



ANDRÉA CRISTIANE KRAUSE BIERHALZ

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES DE ALGINATO IMPREGNADOS
COM NATAMICINA E AFERIÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICÓTICO**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos

ANDRÉA CRISTIANE KRAUSE BIERHALZ

DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES DE ALGINATO IMPREGNADOS COM NATAMICINA E AFERIÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICÓTICO

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em
Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Mariana Altenhofen da Silva (Universidade Federal de Alfenas)

Dr^a. Mara Elga Medeiros Braga (Universidade de Coimbra/ Portugal)

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANDRÉA CRISTIANE
KRAUSE BIERHALZ E ORIENTADA PELO PROF. DR.
THEO GUENTER KIECKBUSCH

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

B477d Bierhalz, Andréa Cristiane Krause, 1981-
Desenvolvimento de biofilmes de alginato impregnados com natamicina e
aferição de seu potencial antimicótico / Andréa Cristiane Krause Bierhalz. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Theo Guenter Kieckbusch.
Coorientador: Mariana Altenhofen da Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Alginatos. 2. Embalagem ativa. 3. Reticulação. 4. Antimicrobianos. 5.
Difusividade efetiva. I. Kieckbusch, Theo Guenter, 1942-. II. Silva, Mariana
Altenhofen da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of alginate films impregnated with natamycin and evaluation of its antimycotic potential

Palavras-chave em inglês:

Alginates

Active packaging

Crosslinking

Antimicrobial

Effective diffusivity

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Theo Guenter Kieckbusch [Orientador]

Ângela Maria Moraes

Érica Maróstica Zactiti

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Fabio Yamashita

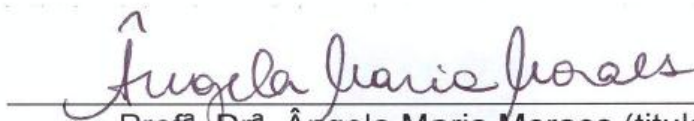
Data de defesa: 28-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

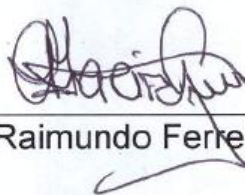
Tese de Doutorado defendida por Andréa Cristiane Krause Bierhalz e aprovada em 28 de abril de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



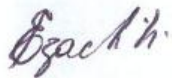
Prof. Dr. – Theo Guenter Kieckbusch (Orientador)



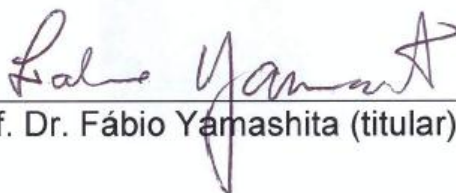
Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes (titular)



Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso (titular)



Dr^a. Érica Maróstica Zactiti (titular)



Prof. Dr. Fábio Yamashita (titular)

RESUMO

Filmes ativos à base de alginato de sódio reticulados com íons cálcio e/ou bário e contendo natamicina como antimicrobiano foram confeccionados por um processo envolvendo duas etapas. Inicialmente, filmes com baixo grau de reticulação foram formados por *casting* (1º estágio). Após a secagem, estes pré-filmes foram submetidos a um segundo tratamento por imersão em soluções mais concentradas de agentes reticulantes, gerando quatro diferentes formulações (*Ca-Ca*, *Ba-Ca*, *Ba-Ba* e *Ca-Ba*, dependendo do íon utilizado no 1º e no 2º estágio de reticulação). Foram avaliadas as propriedades físico-químicas, a cinética de liberação da natamicina e o efeito antimicótico *in vitro* e em fatias de queijo Prato das diferentes formulações. O Ba^{2+} apresentou potencialidade para uso em filmes de alginato somente quando a reticulação era combinada com íons Ca^{2+} . Os filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca* apresentaram características adequadas para aplicações como embalagem. Os filmes *Ba-Ba* tiveram um aspecto insatisfatório, alta solubilidade em água e alto intumescimento. O tempo de imersão na solução reticuladora influenciou as propriedades dos filmes *Ca-Ba*, que apresentaram maior permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio, maior opacidade e rugosidade, consequência de uma reticulação ineficiente da estrutura interna do filme. Três métodos de incorporação de natamicina foram avaliados: o método convencional, em que o antimicrobiano é adicionado diretamente à solução polimérica, a impregnação por imersão dos filmes em soluções contendo natamicina e a impregnação por solvente supercrítico. Filmes ativos confeccionados pelo método convencional apresentaram maior quantidade de natamicina, mas a formação de cristais na superfície afetou a sua transparência, rugosidade e resistência mecânica. O processamento com CO_2 supercrítico (200 bar, 40°C) e etanol como cossolvente (10% molar) resultou em filmes *Ca-Ca* com alta transparência devido à micronização da natamicina, e com carga adequada de antimicrobiano, mas o processo é extremamente lento. Todos os filmes contendo natamicina apresentaram efeito antimicótico frente às espécies testadas, porém uma inibição menos intensa do crescimento fúngico foi observada para os filmes *Ba-Ca*. Em amostras de queijos Prato, os filmes *Ca-Ca* sem natamicina foram capazes de inibir o crescimento microbiano por 5 dias a 25°C. Filmes ativos impediram o crescimento por até 30 dias a 25°C. Ensaio de liberação da natamicina em água apresentaram bom ajuste ao modelo difusional da segunda Lei de Fick, com valores de difusividades na ordem de $10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ para os filmes impregnados pelo método convencional e de $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ para os filmes processados com CO_2 supercrítico. Um novo modelo baseado na solução matemática de difusão em dois meios compostos semi-infinitos foi desenvolvido e aplicado aos dados de liberação de natamicina em materiais semi-sólidos (géis de ágar e gelatina e fatias de queijo). Utilizando difusividades de natamicina nos filmes com a mesma atividade de água dos meios sólidos de liberação, o modelo foi adequado para estimar a difusividade nos géis e no queijo.

Palavras-chave: alginatos, embalagem ativa, reticulação, antimicrobianos, difusividade efetiva.

ABSTRACT

Alginate antimycotic films crosslinked with calcium and/or barium ions and containing natamycin as antimicrobial agent were prepared in a two step process. Initially, films with a low degree of reticulation were obtained by casting. After solvent evaporation, these pre-films were further crosslinked by immersion in a more concentrated Ca^{2+} or Ba^{2+} solution resulting in four different formulations (*Ca-Ca*, *Ba-Ca*, *Ba-Ba* e *Ca-Ba*, depending on the ion used in the 1st and 2nd stage). Physico-chemical properties, release behavior of natamycin and antimicrobial activity *in vitro* and on cheese slices of the different film formulations were monitored. Ba^{2+} ions were relevant as crosslinking agents only if combined with Ca^{2+} ions. *Ca-Ca* and *Ba-Ca* films presented appropriated features as packaging material. *Ba-Ba* films showed unsuitable attributes such as heterogeneities and high soluble matter in water and high swelling degree. The immersion time in the crosslinking solution affected the properties of *Ca-Ba* films. These films showed high opacity, surface roughness and water vapor and oxygen permeabilities due to inefficient bulk crosslinking. Three loading methods were tested: the conventional method, with natamycin added directly to the polymeric film forming solution, the absorption technique when prepared films are immersed in solutions containing natamycin and by supercritical CO_2 impregnation. Active films manufactured by the conventional method showed higher loading capacities, but crystal deposits across the film affected their transparency, roughness and mechanical properties. The supercritical method (200 bar, 40°C) using ethanol as cosolvent (10% molar) resulted in *Ca-Ca* transparent films due to natamycin micronization, with suitable loading yields but the process is extremely time-consuming. All films containing natamycin exhibited antimycotic activity against the tested species and the smallest halo inhibition diameter was observed for *Ba-Ca* films. On cheese slices, *Ca-Ca* films without natamycin were able to inhibit the microbial growth for 5 days at 25°C, due to low O_2 permeability. Active films inhibit the growth up to 30 days at 25°C. Data of natamycin release in water fitted well to Fick's diffusional model, with effective diffusivity values of the order of $10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ in conventional loaded films but $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ for CO_2 loaded films. Release tests in aqueous ethanolic solutions indicated a strong influence of the water activity on the diffusivities. A new release model based on the mathematical solution of the diffusion in two semi-infinite composite media was developed and applied to data of natamycin transferred to semi-solid material (agar and gelatine gels, and cheese slices). Using natamycin diffusivities in films with the same water activity of the solid release media, the model was able to estimate natamycin diffusivities in the gels and in cheese.

Key-words: alginates, active packaging, crosslinking, antimicrobial, effective diffusivity.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
NOMENCLATURA.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Alginato	5
3.2 Filmes de alginato	8
3.3 Reticulação com íons divalentes	10
3.3.1 Considerações sobre o bário e o cálcio	13
3.4 Plastificantes	15
3.5 Filmes ativos antimicrobianos.....	17
3.6 Natamicina	19
3.7 Incorporação de antimicrobianos aos filmes poliméricos	22
3.7.1 Incorporação de antimicrobianos com fluidos supercríticos	23
3.8 Difusividade de substâncias ativas em filmes poliméricos	24
3.9 Modelagem da liberação controlada de substâncias ativas incorporadas em embalagens utilizadas em alimentos semi-sólidos	29
3.10 Queijos: características e aspectos microbiológicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais.....	35
4.1.1 Materiais utilizados para a elaboração dos filmes.....	35
4.1.2 Géis simulantes de alimentos.....	35
4.1.3 Alimento processado	35
4.2 Confeção dos filmes	36
4.2.1 Incorporação da natamicina.....	38
4.3 Caracterização dos filmes	41

4.3.1	Aspecto visual	41
4.3.2	Espessura	42
4.3.3	Conteúdo de umidade	42
4.3.4	Massa solubilizável em água	42
4.3.5	Grau de intumescimento (GI).....	42
4.3.6	Propriedades mecânicas	43
4.3.7	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	44
4.3.8	Permeabilidade ao oxigênio.....	45
4.3.9	Cor e opacidade	46
4.3.10	Microestrutura e análise elementar qualitativa	47
4.3.11	Teor de cálcio e bário	48
4.3.12	Isotermas de sorção de umidade.....	48
4.3.13	Ângulo de contato.....	50
4.3.14	Cristalinidade.....	50
4.3.15	Rugosidade	51
4.3.16	Análise termogravimétrica	51
4.3.17	Espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR)	51
4.4	Ensaio de liberação	52
4.5	Modelagem matemática	54
4.6	Determinação da eficiência antimicrobiana	56
4.6.1	Preparação do inóculo.....	56
4.6.2	Teste de difusão em ágar	56
4.6.3	Determinação da eficiência antimicrobiana no queijo	57
4.7	Microscopia ótica.....	58
4.8	Análise estatística dos dados	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Otimização das condições de reticulação.....	59
5.2	Confecção e caracterização dos filmes ativos antimicrobianos	67
5.2.1	Morfologia.....	68
5.2.2	Análise elementar qualitativa (EDS)	71
5.2.3	Espessura e permeabilidade ao vapor de água	72
5.2.4	Grau de intumescimento.....	74
5.2.5	Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água	75
5.2.6	Resistência mecânica.....	76

5.2.7	Ângulo de contato e rugosidade	78
5.2.8	Cor e opacidade	80
5.2.9	Análise termogravimétrica	84
5.2.10	Permeabilidade ao oxigênio.....	87
5.2.11	Isotermas de sorção	90
5.2.12	FTIR - ATR	94
5.2.13	Cristalinidade.....	96
5.3	Ensaio de liberação de natamicina em água	97
5.4	Morfologia após a liberação.....	105
5.5	Teor de bário e cálcio	106
5.6	Métodos alternativos de incorporação da natamicina	108
5.6.1	Impregnação no 2º estágio de reticulação	108
5.6.2	Impregnação no filme acabado.....	110
5.6.2.2	Impregnação com CO ₂ supercrítico	114
5.6.3	Comparação entre os métodos de impregnação	116
5.7	Efeito antimicrobiano - in vitro	126
5.8	Efeito antimicrobiano – em queijos	129
5.9	Microscopia ótica dos queijos armazenados a 8°C.....	137
5.10	Liberação em soluções hidroetanólicas	139
5.11	Liberação em sólidos.....	143
6	CONCLUSÕES.....	153
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
APÊNDICE A – Meios semi-infinitos.....		176
APÊNDICE B – Dedução da Equação 4.12.....		179
APÊNDICE C – Formulação dos meios de cultura.....		182
APÊNDICE D – Dados da impregnação por imersão.....		184
APÊNDICE E – Ensaio de penetração de natamicina em queijos.....		186

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta
ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

Ao meu esposo Jefferson, por todo carinho, companheirismo, paciência e constante incentivo na busca de meus ideais.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida.

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

À Dr^a. Mara Braga e à prof^a. Mariana Altenhofen da Silva pela coorientação, pelos conselhos e por compartilhar suas experiências como pesquisadoras.

Aos membros da banca, prof^a. Ângela Maria Moraes, Dr^a Érica Maróstica Zactiti, prof. Carlos Raimundo Ferreira Grosso e prof. Fabio Yamashita pela minuciosa correção e pelas sugestões apresentadas para redação final deste trabalho.

Ao prof. Hermínio Sousa e todo o seu grupo de pesquisa, pela acolhida e pelo apoio durante o período de estágio na Universidade de Coimbra.

À prof^a. Sandra Rocha, por disponibilizar os equipamentos para análises de rugosidade e de atividade de água.

À prof^a. Meuris Gurgel e ao prof. Ambrósio De Almeida Neto, pela disponibilidade em ajudar nas análises de espectrofotometria de absorção atômica.

A todos os amigos e colegas da FEQ, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

Aos funcionários da FEQ, em especial aos técnicos Celso Camargo, Adilson Afonso e Kelly Palma, que colaboraram para a realização deste trabalho.

À empresa Danisco, pela doação da natamicina, imprescindível para a realização da pesquisa.

Ao CNPq e a Capes e pelo apoio financeiro.

