, com isto, que excepto para a cor branco e, conforme é visível no gráfico pela aproximação dos pontos à origem, que a cor tornou-se ligeiramente menos intensa. Por outro lado, o ângulo  $h$  não é alterado, indicando uma manutenção da matiz da cor com a aplicação do filme.

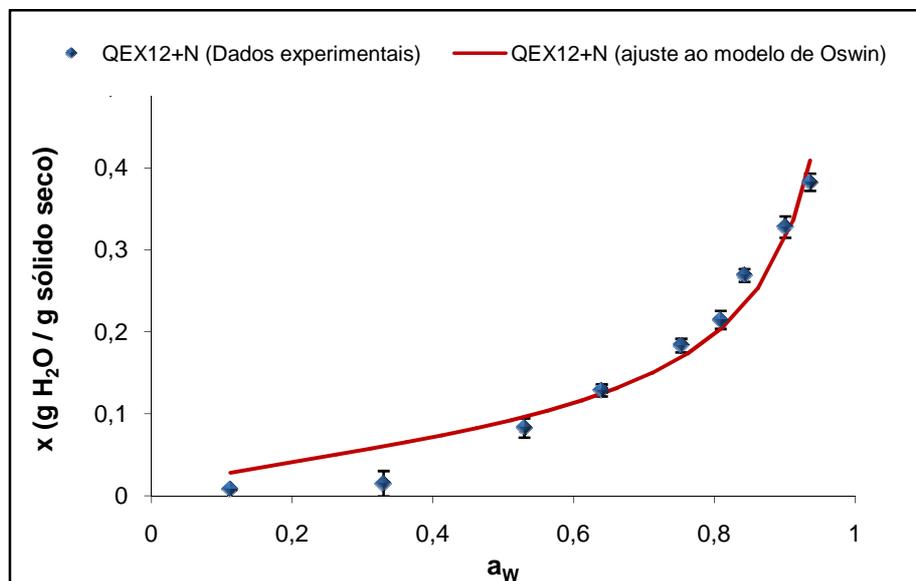
A Figura 22 **b**) proporciona uma melhor percepção da distribuição espacial das amostras e da distância entre a cor sem filme e com filme. É visível que a distância espacial das amostras com e sem filme é bastante reduzida.

### 3.1.5 Propriedades higroscópicas

#### Isotermas de adsorção de água

A sensibilidade à água é um parâmetro importante na avaliação das características de embalagens alimentares. Por isso, é de extrema utilidade o estudo da capacidade de adsorção do vapor de água, através de isotermas de adsorção de água, que expressam a relação de equilíbrio entre a quantidade de água na atmosfera e aquela que está presente no filme.

Os filmes de quitosano obtidos revelaram todos isotermas de absorção bastante semelhantes. A Figura 20 é o exemplo de uma curva resultante deste teste, e que corresponde a um ponto central do desenho experimental (Tabela 1).



**Figura 23** – Isotermas de adsorção da solução QEX12+N (ponto central) ajustadas ao modelo de Oswin.

Conforme é visível na Figura 23 quanto maior a actividade da água da solução a que a amostra de filme esteve submetida, maior a adsorção de água. No entanto, este aumento não é constante, para actividades de água baixas a quantidade de água adsorvida aumenta lentamente, enquanto que, para actividades de água mais elevadas (a partir de 0,33), a quantidade adsorvida aumenta muito rapidamente.

As isotermas de adsorção de todos os filmes foram comparadas e ajustadas pelo modelo de GAB e modelo de Oswin (Figura 23) mas só este último permitiu um bom ajuste (Tabela 10). Na Tabela 10 estão apresentados os parâmetros ajustados do modelo de Oswin.

**Tabela 10** – Parâmetros do modelo de Oswin para ajustar as Isotermas de adsorção

| Solução                                 | C      | K       | R     |
|---|--------|---------|-------|
| QEX1+N 1% Quit / 0,9% AA / 1,19 EX810   | 0,090* | 0,642** | 0,987 |
| QEX2+N 2% Quit / 0,9% AA / 1,19 EX810   | 0,117* | 0,659** | 0,986 |
| QEX3+N 1% Quit / 2,5% AA / 1,19 EX810   | 0,084* | 0,629** | 0,991 |
| QEX4+N 2% Quit / 2,5% AA / 1,19 EX810   | 0,068* | 0,661** | 0,983 |
| QEX5+N 1% Quit / 0,9% AA / 3,19 EX810   | 0,080* | 0,545** | 0,989 |
| QEX6+N 2% Quit / 0,9% AA / 3,19 EX810   | 0,091* | 0,636** | 0,989 |
| QEX7+N 1% Quit / 2,5% AA / 3,19 EX810   | 0,056* | 0,997** | 0,995 |
| QEX8+N 2% Quit / 2,5% AA / 3,19 EX810   | 0,064* | 0,786** | 0,999 |
| QEX9+N 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810    | 0,084* | 0,651** | 0,988 |
| QEX10+N 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,105* | 0,670** | 0,991 |
| QEX11+N 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,121* | 0,627** | 0,997 |
| QEX12+N 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810   | 0,092* | 0,559** | 0,988 |
| QEX13+N 0,659% Quit / 1,7% AA / 2 EX810 | 0,109* | 0,504** | 0,992 |
| QEX14+N 2,34% Quit / 1,7% AA / 2 EX810  | 0,137* | 0,552** | 0,989 |
| QEX15+N 1,5% Quit / 0,35% AA / 2 EX810  | 0,050* | 0,722** | 0,984 |
| QEX16+N 1,5% Quit / 3% AA / 2 EX810     | 0,065* | 0,766** | 0,996 |
| QEX17+N 1,5% Quit / 1,7% AA             | 0,096* | 0,745** | 0,994 |
| QEX18+N 1,5% Quit / 1,7% AA / 4 EX810   | 0,090* | 0,552** | 0,992 |

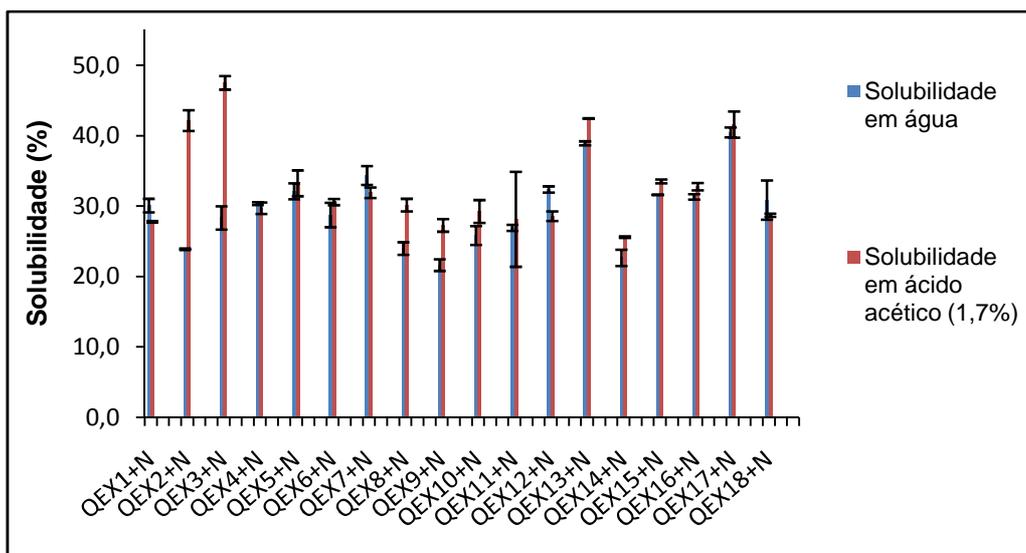
\* Erro associado de 28 a 44%      \*\* Erro associado de 21 a 63%

Os valores dos parâmetros C e K do modelo de Oswin entre soluções são bastante próximos (Tabela 10).

### **Solubilidade e Capacidade de absorção de água**

Dependendo da função a que o filme se destina, ser mais ou menos solúvel, é uma característica importante a ter em conta na protecção da integridade do produto.

Foi testada a solubilidade em água e em ácido acético (1,7%) de todos os filmes obtidos, cujo os resultados estão apresentados graficamente na Figura 21. Alguns filmes desintegraram-se com bastante facilidade (por exemplo, QEX2+N e QEX7+N), o que dificultou a realização deste ensaio.



**Figura 24** – Solubilidade em água e em ácido acético (1,7%) dos filmes de quitosano.

A partir da Figura 21 pode concluir-se que os filmes apresentam uma solubilidade significativa em água ou em ácido, e no geral, os filmes com reticulante apresentam uma menor solubilidade que o filme sem reticulante (QEX17+N). Apesar disso, os valores de solubilidade dos filmes, em água e em ácido acético, são bastante próximos. Seria de esperar que os filmes fossem insolúveis em água devido às suas características descritas anteriormente; e pela adição de um reticulante, também insolúveis em ácido acético.

Uma das explicações para os valores de solubilidade obtidos pode estar relacionada com o pH. Num estudo realizado por Tomihata & Kenji (1997) produziram-se filmes de ácido hialurónico reticulados com diferentes concentrações de EX810 e a vários pH. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente, e depois da obtenção dos filmes, estes foram lavados com água destilada e secos sob vácuo (Tomihata & Kenji, 1997). Neste estudo verificou-se que filmes produzidos a pH ácido (pH=6) resistiam mais tempo à degradação que filmes produzidos a um pH de 8 (Tomihata & Kenji, 1997).

No presente trabalho as soluções filmogénicas apresentavam um pH baixo (pH<5), o que poderá ter promovido a reacção de reticulação. Porém, o reticulante que não reagiu não foi retirado. Este agente é bastante hidrofílico e de cadeia longa. O facto de não se ter lavado os filmes depois de secos, mantendo a presença do reticulante em excesso, pode ter contribuído para a solubilidade dos filmes.

McCloskey *et al.* (2010) realizaram um estudo com lâmpadas de determinação de humidade nos cereais com membranas destinadas à ultra-filtração, e obtidas a partir de quitosano, reticulado com EX810, sob radiação infravermelha e à temperatura de 70°C

durante uma hora e meia. Tendo em conta que as membranas do referido estudo eram destinadas a ultra-filtração e resistiram aos ensaios efectuados, admite-se que estas eram bastante resistentes à água. Por isso, talvez este método de obtenção dos filmes promova uma melhor reticulação que o que foi realizado no presente trabalho.

A presença de um plastificante (glicerol) diminui a interacção entre as cadeias e força de coesão entre as moléculas, o que pode facilitar a desintegração dos filmes. Talvez seja outra explicação para a obtenção dos valores de solubilidade apresentados. De qualquer modo, as condições de reticulação terão de ser optimizadas.

Pelos resultados da Tabela 11, verifica-se que a concentração de polímero e a quantidade de reticulante na solução afectam significativamente a solubilidade.

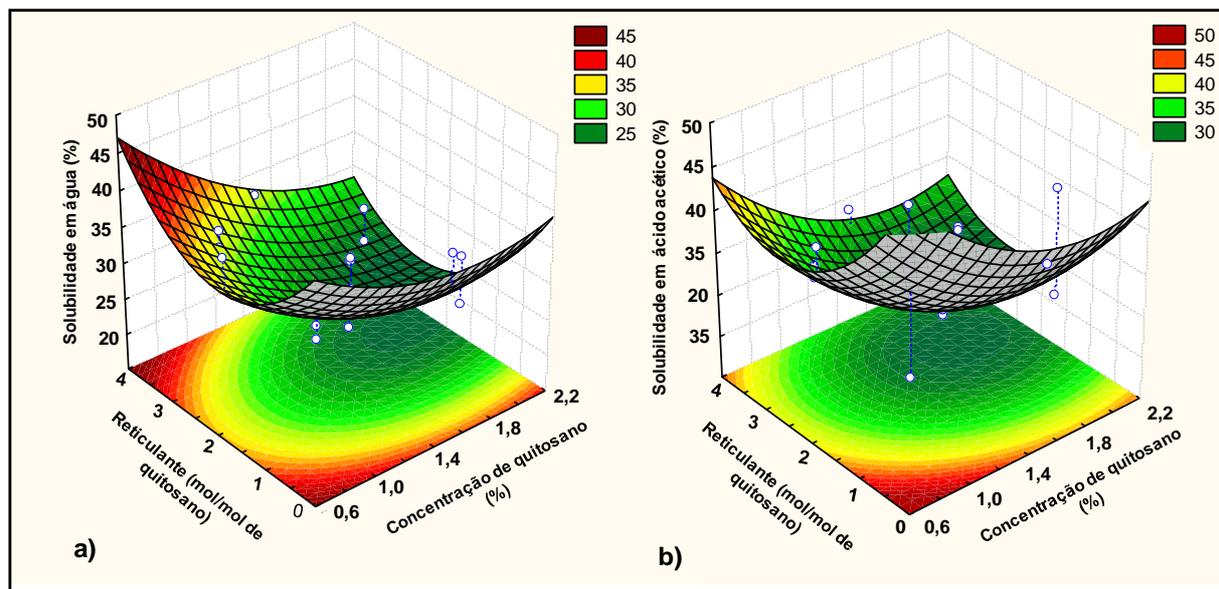
**Tabela 11** - Tabela ANOVA relativa ao efeito dos factores na solubilidade e equações que melhor traduzem as superfícies de resposta (CP – Concentração de polímero, AA – Concentração de ácido acético, R – Razão molar do reticulante  $S_a$ -Solubilidade em água  $S_{AA}$  – Solubilidade em ácido acético).

| <i>p-value</i>  |   |
|-----------------|---|
| Factor          | Água  |
| (1) CP (L)      | <b>0,011747</b>   |
| CP (Q)          | 0,202217  |
| (2) AA (L)      | 0,861593  |
| AA (Q)          | 0,178154  |
| (3) R (L)       | 0,746529  |
| R (Q)           | <b>0,012567</b>   |
| 1L by 2L        |   |
| 1L by 3L        | 0,479816  |
| 2L by 3L        | 0,536129  |
| R-sqr           | 0,736   |
| R-Adj           | 0,471   |
| <b>Equações</b> | $S_a=59,424-21,767CP+6,4539CP^2-7,236R+2,683R^2-1,992CP*R-1,086*1,697R-3,502$ |

Na Tabela 12, embora os ajustes da equação não sejam bons, é possível perceber que a concentração de quitosano (contribuição linear) e a razão molar de reticulante/polímero (contribuição quadrática) na solução afectam significativamente a solubilidade do filme em água. Em ácido acético, o *p-value* associado à concentração de quitosano (contribuição linear) e razão molar de reticulante/polímero (contribuição quadrática) estão muito próximos

de 0,05, por isso deve existir algum efeito dos factores referidos na solubilidade do filme em ácido acético.