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

NOMENCLATURA

A	Alongamento do filme	%
A_e	Área exposta do filme	m^2
A_s	Área da seção transversal do filme	m^2
a_w	Atividade de água	-
C	Constante do modelo GAB	-
c	Concentração	g/L
C^A	Concentração do migrante no alimento	mg/cm^3
C^F	Concentração do migrante no filme	mg/cm^3
C^F_0	Concentração inicial de migrante no filme	mg/cm^3
d	Distância final da separação das garras	mm
d_0	Distância inicial da separação das garras	mm
D_F	Difusividade no filme	cm^2/s
D_A	Difusividade no alimento	cm^2/s
DRM	Desvio relativo médio	
E_a	Energia de ativação	J/mol
F	Fator de correção	-
F_m	Força máxima no momento da ruptura	N
G	Taxa de massa	g/dia
GI	Grau de intumescimento	%
k	Constante difusional	s^{-1}
K	Constante do modelo de GAB	-
$k_{F/A}$	Coeficiente de partição entre o filme e o alimento	-
L^*, a^*, b^*	Parâmetros de cor	-
L_p^*, a_p^*, b_p^*	Parâmetros de cor do filme padrão	-
M_∞	Massa de soluto liberada em tempo infinito	g
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	-
m_f	Massa final da amostra	g
m_i	Massa inicial da amostra	g
MS	Massa solubilizável em água	% (g /100g filme)
M_t	Massa liberada no tempo t	g
M_t / M_∞	Fração liberada	-

um	Massa de filme úmido	g
n	Coeficiente difusional	-
p	Pressão parcial de oxigênio	KPa
P	Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio	$\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{KPa}$
PVA	Permeabilidade ao vapor de água	$\text{g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$
R	Constante universal dos gases	J/mol.K
R_a	Rugosidade	mm
R^2	Coeficiente de determinação	-
T	Temperatura	K
TR	Tensão na ruptura	MPa
TPO_2	Taxa de permeabilidade ao oxigênio	$\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{KPa}$
Y	Opacidade do filme em modo de transmitância	%
Yb	Opacidade em relação a um padrão branco	
Yp	Opacidade em relação a um padrão preto	
X_F	Desvio do comportamento Fickiano	-
X_m	Conteúdo de umidade relativo à monocamada	g H ₂ O/100g sólido
X_w	Teor de umidade de equilíbrio em base seca	g H ₂ O/100g sólido
x	Profundidade de migração	cm
ΔE^*	Diferença total de cor	-
ΔP_{H_2O}	Diferença de pressão parcial de vapor de água	kPa

Letras gregas

δ	Espessura do filme	mm
δ_f	Espessura após imersão com água	mm
δ_i	Espessura inicial do filme	mm
ω	Conteúdo de umidade	% (g H ₂ O/100g filme)
$\rho_{aparente}$	Massa volumétrica aparente	g/cm^3
ρ_{real}	Massa volumétrica real	g/cm^3
θ	Ângulo de contato	°
τ	Tempo de relaxação polimérica	s

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a crescente busca do setor alimentício por métodos de conservação menos agressivos tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias para o acondicionamento dos produtos. Neste contexto, estão inseridas as embalagens ativas, que são capazes de interagir de forma desejável com os alimentos e atuar como um fator ativo na conservação. Exemplos tradicionais de embalagens ativas envolvem sistemas de liberação de aromas e sabores, de agentes antimicrobianos e antioxidantes, de reguladores de umidade interna e de absorvedores de oxigênio. Com base no conhecimento das características do alimento e sua interação com as condições de estocagem, é possível especificar as propriedades das embalagens ativas de maneira a se controlar o ambiente em torno do produto, aumentar sua vida de prateleira e melhorar os atributos sensoriais (Rooney, 2005).

Entre os diversos tipos de embalagens ativas pesquisados, os filmes antimicrobianos são considerados promissores por atuarem na redução ou inibição do crescimento de micro-organismos em alimentos. Nestes filmes, a substância ativa é incorporada à matriz polimérica a fim de ser difundida de forma controlada para a superfície do alimento. Com isto, os conservantes podem estar presentes em quantidades menores nos alimentos e apenas onde sua presença é requerida, ou seja, na superfície do produto, que é a região mais vulnerável à contaminação (Han e Gennadios, 2005). Além desta vantagem, estes filmes podem ser confeccionados a partir de polímeros biodegradáveis, como polissacarídeos e proteínas, que são abundantes na natureza e de fácil extração.

Este conceito de filmes ativos biodegradáveis também vai ao encontro das atuais preocupações dos consumidores, que têm buscado alimentos seguros e com qualidade, porém que contenham uma quantidade mínima de aditivos e cujas embalagens causem pouco impacto ao meio ambiente.

Neste sentido, o Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos (LEPPbio) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, desde 2000, está pesquisando o potencial de utilização de biofilmes como embalagem de alimentos, em substituição a filmes poliméricos de origem petroquímica. Já foram desenvolvidos e caracterizados filmes simples e compostos envolvendo biopolímeros como alginato, pectina e quitosana, e esforços estão sendo direcionados para a obtenção de filmes contendo antimicrobianos para aplicação em alimentos.

Em todos os estudos realizados no grupo de pesquisa, os filmes de alginato destacaram-se dos demais por apresentarem um compromisso entre aspecto visual atraente, alta resistência mecânica, baixo grau de intumescimento e baixa solubilidade em água (Zactiti, 2004; da Silva, 2009; Bierhalz, 2010). O alginato é um carboidrato hidrofílico extraído de algas marinhas marrons e uma de suas principais características, responsável pelo grande campo de aplicações, é sua capacidade de formar géis insolúveis pela reticulação com cátions divalentes (Draget *et al.*, 2005).

Na literatura científica são encontrados diversos trabalhos que reportam a reticulação do alginato com íons cálcio, e esta preferência está relacionada ao fácil uso e ao seu alto poder gelificante. Entretanto, diversos cátions divalentes gelificam o alginato e a intensidade desta associação aumenta com o raio atômico. O bário, por exemplo, possui raio atômico maior do que o cálcio e poderia levar à formação de uma estrutura mais compacta, com menor absorção de água e liberação mais lenta de agentes ativos (Mørch *et al.*, 2006). Estudos preliminares indicaram que filmes de alginato reticulados com bário possuem propriedades atrativas (Valero, 2011), porém havia a necessidade de um estudo mais aprofundado das condições de reticulação com estes íons e da sua influência no processo de liberação do agente ativo, que ainda não era conhecida.

Os íons bário têm sido aplicados com frequência como reticulantes do alginato visando à obtenção de microcápsulas ou esferas para a liberação controlada de fármacos e imobilização de células. De acordo com a literatura, mesmo o bário sendo tóxico ao organismo humano, os sistemas reticulados são de grande estabilidade e não apresentariam risco ao indivíduo receptor, pois uma vez estabelecidas as ligações iônicas na matriz polimérica, este íon se torna indisponível para o meio no qual está em contato (Grazioli *et al.*, 2012).

Existe uma grande variedade de agentes fungicidas e/ou bactericidas que podem ser incorporados aos filmes para a conservação dos alimentos por meio de liberação controlada (Limjaroen *et al.*, 2003). A natamicina é um antifúngico natural produzido pela bactéria *Streptomyces natalensis* por meio de fermentação, sendo ativa contra uma grande variedade de fungos, como *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cândida* (Chen *et al.*, 2008). Seu uso é autorizado pela legislação brasileira e, também, pelos órgãos reguladores EFSA (União Européia) e FDA (Estados Unidos), como aditivo para a preservação de alimentos sendo empregada, principalmente, no controle de crescimento fúngico na superfície de queijos e produtos cárneos.

O tratamento de superfícies de queijos e outros produtos com natamicina é tradicionalmente realizado por pulverização ou imersão do produto em uma solução concentrada, o que pode resultar em uma rápida difusão para o interior do alimento, comprometendo a inativação microbiana na superfície (Reps *et al.*, 2002). Esta difusão para o interior do alimento é indesejável e deve ser controlada, tendo em vista que a legislação determina os limites máximos de concentração (1 mg/dm^2) e profundidade (2 – 5 mm) de natamicina presente nos alimentos. Os filmes antimicrobianos mostram-se como uma alternativa de conservação segura e eficiente, pois além de atuarem como uma barreira protetora à migração de gases e vapor de água, tornam possível manter a concentração crítica do conservante por um prolongado período sem que ocorra a migração para o interior do alimento.

Para a obtenção dos filmes ativos, o antimicrobiano pode ser adicionado diretamente à solução polimérica na concentração desejada. Porém, para compostos de baixa solubilidade em água, como a natamicina, os filmes resultantes deste procedimento podem ter as propriedades mecânicas e ópticas prejudicadas. A fim de contornar estas limitações, métodos alternativos de impregnação da natamicina por imersão em soluções hidroetanólicas e por deposição com CO_2 supercrítico foram avaliados neste trabalho. Esta etapa experimental do projeto, que incluía também algumas caracterizações dos filmes obtidos, foi desenvolvida no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, em Portugal.

A eficiência do filme antimicrobiano está diretamente relacionada à taxa de liberação do aditivo para o alimento. Liberações lentas são desejáveis para que se mantenha uma quantidade mínima do antimicrobiano no alimento e um efeito ativo prolongado. No entanto, a taxa de liberação deve ser suficiente para atingir a concentração mínima inibitória e impedir o início das reações de degradação. No presente trabalho, foi avaliada a cinética de liberação e determinados os coeficientes de difusão da natamicina no filme em contato com água, em géis simulantes de alimento e em um queijo comercial. Mais especificamente no caso da natamicina, torna-se essencial verificar se a concentração e a profundidade até a qual houve migração estão dentro dos limites especificados pela legislação. Estas avaliações, juntamente com os resultados de eficiência antimicrobiana, são de grande importância para prover informações sobre a forma como os filmes selecionados agem efetivamente como carreadores de agentes ativos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta pesquisa teve como objetivo geral avaliar os efeitos das condições de reticulação com íons bário e cálcio sobre as propriedades físico-químicas de filmes de alginato e determinar, através da liberação difusiva e análise antimicrobiana, o potencial dos filmes ativos contendo natamicina na conservação de um queijo comercial.

2.2 Objetivos específicos

Para organizar o desenvolvimento dessa pesquisa foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- a) Determinar o efeito das condições de reticulação (tempo de imersão, concentração) com íons cálcio e bário sobre os atributos funcionais dos filmes;
- b) Comparar o processo tradicional de incorporação da natamicina com o método de impregnação a úmido e impregnação/deposição com CO₂ supercrítico.
- c) A partir de formulações representativas de 2.2a e 2.2b, realizar ensaios de liberação difusiva dos filmes ativos em meios com diferentes atividades de água (soluções etanólicas e géis simulantes de alimento) e um alimento processado (queijo Prato) utilizando diferentes temperaturas;
- d) Determinar os coeficientes de difusão da natamicina no filme e no alimento e simular os perfis de liberação do antimicrobiano através de modelos matemáticos;
- e) Realizar testes de inibição *in vitro* e em amostras de queijo Prato para a determinação da eficiência antimicrobiana dos filmes ativos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura abordando os aspectos mais relevantes para o desenvolvimento dos filmes antimicrobianos, como as características e propriedades das matérias-primas utilizadas, o processo de reticulação com íons divalentes bem como os fundamentos do transporte de substâncias em materiais poliméricos.

3.1 Alginato

O alginato é um polissacarídeo linear de alta massa molar que tem como principal fonte a parede celular de diversas espécies de algas marinhas marrons (classe *Phaeophyceae*). Nestas algas, o ácido algínico é responsável pela força e flexibilidade necessárias para o crescimento no ambiente marítimo e pode representar até 40% da matéria seca (Draget *et al.*, 2005).

Algumas bactérias, como as espécies *Pseudomonas* e *Azotobacter*, também podem sintetizar o alginato na forma de polissacarídeo capsular, diferindo do ácido algínico presente nas algas apenas por ser mais acetilado (Garcia-Cruz *et al.*, 2008). Este tipo de alginato ainda não está disponível comercialmente, mas tem sido amplamente estudado devido à possibilidade de obtenção de um material de alta pureza e biocompatibilidade, com características e estrutura polimérica padronizáveis, que são condições interessantes principalmente para as aplicações nas áreas médica e farmacêutica (Müller *et al.*, 2011).

A estrutura do alginato consiste de resíduos do ácido α -L-gulurônico (blocos G) e ácido β -D-manurônico (blocos M) associados por ligações glicosídicas do tipo (1-4) e distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia. Estes monômeros podem ser organizados em cadeias consecutivas de resíduos G, de resíduos M, ou cadeias com resíduos alternados de M e G, conforme ilustrado na Figura 3.1 (Donati *et al.*, 2005).

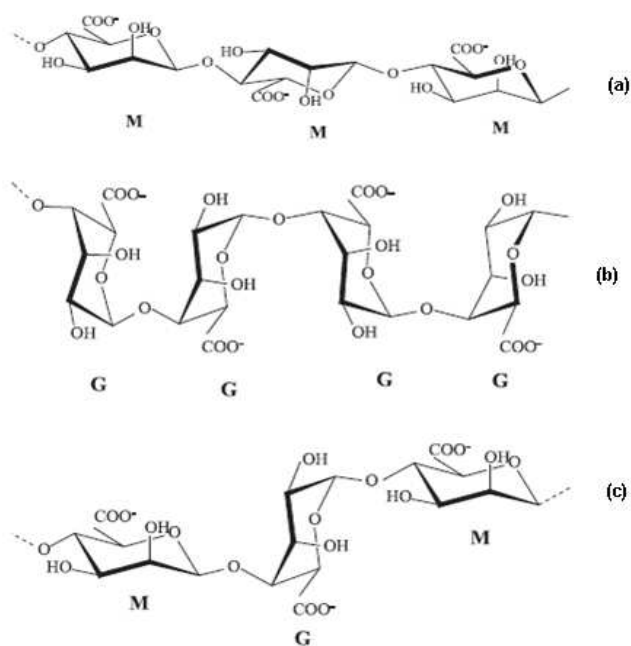


Figura 3.1: Composição de alginatos: (a) cadeia de resíduos de ácido manurônico; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (c) cadeia alternada de resíduos de ácidos manurônicos e gulurônicos (Onsøyen, 1997).

As algas marrons compreendem uma grande diversidade de plantas, porém as principais fontes comerciais de alginato são a alga *Macrocystis pyrifera* (Figura 3.2a), encontrada abundantemente nas costas do Pacífico, das Américas, Nova Zelândia, Austrália e África, e a alga *Laminaria hyperborea*, proveniente da Europa e do Japão (Figura 3.2b).



Figura 3.2: Imagens das algas *Macrocystis pyrifera* (a) e *Laminaria hyperborea* (b). Fonte: Seaplants Handbook (2011).

O tipo de alga de onde o alginato é extraído determina a estrutura sequencial, massa molar e a quantidade relativa de cada tipo de resíduo, podendo existir mais de 200 tipos de alginatos com diferentes proporções de unidades M e G (Lee e Mooney, 2012). Altos teores de blocos G são geralmente encontrados nos alginatos preparados a partir do caule das algas *Laminaria hyperborea*, enquanto que os alginatos da alga *Macrocystis pyrifera* são caracterizados pelo maior teor de blocos M, conforme apresentado na Tabela 3.1 (Draget *et al.*, 2005).

Tabela 3.1: Fração mássica (F) de blocos GG, MM e GM, MG nas principais espécies de algas pardas.

ALGA	F _{GG}	F _{MM}	F _{GM, MG}
<i>Macrocystis Pyrifera</i> (alto M)	0,16	0,38	0,46
<i>Laminaria hyperborea</i> (alto G)	0,56	0,20	0,24

Fonte: Draget *et al.* (2005).

A quantidade relativa de cada monômero no alginato pode variar também entre as mesmas espécies, uma vez que depende da época do ano em que a alga é colhida, das condições de crescimento e de que parte da planta (caule ou folhas) o alginato é extraído (Draget *et al.*, 2005).

As diferentes fontes de alginato e as variações em sua estrutura exercem grande influência em uma das principais propriedades deste polissacarídeo, que é a capacidade de formar géis termoestáveis na presença de cátions divalentes, principalmente o cálcio (Donati *et al.*, 2005). A formação de géis e, consequentemente, de filmes resistentes e insolúveis, está diretamente ligada à distribuição e ao tamanho dos blocos G presentes na molécula do alginato (Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008).

Os alginatos com maior percentual de blocos G são mais reativos com os íons metálicos e produzem géis mais rígidos e quebradiços. Esta maior reatividade deve-se ao fato das cadeias de blocos G apresentarem um formato retorcido e ondulado (Figura 3.1b) que favorece a presença de cavidades adjacentes, nas quais os íons são acomodados (Donati *et al.*, 2005; Braccini e Pérez, 2001). Já as cadeias onde predominam os blocos M tendem a ser

lineares (Figura 1a), sendo que alginatos com alto percentual deste monômero formam géis macios e mais flexíveis, porém pouco resistentes.

A massa molar também é um fator determinante para características de géis ou filmes de alginato (Lee e Mooney, 2012), podendo afetar as propriedades de barreira ou mecânicas de forma mais drástica do que a proporção de blocos M e G (Vaz, 2012).

Recentemente, estudos mostraram ser possível alterar o comprimento e a distribuição dos blocos M e G das cadeias do alginato utilizando enzimas epimerases. Desta forma, tornou-se viável obter alginatos não encontrados na natureza, com uma estrutura ajustada para um melhor desempenho em diversas aplicações (Donati e Paoletti., 2009). Hartmann *et al.* (2006), por exemplo, utilizaram a tecnologia enzimática para converter blocos homopoliméricos M em blocos com sequências alternadas para melhorar a cinética de gelificação do alginato.

Comercialmente, o alginato é encontrado na forma de sal, como os alginatos de sódio, de potássio e de amônio. O alginato de sódio é o mais utilizado, sendo solúvel em água, insolúvel na maioria dos solventes orgânicos e em meios com pH abaixo de 3. Os sais de alginato possuem importantes aplicações nas indústrias de alimentos e bebidas por suas propriedades gelificantes, espessantes e estabilizantes (Sriamornsak e Kennedy, 2008). Na indústria têxtil e de papel, o alginato melhora a aderência e a deposição das tintas nos processos de tingimento e impressão. Na área farmacêutica, o alginato é utilizado como excipiente de medicamentos, em formulações para prevenção de refluxo gástrico e materiais odontológicos (Müller *et al.*, 2011). Por ser biocompatível e não tóxico, diversas aplicações em Engenharia de Tecidos (biomateriais) e como sistemas de imobilização de células e encapsulação de fármacos também têm sido desenvolvidas nos últimos anos (Mørch *et al.*, 2006; Lee e Mooney, 2012).

3.2 Filmes de alginato

Em sistemas alimentícios, os filmes e coberturas de alginato podem atuar especificamente controlando a migração de água, a permeabilidade a gases, a migração lipídica, a rancidez oxidativa e, ainda, podem conter aditivos como antioxidantes e antimicrobianos, os quais visam retardar a taxa de deterioração e prolongar a vida de prateleira. Por serem utilizados tanto como embalagens ou como componentes dos alimentos, devem permanecer estáveis e manter suas propriedades funcionais durante o tempo de uso desejado.

Também devem cumprir alguns requisitos específicos, como apresentar boas propriedades de barreira (permeabilidades ao vapor de água, ao O₂ e ao CO₂), eficiência mecânica (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas e sensoriais adequadas, além de possuir baixo custo no que se refere à de matéria-prima e à forma de fabricação (Debeaufort *et al.*, 1998).

A eficácia das coberturas de alginatos, que são revestimentos comestíveis formados diretamente sobre a superfície do alimento, tem sido comprovada em diversos produtos como carnes, frutas e vegetais (Andrade *et al.*, 2008). As coberturas não substituem a embalagem, mas atuam como uma barreira protetora adicional. Olivas *et al.* (2007), por exemplo, aplicaram coberturas de alginato de cálcio em maçãs do tipo Gala e observaram que o revestimento forneceu uma aparência brilhante e translúcida, diminuiu significativamente a perda de umidade, o colapso da textura e o escurecimento durante o armazenamento. Quando aplicado em cenouras, verificou-se que as coberturas de alginato podem beneficiar o produto com um aumento de 13 dias na vida de prateleira (Mastromatteo *et al.*, 2012).

Fontes *et al.* (2011) confeccionaram filmes de alginato, pectina e carboximetilcelulose para coberturas de alimentos a serem fritos, com o intuito de minimizar a absorção de óleo. As propriedades mecânicas, de barreira e características como cor e tamanho dos filmes foram avaliadas após imersão em oleína e em estearina de palma a 180°C, simulando um processo de fritura. Apesar de sofrer mais alterações na aparência do que os filmes de carboximetilcelulose, os resultados indicaram que os filmes de alginato são mais apropriados para uso em coberturas deste tipo devido a maior resistência mecânica e baixa permeabilidade ao oxigênio.

Filmes são estruturas auto-sustentáveis que são pré-formadas e aplicadas posteriormente como um invólucro do produto, e a maior parte dos trabalhos investiga suas características físico-químicas, reológicas, mecânicas e higroscópicas visando matrizes fortes e resistentes para diversas aplicações, como em sistemas de liberação controlada (Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008; da Silva *et al.*, 2009).

A obtenção de blendas pela combinação sinérgica de diversos polissacarídeos e proteínas compatíveis tem sido pesquisada com o objetivo de melhorar as características dos filmes. Os polímeros combinados podem interagir química e fisicamente, resultando em filmes compostos nos quais são aproveitadas as vantagens de cada um dos componentes puros e quase sempre visando aumentar a limitada elasticidade dos filmes de alginato (Campos *et al.*, 2011). Exemplos de filmes compostos incluem as misturas de quitosana e alginato (da Silva,

2009), alginato e pectina (da Silva *et al.*, 2009; Lambrech *et al.*, 2009), alginato e gelatina (Dong *et al.*, 2006), entre outros.

Uma exploração mais recente na tecnologia de biofilmes é a incorporação de nanofibras ou nanopartículas com o objetivo de formar filmes mais resistentes. Abdollahi *et al.* (2013), por exemplo, adicionaram nanopartículas de argila montmorilonita e celulose aos filmes de alginato e observaram uma diminuição da solubilidade em água dos filmes. Em outro trabalho, argila e celulose também foram utilizadas para formar nanocompósitos com alginato e purê de acerola, obtendo-se uma significativa redução na permeabilidade ao vapor d'água dos filmes (Azeredo *et al.*, 2012).

3.3 Reticulação com íons divalentes

Os hidrocolóides como o alginato, a pectina e a celulose, possuem boa capacidade filmogênica e formam matrizes coesas e contínuas e, conseqüentemente, seus filmes são homogêneos e transparentes. Entretanto, por serem muito hidrofílicos, apresentam pobre desempenho como barreira à água e à umidade, prejudicando suas aplicações, principalmente como embalagem de alimentos. A fim de solucionar esta limitação e obter filmes com boas propriedades mecânicas e de barreira, diversas alternativas têm sido propostas, como a mistura de diferentes polímeros, a adição de materiais hidrofóbicos e a modificação química da estrutura polimérica, como o uso da reticulação (Campos *et al.*, 2011).

A reticulação tem-se mostrado muito eficaz para os filmes de alginato, tendo em vista que este polissacarídeo pode reagir irreversivelmente com íons divalentes, sobretudo com o cálcio, produzindo filmes com baixa solubilidade em água (Rhim, 2004; Donati *et al.*, 2005).

A gelificação induzida pelo cálcio é resultado das interações deste íon com os blocos guluronatos (blocos G) no alginato. As zonas de junção formadas pelos pares das cadeias de guluronatos criam cavidades com o formato de losango que podem ser preenchidas pelos cátions, fortalecendo a interação desses resíduos (Braccini e Pérez, 2001). Dessa forma, os géis de alginato-Ca são descritos em termos do modelo conhecido como “caixa de ovos” pela semelhança dessa estrutura com a forma com que os íons cálcio permanecem ligados à cadeia do polissacarídeo, conforme ilustrado na Figura 3.3.

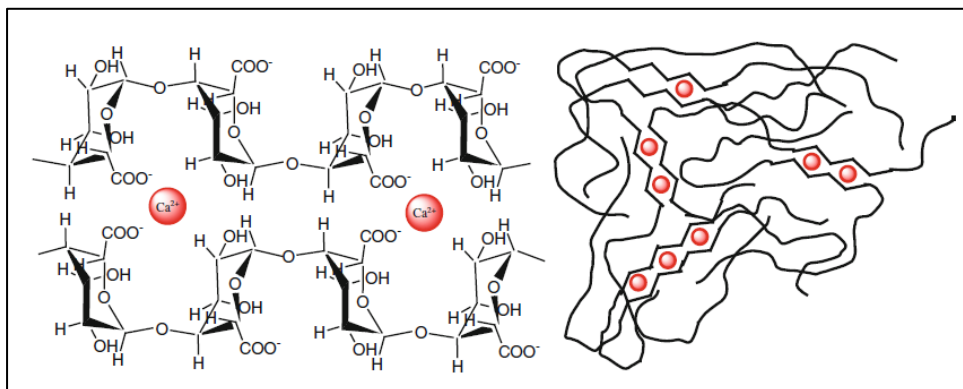


Figura 3.3: Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” para o alginato (Lencina *et al.* 2013).

A reação de reticulação tende a ser muito rápida e quando o cálcio é adicionado diretamente à solução polimérica de alginato, poderá haver a formação local de um gel de alta viscosidade. Isto dificulta transferir a solução de forma adequada aos moldes e impede a formação de uma estrutura homogênea e contínua (Rhim, 2004). A fim de se obter uma solução com fluidez adequada, baixas concentrações de cálcio devem ser utilizadas na reticulação.

Os trabalhos de Pavlath e Robertson (1999) e de Rhim (2004) reportam que a adição de pequenas concentrações de cálcio à solução não é suficiente para promover um aumento da barreira protetora à água dos filmes de alginato. Como alternativa, estes autores confeccionaram os filmes sem cálcio que, após secos e estruturados, foram submetidos à reticulação pela imersão em uma solução concentrada dos íons, verificando a melhora de todas as propriedades dos filmes. Desde então, diversos trabalhos com filmes de alginato utilizam este método de reticulação por difusão do cálcio através de uma matriz de alginato de sódio (Remuñan-López e Bodmeier, 1997; Al-Musa *et al.*, 1999; Pranoto *et al.*, 2005a; Russo *et al.*, 2007; Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008).

No entanto, segundo Pavlath e Robertson (1999), no processo de reticulação por imersão existe uma relação competitiva entre a dissolução do filme e a reticulação, de forma que a concentração da solução iônica deve ser suficientemente alta para que a difusão/reticulação seja predominante. Esse comportamento é acentuado, sobretudo, porque a ausência de íons cálcio na frágil estrutura tridimensional já formada faz com que o processo de dissolução seja intenso e rápido, causando alterações irreversíveis na matriz polimérica. Em contrapartida, concentrações muito altas de Ca^{2+} na solução de imersão tendem a provocar uma reticulação muito rápida e intensa na superfície do filme. Com isto, forma-se um bloqueio

da difusão dos íons para o interior do filme, resultando em uma reticulação incompleta e filmes com propriedades mecânicas e de barreira deficientes.

Frente a isto, um procedimento em dois estágios foi desenvolvido para obter filmes de alginato com alto grau de reticulação (Zactiti e Kieckbusch, 2005). Inicialmente, os filmes são confeccionados com um baixo grau de reticulação, por meio da adição lenta do cálcio à solução polimérica. Após a secagem, estes mesmos filmes entram em contato com uma solução concentrada de cálcio, onde os íons são difundidos pela matriz. Como estes filmes já possuíam um grau de reticulação, a relação competitiva entre a dissolução do filme e a difusão do cálcio seria revertida.

Na literatura, são encontrados poucos trabalhos envolvendo a reticulação do alginato com outros cátions que não o cálcio. Em relação ao bário, por exemplo, a maior parte está relacionada à encapsulação de fármacos ou à imobilização de células (Bajpai e Sharma, 2004; Tamet *et al.*, 2011), situações que não utilizam plastificantes e nem se busca obter as características e propriedades funcionais típicas de filmes para embalagens. Segundo Mørch *et al.* (2006), a afinidade do alginato com os diferentes cátions decresce na seguinte ordem:



Esta seqüência de afinidade estaria relacionada ao raio atômico do cátion e também à relação da proporção de ácido gulurônico do alginato. A ilustração da Figura 3.4 compara a acomodação dos íons cálcio e dos íons bário na cadeia do ácido gulurônico. Como o raio do bário é maior (1,35 Å) em relação ao cálcio (0,97 Å), há um maior preenchimento das zonas de junção, resultando em uma energia de reticulação mais intensa (Al-Musa *et al.*, 1999).

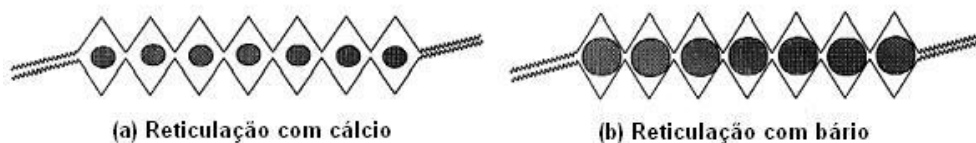


Figura 3.4: Representação das ligações do alginato com íons cálcio (a) e bário (b) (Al-Musa *et al.*, 1999).

Mørch *et al.* (2006) confeccionaram microcápsulas de alginato com alto-M e alto-G e compararam os efeitos da reticulação com Ba^{2+} , Sr^{2+} e Ca^{2+} sobre algumas propriedades. Os autores verificaram que, para géis com alto-G, o bário e o estrôncio se mostraram mais adequados. Já para o alginato com alto-M, o cálcio foi mais eficiente. Em outro trabalho com microcápsulas de alginato, foi observado que, tanto para alginatos com alto-M e com alto-G, o bário é mais eficiente do que o cálcio em relação à manutenção da estrutura tridimensional, aferida pelo menor grau de intumescimento em água (Darrabie *et al.*, 2006).

Em um dos poucos trabalhos em que a confecção de filmes de alginato estruturados com íons diferentes do cálcio é descrita, Al-Musa *et al.* (1999) incorporaram um fármaco ao filme reticulado com BaCl_2 , SrCl_2 ou AlCl_3 e verificaram que o tipo de reticulante exerce grande influência sobre a liberação. O bário apresentou uma liberação mais rápida e, segundo os autores, isto ocorreu devido a uma reticulação limitada no interior do filme. Este comportamento seria consequência do tamanho dos íons bário, que de forma similar ao que ocorre com altas concentrações de cálcio na solução de imersão, provocam uma intensa reticulação superficial que dificulta a migração dos íons para o interior do filme. Uma vez que a rede tridimensional polimérica está menos fechada, a mobilidade molecular é maior e facilita a difusão do fármaco.

3.3.1 Considerações sobre o bário e o cálcio

O bário ocorre na natureza somente em combinação com outros elementos, principalmente nas formas de sulfato e carbonato de bário. Ele pode ser encontrado em pequenas quantidades nos alimentos, na água e no ar.

Dentre os alimentos consumidos pelo homem, a castanha-do-pará possui as maiores concentrações de bário, que podem variar de 1,5 a 4 mg/g. Outros produtos como pães, ovos, leite, queijos e frutas contêm quantidades de bário inferiores que 0,002 mg/g (Inchem, 2014; World Health Organization, 2004). Estima-se que a ingestão alimentar média de bário de um adulto seja de 300 a 1770 $\mu\text{g}/\text{dia}$, sendo que os pães contribuem com cerca de 20% da ingestão total (Cetesb, 2012).

A legislação brasileira limita as quantidades de bário somente para a água mineral, cujo valor máximo permitido é de 0,7 mg/L (Anvisa, 2005). Em países como os Estados Unidos, o valor da concentração máxima é de 2 mg/L (FDA, 2014).