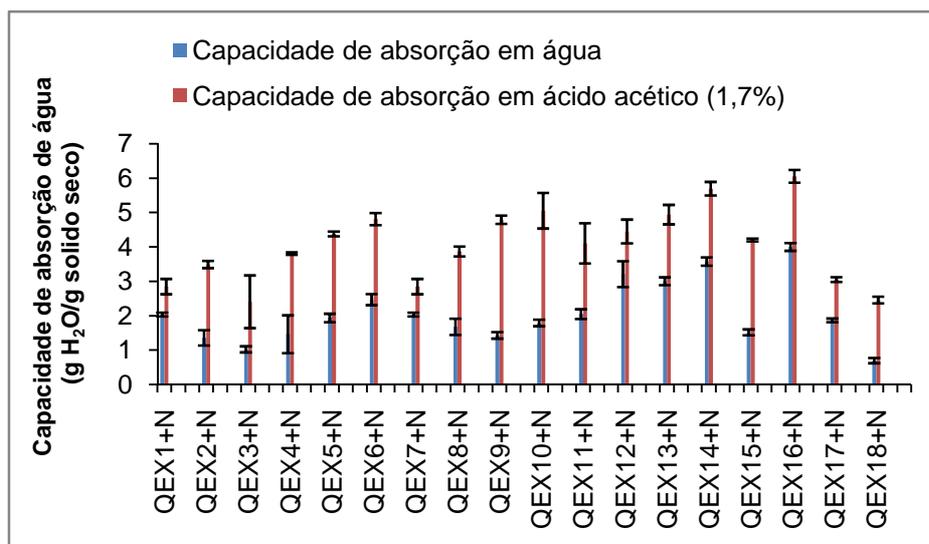
A Figura 25 representa a dependência da solubilidade em água (Figura 25 a)) e em ácido acético (Figura 25 b)) em função da concentração de quitosano e da razão molar de EX810.



**Figura 25** – Gráfico de superfície do efeito da concentração de quitosano e da razão molar de reticulante/polímero na solubilidade em: **a)** água **b)** ácido acético.

A Figura 25 mostra que o filme é menos solúvel em água (Figura 25 a)) ou em ácido acético (Figura 25 b)), quando a razão molar de reticulante/polímero é próxima dos valores centrais. A evolução da solubilidade pode ter a seguinte explicação: quando a razão molar é mínima, não existe reticulação suficiente e o filme torna-se mais solúvel, e quando é máxima, o reticulante em excesso (sendo hidrofílico) pode estar a ajudar na desintegração do filme. É possível verificar na Figura 25 que a solubilidade dos filmes também diminui com o aumento da concentração de quitosano na solução. Isto pode dever-se ao facto de existir uma maior quantidade de polímero capaz de reagir com o EX810, diminuindo a quantidade de reticulante disponível para provocar a desintegração do filme.

A capacidade para absorver água foi determinada através da diferença entre o filme depois de estar mergulhado em água/ácido acético, e o filme seco. Os resultados obtidos estão representados graficamente na Figura 26.



**Figura 26** – Capacidade de absorção em água e em ácido acético (1,7%) dos filmes de quitosano

Na figura 26 pode verificar-se que a capacidade de absorção de água é menor em água que em ácido acético. Este resultado pode dever-se ao facto do baixo pH da solução de ácido acético poder deslocar o equilíbrio sólido-líquido para uma maior entrada de água, uma vez que o meio ácido é o solvente original para a dissolução do quitosano.

Pela análise da Figura 23, considera-se que a capacidade do filme para absorver água é, no geral, bastante elevada. Estes valores podem dever-se ao reticulante utilizado. A natureza hidrofílica do EX810 pode causar uma maior absorção de água. Adicionalmente, o seu próprio peso molecular e a sua estrutura química pode fazer com que o espaço entre as moléculas de quitosano reticuladas seja grande, facilitando a absorção de água pela matriz polimérica.

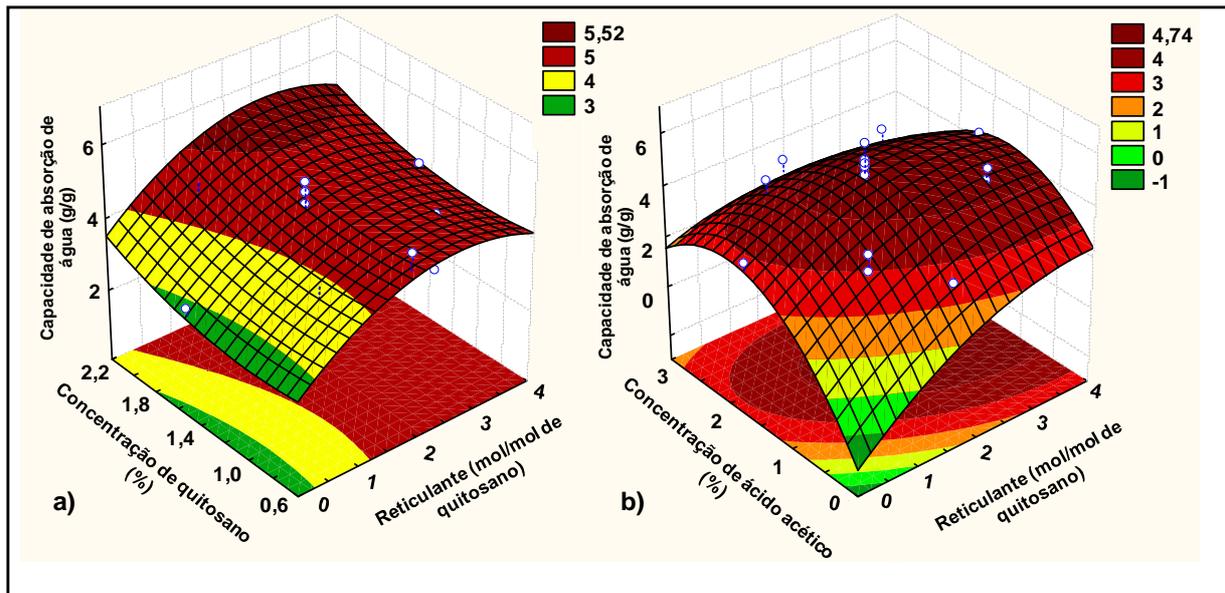
Na Tabela 12 estão indicados os *p-values* resultantes da análise estatística realizada ao efeito da concentração de quitosano, concentração de ácido acético e razão molar de reticulante/polímero, na capacidade de absorção de água.

**Tabela 12** - Tabela ANOVA do efeito dos factores na capacidade de absorção de água em ácido acético com equações que melhor traduzem as superfícies de resposta (CP – Concentração de polímero, AA – Concentração de ácido acético, R – Razão molar do reticulante,  $CA_{AA}$ - Capacidade de absorção de água em ácido acético).

| Factor          | <i>p-value</i>  |
|-----------------|---|
| (1) CP (L)      | <b>0,026756</b>   |
| CP (Q)          | 0,265842  |
| (2) AA (L)      | 0,247375  |
| AA (Q)          | <b>0,000416</b>   |
| (3) R (L)       | <b>0,045998</b>   |
| R (Q)           | <b>0,023607</b>   |
| 1L by 2L        | 0,352640  |
| 2L by 3L        | 0,090592  |
| <b>R-sqr</b>    | 0,867   |
| <b>R-Adj</b>    | 0,758   |
| <b>Equações</b> | $CA_{AA} = -43,262 - 199,916R + 65,96CP^2 + 217,3R - 27,43R^2 + 42,22*1,7CP - 40,52*1,7R + 357,3$<br>$CA_{AA} = -43,26 + 415,62AA - 120,84AA^2 + 217,3R - 27,43R^2 + 42,22*1,5*AA - 40,52AA*R - 151,46$ |

Pela análise feita à Tabela 13 pode verificar-se que a capacidade de absorção de água em ácido acético é significativamente afectada pela concentração de quitosano (contribuição linear), concentração de ácido acético (contribuição quadrática) e razão molar de reticulante/polímero (contribuição linear e contribuição quadrática).

A Figura 27 representa graficamente o efeito da concentração de quitosano, concentração de ácido acético e razão molar de reticulante/polímero na capacidade de absorção de água.



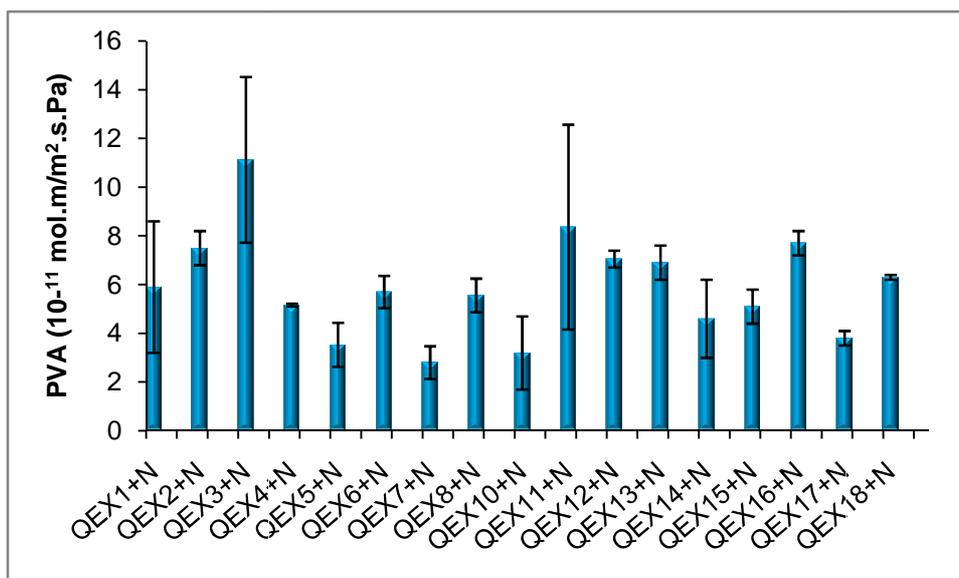
**Figura 27** – Gráfico de superfície do efeito da razão molar de reticulante/polímero e concentração de quitosano (a) e da razão molar de reticulante/polímero e concentração de ácido acético (b) na capacidade de absorção de água em meio ácido.

Pela análise da Figura 27 a) verifica-se que existe um aumento da capacidade de absorção de água com o aumento da concentração de quitosano e da razão molar de reticulante/polímero. No gráfico da Figura 27 b) verifica-se um aumento da capacidade de absorção de água com o aumento da razão molar de reticulante/polímero e com a concentração de ácido acético.

À partida não seria de esperar uma maior absorção de água com o aumento da razão molar de reticulante/polímero, dado que um maior grau de reticulação dificulta o “inchamento” da estrutura polimérica. Porém, como já foi referido, o reticulante usado tem uma natureza hidrofílica e uma estrutura linear com tamanho relativamente elevado, quando comparado com outros agentes reticulantes. Por outro lado, o reticulante em excesso manteve-se na estrutura do filme. Estes factos podem estar na origem dos resultados obtidos.

### 3.1.6 Permeabilidade ao vapor de água

Na Figura 28 verificam-se algumas diferenças entre os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) observados.



**Figura 28** – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de quitosano

A PVA dos filmes dos filmes situa-se entre  $2 \times 10^{-11}$  mol.m/m<sup>2</sup>sPa e  $6 \times 10^{-11}$  mol.m/m<sup>2</sup>sPa. Pranoto *et al.* (2005), produziram filmes obtidos a partir da dissolução de quitosano em ácido acético e à qual foram adicionados vários agentes antimicrobianos (óleo de alho, sorbato de potássio e nisina). Esses autores obtiveram valores de PVA em filmes de quitosano com nisina, entre  $1,5 \times 10^{-11}$  e  $2,2 \times 10^{-11}$  mol.m/m<sup>2</sup>s.Pa, portanto, na gama dos valores obtidos no presente estudo.

Através da análise estatística realizada ao efeito dos factores na PVA, e conforme é visível no Anexo II, não se obteve um bom ajuste do modelo quadrático. Assim sendo, optou-se por fazer um teste *t-student* para perceber se existem diferenças significativas entre os extremos de concentração de polímero (QEX14+N e QEX13+N), extremos de concentração de ácido acético (QEX15+N e QEX16+N) e extremos de razão molar de reticulante/polímero (QEX17+N e QEX18+N). A tabela 13 indica a PVA dos filmes testados, e os *p-values* obtidos a partir do teste *t-student*.

**Tabela 13** – Valores de PVA e *p-values* obtidos no teste *t-student* (n=3)

| Formulação | PVA (10 <sup>-11</sup> mol.m/m <sup>2</sup> .s.Pa) | <i>p-value</i> |
|------------|--|----------------|
| QEX13+N    | 6,9 ± 0,7  | 0,168          |
| QEX14+N    | 4,6 ± 1,6  |                |
| QEX15+N    | 5,1 ± 0,7  | <b>0,025</b>   |
| QEX16+N    | 7,7 ± 0,5  |                |
| QEX17+N    | 3,8 ± 0,3  | <b>0,006</b>   |
| QEX18+N    | 6,3 ± 0,1  |                |

Na Tabela 13, verifica-se que apenas entre os extremos de concentração de quitosano (QEX13+N e QEX14+N) não existem diferenças significativas. O filme com menor concentração de ácido acético (QEX15+N) é significativamente menos permeável ao vapor de água que o filme com maior concentração de ácido acético (QEX16+N). O mesmo acontece com o filme sem reticulante (QEX17+N) que apresenta uma permeabilidade ao vapor de água significativamente inferior ao filme com maior razão molar de reticulante/polímero (QEX18+N). Este último resultado vem reforçar a ideia do carácter hidrofílico conferido ao filme pelo agente reticulante usado.

### 3.1.7 Propriedades mecânicas

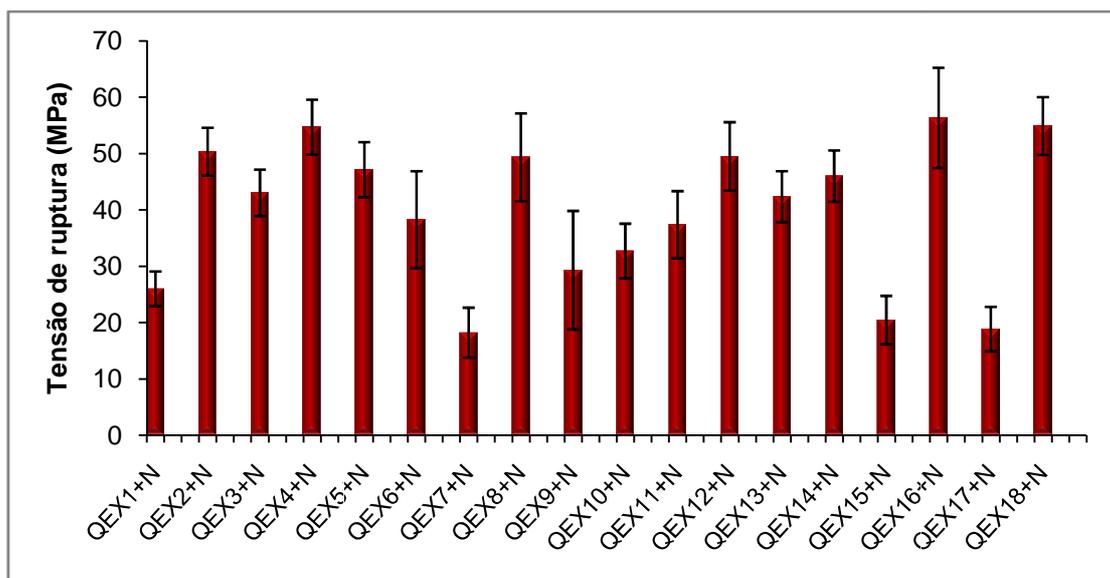
As propriedades mecânicas dos filmes são características importantes para manter a integridade estrutural dos produtos e promover a protecção física dos alimentos. Daí a importância de realizar testes de extensão e testes de perfuração, de modo a conhecer as propriedades mecânicas dos filmes.

Através da análise estatística realizada ao efeito dos factores nas variáveis dependentes que resultam do teste de extensão (tensão de ruptura, alongamento na ruptura e módulo de Yong) e do teste de perfuração (tensão na ruptura e deformação), e conforme é visível no Anexo III, não se obteve um bom ajuste do modelo quadrático. Assim sendo, optou-se por fazer um teste *t-student* para perceber se existem diferenças significativas entre os extremos de concentração de polímero (QEX14+N e QEX13+N), extremos de concentração de ácido acético (QEX15+N e QEX16+N) e extremos de razão molar de reticulante/polímero (QEX17+N e QEX18+N).

#### **Teste de extensão**

No teste de extensão, os filmes obtidos sofreram um alongamento considerável até a força exercida pelas sondas de tracção, ser suficiente para causar a quebra do filme. A tensão de ruptura e o alongamento na ruptura dos filmes de quitosano estão representados na Figura 29 e Figura 30, respectivamente.

A Figura 29 mostra os valores correspondentes à tensão na ruptura, de cada um dos filmes obtidos.



**Figura 29** – Representação gráfica dos valores de tensão de ruptura.

Na figura 29 podem identificar-se diferenças entre o filme que contém o máximo e o filme que contém o mínimo de concentração de ácido acético (QEX15+N e QEX16+N), e entre o filme sem reticulante e o filme com a máxima razão molar de reticulante/polímero (QEX17+N e QEX18+N). A Tabela 14 indica o valor da tensão de ruptura ( $\sigma$ ) dos filmes que correspondem aos pontos extremos do desenho experimental da Tabela 1.

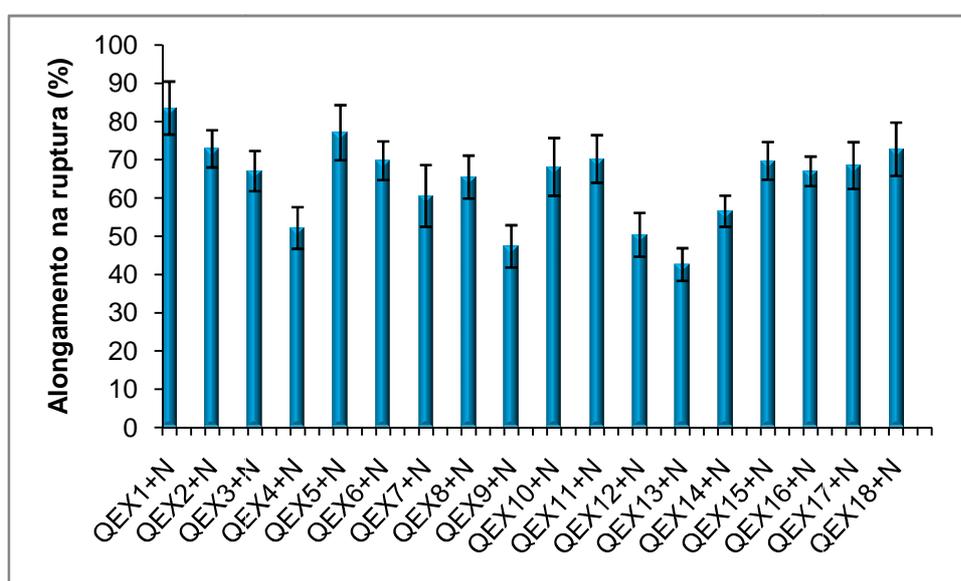
**Tabela 14** – Valores da tensão de ruptura ( $\sigma$ ) dos pontos extremos e *p-values* obtidos no teste *t-student* (n=15)

| Formulação | $\sigma$ (MPa) | <i>p-value</i> |
|------------|----------------|----------------|
| QEX13+N    | 42,4 ± 4,5     | 0,13           |
| QEX14+N    | 46,0 ± 4,6     |                |
| QEX15+N    | 20,4 ± 4,3     | 0,00           |
| QEX16+N    | 56,3 ± 8,9     |                |
| QEX17+N    | 18,8 ± 5,1     | 0,00           |
| QEX18+N    | 54,9 ± 3,9     |                |

Pela análise da Figura 29 e da Tabela 14, pode afirmar-se que a tensão de ruptura do filme QEX15+N é significativamente inferior à do filme QEX16+N (um pH mais baixo tem como consequência um aumento significativo da tensão na ruptura), e a tensão de ruptura do filme QEX18+N é significativamente superior à do filme QEX17+N (a presença de reticulante tem como consequência ligações entre as cadeias de polímero, que torna a matriz mais resistente). Já a concentração de polímero não levou a valores de tensão na ruptura significativamente diferentes (QEX13+N e QEX14+N).

Lazaridou & Biliaderis (2002) realizaram filmes a partir da dissolução do quitosano em água e solução diluída de ácido acético (obtendo um pH de 4), e com a adição de sorbitol (10 e 30% da massa de quitosano). Os filmes do referido estudo foram obtidos à temperatura ambiente, e depois condicionados a diferentes humidades relativas para o estudo de várias propriedades (propriedades mecânicas e termo-físicas). No referido estudo, Lazaridou & Biliaderis (2002), verificaram que quanto maior a hidratação dos filmes, e a concentração de plastificante (sorbitol) presente, menor a tensão de ruptura. Por exemplo, para filmes hidratados em 25%, a tensão de ruptura é cerca de 20 e 30 MPa, respectivamente, em filmes com 30% e 10% de sorbitol (Lazaridou & Biliaderis, 2002).

Aquando a realização dos testes de extensão, observou-se que os filmes alongavam bastante até quebrarem (Figura 30).

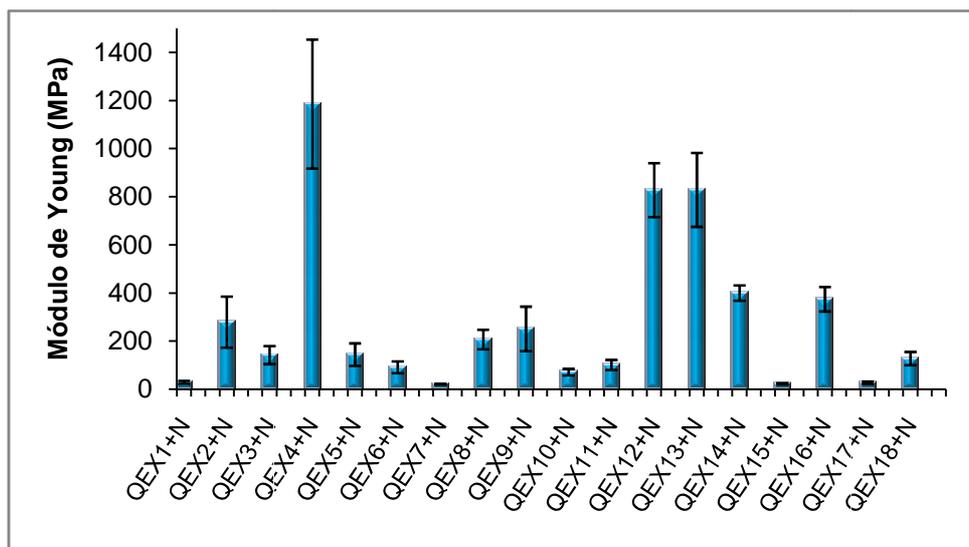


**Figura 30** – Representação gráfica dos valores de alongamento na ruptura obtido no teste de extensão.

Na Figura 30 verifica-se que todos os valores de alongamento na ruptura são superiores a 40%. Através do teste *t-student* realizado, conclui-se que o filme QEX14+N (máxima concentração de polímero) apresenta um alongamento na ruptura de  $55,6 \pm 4,1\%$ , significativamente superior ( $p\text{-value}=0,000023$ ) ao valor de  $42,6 \pm 4,3\%$  obtido com o filme QEX13+N (mínima concentração de polímero). No que diz respeito à influência da concentração de ácido e da razão de reticulante, o teste *t-student* não revelou diferenças significativas.

No estudo realizado por Lazaridou & Biliaderis (2002) às propriedades dos filmes de quitosano (estudo referido anteriormente), verificou-se que o alongamento na ruptura é tanto maior quanto maior a hidratação do filme e a concentração de plastificante (sorbitol). Por exemplo, no referido estudo, para uma hidratação de 25%, o alongamento é de cerca 80 e 85%, respectivamente, em filmes com 10% e 30% de sorbitol (Lazaridou & Biliaderis, 2002).

A Figura 31 representa os módulos de Young obtidos a partir das curvas de tensão/deformação dos filmes de quitosano.



**Figura 31** – Representação gráfica dos módulos de Young dos filmes de quitosano

Na Figura 31 identificam-se diferenças entre os valores obtidos. A Tabela 15 indica os *p-values* obtidos a partir do teste *t-student* realizado às soluções com concentrações extremas de quitosano (QEX13+N e QEX14+N), concentrações extremas de ácido acético (QEX15+N e QEX16+N) e razões molares extremas de reticulante (QEX17+N e QEX18+N).

**Tabela 15** – Valores do módulo de Young (E) e *p-values* obtidos no teste *t-student* (n=15)

| Formulação | E (MPa)       | <i>p-value</i>  |
|------------|---------------|-----------------|
| QEX13+N    | 828,4 ± 153,7 | <b>0,000002</b> |
| QEX14+N    | 399,6 ± 32,0  |                 |
| QEX15+N    | 223,9 ± 28,2  | <b>0,000005</b> |
| QEX16+N    | 373,9 ± 54,9  |                 |
| QEX17+N    | 26,2 ± 4,9    | <b>0,000000</b> |
| QEX18+N    | 98,9 ± 2,5    |                 |

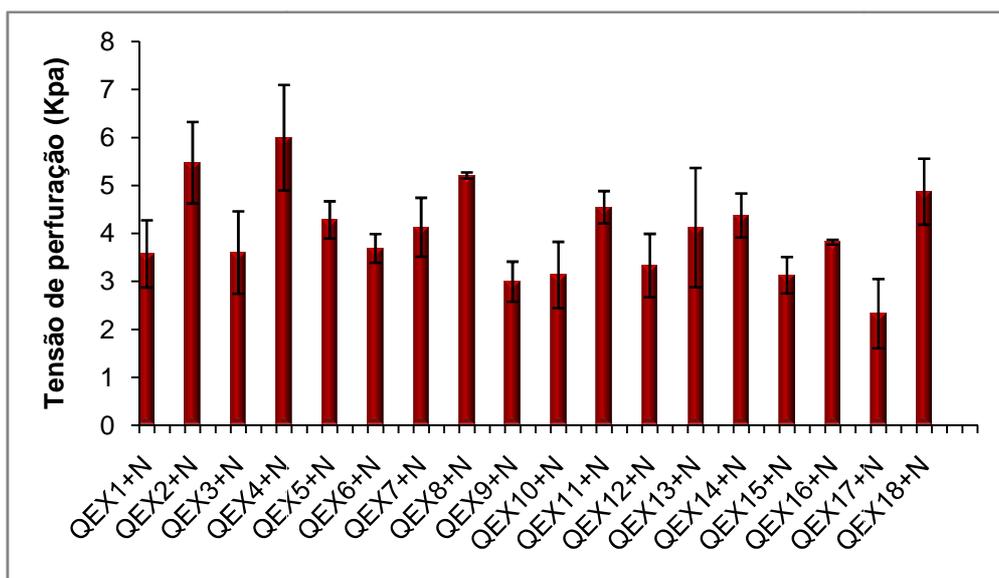
Fazendo uma análise da Figura 31 e da Tabela 15, conclui-se que o módulo de Young do filme QEX13+N é significativamente maior que o do filme QEX14+N. O mesmo acontece

com o filme QEX16+N, cujo o valor do módulo de Young é significativamente superior ao obtido para o filme QEX15+N. Por fim, o filme QEX18+N, apresenta um valor do módulo de Young, significativamente maior que o do filme QEX17+N.

No estudo realizado por Lazaridou & Biliaderis (2002) às propriedades dos filmes de quitosano (estudo referido anteriormente), os valores do módulo de Young dos filmes obtidos, diminuem com a concentração de plastificante (sorbitol) e com a hidratação do filme. Por exemplo, um filme hidratado em 20% apresentou um módulo de Young de cerca de 200 e 400 MPa, respectivamente, em filmes com 30 e com 10% de sorbitol (Lazaridou & Biliaderis, 2002).

### Teste de perfuração

No teste de perfuração, os filmes obtidos sofreram um alongamento considerável até a força exercida pela sonda ser capaz de perfurar o filme. Na Figura 32 estão representados os valores da tensão de perfuração.