A toxicidade do metal depende de sua forma química. Compostos como o cloreto de bário e carbonato de bário são solúveis em água e no organismo e, portanto, apresentam maiores riscos do que os compostos insolúveis, como o sulfato de bário. A ingestão de doses dos compostos solúveis entre 0,2 a 0,5 mg/kg de massa corporal pode provocar intoxicação com sintomas que incluem gastroenterite aguda, perda de reflexos e paralisia muscular. A ingestão de altas quantidades de bário pode causar alterações no ritmo cardíaco e paralisia, e levar a óbito se não houver tratamento adequado. Em estudos com cães, a menor dose letal obtida foi de 400 e 90 mg/kg de massa corporal para ingestão de carbonato de bário e cloreto de bário, respectivamente (Inchem, 2014; World Health Organization, 2004).

Mesmo sendo o bário um composto tóxico, diversas pesquisas o utilizam como agente reticulante de membranas e microcápsulas de alginato para aplicações médicas e farmacêuticas. A segurança destes sistemas está relacionada ao fato de que, uma vez estabelecidas as ligações iônicas com as cadeias do alginato na matriz polimérica, o bário se torna indisponível para o meio com o qual está em contato, não apresentando toxicidade (Grazioli *et al.*, 2012). De acordo com Bajpai e Sharma (2004), a liberação do bário para um meio líquido no qual as partículas ou membranas estão em contato pode ocorrer na presença de íons sódio, porém a uma taxa muito lenta.

Com base nestas considerações pode-se descartar a possibilidade de liberação do bário dos filmes de alginato aplicados em alimentos. Ressalta-se também que a resolução nº 56, de 16 de novembro de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária autoriza o uso de sais de bário para a elaboração de embalagens plásticas para contato com alimentos (Anvisa, 2012). Nesta resolução não são especificadas restrições de uso, limites de composição e limites de migração para o alimento.

O cálcio é um mineral essencial para a saúde e desempenha um papel importante na formação estrutural de ossos e dentes, condução nervosa, contração muscular e coagulação sanguínea. Ele está presente em diversos alimentos como o leite e seus derivados, vegetais folhosos, sardinha e salmão. O cálcio não apresenta toxicidade, no entanto, o consumo excessivo prejudica a absorção de outros nutrientes, como o zinco e o ferro, e contribui para a formação de cálculos renais. A dose máxima de ingestão de cálcio para adultos varia de 2000 a 2500 mg/dia, conforme sexo e idade (Houtcooper e Farrel, 2011).

A não-toxicidade e a boa afinidade com o alginato são os responsáveis pela extensa utilização do cálcio como agente reticulante. Como desvantagem, porém, está a grande

sensibilidade dos filmes reticulados com este cátion a agentes quelantes, como o fosfato e o citrato, e a íons não gelificantes, como o sódio e o magnésio (Mørch *et al.*, 2006).

Além dos agentes reticulantes, outros aditivos utilizados na confecção dos filmes podem promover mudanças nas propriedades. Entre estes, destacam-se os plastificantes, cujas características e propriedades serão abordadas no item seguinte.

3.4 Plastificantes

Os filmes de alginato, ao serem submetidos ao processo de reticulação, têm as forças coesivas entre as cadeias aumentadas, o que geralmente resulta em filmes quebradiços. Para reduzir este efeito, podem ser adicionados plastificantes à formulação, de forma a aumentar a mobilidade das cadeias, melhorando a flexibilidade e o alongamento do filme (Sothornvit e Krochta, 2005).

Os plastificantes comumente utilizados em biofilmes são monossacarídeos, oligossacarídeos (glicose, frutose e sacarose), polióis (glicerol e sorbitol) e lipídios (ácidos graxos e tensoativos). Estas substâncias geralmente apresentam moléculas pequenas (baixa massa molar) que podem ser facilmente incorporadas entre as cadeias poliméricas, diminuindo a temperatura de transição vítrea e, conseqüentemente, afetando as propriedades físicas, químicas e mecânicas dos filmes (McHugh e Krochta, 1994).

Existem duas teorias principais que procuram explicar a ação do plastificante sobre filmes e coberturas biodegradáveis, conferindo-lhe flexibilidade: teoria do gel e teoria do volume livre (Sothornvit e Krochta, 2005). A teoria do gel propõe que, ao penetrar entre as cadeias da matriz polimérica, os plastificantes aumentam a distância entre elas e, portanto, ocorre um enfraquecimento da força de atração entre as cadeias, dando maior flexibilidade ao polímero. Na teoria do volume livre, a adição de pequenas moléculas proporciona o aumento do volume livre entre e ao redor das macromoléculas, favorecendo seu movimento.

O plastificante escolhido deve ter boa solubilidade no solvente utilizado, não ser volátil e apresentar alto grau de retenção no polímero de forma a evitar a separação no decorrer do processo de secagem e após a finalização do filme. Dependendo da aplicação, também devem ser observados aspectos como cor, sabor, estabilidade química e higroscopicidade.

De forma geral, a permanência do plastificante no polímero depende do tamanho da molécula e da taxa de difusão na matriz polimérica. Plastificantes com moléculas grandes possuem menor volatilidade, resultando em maior permanência no filme. Já a migração do plastificante para a superfície do filme pode ser resultado da incompatibilidade química do plastificante com o polímero, sendo que um indicador da migração é uma aparência oleosa e opaca.

A principal desvantagem resultante da utilização dos plastificantes hidrofílicos é a diminuição da barreira ao vapor de água dos filmes devido à diminuição das forças intermoleculares. O plastificante também exerce grande influência na difusão. Aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, a taxa de liberação também aumenta, resultando em altas difusividades (George e Thomas, 2001). Franssen *et al.* (2004) observaram em filmes de proteína de soro de leite, que o aumento da proporção de glicerol de 10 para 50% promoveu um aumento na difusividade da natamicina em quase 9 vezes.

Desta forma, o plastificante deve ser utilizado em uma quantidade que permita a otimização das propriedades mecânicas com um aumento mínimo na permeabilidade e na taxa de liberação do agente ativo incorporado (Sothornvit e Krochta, 2005). Diversos estudos mostram que pequenos incrementos na concentração do plastificante provocam perdas significativas nas propriedades de barreira à água. No caso do alginato, o efeito da reticulação pode até ser suprimido, fazendo com que os limites máximos de plastificante a serem usados resultem em um alongamento médio em torno de 6-10%. Este percentual de alongamento representa uma grande limitação dos filmes à base de polissacarídeos, tendo em vista que os filmes sintéticos convencionais possuem alongamentos de até 500%, como no caso do polietileno de baixa densidade (McHugh e Krochta, 1994).

Um estudo com diferentes plastificantes em filmes de alginato reticulados com cálcio revelou que o glicerol é o mais vantajoso em termos de compromisso entre bom aspecto visual, propriedades mecânicas e baixa solubilidade em água. Filmes com xilitol apresentam um comportamento semelhante ao glicerol. Plastificantes como manitol e citrato de tributila formam filmes com baixa higroscopicidade, porém são menos flexíveis (Santana e Kieckbusch, 2013).

Dependendo da concentração em que são empregados, os plastificantes também podem causar um efeito chamado antiplastificante, ou seja, exercem um efeito contrário na flexibilidade e hidrofobicidade dos filmes. Isto ocorre quando são empregadas pequenas

concentrações de plastificante, que interagem com a matriz polimérica, mas não em quantidade suficiente para aumentar a mobilidade molecular, aumentando somente o grau de interações e a rigidez desta matriz. Este fenômeno tem sido observado com frequência em filmes de amido (Galdeano *et al.*, 2009). Em filmes de alginato e blendas de alginato com hidroxietilcelulose contendo 25% de poliglicerol como plastificante, Russo *et al.* (2010) constataram um efeito antiplastificante com um aumento na temperatura de transição vítrea e diminuição do alongamento na ruptura.

3.5 Filmes ativos antimicrobianos

Ao longo das últimas décadas, diversos tipos de antimicrobianos vêm sendo utilizados nos alimentos a fim de controlar o crescimento de micro-organismos que podem comprometer a qualidade e a segurança alimentar (Han e Gennadios, 2005).

Tradicionalmente, os antimicrobianos são adicionados à formulação inicial do alimento ou são aplicados na sua superfície por imersão ou pulverização. Quando a deterioração tem como origem a superfície, a adição do antimicrobiano na formulação do alimento não é adequada, pois uma excessiva quantidade de conservante será necessária, podendo comprometer as características sensoriais do alimento. Os métodos de tratamento por imersão ou pulverização também podem ter eficiência limitada, uma vez que possibilitam a difusão do antimicrobiano para as partes internas do alimento, reduzindo sua concentração na superfície, onde as reações deteriorantes são mais intensas (Appendini e Hotchkiss, 2002; Han e Gennadios, 2005; Gemili *et al.*, 2009). Ainda, a cobertura ativa produzida pode ser facilmente lixiviada ou rompida no manuseio do produto.

Os filmes antimicrobianos são uma alternativa promissora para superar estas limitações, pois são formulados para transferir o agente ativo incorporado na matriz polimérica para o alimento, de maneira a manter uma concentração predeterminada do composto ativo na superfície por um determinado tempo (Appendini e Hotchkiss, 2002; Gemili *et al.*, 2009). Além disso, os filmes podem atuar como uma barreira adicional de proteção contra a migração de gases, perda de umidade e permitem que apenas uma pequena quantidade de conservantes seja necessária.

Alguns fatores podem afetar a eficiência antimicrobiana dos filmes, como as características do alimento (pH, atividade de água) e do agente ativo (tamanho da molécula e

solubilidade), condições de estocagem e distribuição, método de preparo do filme (extrusão ou *casting*) e interação entre antimicrobiano e polímero (Soares *et al.*, 2009).

As pesquisas envolvendo a incorporação de agentes ativos em matrizes poliméricas para aplicação em alimentos tiveram sua origem nas coberturas comestíveis, principalmente na década de 90. Desde então, filmes antimicrobianos tem sido desenvolvidos com uma grande variedade de biopolímeros e direcionados para diferentes aplicações como frutas, peixes, carnes, presuntos e queijos. Porém, os trabalhos envolvendo filmes de alginato ainda são escassos e a maioria deles determina os efeitos inibitórios através de testes *in vitro*, sem aplicação em alimentos e sem estudo do comportamento difusivo.

Cha *et al.* (2002), por exemplo, confeccionaram filmes de alginato sem reticulação e avaliaram a eficiência antimicrobiana da lisozima, nisina, extrato de semente de pomelo e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), individualmente ou em combinação. Os testes de difusão em ágar revelaram que, quando o extrato de semente de pomelo e o EDTA foram utilizados, um efeito inibitório foi observado contra todos os micro-organismos testados (*Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).

Os efeitos inibitórios contra diferentes espécies de bactérias foram também observados em filmes de alginato contendo lactoperoxidase (Yener *et al.*, 2009), extrato de ginseng (Norajit *et al.*, 2010), óleo de alho (Pranoto *et al.*, 2005a) e extrato de alecrim (Yan *et al.*, 2013).

Em um dos poucos trabalhos com aplicação em alimentos, Siragusa e Dickinson (1993) confeccionaram coberturas de alginato contendo ácidos orgânicos e verificaram seus efeitos na conservação da carne, pela redução dos níveis de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* e *Escherichia coli*. Ogunbanwo e Okanlawon (2006) imobilizaram a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus brevis* em um filme de alginato e aplicaram na superfície de carne de frango refrigerada. Os autores observaram que a aplicação da cobertura ativa foi mais eficiente do que a aplicação direta da bacteriocina no frango, podendo prolongar a vida de prateleira por até 14 dias, mantendo características sensoriais adequadas. Mais recentemente, Millette *et al.* (2007) verificaram que filmes ou partículas de alginato contendo nisina são eficientes no controle do crescimento de micro-organismos patogênicos, como o *Staphylococcus aureus*, em superfícies de carnes.

A seleção do antimicrobiano a ser utilizado no filme ativo deve levar em consideração a efetividade contra o micro-organismo-alvo e as interações com o biopolímero e outros componentes presentes na formulação (Campos *et al.*, 2011).

De acordo com Ozdemir e Floros (2004), um dos principais problemas dos filmes antimicrobianos é a perda parcial ou total da eficiência antimicrobiana após a incorporação no filme. Para contornar este problema, tratamentos prévios no polímero podem ser necessários para aumentar sua compatibilidade com o agente ativo.

Possíveis interações entre o antimicrobiano e o biopolímero ou uma má incorporação na solução polimérica também podem modificar as características do filme. Diversos trabalhos relatam que após a adição de agentes ativos ocorre uma modificação da estrutura polimérica e os filmes podem apresentar prejuízos significativos na permeabilidade ao vapor de água, transparência e na tensão de ruptura (Cha *et al.*, 2002; Limjaroen *et al.*, 2003; Pranoto *et al.*, 2005b). Em coberturas de quitosana para aplicação em queijos foi observado um aumento de 500% na permeabilidade ao CO₂ após a adição da natamicina (Fajardo *et al.*, 2010). Em outro trabalho, a incorporação de natamicina a filmes de celulose promoveu uma diminuição de aproximadamente 40% na tensão de ruptura e de 62% no alongamento (Pires *et al.*, 2008). Neste mesmo trabalho, a tensão de ruptura foi reduzida ainda mais drasticamente (cerca de 90%) quando nisina também foi adicionada à formulação.

3.6 Natamicina

A natamicina, também conhecida como pimaricina, é um antimicótico poliênico (Figura 3.5), produzido pela bactéria *Streptomyces natalensis*, ativa contra uma grande variedade de fungos filamentosos (multinucleados) e leveduriformes (um só núcleo), incluindo os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cândida*.

De forma geral, o mecanismo de ação de um antimicótico poliênico consiste na sua interação com componentes da membrana celular fúngica, os ergosteróis. Esta ligação faz com que ocorra um aumento da permeabilidade da membrana, perda de componentes essenciais e a consequente morte da célula (Welscher *et al.*, 2008). As bactérias são insensíveis aos antimicóticos poliênicos, como a natamicina, porque sua membrana celular não possui esteróis (ESFA, 2009).

O uso da natamicina é autorizado em mais de 40 países como aditivo para preservação de alimentos, principalmente, no controle de crescimento fúngico na superfície de queijos, produtos cárneos e salsichas (Chen *et al.*, 2008; Danisco, 2011). Nos Estados Unidos, a agência reguladora FDA (*Food and Drug Administration*) classificou a natamicina como GRAS (*generally recognized as safe*), sendo permitida, inclusive, como aditivo em rações para frangos de corte visando retardar o crescimento de alguns fungos patogênicos específicos, como o *Aspergillus parasiticus*. Na União Européia, a natamicina também foi classificada como aditivo seguro pelo órgão EFSA (*European Food Safety Authority*) (EFSA, 2009).

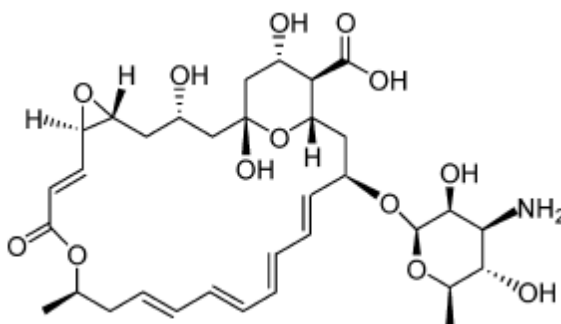


Figura 3.5: Estrutura química da natamicina (Chen *et al.*, 2008).