**Figura 32** – Representação gráfica da tensão de perfuração.

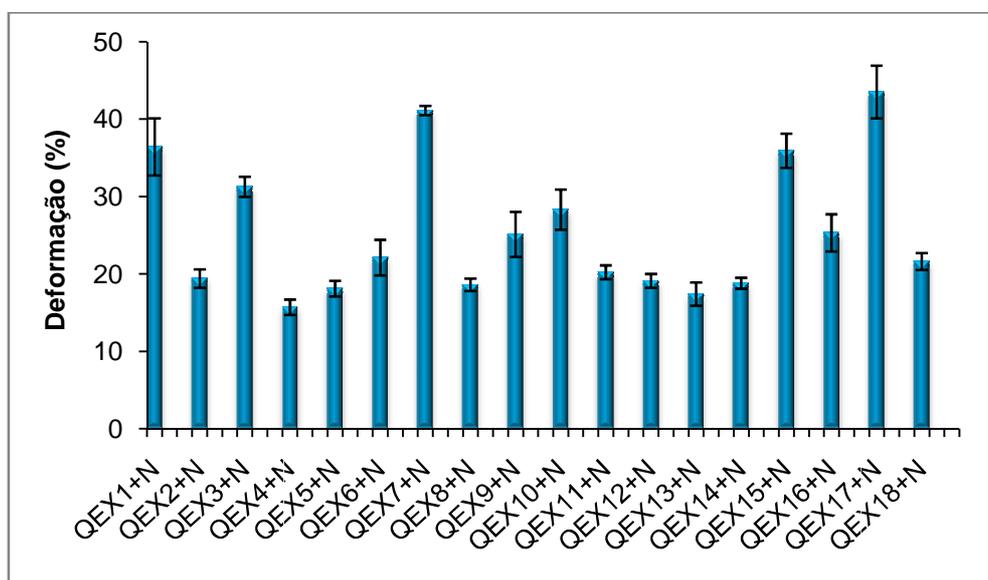
Na Figura 32 verificam-se algumas diferenças entre os valores da tensão de perfuração. Na Tabela 16 estão indicados as tensões de perfuração ( $\sigma_p$ ) e *p-value* resultantes do teste *t-student* realizado aos filmes correspondentes aos pontos extremos da Tabela 1.

**Tabela 16** – Valores da tensão de perfuração ( $\sigma_p$ ) dos pontos extremos e *p-values* obtidos no teste *t-student* (n=5)

| Formulação | $\sigma_p$ (KPa) | <i>p-value</i> |
|------------|------------------|----------------|
| QEX13+N    | 4,7 ± 1,5        | 0,445          |
| QEX14+N    | 4,0 ± 0,8        |                |
| QEX15+N    | 3,1 ± 0,4        | <b>0,027</b>   |
| QEX16+N    | 3,8 ± 0,1        |                |
| QEX17+N    | 2,6 ± 0,4        | <b>0,001</b>   |
| QEX18+N    | 4,9 ± 0,7        |                |

Pela análise da Tabela 16 conclui-se que a tensão de perfuração do filme QEX16+N é significativamente superior à do filme QEX15+N (um aumento da concentração de ácido torna os filmes mais fortes na ruptura) e a tensão de perfuração do filme QEX17+N é significativamente menor que a do filme QEX18+N (a presença de reticulante tem como consequência a formação de ligações entre as cadeias de polímero, que torna a matriz mais resistente, como aconteceu nos testes de extensão).

A Figura 33 representa os valores de deformação dos filmes de quitosano, nos testes de perfuração.



**Figura 33** – Representação gráfica da deformação dos filmes de quitosano

Na Figura 33 verificam-se diferenças entre os valores de deformação obtidos. Na Tabela 17 está indicada a deformação ( $\epsilon_p$ ) dos filmes que correspondem aos pontos extremos da Tabela 1, e respectivo *p-value* resultantes do teste *t-student* realizado.

**Tabela 17** – Valores da deformação ( $\epsilon_p$ ) dos pontos extremos e *p-values* obtidos no teste *t-student* (n=5)

| Formulação | $\epsilon_p$ (%) | <i>p-value</i> |
|------------|------------------|----------------|
| QEX13+N    | 17,4 ± 1,5       | 0,180          |
| QEX14+N    | 18,8 ± 0,8       |                |
| QEX15+N    | 35,8 ± 2,1       | <b>0,002</b>   |
| QEX16+N    | 25,3 ± 2,4       |                |
| QEX17+N    | 44,7 ± 2         | <b>0,000</b>   |
| QEX18+N    | 21,6 ± 1,1       |                |

Pela análise da Tabela 17 conclui-se que a concentração de polímero não afecta significativamente a deformação nos ensaios de perfuração. Porém, o filme QEX15+N é significativamente mais extensível que o filme QEX16+N (indicando um efeito negativo do aumento da concentração de ácido na deformação dos filmes), e o filme QEX18+N é significativamente menos extensível que o filme QEX17+N (a actuação do reticulante limita o deslizamento das cadeias uma sobre as outras, diminuindo a deformação na ruptura).

### 3.2 Filmes com dupla camada de quitosano e gelatina e peixe e filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe.

No presente estudo, produziram-se filmes de mistura e filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe. As propriedades destes filmes/soluções (propriedades reológicas, propriedades higroscópicas, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e cor), foram estudadas, e comparadas entre formulações/filmes de mistura, e filmes com dupla camada, e comparadas com as propriedades de um(a) formulação/filme de quitosano (QEX11+N) e com um(a) formulação/filme de gelatina de peixe (GAA11+N). Na Tabela 18 está indicada a concentração de polímero, a concentração de ácido acético e a razão molar de reticulante/polímero presente na formulação de quitosano (QEX11+N) e na formulação de gelatina de peixe (GAA11+N).

**Tabela 18** – Concentração de polímero, de ácido acético e razão molar de reticulante/polímero das soluções de quitosano (QEX11+N) e de gelatina de peixe (GAA11+N).

| Solução | Concentração de polímero (% p/p) |                   | Ácido acético (% p/p) | EX810 (mol/mol de polímero) |
|---------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|
|         | Quitosano                        | Gelatina de peixe |                       |                             |
| GAA11+N | 0                                | 5                 | 1,7                   | 2                           |
| QEX11+N | 1,5                              | 0                 | 1,7                   | 2                           |

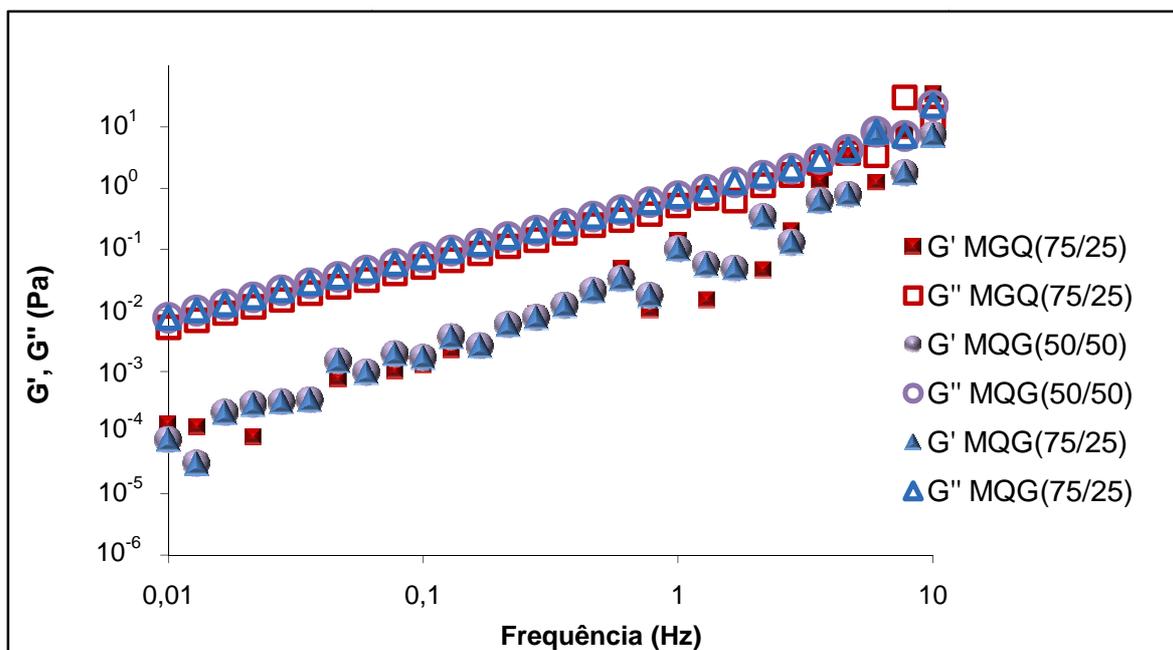
### 3.2.1 Formulações à base de quitosano e gelatina de peixe

As soluções para obtenção de filmes de mistura de quitosano e gelatina de peixe apresentavam uma cor mais clara e transparente que as soluções filmogênicas de quitosano. O pH das soluções para obtenção de filmes de mistura de quitosano e gelatina de peixe apresentaram um pH de  $3,82 \pm 0,01$ .

### 3.2.2 Análise reológica das soluções para obtenção de filmes de mistura de quitosano e gelatina de peixe

#### Testes oscilatórios

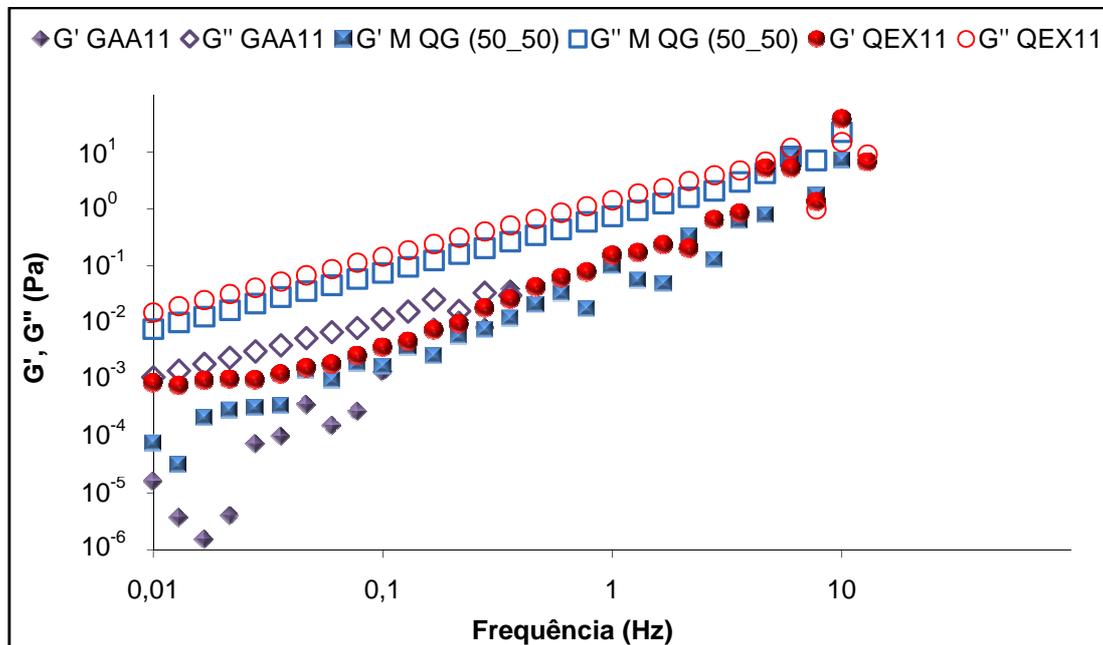
As soluções de mistura de quitosano e gelatina de peixe foram submetidas a um teste de varrimento de frequências, 24h após a adição do reticulante. Na Figura 34 estão representadas as curvas das soluções de mistura MGQ(75/25), MQG(50/50) e MQG(75/25).



**Figura 34** - Ensaio de varrimento de frequência das soluções de mistura.

Na Figura 34 pode observar-se que o teste de varrimento de frequências realizado às soluções de mistura (MGQ(75/25), MQG(50/50) e MQG(75/25)) deram origem a curvas de ambos os módulos sobrepostas. No gráfico, verifica-se que o módulo conservativo e o módulo dissipativo aumentam significativamente com a frequência, sendo o módulo  $G''$  superior ao módulo  $G'$ , sendo possível concluir que se está na presença de uma solução viscosa, sem estruturação, e em que o reticulante ainda não terá reagido com o polímero.

É interessante fazer uma comparação das curvas obtidas no teste de varrimento de frequências da solução MQG(50/50) com as da solução de quitosano (QEX11+N) e da solução de gelatina (GAA11+N) (Figura 35).

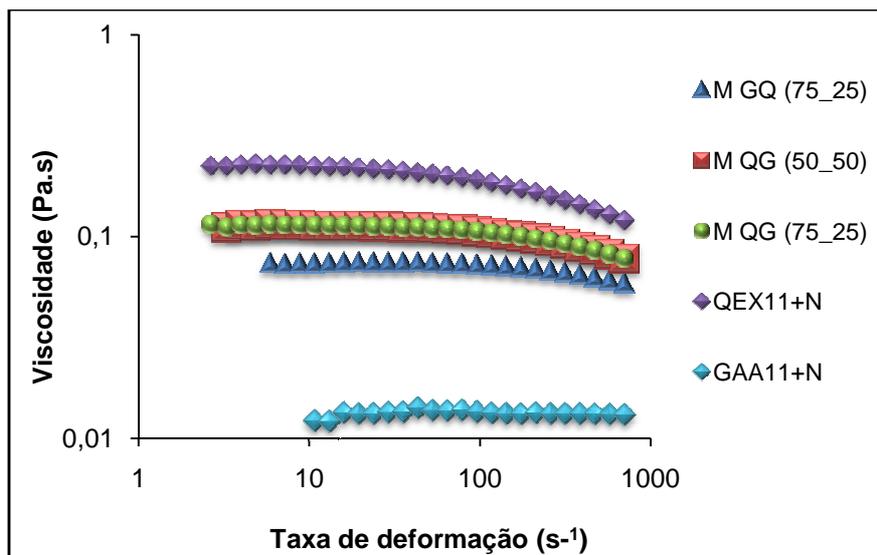


**Figura 35** - Ensaio de varrimento de frequência das soluções M QG (50/50), QEX11+N (Soluções quitosano) e GAA11+N (Solução de gelatina de peixe)

Entre as três curvas das soluções representadas na Figura 35, a solução de gelatina (GAA11+N) é a que apresenta valores de  $G'$  e  $G''$  mais baixos, seguindo-se a solução de mistura (MQG(50/50)), e por fim a solução de quitosano (QEX11+N) que apresenta valores dos módulos superiores aos das restantes.

### Curvas de escoamento

Na Figura 36 estão representadas as curvas de escoamento das soluções de mistura e das soluções simples de quitosano e de gelatina.



**Figura 36** - Curva de escoamento das soluções de mistura, QEX11+N e GAA11+N

Na Figura 36, e conforme já foi visto na Figura 14 onde estão representadas todas as curvas de escoamento das formulações de quitosano, verificam-se dois comportamentos distintos. A curva que corresponde à formulação de gelatina de peixe (GAA11+N) apresenta um comportamento praticamente Newtoniano, depois, à medida que a proporção de quitosano na solução vai aumentando, o efeito reofluidificante nas curvas de escoamento também aumenta. O carácter reofluidificante é mais evidente nas soluções com maior proporção de quitosano, onde as cadeias de quitosano induzem uma maior viscosidade. Nestes casos, a partir de uma determinada taxa de deformação, a velocidade do estabelecimento de interações entre cadeias é inferior à velocidade a que novas se formam, diminuindo a viscosidade (comportamento reofluidificante).

O ajuste das curvas de escoamento, ao modelo de Cross, permite-nos obter a viscosidade no patamar newtoniano. A Tabela 19 indica o valor dos parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas de escoamento.

**Tabela 19** - Parâmetros da viscosidade das soluções de mistura e soluções simples de quitosano e de gelatina de peixe, obtidos a partir do ajuste das curvas de escoamento ao modelo de Cross.

| Formulação   | $\eta_0$ (Pa.s) | $\tau$ (s)  | m       | R      |
|--------------|-----------------|-------------|---------|--------|
| GAA11+N      | 0,01            | -----       | -----   | -----  |
| M GQ (75/25) | 0,074**         | 0,000470*** | 1,13*** | 0,999  |
| M QG (50/50) | 0,115*          | 0,000640**  | 0,90**  | 0,9999 |
| M QG (75/25) | 0,115*          | 0,000640**  | 0,90**  | 0,9999 |
| QEX11+N      | 0,231*          | 0,001340**  | 0,76**  | 0,9999 |

\*Erro associado de 0,63 a 0,90%

\*\*Erro associado de 1,3 a 9,4%

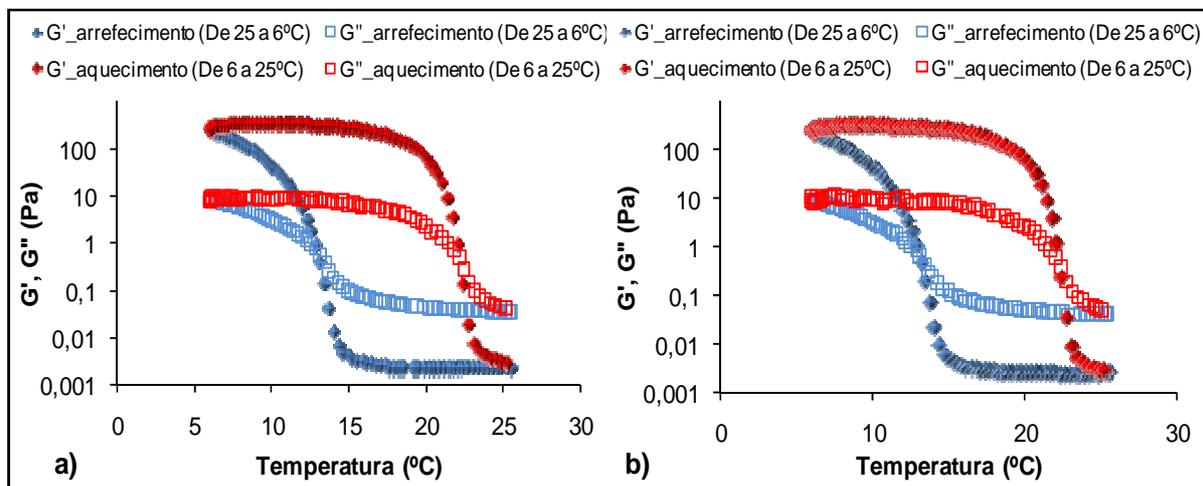
\*\*\*Erro associado de 14,9 a 40,4%

A solução de gelatina de peixe, por apresentar um comportamento Newtoniano, a viscosidade é constante ao longo das taxas de deformação.

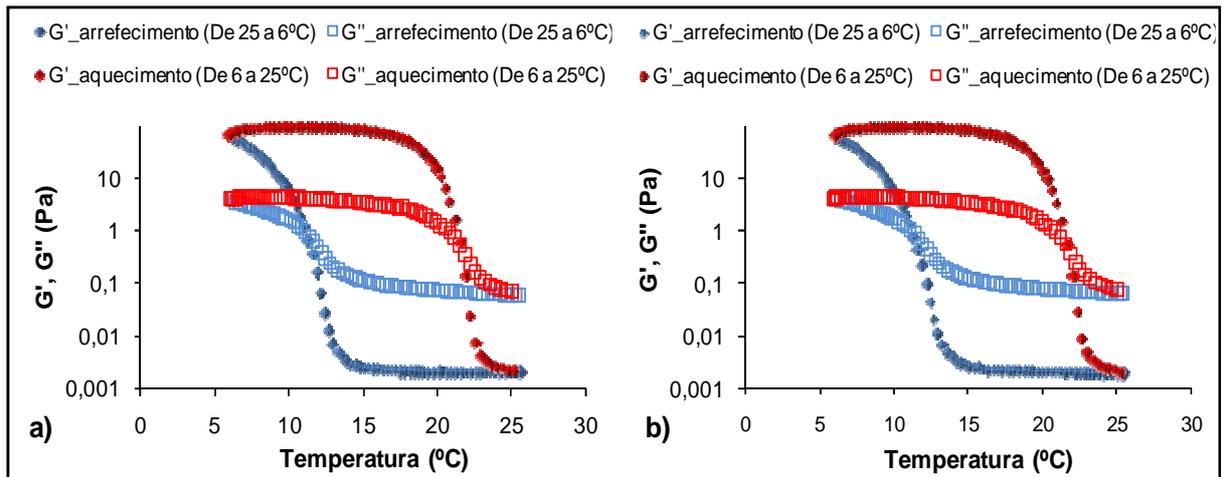
Conforme já era previsto pelas observações anteriores feitas à Figura 36, a Tabela 19 indica que, o valor da viscosidade no patamar newtoniano é tanto maior, quanto maior é a proporção de quitosano na solução, portanto, o valor de  $\eta_0$  é maior na formulação de quitosano (QEX11+N), e menor na formulação de gelatina de peixe (GAA11+N).

Com a adição de gelatina de peixe, a formação de gel é possível, o que levou à realização do teste de varrimento de temperaturas, de modo a verificar essa possibilidade. A partir deste ensaio obtiveram-se as temperaturas de fusão e de gelificação (Tabela 20) e as curvas representadas nos gráficos da Figura 34, Figura 35 e Figura 36.

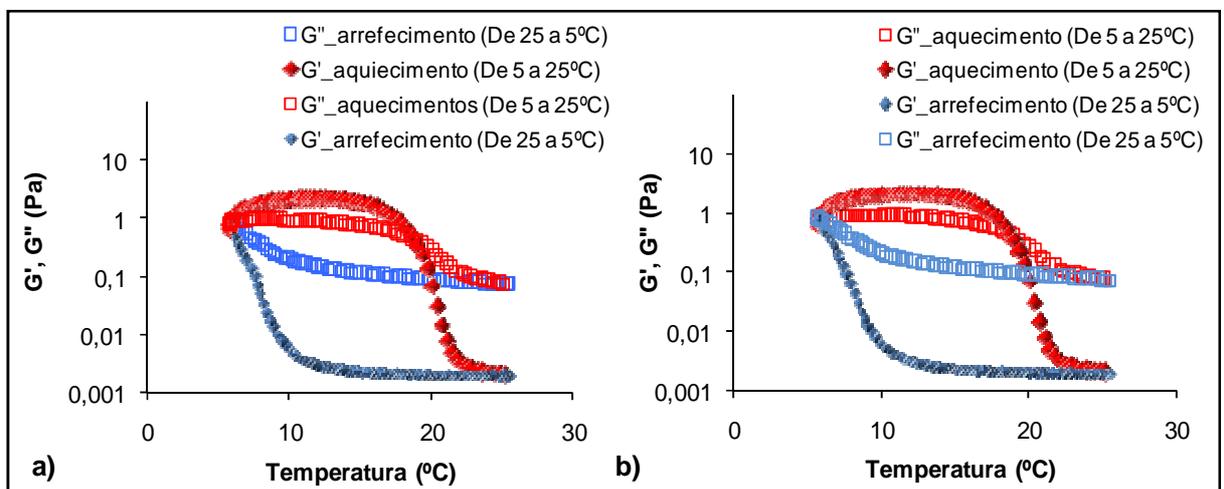
Foi notória a formação de um gel, em qualquer das misturas de gelatina e quitosano estudadas (Figuras 37, 38 e 39). Nas Figuras 37 **a**), 38 **a**) e 39 **a**) estão apresentados os módulos  $G'$  e  $G''$  em função da temperatura, para um arrefecimento de 25°C a 6°C, seguido de um aquecimento de 6°C para 25°C (1ª transição sol-gel-sol). Nas figuras 37 **b**), 38 **b**) e 39 **b**) estão representadas as curvas do segundo varrimento de temperaturas, efectuado imediatamente a seguir ao primeiro (2ª transição sol-gel-sol), e que são coincidentes com o anterior.



**Figura 37** - Curvas de varrimento de temperaturas da solução MGQ(75/25): a) Primeira transição solução-gel-solução; b) 2ª transição solução-gel-solução.



**Figura 38** – Curvas de varrimento de temperaturas da solução MQG(50/50): a) Primeira transição solução-gel-solução; b) 2ª transição solução-gel-solução.



**Figura 39** - Curvas de varrimento de temperaturas da solução MQG(75/25): a) Primeira transição solução-gel-solução; b) 2ª transição solução-gel-solução.

Através da análise das curvas obtidas nos testes de varrimento de temperaturas, é possível obter as temperaturas de gelificação e de fusão das soluções filmogénicas (Tabela 20).

**Tabela 20** – Temperaturas de gelificação e de fusão das soluções de mistura e da solução de gelatina de peixe GAA11+N.

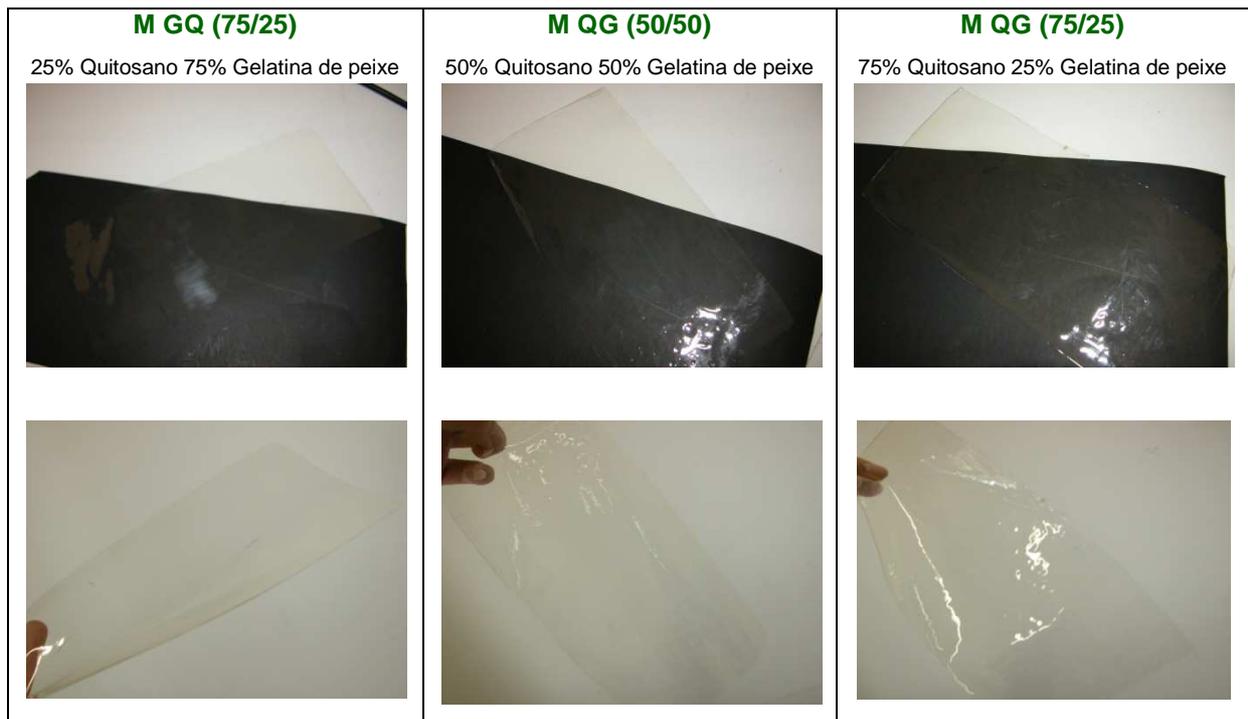
| Formulação          | 1ª Transição sol-gel-sol        |                           |                 | 2ª Transição sol-gel-sol        |                           |                 |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------|
|                     | Temperatura de Gelificação (°C) | Temperatura de Fusão (°C) | $\Delta T$ (°C) | Temperatura de Gelificação (°C) | Temperatura de Fusão (°C) | $\Delta T$ (°C) |
| <b>GAA11 +N</b>     | 14,6                            | 22,50                     | 7,90            | 14,6                            | 22,50                     | 7,90            |
| <b>M GQ (75/25)</b> | 13,13                           | 22,41                     | 9,28            | 13,13                           | 22,41                     | 9,28            |
| <b>M QG (50/50)</b> | 11,37                           | 21,60                     | 10,23           | 11,37                           | 21,6                      | 10,23           |
| <b>M QG (75/25)</b> | 5,837                           | 19,05                     | 13,21           | 6,27                            | 19,11                     | 12,84           |

Ambas as curvas do primeiro e do segundo varrimento de temperaturas das solução de mistura de quitosano e gelatina de peixe coincidem, e os cruzamentos do módulo conservativo e do módulo dissipativo ocorrem às mesmas temperaturas, ou seja, o gel obtido é termicamente reversível (Tabela 20).

Ao comparar as temperaturas de gelificação, da Tabela 20, conclui-se que, quanto maior é a proporção de quitosano na solução, menor é a sua temperatura de gelificação e menor é a temperatura a que o gel funde. Isto indica que, soluções com maior proporção de quitosano aguentam em forma de solução, sem gelificar, até temperaturas mais baixas, e têm a capacidade para fundir novamente para solução, a temperaturas também mais baixas. Também se concluir com a Tabela 21 que, quanto maior é a quantidade de quitosano na solução, maior a distância entre a temperatura de fusão e de gelificação.

### 3.2.3 Aparência dos filmes obtidos

Tanto os filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe como os filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe eram praticamente incolores e mais transparentes que os filmes de quitosano. A Figura 40 mostra a aparência dos filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe.