De acordo com a Resolução nº 28 da Anvisa (Anvisa, 2001), a presença da natamicina é permitida no limite máximo de 1mg/dm² e deve estar ausente a 2 mm de profundidade em queijos e 5 mm em embutidos e produtos cárneos. Isto torna importante a determinação da concentração e da profundidade em que o agente ativo se encontra no alimento durante os ensaios de liberação. Nestes níveis, não haveria indução de resistência microbiana, uma vez que a natamicina não é absorvida de forma significativa pelo trato gastrointestinal e é rapidamente excretada pelo organismo (EFSA, 2009).

A natamicina possui alta massa molar (665,73 g/mol) e baixa solubilidade em água (0,0520 mg/mL). Apresenta maior estabilidade na forma de pó e na ausência de calor e luz. A estabilidade é afetada, principalmente, pelo pH (abaixo de 5 e acima de 9), por exposição à radiação UV, luz solar, altas temperaturas (principalmente acima de 100°C) e por oxidantes químicos. A dose diária de natamicina não deve ultrapassar 0,3 mg/ kg massa corporal/dia, sendo que a ingestão oral em doses superiores a 300 mg/dia pode ocasionar náuseas, vômitos e diarreia (Pedersen, 1992; Sullof, 1999). Em estudos de toxicidade, os efeitos observados em

animais foram decréscimo na ingestão de alimentos, diminuição na taxa de ganho de peso corporal, irritação gastrointestinal e diarreia. A dose letal (DL50) para roedores pode variar de 450 a 1400 mg/kg de massa corpórea (ESFA, 2009).

Entre as principais vantagens da natamicina destacam-se a baixa migração para o interior dos alimentos quando aplicada na superfície; boa relação custo-benefício, visto que existe alta eficiência com baixas concentrações (1-20 ppm); possível aplicação em produtos fermentados, pois não tem ação contra bactérias e baixa influência sobre o sabor, aroma e cor do produto alimentício (Danisco, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado eficiência e aplicabilidade dos filmes e coberturas ativas contendo natamicina. Oliveira *et al.* (2007), por exemplo, elaboraram filmes de celulose contendo diferentes concentrações de natamicina e avaliaram o seu efeito contra o fungo *Penicillium roqueforti* em queijos do tipo gorgonzola. Resultados satisfatórios foram obtidos para a inibição fúngica com filmes contendo 2 e 4% de natamicina. Os autores observaram que a quantidade de natamicina liberada para manter a atividade no queijo foi inferior à quantidade máxima permitida pela legislação e, também, inferior à quantidade encontrada no queijo controle (produzido com imersão em solução de natamicina), confirmando seu potencial em diminuir os níveis de consumo de aditivos sem comprometer a eficácia antimicrobiana.

Filmes de celulose com natamicina também foram avaliados por Pires *et al.* (2008) e mostraram-se efetivos em testes de inibição *in vitro* contra os fungos *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp. Em outro teste, ao aplicarem os filmes antimicrobianos entre fatias de queijo muzzarella, os autores observaram uma diminuição significativa na contagem de fungos e leveduras, prolongando em 6 dias a vida de prateleira deste tipo de queijo.

Natamicina foi incorporada a filmes de metilcelulose e glúten de trigo observando-se efeito inibitório através de testes *in vitro* contra o *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti* (Türe *et al.*, 2008). Recentemente, estes autores, em outro trabalho utilizando os mesmos biopolímeros com natamicina, investigaram o efeito contra os micro-organismos *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti* na superfície do queijo Kashar refrigerado a 10°C (Türe *et al.*, 2011). Foram realizados testes microbiológicos durante 30 dias e foi verificado que ambos os filmes foram eficientes contra o *Aspergillus niger*. Porém, ao contrário dos testes *in vitro*, os filmes com natamicina não tiveram nenhum efeito sobre o *Penicillium roqueforti*. Essa diferença

de atuação foi atribuída ao crescimento fúngico mais intenso no queijo do que no meio de cultura e fez com que os autores recomendassem a aplicação de ensaios em alimentos reais.

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

3.7 Incorporação de antimicrobianos aos filmes poliméricos

A incorporação do antimicrobiano aos filmes é, na maioria dos casos, feita pela adição direta à solução aquosa formadora de filme (Pires *et al.*, 2008). No entanto, para compostos que possuem baixa solubilidade em água, como a natamicina, esta técnica apresenta alguns aspectos negativos. Alguns trabalhos que utilizam natamicina reportam que após esta incorporação, os filmes tendem a ser heterogêneos, com a presença de cristais não dissolvidos na matriz polimérica que, conseqüentemente, influenciam a liberação e prejudicam as propriedades mecânicas, ópticas e de barreira (Pires *et al.*, 2008; da Silva, 2009; Türe *et al.*, 2009).

Métodos alternativos de incorporação do antimicrobiano incluem a impregnação por absorção. Nesta técnica, o antimicrobiano é dissolvido em um solvente adequado (aquoso ou orgânico), o filme já estruturado é imerso nesta solução e a impregnação ocorre durante o intumescimento da matriz. O solvente é posteriormente eliminado, permanecendo o agente ativo no filme. Este procedimento tem sido utilizado para impregnação de fármacos com baixa solubilidade em água em diversos biopolímeros e outros materiais (Costa *et al.*, 2010). Este método, no entanto, tende a apresentar desvantagens em relação ao rendimento de incorporação e formação de solução residual após o procedimento.

Uma abordagem mais recente nos estudos com biopolímeros é a utilização de fluidos supercríticos, como o dióxido de carbono, para a impregnação de substâncias ativas em matrizes poliméricas. Esta técnica está descrita no próximo subitem.

3.7.1 Incorporação de antimicrobianos com fluidos supercríticos

Na técnica de incorporação com fluidos supercríticos, o composto a ser impregnado e os filmes são colocados dentro de uma célula de alta pressão. O conjunto é então pressurizado em condições pré-estabelecidas em que o fluido supercrítico solubiliza o composto e promove sua impregnação no filme. Após um determinado tempo de ação, realiza-se uma lenta despressurização para remoção do gás sem alterar o sistema impregnado (Braga *et al.*, 2008).

Uma substância pode ser definida como fluido supercrítico quando sua temperatura e pressão estão acima de sua temperatura e pressão críticas. No ponto crítico, a densidade da fase gasosa torna-se igual à da fase líquida e a interface entre estas duas fases desaparece (Cansell *et al.*, 2003).

Quando empregados nestas condições, os fluidos supercríticos apresentam propriedades físicas intermediárias entre um gás e um líquido, como baixa viscosidade, densidade maior do que a de gases e difusividade de massa maior do que em líquidos, conferindo alta capacidade de solubilização e de transferência de massa. Desta forma, um fluido supercrítico tem a capacidade de dissolver uma grande variedade de materiais, como os líquidos convencionais, porém mantendo o alto poder de penetração dos gases. Estas propriedades específicas permitem que os fluidos supercríticos possam ser utilizados em diferentes áreas, com destaque para extração de componentes ativos de substratos naturais. Alguns destes processos já estão bem estabelecidos industrialmente como, por exemplo, a descafeinização de grãos de café, extração de compostos amargos do lúpulo e remoção da nicotina do tabaco (Maul *et al.*, 1999).

O dióxido de carbono tem sido o fluido supercrítico mais utilizado por apresentar uma série de vantagens, como a baixa temperatura crítica (31°C), que permite que os processos sejam conduzidos a temperaturas suficientemente baixas para não provocar degradação de compostos sensíveis. O dióxido de carbono também não apresenta toxicidade e não é poluente nem corrosivo na ausência de água. Além disso, o custo é considerado baixo em relação a outros fluidos com pureza semelhante (Duarte *et al.*, 2009)

Em processos de impregnação em matrizes poliméricas, o CO₂ supercrítico pode atuar com um plastificante, promovendo o intumescimento do filme e facilitando a difusão do soluto (Braga *et al.*, 2008). Em condições adequadas, o CO₂ é facilmente removido da matriz e não altera ou danifica as propriedades físicas, químicas e mecânicas (Yañez *et al.*, 2011). Além do intumescimento reversível do filme, para que o processo de impregnação seja viável, é necessário que o agente ativo seja solúvel no fluido supercrítico e que o coeficiente de partição seja favorável para permitir que a matriz seja impregnada com uma quantidade suficiente de soluto (Kikic e Vecchine, 2003).

A densidade do solvente pode ser facilmente alterada modificando-se a pressão e a temperatura do sistema. Com isto, pode-se aumentar a solubilidade da substância a ser impregnada no meio e melhorar, conseqüentemente, a eficiência de impregnação. A solubilidade também pode ser aumentada significativamente pela adição de pequenas quantidades de outros produtos, chamados de cossolventes, polares ou apolares, como a água e o etanol (Costa *et al.*, 2010). Essas opções adicionam flexibilidade e permitem a adequação de condições de processamento para as necessidades específicas dos produtos a serem processados.

A impregnação de compostos ativos em filmes e membranas utilizando fluidos supercríticos tem sido amplamente estudada para o desenvolvimento de dispositivos para liberação controlada de fármacos (Braga *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010). No entanto, a aplicação desta técnica para a obtenção de filmes antimicrobianos para alimentos é muito escassa e está limitada ao estudo de Souza *et al.* (2014), que avaliaram a impregnação de cinamaldeído em filmes à base de fécula de mandioca .

3.8 Difusividade de substâncias ativas em filmes poliméricos

A eficácia dos filmes antimicrobianos está diretamente relacionada ao comportamento da liberação do agente ativo para a superfície do alimento, que deve ocorrer a uma taxa que permita que a concentração mínima inibitória contra os micro-organismos deteriorantes seja mantida durante o período desejado (Han e Gennadios, 2005).

As tentativas de se obter sistemas de liberação controlada foram direcionadas, inicialmente, para aplicações farmacêuticas que incluíam liberação de drogas a partir de cápsulas e outros dispositivos poliméricos. Estudos sobre o desenvolvimento de filmes para

aplicação em alimentos com liberação controlada de substâncias ativas são ainda bastante limitados (Gemili *et al.*, 2009). Um dos motivos, é que, diferentemente da maioria dos sistemas contendo fármacos, a matriz polimérica das embalagens de alimentos não se desintegra durante a liberação do agente ativo (Buonocore *et al.*, 2003a).

Em um dos primeiros trabalhos focados em controlar a taxa de liberação de um antimicrobiano a partir de um filme, Ozdemir e Floros (2003) adicionaram cera de abelha à formulação de um filme de proteína, promovendo a diminuição da difusividade do sorbato de potássio. A partir de então, diferentes estratégias tem sido utilizadas. Buonocore *et al.* (2005), por exemplo, desenvolveram um filme em multicamadas de PVOH com e sem reticulação. Estes filmes eram compostos de duas camadas externas e uma camada interna contendo lisozima. Nestas estruturas, a camada interna regula a velocidade de difusão do agente ativo e as camadas externas exercem uma função de barreira para proteger este agente do contato direto com o alimento e umidade e evitar a migração para o exterior da embalagem.

O mecanismo da liberação de um agente ativo está baseado na difusão através da matriz polimérica que, fundamentalmente, corresponde a um processo de agitação e mistura em escala molecular. Esse movimento aleatório e individual das moléculas das substâncias-alvo associado a um gradiente de concentração faz com que, macroscopicamente, resulte em um fluxo de massa. A difusão pode ser vista como um processo no qual a concentração tende a se igualar em todos os pontos de cada fase do sistema com o passar do tempo levando a uma concentração de equilíbrio do soluto entre as fases.

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

Para processos de difusão de massa em regime permanente, em uma única fase, a equação que correlaciona o fluxo de difusão com o gradiente de concentração é a Equação 3.1, conhecida como Lei de Fick (Cussler, 2009).

$$j = -D \frac{dC}{dz} \quad (3.1)$$

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

Entretanto, a maioria das situações práticas envolvendo difusão, bem como a difusão de um composto ativo incorporado em um filme, ocorre em condições transientes. Neste tipo de difusão, tanto o fluxo quanto o gradiente de concentração numa dada posição, variam com o tempo. Como resultado, ocorre um acúmulo ou esgotamento do componente que está difundindo. Este processo é descrito pela 2ª Lei de Fick (Equação 3.2).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (3.2)$$

Os métodos de análise em regime transiente, conhecidos como ensaios de liberação ou migração, medem a taxa de difusão enquanto o soluto se difunde para dentro ou para fora da matriz. O filme é imerso em água (ou outro sorvedouro) e o aumento de concentração do agente antimicrobiano é monitorado periodicamente e permite calcular a massa liberada com o tempo (Han, 2000). A equação diferencial 3.2 pode ser integrada, e quando se considera a difusividade e a espessura do filme constantes, a transferência do soluto pelas duas faces do filme e que não há reação química, obtém-se a Equação 3.3 (Cussler, 2009):

$$\frac{\bar{C}_t - C_{Sup}}{C_{inicial} - C_{Sup}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 D}{\delta^2} t\right) \quad (3.3)$$

onde $\bar{C}_t$ é a concentração média do soluto remanescente no filme no tempo t , e corresponde à integral do perfil de concentração obtido da 2ª Lei de Fick, C_{Sup} é a concentração do soluto na superfície do filme, $C_{inicial}$ é a concentração inicial, assumida uniforme em todo o filme e δ é a espessura do filme.

Como o volume do filme foi assumido constante, o adimensional de concentração pode ser considerado como a fração da massa total de soluto contido no filme transferido para a água em um intervalo de tempo de 0 a t através da Equação 3.4:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = \frac{\bar{C}_t - C_{Sup}}{C_{inicial} - C_{Sup}} \quad (3.4)$$

onde M_t é a massa liberada no tempo t e M_∞ é a massa de soluto que seria liberada em um tempo infinito.

Na determinação experimental da difusividade, o filme é colocado em contato com um líquido e monitora-se a variação da concentração do componente ativo no líquido. Para uma adequada interpretação das Equações 3.4 e 3.3, a resistência à transferência de massa no fluido (líquido bem agitado) deve ser baixa. Nessa situação, C_{Sup} é a concentração em equilíbrio com esse fluido e calculável pelo uso do coeficiente de partição entre o filme e o meio de liberação. Infelizmente, entretanto, esses coeficientes de partição são de difícil determinação de modo que é preferível manter a concentração média no líquido próximo a zero (renovando o volume) ou, se possível, usar um solvente com alto poder de solubilização do soluto.

Para tempos curtos, quando $M_t/M_\infty < 0,6$ (ver Apêndice A), a Equação 3.2 assume condições de contorno de um meio semi-infinito e com o soluto sendo liberado pelas duas fases do filme com espessura total δ , pode se obter a Equação 3.5, também conhecida como solução de tempos curtos (Crank, 1975).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\delta^2 \pi}} \quad (3.5)$$

Pesquisas no LEPPbio indicam que estas soluções da 2ª Lei de Fick podem ser ajustadas aos resultados experimentais, fornecendo com boa precisão o valor da difusividade efetiva (D_{ef}) do soluto no filme (da Silva, 2009; Bierhalz, 2010). Porém, o elevado intumescimento que ocorre nos primeiros minutos dos filmes em contato com a água pode afetar os valores de difusividade e deveria ser levado em consideração nos cálculos. A influência do intumescimento e a identificação do mecanismo envolvido no processo de difusão podem ser avaliados pelo Modelo da Lei da Potência, descrito pela Equação 3.6 (Siepmann e Peppas, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.6)$$

Neste modelo, k é uma constante associada às características estruturais e geométricas dos dispositivos de liberação e n é o expoente que define o mecanismo de

liberação. O valor do expoente de liberação (n), calculado por esta equação, está relacionado com o comportamento da matriz polimérica. Quando o valor de n for igual a unidade ($n=1$), a taxa de liberação do agente ativo é independente do tempo, correspondendo a uma cinética de ordem zero, também conhecida como *transporte caso-II*. Neste caso a liberação é controlada pelo intumescimento e desestruturação do filme. Quando n for igual a 0,5 o mecanismo de liberação é controlado por difusão e tem-se um *transporte fickiano do tipo I*. Valores de n entre 0,5 e 1,0 podem ser considerados como um indicador para a superposição dos fenômenos de difusão e relaxação (*transporte anômalo*) (Siepmann e Peppas, 2001).