**Figura 40** - Aparência dos filmes obtidos a partir das misturas de quitosano e gelatina de peixe

A Figura 41 mostra a aparência dos filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe, vistos de duas perspectivas.



**Figura 41** - Aparência dos filmes com dupla camada de gelatina de peixe e quitosano

Na Figura 41 pode verificar-se que os filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe eram transparentes, sem que fosse possível distinguir a zona de separação de camadas. Estes filmes com dupla camada apresentavam uma tendência para se enrolarem sobre si.

### 3.2.4 Alteração da cor

O modelo de cores L\*a\*b\* permite estudar a diferença de cor provocada pelos filmes nas cartolinas coloridas.

A Tabela 21 indica a diferença de cor entre as cartolinas coloridas com e sem os filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe e filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe.

**Tabela 21** - Diferença de cor ( $\Delta E$ ) das cartolinas com e sem filme.

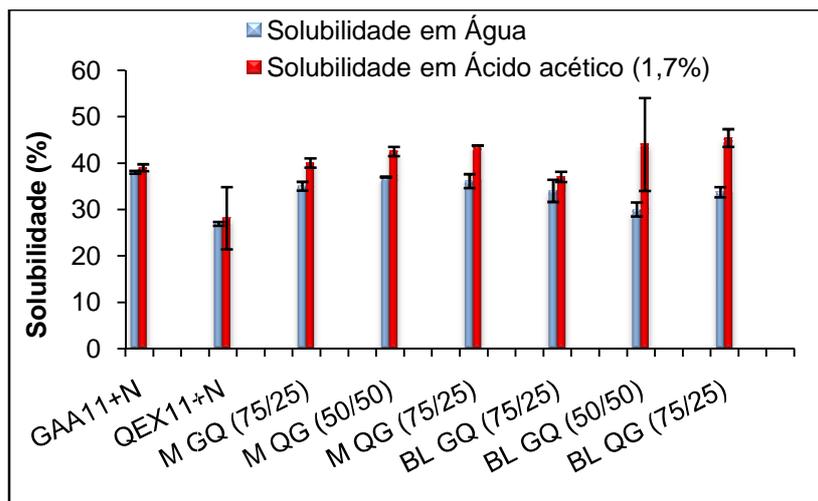
|   |                              | $\Delta E$ |         |      |       |          |       |
|---|------------------------------|------------|---------|------|-------|----------|-------|
| <b>Solução</b>  |                              | Branco     | Amarelo | Azul | Verde | Vermelho | Preto |
| <b>Filmes obtidos a partir das soluções de mistura</b>          |                              |            |         |      |       |          |       |
| <b>M GQ (75/25)</b>   | 25% Quitosano / 75% Gelatina | 4          | 6       | 5    | 7     | 7        | 7     |
| <b>M QG (50/50)</b>   | 50% Quitosano / 50% Gelatina | 6          | 7       | 7    | 7     | 7        | 8     |
| <b>M QG (75/25)</b>   | 75% Quitosano / 50% Gelatina | 6          | 6       | 7    | 7     | 7        | 7     |
| <b>Filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe</b> |                              |            |         |      |       |          |       |
| <b>BL GQ (75/25)</b>  | 25% Quitosano / 75% Gelatina | 3          | 7       | 6    | 7     | 9        | 8     |
| <b>BL GQ (50/50)</b>  | 50% Quitosano / 50% Gelatina | 5          | 7       | 6    | 7     | 7        | 7     |
| <b>BL QG (75/25)</b>  | 75% Quitosano / 50% Gelatina | 5          | 6       | 7    | 6     | 7        | 7     |

Pela análise dos valores indicados na Tabela 21, conclui-se que em todos os filmes obtidos a alteração das cores devido à aplicação dos filmes é muito baixa ( $\Delta E < 10$ ), quer para os filmes obtidos a partir da mistura, quer para os com dupla camada.

### 3.2.5 Propriedades higroscópicas

#### Solubilidade

Na Figura 42 estão representadas as solubilidades em água e em ácido acético (1,7%) dos filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe, bem como dos filmes com dupla camada de quitosano (QEX11+N) e gelatina de peixe (GAA11+N).



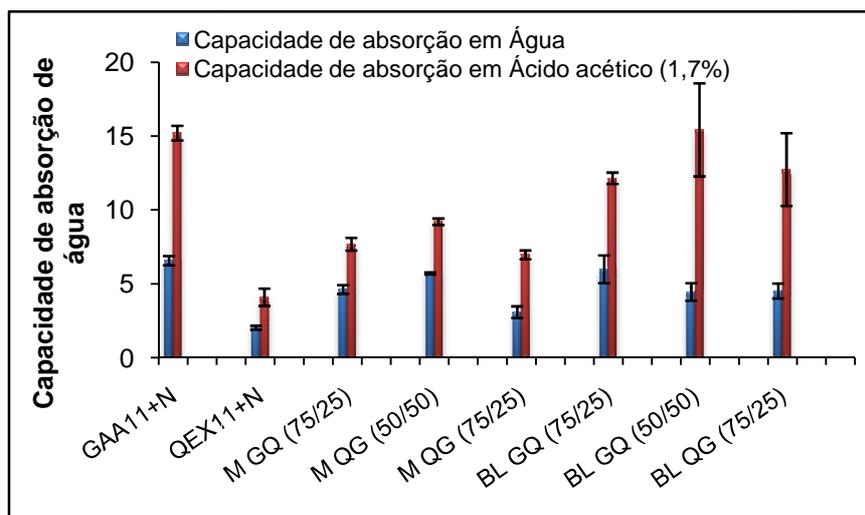
**Figura 42** – Representação gráfica da solubilidade dos filmes em água e em ácido acético.

Analisando a Figura 42 verifica-se que, no geral, a solubilidade em ácido acético é ligeiramente superior, tanto para os filmes de mistura como para os de dupla camada. Porém, não existem diferenças significativas entre solubilidade dos vários filmes estudados (a partir de mistura, de dupla camada, e mesmo só de quitosano e de gelatina).

Era esperado que estes filmes não fossem solúveis, contudo os valores obtidos revelam uma solubilidade significativa. Estes valores talvez se devam ao tipo de reticulante usado, ou ao glicerol, pelas razões que já foram anteriormente descritas no ponto 3.1.6.

### Capacidade de absorção de água

A Figura 43 indica o valor da capacidade de absorção de água dos filmes de mistura e dos filmes com dupla camada em dois meios, água e ácido acético (1,7%).



**Figura 43** – Capacidade de absorção de água em água e em ácido acético.

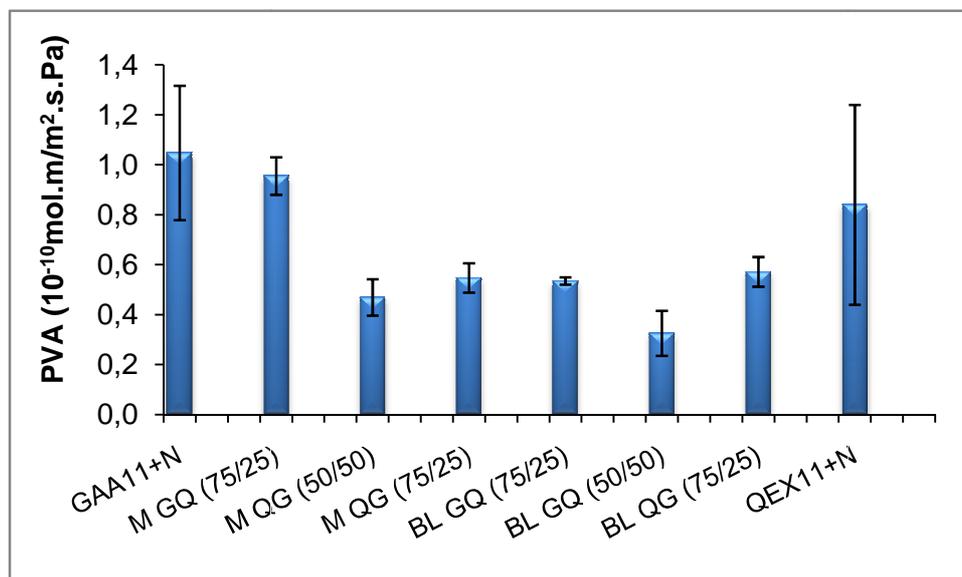
Pode ver-se pela Figura 43 que a capacidade de absorção é maior em ácido acético que em água, e em ambos os meios, é maior nos filmes com dupla camada que nos filmes de mistura.

Entre filmes de mistura, o que contém igual proporção de quitosano e gelatina (MQG(50/50)), é o que apresenta valores mais elevados de absorção em ambos os meios. Nos filmes com dupla camada, o que apresenta maior proporção em gelatina de peixe (BLGQ(75/25)), revela maior absorção em água, enquanto que em ácido, o filme constituído pela mesma proporção de quitosano e gelatina (BLGQ(50/50)), é que apresenta maior absorção.

Uma vez mais, obtiveram-se valores de absorção de água elevados. Estes valores talvez se devam ao reticulante EX810, pelas causas que já foram anteriormente descritas no ponto 3.1.5 do presente trabalho.

### 3.2.6 Permeabilidade ao vapor de água

Figura 44 indica os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes obtidos a partir da mistura de quitosano e gelatina de peixe e filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe.



**Figura 44** – Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de mistura, filmes com dupla camada, filme de quitosano e filme de gelatina de peixe

Na Figura 44 pode verificar-se que a permeabilidade ao vapor de água, entre os filmes de mistura, é maior no que contém maior proporção de gelatina de peixe (MGQ(75/2)), e menor no filme que contém igual proporção dos polímeros (MQG(50/50)). Entre os filmes

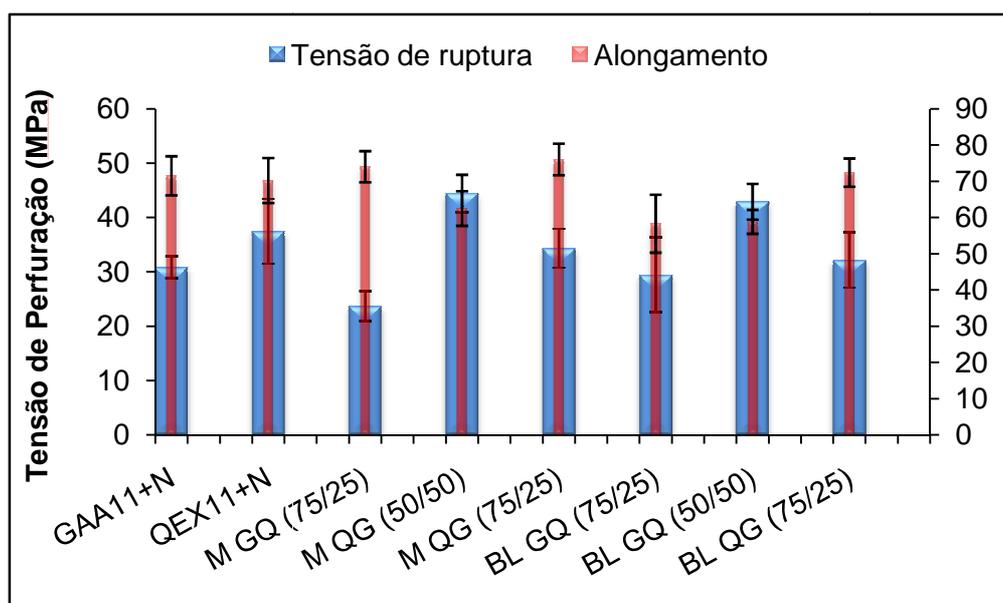
com dupla camada, o de igual proporção dos polímeros (BLGQ(50/50)) é o que apresentam menor permeabilidade.

Relativamente ao filme de quitosano (QEX11+N), este apresenta maior permeabilidade ao vapor de água que a maioria dos filmes de mistura e com dupla camada, excepto no filme de mistura com maior proporção de gelatina de peixe que apresenta uma permeabilidade superior.

### 3.2.7 Propriedades mecânicas

#### Teste de Extensão

No teste de extensão, os filmes obtidos sofreram um alongamento considerável até a força exercida pelas sondas de tracção, ser suficiente para causar a quebra do filme. Através da realização do teste de extensão, calculou-se a tensão de ruptura, o alongamento de ruptura (Figura 45) e o módulo de Young (Figura 46).

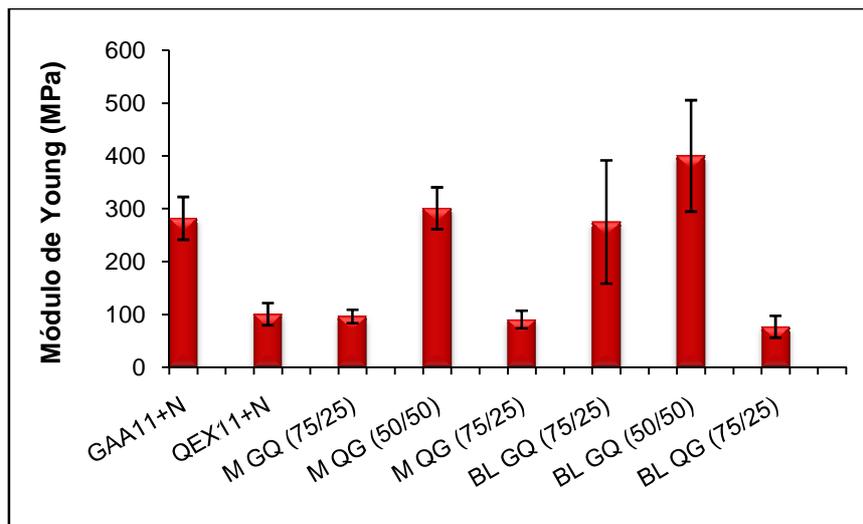


**Figura 45** – Representação gráfica da tensão de ruptura e do alongamento dos filmes

Feita uma análise dos resultados dos filmes da Figura 45 verifica-se que o filme de quitosano (QEX11+N) tem uma tensão de ruptura superior ao filme de gelatina (GAA11+N). Este facto parece influenciar no mesmo sentido os filmes de misturas e dupla camada. Verifica-se uma tendência para que, quanto maior a proporção de quitosano no filme, maior seja a tensão de ruptura. Este facto observa-se quer para os filmes de mistura, quer para os de dupla camada.

Em relação aos valores entre os filmes de mistura e entre os filmes com dupla camada, os filmes com igual proporção de quitosano e gelatina de peixe (MQG(50/50) e BLGQ(50/50)) apresentam uma tensão na ruptura superior e um alongamento inferior. Já os filmes com maior proporção de gelatina de peixe (MGQ(75/25) e BLGQ(75/25)) é o apresentam um valor de tensão de ruptura superior aos restantes.

A Figura 46 representa o valor dos módulos de Young dos filmes de mistura de quitosano e gelatina de peixe e os filmes com dupla camada de quitosano e gelatina de peixe.

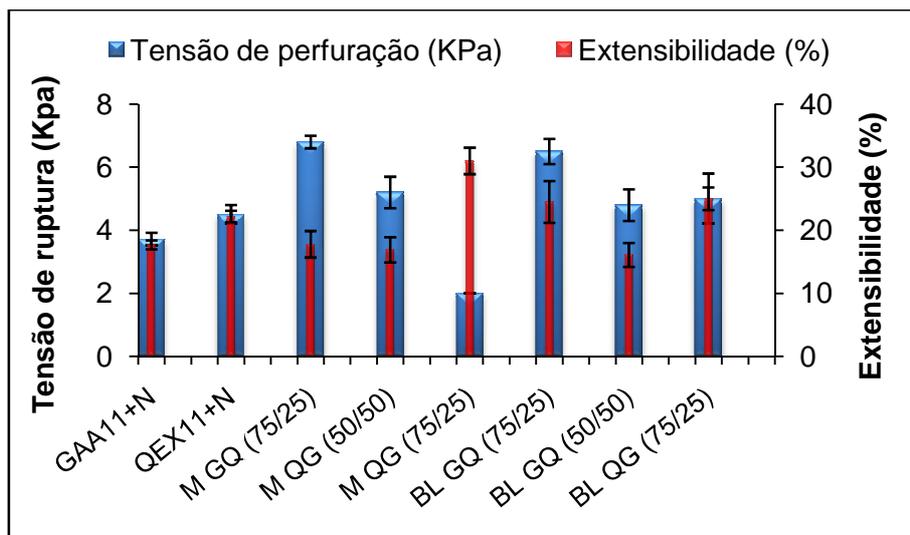


**Figura 46** – Representação gráfica do Módulo de Young dos filmes de mistura, filmes com dupla camada, filme de quitosano e filme de gelatina de peixe.

Verifica-se na Figura 46 que, no geral, os filmes com dupla camada apresentam módulos de Young superiores aos das misturas. Quer os filmes com dupla camada quer os filmes resultantes de soluções de mistura, os de maior proporção de quitosano (MQG(75/25) e BLQG(75/25)), são os que apresentam um menor módulo de Young, enquanto que os filmes de proporção igual de quitosano e gelatina de peixe (MQG(50/50) e BLGQ), são os que apresentam valores mais elevados. Os filmes MQG(75/25) e BLQG(75/25) devem estar a ser fortemente influenciados pela presença maioritária de quitosano, já que o filme de quitosano (QEX11+N) apresenta um valor bastante inferior ao obtido com o filme de gelatina de peixe (GAA11+N).

### **Teste de Perfuração**

No teste de perfuração, os filmes obtidos sofreram um alongamento considerável até a força exercida pela sonda ser capaz de perfurar o filme. Na Figura 47 pode comparar-se a tensão de perfuração e a deformação dos filmes obtidos.



**Figura 47** – Representação gráfica da tensão de perfuração e deformação dos filmes de mistura, filmes com dupla camada, filme de quitosano e filme de gelatina de peixe.

As propriedades mecânicas, quer dos filmes de mistura quer dos com dupla camada, obtidas com os testes de perfuração (Figura 47), revelam uma tendência para, quanto maior a proporção de quitosano no filme, menor a tensão de perfuração.

Nos filmes de mistura verifica-se que, quanto maior a proporção de quitosano no filmes, maior a deformação do filme.

## 4. Conclusões

Neste trabalho foi realizado um delineamento experimental (composto central rotativo) para a obtenção de filmes à base de quitosano, em que a concentração de quitosano, a concentração de ácido acético e a razão molar de reticulante/polímero (EX810) correspondem às variáveis independentes. A realização deste trabalho permitiu obter conclusões relativamente ao efeito das variáveis independentes nas propriedades reológicas das soluções filmogénicas; e nas propriedades mecânicas, higroscópicas e de permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Foram ainda obtidos filmes a partir de mistura de quitosano e gelatina de peixe, e com duas camadas, uma de quitosano sobre outra gelatina de peixe.

Nos testes oscilatórios realizados às soluções filmogénicas de quitosano verificou-se que o valor dos módulos conservativo e dissipativo aumenta com a frequência, e inicialmente, a natureza viscosa do fluido prevalece sobre a natureza elástica. Conclui-se com isto que não existe nenhuma estruturação, e que o reticulante ainda não terá actuado de forma significativa. O valor de ambos os módulos aumenta com a concentração de quitosano na solução. As curvas de escoamento realizadas às soluções filmogénicas de quitosano permitiram concluir que viscosidade da solução filmogénica aumenta com o aumento da concentração de quitosano, bem como o carácter reofluídificante da solução.

Os filmes de quitosano obtidos, apesar da cor amarelada, eram transparentes e bastante semelhantes entre si.

Pode concluir-se que os filmes de quitosano obtidos são todos bastante hidrofílicos, e apresentaram isotermas de adsorção idênticas (quanto maior a actividade da água da solução a que a amostra de filme esteve submetida, maior a adsorção de água).

Nos filmes reticulados observou-se uma menor solubilidade em água e em ácido acético, que nos filmes sem reticulante. Verificou-se que a solubilidade dos filmes aumenta para razões molares reticulante/polímero muito baixas (talvez por não existir reticulante suficiente) e para razões molares muito elevadas de reticulante (possivelmente porque existe reticulante em excesso, que é hidrofílico e pode favorecer a desintegração do filme). Também se verificou que a solubilidade, em ambos os meios, diminui com o aumento da concentração de quitosano. O aumento da concentração de polímero poderá favorecer a obtenção de um filme mais coeso.

Verificou-se que a capacidade de absorção de água dos filmes de quitosano, é maior em ácido acético que em água. Talvez isto se deva ao baixo pH da solução que, pode deslocar o equilíbrio sólido-líquido para uma maior entrada de água. Verificou-se que um aumento das concentrações de ácido acético e de quitosano favorece a absorção de água.

No que diz respeito ao efeito da razão molar de reticulante/polímero, observou-se uma menor absorção de água e solubilidade em água e ácido, para valores centrais de razão molar reticulante/polímero, mas ainda relativamente elevada. Este facto pode ser devido ao excesso de reticulante na matriz polimérica e à sua natureza hidrofílica e estrutura linear e alongada, que pode criar espaços e facilitar a absorção de água e a desintegração da matriz polimérica. Por outro lado, a reacção de reticulação pode não ter sido eficaz.

As propriedades de barreira ao vapor de água são melhoradas com o aumento da concentração de quitosano e aumento do pH da solução. Quanto ao efeito do reticulante, verificou-se que os filmes sem reticulante apresentaram uma menor PVA. Este facto pode dever-se mais uma vez à sua natureza hidrofílica e elevado peso molecular que, apesar de promover a criação de ligações intra e inter-cadeias, pode aumentar a afinidade para a água e o espaço disponível à difusão.

Relativamente às propriedades mecânicas, quer nos testes de extensão quer nos de perfuração, concluiu-se que a tensão de ruptura é positivamente afectada pela diminuição do pH, bem como pelo aumento de reticulante, uma vez que aumentam as ligações entre as cadeias de polímero tornando a matriz mais resistente. Já o alongamento do filme só foi positivamente afectado pela concentração de quitosano.

Nos testes oscilatórios realizados às soluções de mistura de quitosano e gelatina de peixe, o valor dos módulos conservativo e dissipativo aumentaram com a frequência, indicando que se está na presença de uma solução viscosa, sem estruturação, e em que o reticulante também ainda não actuou. Conclui-se ainda que a proporção de quitosano na solução afectou significativamente (aumentou) o valor dos módulos nos testes oscilatórios; bem como a viscosidade da solução e o carácter reofluidificante nas curvas de escoamento.

Dos testes de varrimento de temperaturas às soluções de mistura de polímeros, concluiu-se que, o aumento da proporção de quitosano na solução de mistura provocou uma diminuição na temperatura de gelificação e temperatura de fusão.

Verificou-se que a solubilidade em água e em ácido, entre os filmes de mistura, e entre os filmes com dupla camada, não sofreu variações significativas. Apesar disso, os filmes de

mistura apresentam valores de solubilidade inferiores ao dos filmes com dupla camada. Os valores relativamente elevados da solubilidade destes filmes, poderão, uma vez mais, ser consequência do tipo de reticulante usado. Observou-se ainda que as estratégias de mistura e dupla camada aumentaram a solubilidade em água e em ácido, relativamente aos filmes obtidos só com quitosano.

Quando comparados com os filmes preparados só com quitosano, os filmes de mistura e com dupla camada aumentaram significativamente a capacidade de absorção de água. Já a permeabilidade ao vapor de água nos filmes de mistura, é maior no filme com maior proporção de gelatina de peixe, enquanto que, os filmes de mistura e com dupla camada de igual proporção de quitosano e gelatina apresentam uma PVA mais baixa.

Nos testes de perfuração concluiu-se que, quer nos filmes de mistura, quer nos com dupla camada, o aumento da proporção de quitosano causa a diminuição da tensão de perfuração e o aumento do alongamento na ruptura.

## 5. Trabalho futuro

Como trabalho futuro, seria importante estudar os seguintes tópicos:

- O efeito da formulação na actividade antimicrobiana dos filmes obtidos
- Optimização das condições de reticulação, de modo a minimizar a absorção de água, a solubilidade dos filmes e a permeabilidade ao vapor de água. Estudar outros agentes de reticulação.
- Substituição do plastificante utilizado neste estudo (glicerol), por outro que não influencie as propriedades higroscópicas.
- Aplicação dos filmes produzidos em casos de estudo, nomeadamente como revestimentos em queijo de leite cru.

## 6. Bibliografia

Almeida, T.L. (2009) Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosano compatível com o sistema dermo-epidérmico. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em ciências na área de tecnologia nuclear. São Paulo.

Alves, V.D., Costa, N., Coelho, I.M. (2010). Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. *Carbohydrate Polymers*. 69, 269–276.

Arvanitoyannis, I.S., Nakayama, A., Aiba, S. (1998). Chitosan and gelatin based edible film: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*. 37, 371-382.

Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Fook, M. V. L., Costa, A. C. F. M. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 23, 27-34.

Bégin A., Calsteren M. V. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 26, 63–7.

Belitz, H.D., Grosch, W. (1987). Food Chemistry. Springer-Verlag. Berlin. P. 31.

Cárdenas, G., Anaya, P., Plessing, S.V., Rojas, C., Sepúlveda, J. (2008). Chitosan composite films: Biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med*. 19, 2397–2405.

Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application. *Food Chemistry*. 114, 1173–1182.

Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., Nishi, N. and Tokura, S. (1996). Facile Preparation and Inclusion Ability of a Chitosan Derivative Bearing Carboxymethyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*. 9, 29-34.

Gorna, K., Hund, M., Vučak, M., Gröhn, F., Wegner, G. (2008). Amorphous calcium carbonate in form of spherical nanosized particles and its application as fillers for polymers. *Materials Science and Engineering: A*. 477, 217-225.

Hirano, S. (1996). Chitin biotechnology applications. *Biotechnology Annual Review*. 2, 237-255.

Holappa, J., Hjálmarsdóttir, M., Másson, M., Rúnarsson, O., Asplund, T., Soininen, P., Nevalainen, T., Jarvinen, T. (2006). Antimicrobial activity of chitosan N-betainates. *Carbohydrate Polymers*. 65, 114–118.

Jung, G., Sahl, H.G. (1991). Nisin and novel lantibiotics: proceedings of the First International workshop on lantibiotics. *ESCOM Science Publishers B.V.* P. 3

Kittur, F. S., Kumar, K. R., Tharanathan, R. N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 206, 44-47.

Kolodziejska, I., Piotrowska, B. (2006). The water vapour permeability, properties and solubility of fish gelatine-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food chemistry*. 103, 295-300.

Kurita K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in polymer science*. 26, 1921–1971.

Lang, K., Steinberg, M: P. (1981). Linearization of the Water Sorption Isotherm for Homogeneous Ingredients over a, 0.30 - 0.95. *Journal of food science*. 46, 1450-1452.

Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. (2001). Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*. 48, 179-190.

Majeti, N.V., Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan, *Reactive & Functional Polymers*. 46, 1–27.

Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino M. N., Zaritzky, N. E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*. 75, 453-460.

McCloskey, B. D., Ju, H., Freeman, B. D. (2010). Composite membranes based on a selective Chitosan-Poly(ethylene glycol) hybrid layer: synthesis, characterization, and performance in oil-water purification. *American Chemical Society. Ind. Eng. Chem*. 49, 366–373.

Mohanty, A.K., Misra, M., Drzal, L.T. (2005). Natural Fibers, biopolymers and biocomposites. Taylor & Francis. P. 705, 706.

Monteiro Jr, O.A.C.; Airoidi, C. (1999) Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*. 26, 119-118.

No, K., Park, Y., Lee, H., Meyers, P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 74, 65– 72.

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*. 21, 240-245.

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 72, 1891-1895.

Pranoto et al., Y.; Rakshit, S.K.; Salokhe, V.M. (2005) Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 38, 859–865.

Rodrigues, T. A. F. R. (2008). Preparação e caracterização de membranas biodegradáveis. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica. Lisboa.

Schulz, D., Pereira, M.A., Bonelli, R. R.; Nunes, M. M., Batista, C. R. V. (2003). Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alim. Nutr., Araraquara*, 14, Nr. 2, 229-235.

Shahidi, F.; Arachchi, J.K:V.; Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Food Science & Technology*. 10, 37-51.

Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R.; Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 274, 1–33.

Tomihata, K., Ikada, Y. (1997). Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*. 18, Nr.3, 189-195.

Zheng L.Y., Zhu Y.F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrates Polymer*. 54, 527–30.

Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*. 70, Nr. 1. 45-51.