Segundo Buonocore *et al.* (2003b), o modelo matemático para filmes hidrofílicos deve associar a difusão das moléculas de água para o interior do filme, a contra-difusão do agente antimicrobiano do filme para a água e a cinética de intumescimento da matriz. Estes autores desenvolveram um modelo matemático levando em consideração estes fatores e obtiveram bons resultados para filmes de polivinilálcool contendo lisozima, nisina e benzoato de sódio como agentes antimicrobianos.

Baseados também na combinação destes parâmetros, Flores *et al.* (2007) desenvolveram um modelo (a Equação 3.7) para a liberação de sorbato de potássio a partir de filmes de fécula de mandioca em meios agitados com diferentes pHs. Além dos coeficientes de difusão, o modelo permite estimar o tempo da relaxação polimérica associado à relaxação do polímero (τ) e o desvio do comportamento fickiano (X_F).

$$M_t = M_\infty \cdot \left\{ X_F \cdot \left[1 - \frac{8}{\pi^2} \cdot \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \cdot \exp \left[-D(2n+1)^2 \cdot \pi^2 \cdot \frac{t}{\delta^2} \right] \right] + (1 - X_F) \cdot \left[1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau} \right) \right] \right\} \quad (3.7)$$

Fajardo *et al.* (2010) utilizaram este modelo para o estudo da difusividade da natamicina a partir de coberturas de quitosana em um meio líquido (solução de PBS) e também sobre uma amostra de queijo e obtiveram bons ajustes. Os valores e o significado físico dos parâmetros obtidos, entretanto, precisam ser confirmados, pois a equação 3.7 assume que a resistência à transferência de massa no alimento é desprezível em relação à resistência no filme, uma situação questionável no caso de queijos, por exemplo.

3.9 Modelagem da liberação controlada de substâncias ativas incorporadas em embalagens utilizadas em alimentos semi-sólidos

A partir da 2ª Lei de Fick e conhecendo-se as difusividades dos solutos, diversos modelos matemáticos têm sido propostos para a avaliação da migração de aditivos a partir de materiais de embalagem (Chung *et al.*, 2002). Com um modelo matemático adequado, o perfil de liberação do antimicrobiano para o alimento pode ser simulado e o tempo de permanência deste agente ativo acima da concentração inibitória dos micro-organismos pode ser predito (Sebti *et al.* 2003).

O conhecimento e controle destes sistemas difusionais é crítico no caso de embalagens de poliolefinas que normalmente contêm plastificantes tóxicos, que tendem a migrar para o alimento (Brandsch *et al.*, 2002; Sanches-Silva *et al.*, 2009).

Os modelos mais refinados de baseiam em soluções da 2ª Lei de Fick, a exemplo da Equação 3.3, mas incorporam também o coeficiente de partição do soluto entre a embalagem e o alimento e o fato do volume de alimento ser finito. Os modelos encontrados na literatura, entretanto, sempre assumem o alimento como um meio sem resistência à transferência de massa (Cruz *et al.*, 2008; Sanches-Silva *et al.*, 2009).

Se o filme for utilizado na embalagem de um alimento pastoso (cremes, patês, mingaus) ou sólido como queijos, carnes ou frutas, por exemplo, será preciso considerar as resistências à transferência de massa (no filme e no alimento), a distribuição de equilíbrio do soluto entre essas duas fases e, para ser realista, incluir uma resistência de contato (Han, 2000). São elementos adicionais que aumentam a complexidade, não apenas da expressão matemática, como também do levantamento experimental dos parâmetros físicos.

A difusividade de princípios ativos em alimentos é baixa, aproximando-se da difusão no próprio filme. Han e Floros (1998) encontraram difusividades do sorbato em queijo muzzarella da ordem de $0,7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Os autores utilizaram a solução em série de Fourier para ajuste dos resultados experimentais, mas não especificaram a temperatura do ensaio.

Usando um gel de agarose (3%), Ripoche *et al.* (2006) determinaram uma difusividade da nisina de $4,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, a 10°C . Neste ensaio, um cilindro de 7 cm de diâmetro e 7 cm de comprimento teve uma das faces planas em contato com uma solução aquosa contendo 300 $\mu\text{g/mL}$ de nisina, bem agitada.

Estes baixos valores de difusividade permitem afirmar que o alimento pode ser considerado um meio semi-infinito, isto é, a frente de concentração não alcança a face mais afastada do local da fonte do agente ativo no período considerado. Este modelo foi aplicado por Ripoche *et al.* (2006) e a Figura 3.6 confirma o bom ajuste aos pontos experimentais. Foi observado que após 6 dias de contato, a frente de concentração penetrou apenas 1,8 cm, caracterizando portanto, uma situação de “difusão livre”.

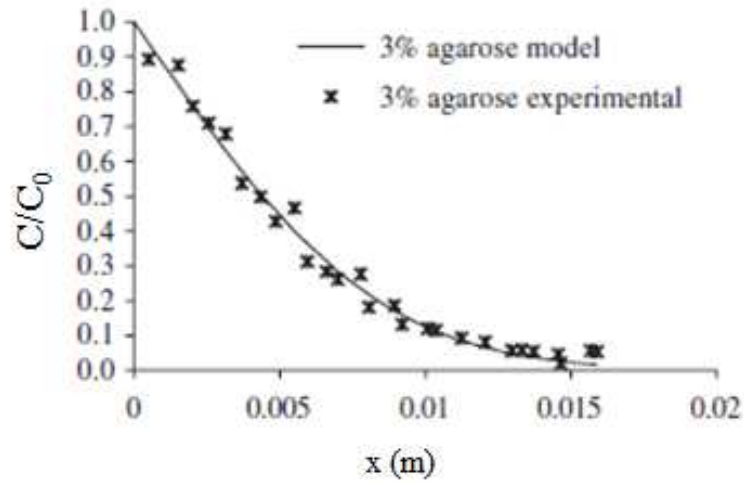


Figura 3.6: Perfil de concentração de nisina em um gel de agarose após 6 dias de contato a 10°C (Ripoche *et al.*, 2006).

Conforme já explicitado, o comportamento inicial na liberação de antimicrobianos contidos em filmes ativos também pode ser modelado como o de um meio semi-infinito (da Silva, 2009; Bierhalz, 2010).

Crank (1975) desenvolveu soluções analíticas para um sistema composto por dois meios semi-infinitos justapostos, com e sem resistência na interface. Denotando pelo superscrito A o alimento e F o filme, as equações de Crank têm as seguintes expressões para o perfil de concentração no filme (Equação 3.8) e no alimento (Equação 3.9).

$$C^F = \frac{k_{F/A} C_0^F}{1 + k_{F/A} (D^F/D^A)^{1/2}} \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{D^F t}} \quad (3.8)$$

$$C^A = \frac{C_0^F}{1 + k_{F/A} (D^F/D^A)^{1/2}} \left\{ 1 + k_{F/A} (D^F/D^A)^{1/2} \operatorname{erf} \frac{x}{2\sqrt{D^A t}} \right\} \quad (3.9)$$

Na dedução destas equações, assume-se que a concentração inicial de antimicótico no alimento é zero e C_0^F é a concentração inicial do agente ativo no filme. A constante k corresponde ao coeficiente de partição, definido como a relação entre as concentrações de equilíbrio do migrante no filme e no alimento, representada pela Equação 3.10:

$$k_{F/A} = \frac{C^F}{C^A} \quad (3.10)$$

Uma situação com valores típicos de difusividades encontrados em alimentos e filmes e desprezando possíveis resistências de contato está traçada na Figura 3.7.

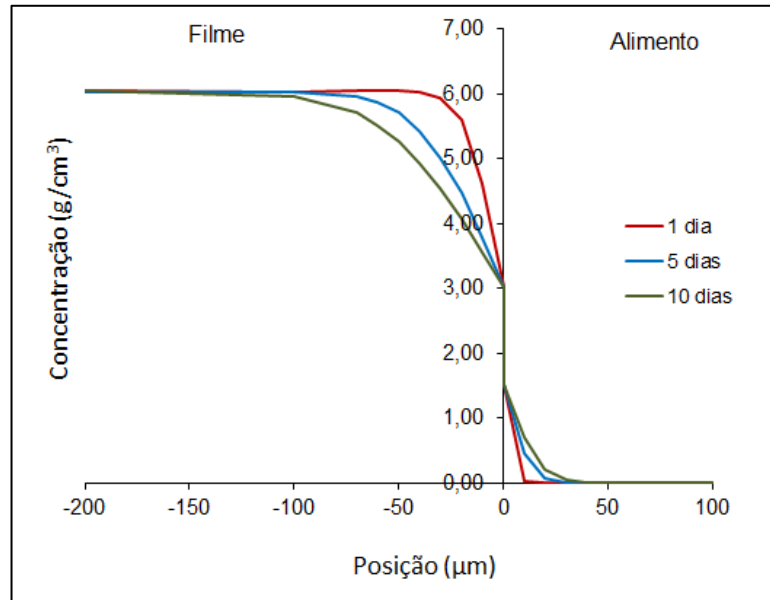


Figura 3.7: Simulação dos perfis de concentração para um meio composto de um filme e um alimento sólido ($D^F = 1 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $D^A = 1 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$, $k=2$, $C_0^F = 6 \text{ mg}/\text{cm}^3$). Fonte: Elaborado pela autora.

Este modelo prediz que enquanto houver a situação de dois sólidos semi-infinitos justapostos, a concentração na superfície do alimento permanece:

$$C_{interface}^A = \frac{k_{F/A} C_0^F}{1 + k_{F/A} (D^F / D^A)^{\frac{1}{2}}} \quad (3.11)$$

Este resultado é interessante porque esta concentração depende da razão entre as difusividades, um parâmetro mais fácil de estimar do que o valor absoluto das difusividades. Quando houver uma resistência de contato, entretanto, Crank (1975) demonstra que esta concentração não permanece constante.

As equações 3.8 e 3.9 também são propostas por Han (2000), mas a literatura sobre embalagens ativas, entretanto, não apresenta resultados experimentais de aplicação deste modelo. As dificuldades encontradas na simulação utilizando o modelo dos dois meios semi-infinitos estão associadas às imprecisões no levantamento do perfil de concentração junto à interface e à coerência de dados de coeficiente de partição.

No presente trabalho faz-se uma avaliação da migração da natamicina a partir de filmes de alginato para a superfície de amostras de queijo, determinando-se, também, sua atividade antimicrobiana. Devido a isto, no próximo item são apresentadas algumas características gerais e aspectos microbiológicos deste alimento.

3.10 Queijos: características e aspectos microbiológicos

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra, sendo que há indícios de seu consumo nos anos 7000 a.C. O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas, as vitaminas A e B (Perry, 2004).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o queijo pode ser definido como “o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”. A denominação queijo está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea (Anvisa, 1996).

Todos os queijos possuem um processo básico de fabricação, no entanto, variações na origem do leite, técnicas de processamento e tempo de maturação fazem com que existam cerca de 1000 tipos de queijos (Perry, 2004). Na Tabela 3.2 está apresentada a classificação

dos queijos quanto ao teor de umidade. Esta classificação é importante no âmbito deste trabalho, tendo em vista que as especificações dos critérios microbiológicos e limites de aditivos permitidos são estabelecidos com base no teor de umidade do produto (Anvisa, 1996).

Tabela 3.2: Classificação geral dos queijos quanto ao teor de umidade.

Classificação	Umidade (%)	Consistência da massa	Exemplo comercial
Baixa umidade	Até 35,9%	Dura	Parmesão
Média umidade	Entre 36 e 45,9%	Semi-dura	Prato
Alta umidade	Entre 46 e 54,9%	Macia	Minas
Muita alta umidade	Maior de 55%	Mole	<i>Cottage</i> , frescal

O queijo Prato, avaliado no presente trabalho, é o 2º tipo mais consumido no Brasil e sua produção representa 40% do total de queijos no país. É um queijo tipicamente brasileiro, que teve origem no sul de Minas Gerais na década de 20, ao se tentar reproduzir os queijos Danbo (dinamarquês) e Gouda (holandês) nas condições locais (Londoño e Abreu, 1998).

O queijo Prato é obtido do leite de vaca pasteurizado, com massa semicozida, prensado e maturado, no mínimo, por 30 dias. É um queijo gordo, de consistência semi-dura e textura homogênea, com poucas e pequenas olhaduras (orifícios regulares e ovais) lisas e brilhantes. Seu sabor é suave, levemente adocicado e sua cor é amarelo-ouro. Em média, o queijo prato possui 43% de umidade e 27% de gordura em sua composição (Perry, 2004) com pH entre 5,2 e 5,5.

De forma geral, o queijo é um alimento de composição complexa e muito suscetível à contaminação, principalmente, devido à própria matéria-prima utilizada e ao alto teor de umidade dos locais de sua produção (Fajardo *et al.*, 2010). A contaminação microbiológica dos alimentos, além de representar um risco para a saúde do consumidor, acarreta inúmeros prejuízos econômicos para a indústria.

A presença de bolores e leveduras em queijos é, na maioria dos casos, indesejável e pode causar modificações nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais como, por exemplo, proteólise da casca em alguns tipos de queijos semi-duros, aparecimento de manchas de cores variadas e modificação do sabor na região periférica (Perry, 2004). Alguns fungos, como os da espécie *Aspergillus*, também podem ser patogênicos por

produzirem micotoxinas. As micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, por exemplo, são potentes carcinógenos hepáticos para animais e para o homem (Zacarchenco *et al.*, 2011).

Os principais fungos envolvidos na deterioração da superfície dos queijos pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Cladosporium* (Pires *et al.*, 2008; Fajardo *et al.*, 2010). Como os esporos de bolores requerem oxigênio para crescimento, não se espera seu desenvolvimento em queijos embalados a vácuo. Sua proliferação, entretanto, pode ocorrer em bolsas de ar existentes entre o material de embalagem e a superfície do queijo. Neste tipo de material, os fungos mais comuns são *Penicillium* spp. (principalmente o *commune*, um fungo azul) e o *Cladosporium cladosporioides* (um fungo preto).

Enquanto os fungos fazem parte da microbiota normal das câmaras de maturação de queijos devido à temperatura e à umidade favoráveis, a maior fonte de contaminação por leveduras é a salmoura. Desta forma, os queijos salgados em salmouras são mais suscetíveis a este tipo de contaminação. As espécies mais comuns são *Candida* spp., *Yarrowia lipolítica*, *Kluyveromices marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Debaromices hansenii* e *Pichia* spp. As leveduras possuem um metabolismo fermentativo que as tornam deteriorantes mesmo antes de suas colônias se tornarem visíveis no alimento. O queijo pode ficar rançoso, com sabor e cheiro muito desagradáveis e isto é frequentemente associado a pontos brancos na sua superfície.

A legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece limites em queijos somente para coliformes, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. O parâmetro bolores e leveduras foi extinto para a maioria dos queijos (Anvisa, 2001), ou seja, não são estabelecidos limites pela legislação para a contagem destes microorganismos. De acordo com Zacarchenco *et al.* (2011) isto seria uma inadequação da legislação, tendo em vista que avaliações em queijos de diferentes regiões do Brasil apontam frequentes contaminações por bolores e leveduras que representam riscos à saúde dos consumidores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 *Materiais utilizados para a elaboração dos filmes*

Para a confecção dos filmes foi utilizado alginato de sódio de média viscosidade (A2033, lote 058K0126, Sigma, EUA), massa molar de $1,3 \times 10^6$ g/gmol, proveniente de algas *Macrocystis pyrifera* e, portanto, com alto conteúdo de blocos M. Glicerol (Synth, Brasil) foi utilizado como plastificante. Como agente reticulante foram utilizados o cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Alemanha) e o cloreto de bário dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Synth, Brasil). Natamicina (Natamax[®]) com 50% de pureza (50% lactose, Danisco, Dinamarca) foi utilizada como agente antimicrobiano. Para a construção da curva de calibração foi utilizada Pimaricina grau HPLC, com pureza mínima de 95% (Sigma-Aldrich, EUA). Para impregnação da natamicina pelo método supercrítico foram utilizados dióxido de carbono (99,998%, Praxair, Espanha), etanol PA (Panreac, Espanha) e água deionizada em sistema Milli-Q (Milipore, EUA) como solventes.

4.1.2 *Géis simulantes de alimentos*

Os géis simulantes de alimentos para os testes de difusão dos filmes ativos foram preparados com ágar (Bacto, França) e gelatina (tipo A, Leiner Davis Gelatin, Brasil). O método de preparação dos géis está descrito em detalhes no item 4.4 c.

4.1.3 *Alimento processado*

Como alimento processado para os testes de difusão e eficiência antimicrobiana, selecionou-se um queijo tipo Prato (Heloisa, Brasil), produzido sem conservantes e com umidade média de $37,3 \pm 1,3\%$. De acordo com o fabricante, o queijo foi elaborado utilizando leite pasteurizado, cloreto de sódio, fermento lácteo, coalho, corante natural de urucum e cloreto de cálcio.

4.2 Confeção dos filmes

A elaboração dos filmes de alginato de cálcio seguiu o método composto de dois estágios desenvolvido por Zactiti e Kieckbusch (2005), com algumas modificações.

No primeiro estágio, glicerol na quantidade de 3,6 g foi solubilizado em 400 mL de água destilada por 15 minutos sob agitação mecânica de 900 rpm (Tecnal, modelo TE-139, Piracicaba, Brasil). Em seguida, adicionou-se 6 g de alginato de sódio, mantendo-se a agitação por 1 hora para completa dissolução. A solução foi aquecida a 70°C e pré-reticulada com a adição de 30 mL de solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a uma vazão de 1 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo 77120-70, EUA). Durante o processo de pré-reticulação, a solução foi mantida na temperatura de 70°C por meio de uma manta aquecedora (Fisaton, modelo 67, São Paulo, Brasil). A solução pré-reticulada ainda quente foi então transferida em alíquotas de 50 g para placas de acrílico (15 cm x 15 cm x 1 cm), que foram mantidas em estufa com circulação de ar (Tecnal, modelo TE-394/2, Brasil) a 40°C durante um período de 20 horas. Após este período, os filmes foram retirados dos suportes e armazenados durante 48 horas em ambiente a 25°C e 52% de umidade relativa.

No segundo estágio, os filmes obtidos na primeira etapa foram imersos em 50 mL de solução contendo glicerol (3% m/v) e íons Ca^{2+} ou Ba^{2+} durante diferentes períodos de tempo (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos). Após o tratamento, os filmes foram submetidos a uma lavagem rápida, pela imersão em 50 mL de solução aquosa de glicerol (3% m/v) por aproximadamente 5 segundos. Os filmes foram colocados sobre placas de acrílico e secos em um túnel com circulação de ar a temperatura ambiente (Figura 4.1) e umidade relativa superior a 60%. Durante este processo, hastes de metal foram utilizadas para fixar as bordas dos filmes e evitar o enrugamento durante a secagem.



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

Após esta etapa de secagem, os filmes foram acondicionados em ambiente com 52% de umidade relativa, por 72 horas antes dos ensaios de caracterização.

A utilização dos reticulantes Ca^{2+} e Ba^{2+} de forma individual ou combinada no 1º e 2º estágio de reticulação resultou em 4 diferentes formulações. Na Tabela 4.1 está apresentada a relação dos íons utilizados em cada estágio, bem como suas respectivas concentrações para cada uma destas formulações.

Tabela 4.1: Denominação dos filmes e especificações das condições de reticulação utilizada em cada formulação.

Formulação	1º estágio		2º estágio	
	Íon	Concentração (m/v)	Íon	Concentração (m/v)
<i>Ca-Ca</i>	Ca	0,27%	Ca	1,2%
<i>Ca-Ba</i>	Ca	0,27%	Ba	0,6%
<i>Ba-Ba</i>	Ba	0,06%	Ba	1,2%
<i>Ba-Ca</i>	Ba	0,06%	Ca	0,6%

As concentrações no 1º estágio correspondem à concentração de Ca^{2+} e Ba^{2+} em 30 mL de solução reticuladora que era adicionada lentamente à solução contendo o alginato. Esta concentração foi definida como a máxima quantidade possível de ser adicionada à solução de alginato a 70°C, mantendo a solução fluida, homogênea e sem pontos localizados de gelificação.

As quantidades de íons Ca^{2+} e Ba^{2+} utilizadas no 2º estágio de reticulação foram determinadas como a máxima concentração possível de promover melhorias nas propriedades físico-químicas, como resistência mecânica, massa solubilizada em água e permeabilidade ao vapor d'água, mantendo o aspecto visual dos filmes adequado.

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

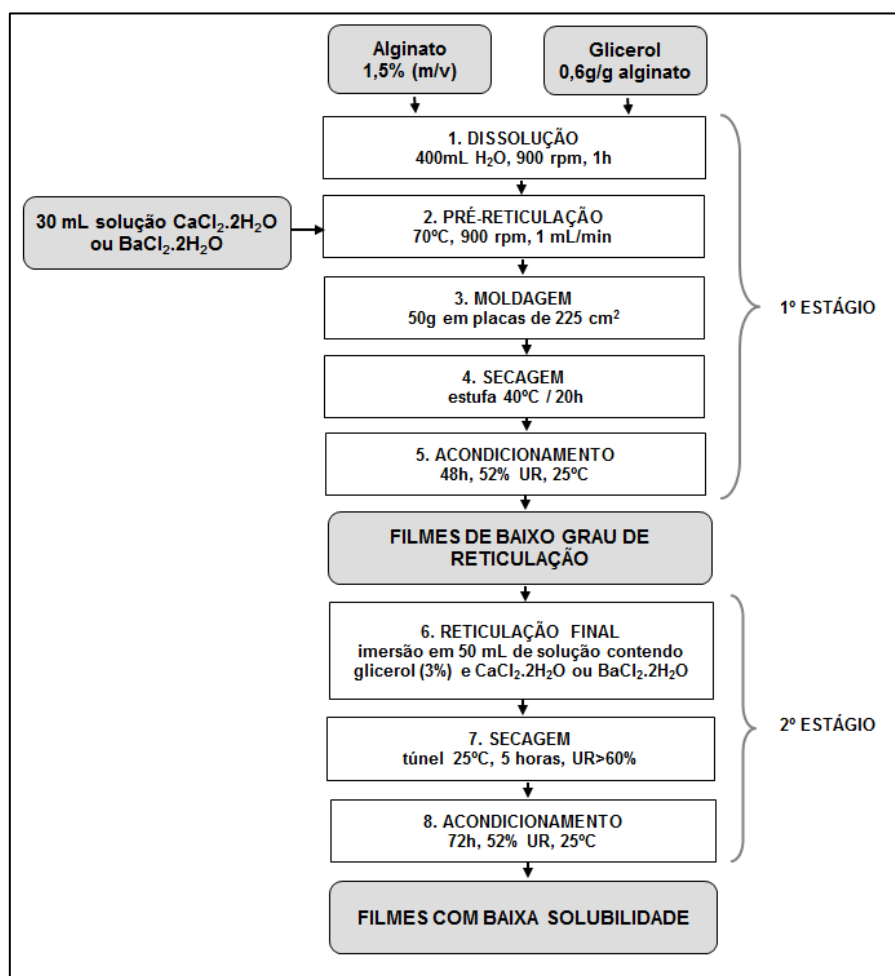


Figura 4.2: Fluxograma do processo de obtenção dos filmes de alginato reticulados com cálcio ou bário.

4.2.1 Incorporação da natamicina

4.2.1.1 Método convencional

O método convencional de incorporação consistiu na adição direta do antimicrobiano à solução formadora de filme. A natamicina foi adicionada após a etapa pré-reticulação (entre as etapas 2 e 3 do fluxograma apresentado na Figura 4.2), na quantidade de 0,04 g/g alginato, mantendo-se a agitação e o aquecimento da solução durante 10 minutos antes de prosseguir com o *casting*. A concentração de natamicina utilizada foi definida com base no estudo preliminar de da Silva (2009), que observou que esta era a concentração mínima a ser

adicionada em filmes de alginato e filmes compostos de alginato e quitosana a fim de se obter inibição *in vitro*.

4.2.1.2 Impregnação por imersão dos filmes em solução contendo natamicina

a) Durante o preparo do filme: Este processo de impregnação foi investigado como um procedimento em conjunto durante a realização do 2º estágio de reticulação. A natamicina, na concentração de 0,06%, foi adicionada à solução reticuladora contendo cloreto de cálcio (1,2% m/v) e glicerol (3% m/v) na qual filmes de 1º estágio eram imersos. Foram avaliados tempos de imersão de 15 a 240 minutos, com base em ensaios preliminares.

b) No filme acabado: Amostras de filmes (ainda sem natamicina) com os dois estágios de reticulação foram imersos em uma solução etanólica contendo natamicina. Foi verificado em ensaios preliminares que, devido à baixa solubilidade da natamicina, soluções com água pura não promoviam a impregnação do antimicrobiano aos filmes. Desta forma, para aumentar a solubilidade da natamicina e permitir uma maior quantidade impregnada, foram utilizadas diferentes concentrações de etanol na solução (2, 3, 5 e 8% molar). Glicerol foi adicionado à solução com o intuito de impedir a lixiviação do plastificante do filme.

Filmes com dimensões de 9 cm², foram imersos em soluções etanólicas (20 mL) contendo natamicina (0,1% m/v) e glicerol (3% v/v). As soluções foram mantidas em temperatura ambiente (23 ± 1 °C) sob lenta agitação magnética (50 rpm).

A fim de avaliar o efeito do tempo na quantidade impregnada, os filmes permaneceram imersos durante 2, 5, 10, 18 e 24 horas. Após o período de contato, os filmes foram dispostos sobre placas de acrílico para secagem em temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas.

4.2.2.3 Impregnação com CO₂ supercrítico

O esquema do aparato experimental utilizado para os ensaios de impregnação com CO₂ supercrítico está apresentado na Figura 4.3. Estes ensaios foram realizados no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

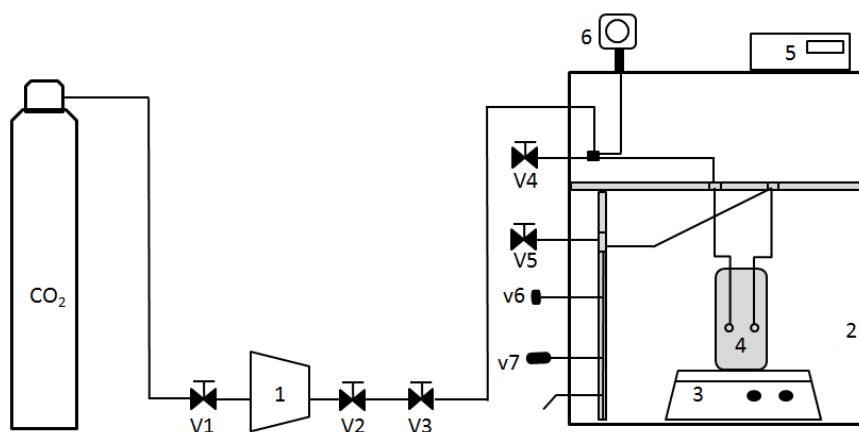


Figura 4.3: Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na impregnação com solvente supercrítico. Bomba de CO₂ (1); banho de ar (2); agitador magnético (3); célula de impregnação de aço inoxidável (volume interno de 20 cm³) (4); controlador de temperatura (5); manômetro (6), válvulas (V); válvulas de controle (v).

Na parte inferior da célula de impregnação (Figura 4.4 A), colocou-se um anel metálico e no seu interior foi adicionada a natamicina em pó, na quantidade de 2 mg, juntamente com uma barra de agitação magnética. Na camada acima da natamicina, foi posicionado o suporte (Figura 4.4B) contendo 3 amostras de filme com 1 cm², previamente pesados. Após esta montagem, a célula foi fechada e acoplada ao sistema de banho de ar, procedendo-se então a pressurização até a condição desejada. Durante a operação, o sistema manteve-se sob agitação magnética para solubilizar e homogeneizar a mistura.

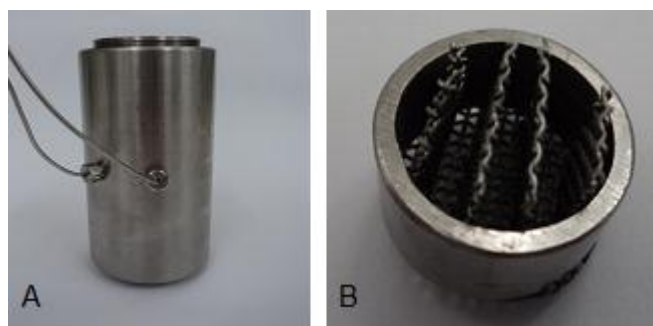


Figura 4.4: Célula de impregnação (A) e suporte utilizado para os filmes (B).

A fim de aumentar a solubilidade da natamicina no CO₂ supercrítico, também foi avaliada a utilização de etanol como cossolvente (10% molar). O etanol líquido foi colocado em contato com a natamicina, no interior da célula de impregnação. O volume de etanol utilizado foi calculado levando em consideração a concentração desejada e as condições (temperatura e pressão) do processo. Inicialmente, os ensaios foram realizados a 40°C e 200 bar, variando o tempo de processo (2,5, 4 e 14 horas) com e sem cossolvente. Definido o tempo adequado, foram avaliadas diferentes densidades de CO₂, conforme as condições apresentadas na Tabela 4.2. Foram utilizadas taxas de despressurização de 5 bar/min.

Tabela 4.2: Densidades do CO₂ utilizadas nos ensaios de impregnação da natamicina.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade CO ₂ (kg/m ³)
100	40	628
150	40	780
200	40	839
300	40	909

As densidades do CO₂ utilizadas nos ensaios de impregnação da natamicina são conhecidas por promoverem a solubilização e a impregnação de diversos compostos de baixa solubilidade em água em matrizes biopoliméricas (Dias *et al.*, 2011; González-Chomón *et al.*, 2012).