## 7. Anexos

### Anexo I

#### pH das soluções filmogénicas

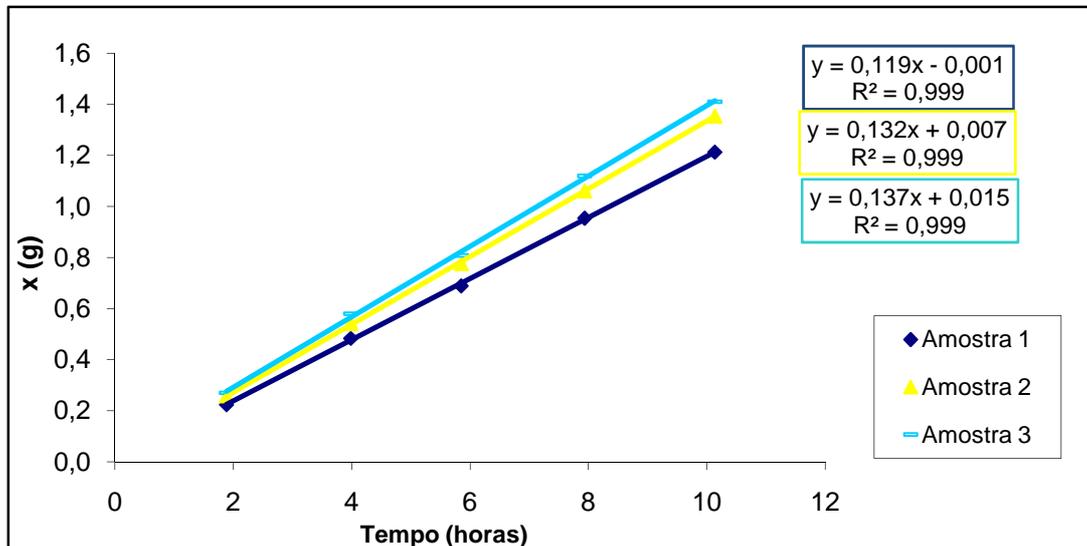
O pH das soluções filmogénicas foi determinado por um medidor de pH à temperatura ambiente

Tabela 22 – pH referente às soluções filmogénicas.

| Solução                                      |                                       | pH   |      |
|--|---------------------------------------|------|------|
| <b>QEX1+N</b>                                | 1% Quit / 0,9% AA / 1,18906 EX810     | 3,91 |      |
| <b>QEX2+N</b>                                | 2% Quit / 0,9% AA / 1,18906 EX810     | 4,04 |      |
| <b>QEX3+N</b>                                | 1% Quit / 2,5% AA / 1,18906 EX810     | 3,47 |      |
| <b>QEX4+N</b>                                | 2% Quit / 2,5% AA / 1,18906 EX810     | 3,75 |      |
| <b>QEX5+N</b>                                | 1% Quit / 0,9% AA / 3,18906 EX810     | 3,95 |      |
| <b>QEX6+N</b>                                | 2% Quit / 0,9% AA / 3,18906 EX810     | 4,46 |      |
| <b>QEX7+N</b>                                | 1% Quit / 2,5% AA / 3,18906 EX810     | 3,40 |      |
| <b>QEX8+N</b>                                | 2% Quit / 2,5% AA / 3,18906 EX810     | 3,73 |      |
| <b>QEX9+N</b>                                | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810         | 3,77 |      |
| <b>QEX10+N</b>                               | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810         | 3,83 |      |
| <b>QEX11+N</b>                               | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810         | 3,81 |      |
| <b>QEX12+N</b>                               | 1,5% Quit / 1,7% AA / 2 EX810         | 3,78 |      |
| <b>QEX13+N</b>                               | 0,659% Quit / 1,7% AA / 2 EX810       | 3,48 |      |
| <b>QEX14+N</b>                               | 2,34% Quit / 1,7% AA / 2 EX810        | 4,45 |      |
| <b>QEX15+N</b>                               | 1,5% Quit / 0,35% AA / 2 EX810        | 5,65 |      |
| <b>QEX16+N</b>                               | 1,5% Quit / 3% AA / 2 EX810           | 3,53 |      |
| <b>QEX17+N</b>                               | 1,5% Quit / 1,7% AA                   | 3,78 |      |
| <b>QEX18+N</b>                               | 1,5% Quit / 1,7% AA / 4 EX810         | 3,50 |      |
| <b>Soluções de Mistura</b>                   |                                       |      |      |
| <b>M QG (50/50)</b>                          | 50% Quitosano / 50% Gelatina de peixe | 3,81 |      |
| <b>M QG (75/25)</b>                          | 75% Quitosano / 25% Gelatina de peixe | 3,82 |      |
| <b>Soluções para filmes com dupla camada</b> |                                       |      |      |
| <b>BL QG (75/25)</b>                         | Solução de Gelatina de peixe          | 25%  | 3,43 |
|  | Solução de Quitosano                  | 75%  | 3,84 |

## Anexo II

### Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosano



**Figura 48** – Rectas de permeabilidade ao vapor de água

O valor de  $x(g)$  obtém-se a partir da diferença entre o peso inicial do conjunto placa+KNO<sub>3</sub>+filme e o peso depois do conjunto estar exposto nas condições referidas no ponto 3.1.6.

A análise estatística permitiu a obtenção da Tabela 19.

**Tabela 23** – Tabela ANOVA referente ao efeito dos factores na PVA (CP- concentração de polímero, AA-Concentração de ácido acético, R-razão molar de reticulante/polímero).

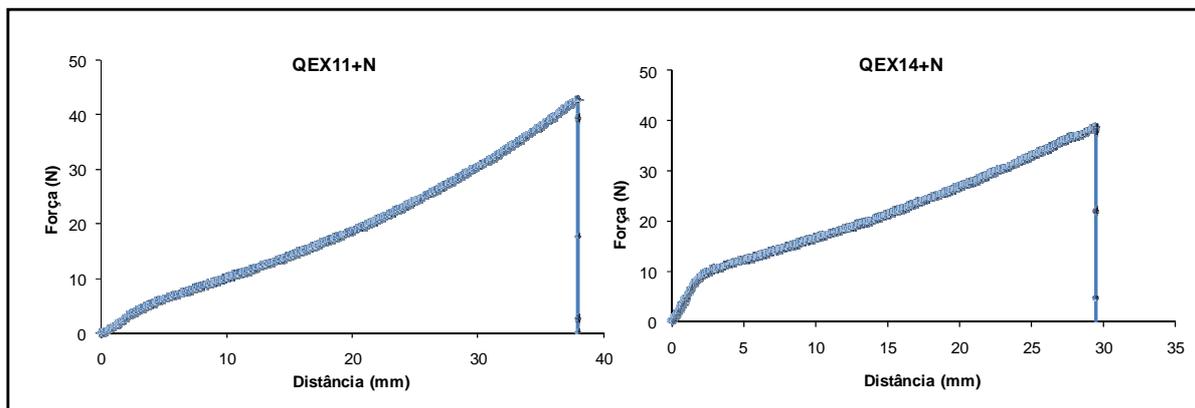
| Factor     | <i>p-value</i> |
|------------|----------------|
| (1) CP (L) | 0,782          |
| CP (Q)     | 0,277          |
| (2) AA (L) | 0,417          |
| AA (Q)     | 0,432          |
| (3) R (L)  | 0,273          |
| R (Q)      | 0,123          |
| 1L by 1L   | 0,240          |
| 1L by 2L   | 0,121          |
| R-sqr      | 0,580          |
| R-Adj      | 0,110          |

## Anexo III

### Teste de extensão

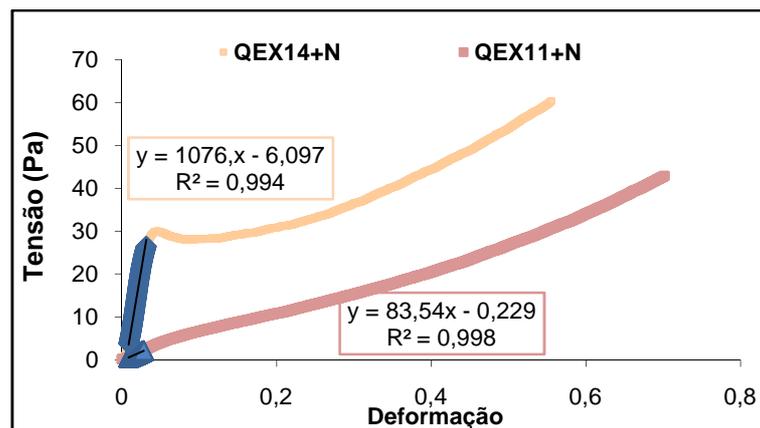
#### Cálculo do módulo de Young

Através dos dados obtidos pelo texturómetro (Figura 44) é possível calcular a tensão de ruptura e o alongamento na ruptura. A partir destes parâmetros é possível fazer uma representação gráfica da tensão de ruptura em função do alongamento (Figura 45)



**Figura 49** – Exemplo de curvas de força em função da distância obtidas nos testes de extensão.

Sendo que a tensão é quociente da força pela área da secção recta e o alongamento é o quociente da distância pelo comprimento inicial da amostra, pode obter-se a tensão em função da deformação, e a partir daí, pode tirar-se o módulo de Young (Figura 45)



**Figura 50** – Exemplo de curvas de tensão em função da deformação

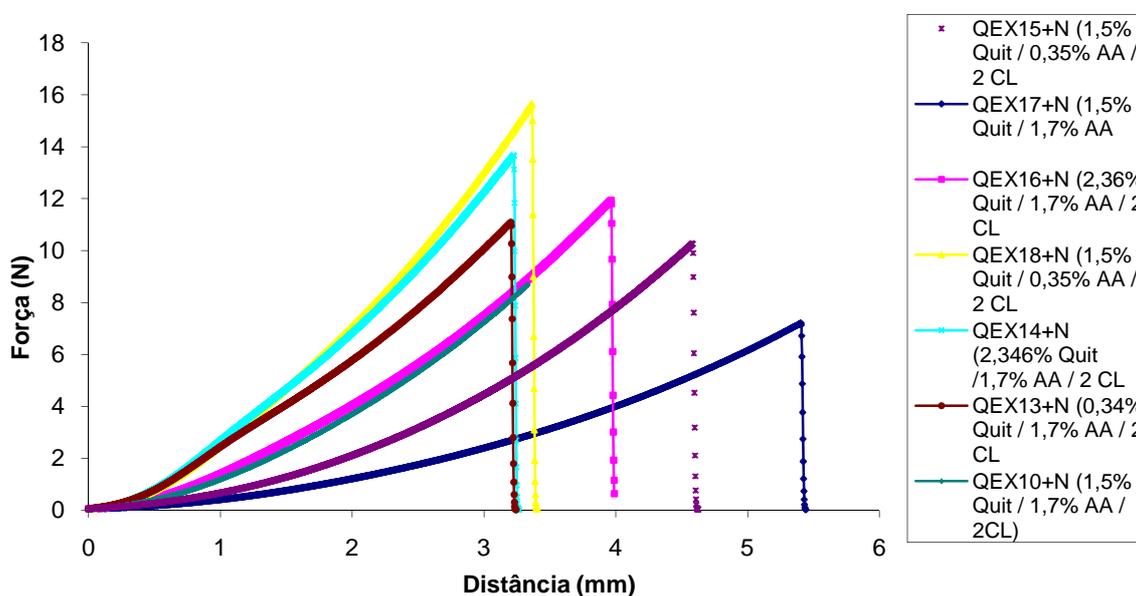
O declive da recta obtido, quando se traça a linha de tendência nos pontos iniciais (são lineares) da curva de tensão em função do alongamento (Figura 45), corresponde ao modelo de Young, já que este é o quociente entre a tensão e o alongamento.

## Análise estatística

**Tabela 24** - Tabela ANOVA do efeito dos factores nos parâmetros obtidos no teste de extensão (CP-concentração de polímero, AA-Concentração de ácido acético, R-razão molar de reticulante/polímero).

| Factor     | p-value     |                   |                 |
|------------|-------------|-------------------|-----------------|
|            | Alongamento | Tensão de Ruptura | Módulo de Young |
| (1) CP (L) | 0,981       | 0,255             | 0,649           |
| CP (Q)     | 0,528       | 0,593             | 0,348           |
| (2) AA (L) | 0,197       | 0,296             | 0,270           |
| AA (Q)     | 0,198       | 0,983             | 0,597           |
| (3) R (L)  | 0,680       | 0,404             | 0,385           |
| R (Q)      | 0,185       | 0,774             | 0,316           |
| 1L by 1L   | 0,829       | 0,505             | 0,301           |
| 1L by 2L   | 0,557       | 0,809             | 0,333           |
| 2L by 3L   | 0,687       | 0,280             | 0,314           |
| R-sqr      | 0,494       | 0,445             | 0,536           |
| R-Adj      | 0,000       | 0,000             | 0,015           |

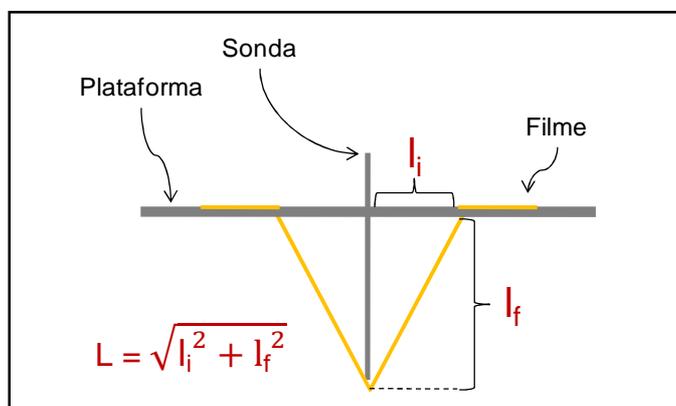
## Teste de perfuração



**Figura 51** – Exemplo de curvas resultantes da força em função do tempo obtido pelo teste de perfuração

## Cálculo da deformação

A deformação pode ser calculada a partir da diferença entre o alongamento na perfuração (L) e a distância inicial ( $l_i$ ) (Figura 22). O alongamento na perfuração é a hipotenusa obtida a partir da soma da distância inicial ( $l_i$ ) e da distância final ( $l_f$ ).



**Figura 52** – Esquema representativo dos parâmetros necessários ao cálculo da deformação na ruptura

## Análise estatística

**Tabela 25** – Tabela ANOVA referente ao efeito dos factores nos parâmetros obtidos no teste de perfuração (CP- concentração de polímero, AA-Concentração de ácido acético, R-razão molar de reticulante/polímero).

| <i>p-value</i> |            |                      |
|----------------|------------|----------------------|
| Factor         | Deformação | Tensão de perfuração |
| (4) CP (L)     | 0,132      | 0,168                |
| CP (Q)         | 0,634      | 0,193                |
| (5) AA (L)     | 0,950      | 0,429                |
| AA (Q)         | 0,184      | 0,703                |
| (6) R (L)      | 0,248      | 0,234                |
| R (Q)          | 0,106      | 0,855                |
| 1L by 1L       | 0,275      | 0,339                |
| 1L by 2L       | 0,660      | 0,172                |
| 2L by 3L       | 0,189      | 0,642                |
| R-sqr          | 0,690      | 0,573                |
| R-Adj          | 0,291      | 0,092                |