4.3 Caracterização dos filmes

Antes das análises de caracterização, todos os filmes utilizados foram mantidos em ambiente com 52% de umidade relativa por 72 horas.

4.3.1 Aspecto visual

A avaliação do aspecto visual foi realizada de forma subjetiva, considerando características como homogeneidade, continuidade, facilidade de desprendimento do suporte e de manuseio.

4.3.2 Espessura

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

4.3.3 Conteúdo de umidade

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

4.3.4 Massa solubilizável em água

A massa solubilizável em água dos filmes foi quantificada segundo método proposto por Irissin-Mangata *et al.* (2001). Inicialmente, a umidade de uma amostra de filme foi determinada (105°C/ 24 h) conforme o Item 4.3.3. Outra amostra do mesmo filme foi então imersa em 50 mL de água destilada e o sistema mantido sob agitação lenta e periódica (150 rpm) a 25°C por 24 h, utilizando-se um banho com temperatura controlada (*Shaker Bath Orbit*, Lab-Line, EUA). Esse segundo filme foi seco em estufa a vácuo para determinação da massa não solúvel. Foram realizadas três replicatas. A massa solubilizada (MS) é expressa em função da massa seca inicial conforme a Equação 4.1.

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

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

m_0 é a massa total inicial de amostra [g]

m_f é a massa não solúvel [g]

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

4.3.5 Grau de intumescimento (GI)

a) em água: O grau de intumescimento foi determinado segundo a metodologia proposta por Xu *et al.* (2003). A massa inicial (m_i) de uma amostra circular de filme de 2,5 cm de diâmetro foi quantificada e imersa em água destilada por diferentes períodos a fim de

determinar o tempo de estabilização da absorção de água. O filme hidratado foi novamente pesado após leve compressão entre folhas de papel para retirar o excesso de água. O grau de intumescimento (GI) foi calculado em função da massa total inicial da amostra conforme Equação 4.2. Também foi determinado o aumento da espessura e do diâmetro dos filmes após a imersão em água pela razão entre a média das medidas final e inicial. O diâmetro foi medido com um paquímetro (Mitutoyo, Japão). A análise foi realizada com quatro repetições.

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

Onde: GI é o grau de intumescimento

m_u é a massa do filme úmido [g]

m_i é a massa total inicial da amostra [g]

b) Em contato com o gel e o alimento: Amostras de filmes com 2,5 cm de diâmetro foram colocadas sobre os géis de ágar e de gelatina (preparados conforme descrito no item 4.4 c) e também sobre uma fatia de queijo prato. Foram realizadas as pesagens em diferentes intervalos de tempo até que não houvesse mais variação na massa final do filme. O grau de intumescimento, a relação entre as espessuras e os diâmetros foram determinados conforme descrito no Item anterior.

c) Em soluções hidroetanólicas: Amostras de filmes (2,5 cm de diâmetro) também foram imersas em 50 mL de soluções aquosas contendo etanol nas concentrações de 2 a 8 mol%. O aumento de massa dos filmes foi monitorado periodicamente durante 24 horas. Este ensaio foi realizado com o objetivo de relacionar a eficiência de incorporação da natamicina com o grau de intumescimento dos filmes nas soluções de impregnação utilizadas.

4.3.6 Propriedades mecânicas

As análises de tensão na ruptura (TR) e alongamento na ruptura (A) foram realizadas com o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System SMD, Inglaterra), seguindo o método padrão D-882 (ASTM, 1995a). A separação inicial das garras foi de 5 cm e a velocidade de afastamento das garras de 0,1 cm/s. Um mínimo de doze amostras de filmes com dimensões de 10 x 2,54 cm, equilibrados em umidade relativa de 52%, foram utilizados. A espessura foi

pré-determinada pela média aritmética de cinco medidas em pontos aleatórios em cada amostra. Um microcomputador foi utilizado para registrar as curvas de tensão-deformação. A tensão na ruptura do filme foi determinada a partir da Equação 4.3, na qual a força máxima no rompimento é dividida pela área da seção transversal (espessura x largura). O alongamento na ruptura foi determinado pela Equação 4.4, que relaciona a distância final da separação das garras pela distância inicial da separação.

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

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

onde: TR é a tensão na ruptura [MPa]

F_m é a força máxima no rompimento [N]

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

A é o alongamento na ruptura [%]

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

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

4.3.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995b), utilizando-se uma célula de acrílico com um volume interno de 30 mL e que dispõe de uma tampa com abertura central de 15,21 cm² na qual se fixa o filme (Figura 4.5). Cloreto de cálcio granulado (Ecibra, São Paulo, Brasil) foi utilizado para preencher o fundo da célula até próximo à borda. A célula foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado. O fundo desse recipiente continha uma solução saturada de NaCl (Synth, Diadema, Brasil) para manter o ambiente a 75% UR. A variação de massa da célula com o tempo (G) corresponde à taxa de água que permeou pelo filme sendo usada na equação para calcular a PVA (Equação 4.5).

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

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

δ é a espessura do filme [mm].

G é a taxa de permeação [g/dia] calculada por regressão linear de ganho de massa *versus* tempo.

A_e é a área exposta do filme [m²].

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

F é um fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o $CaCl_2$ e o filme (McHugh *et al.*, 1993). Nas condições do ensaio esta camada era inferior a 1,0 mm e cálculos indicaram que F era muito próximo de 1,0.



Figura 4.5: Aparato experimental utilizado para determinação da permeabilidade ao vapor de água.

4.3.8 Permeabilidade ao oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) a úmido foi determinada por método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma ASTM F1927 (ASTM, 2007). Foi utilizado o equipamento OXTRAN (Mocon, modelo 2/20, EUA) do Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA/ITAL), operando com oxigênio puro como gás permeante a 23°C e 77% UR. As amostras possuíam uma área efetiva de permeação de 50 cm² e foram acondicionadas de 42 a 78 horas em câmara climatizada a 25°C e 75% UR. O resultado obtido foi corrigido para 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio. Uma vez determinada a TPO_2 , calculou-se o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P), conforme a Equação 4.6:

$$P = \frac{TPO_2 \cdot \delta}{p} \quad (4.6)$$

Onde: P = coeficiente de permeabilidade ao oxigênio [$\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{KPa}$]

TPO_2 = taxa de permeabilidade ao oxigênio [$\text{cm}^3/\text{m}^2 \cdot \text{d}$.]

δ = espessura média do corpo de prova [μm]

p = pressão parcial de oxigênio na câmara de teste [101,32 KPa]

4.3.9 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi avaliada com um colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Faifax, EUA), utilizando-se os padrões CIELab. Neste sistema, conforme apresentado na Figura 4.6, são determinados os parâmetros de luminosidade L^* , variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo. A diferença total de cor (ΔE^*) entre os filmes ativos e os filmes sem natamicina foi calculada de acordo com a Equação 4.7.

$$\Delta E^* = \left[(L^* - L_p^*)^2 + (a^* - a_p^*)^2 + (b^* - b_p^*)^2 \right]^{0,5} \quad (4.7)$$

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

Também foi determinado o ângulo Hue, que dá a medida da tonalidade, pela Equação 4.8; e o Croma, referente à intensidade desta cor pela Equação 4.9.

$$\text{Hue} = \tan^{-1} (b^* / a^*) \quad (4.8)$$

$$\text{Croma} = \left[(a^*)^2 + (b^*)^2 \right]^{0,5} \quad (4.9)$$

A opacidade, medida da obstrução à passagem de luz pelo filme, foi determinada seguindo o método Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, 1997), utilizando-se o mesmo equipamento das medidas de cor, no modo de transmitância.

Por este método, a opacidade (Y) da amostra é calculada como a relação entre a opacidade do filme colocado sobre o padrão preto (Y_p) e a opacidade do filme colocado sobre o padrão branco (Y_b).

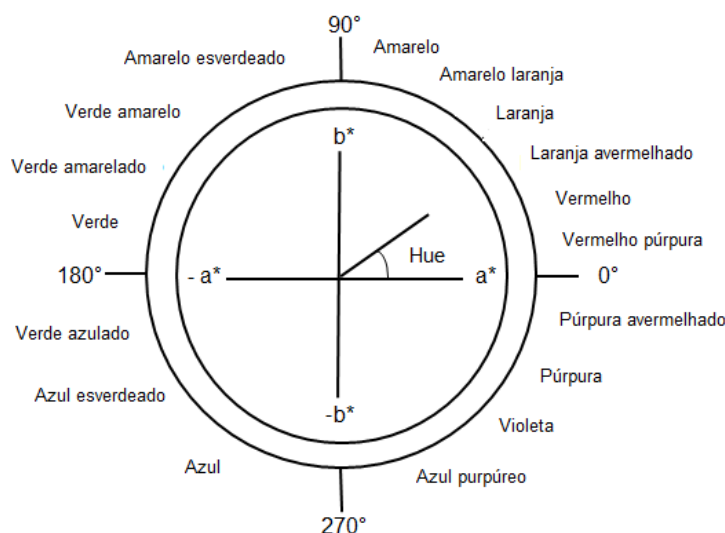


Figura 4.6: Seqüência Hue e orientação do ângulo Hue no diagrama CIE Lab com a seqüenciadas nuances de cores (Voss, 1992).

4.3.10 Microestrutura e análise elementar qualitativa

Os filmes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a avaliação da microestrutura da superfície e da seção transversal. Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (LEO 440i, Inglaterra) do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/Unicamp) com tensão de aceleração de 15kV e corrente de feixe igual a 100 pA. As amostras foram mantidas em dessecadores com sílica gel por 7 dias antes das análises. Após este período, os filmes foram criofraturados com nitrogênio líquido e fixados em suportes de alumínio. Para conferir condutividade, as superfícies das amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em um *Sputter Coater Polaron* (VG Microtech, Modelo SC7620, Inglaterra). Foi avaliada a morfologia dos filmes controle (sem natamicina) e dos filmes ativos antes e após os ensaios de liberação em água.

Integrado ao microscópio eletrônico de varredura, um detector de energia dispersiva de raios X (EDS, modelo 6070) permitiu realizar a análise elementar qualitativa dos filmes.

4.3.11 Teor de cálcio e bário

Para a quantificação da concentração de cálcio e bário nos filmes reticulados, amostras com aproximadamente 8 mg foram dissolvidas em 10 mL de solução aquosa de citrato de sódio (Synth, Brasil) a 2%, de acordo com o método descrito por Sriamornsak e Kennedy (2008). O cálcio foi determinado utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 100, EUA) com queimador de ar-acetileno do Laboratório de Engenharia Ambiental (LEA/FEQ/Unicamp). A determinação de bário foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Perkin-Elmer, DV-3000, EUA) na Central Analítica (IQ/Unicamp). Para a curva analítica, foram utilizadas soluções padrão de bário 1000 ppm (Ultra Scientific, EUA) e cálcio 1000 ppm (Titrisol, Merck, Alemanha). As determinações foram feitas em triplicata.

Foram avaliados filmes confeccionados somente com o 1º estágio de reticulação e filmes submetidos também ao 2º estágio de reticulação. Para as amostras *Ca-Ba*, foram comparados os resultados de filmes sem lavagem com os resultados de filmes com diferentes tempos de lavagem (5 s, 1 min, 5 min e 15 min) após o período de imersão na solução reticuladora. No processo de lavagem, o filme era imerso em uma solução contendo 50 mL de água destilada e glicerol (3% m/v).

4.3.12 Isotermas de sorção de umidade

As isotermas de sorção dos filmes foram levantadas por meio do método gravimétrico, utilizando soluções saturadas de sais em água destilada, que fornecem uma faixa de atividade de água de 0,11 a 0,90 (Tabela 4.3) de acordo com a metodologia descrita por Spiess e Wolf (1993). As amostras de filme com 2,5 cm de diâmetro foram dispostas em pesa-filtros que permaneceram abertos em um recipiente plástico (~100 mL) com fechamento hermético contendo a solução salina. Estes recipientes plásticos foram fechados e mantidos a 25°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Os pesa-filtros foram pesados em intervalos de 7 dias até que o equilíbrio fosse atingido.

Tabela 4.3: Atividades de água (a_w) das soluções saturadas de sais a 25°C (Spiess e Wolf, 1993).

Sal	a_w a 25°C
LiCl	0,113
MgCl ₂	0,328
K ₂ CO ₃	0,432
Mg(NO ₃) ₂	0,529
NaNO ₂	0,645
NaCl	0,753
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,803
KCl	0,843
BaCl ₂	0,903

Os pontos experimentais obtidos foram ajustados pelo modelo de Guggenheim-Anderson-De Bôer (GAB) (Equação 4.10) (Chirife e Iglesias, 1978).

$$X_w = \frac{CkX_m a_w}{(1 - k a_w)(1 - k a_w + Ck a_w)} \quad (4.10)$$

onde: X_w é o teor de umidade de equilíbrio em base seca;

a_w é a atividade de água (UR/100);

X_m é o conteúdo de umidade relativo à monocamada;

C e k são constantes do modelo GAB.

O ajuste do modelo aos dados foi avaliado em função da porcentagem da diferença relativa entre os valores experimentais e os valores preditos, definida como desvio relativo médio (DRM), calculado pela Equação 4.11 (Lomauro *et al.* 1985).

$$DRM = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{(V_i - V_p)}{V_i} \quad (4.11)$$

onde: DRM é o desvio relativo médio (%);

V_i são os valores observados experimentalmente;

V_p são os valores preditos pelo modelo;

N é o número de pontos experimentais.

Os parâmetros do modelo de GAB foram obtidos pelo programa computacional *Statistica* (versão 7.0) utilizando-se o módulo de estimativa não-linear com método Levenberg-Marquardt.

4.3.13 Ângulo de contato

A molhabilidade e a hidrofobicidade da superfície dos filmes foram avaliadas pelas medidas do ângulo de contato estático obtidas com o equipamento OCA-20 (Dataphysics, Alemanha) do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. Foi utilizado o método da gota sésil, o qual se baseia na determinação do ângulo de contato entre a gota e a superfície da amostra, através das medidas do diâmetro da base da gota e da altura da mesma. Uma gota de água deionizada (1 μL) é depositada na superfície do filme com uma microseringa e a imagem é imediatamente capturada pela câmera acoplada ao equipamento. Pelo *software*, o ângulo de contato (θ) da gota formada com a superfície é calculado, conforme ilustrado na Figura 4.7. Para que os filmes ficassem perfeitamente estendidos, estes foram fixados na lâmina de vidro com uma fita adesiva dupla face. Para cada tipo de filme foram realizadas seis medidas.

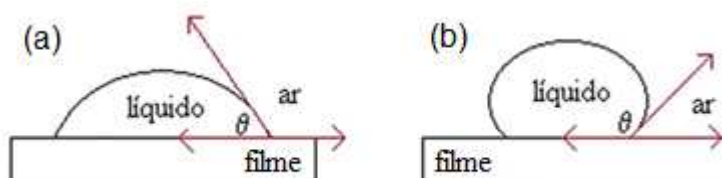


Figura 4.7: Representação do ângulo de contato (θ) formado entre a gota e a superfície sólida para material hidrofílico (a) e hidrofóbico (b).

4.3.14 Cristalinidade

A cristalinidade dos filmes foi determinada por meio da técnica de difração de raios-X, utilizando-se um difratômetro Philips Analytical X'Pert PW 3050 (Almelo, Holanda) com radiação Cu-K α . A fonte de raios-X operou em 40 kV e 40 mA e a intensidade da difração foi medida no

modo de reflexão a uma taxa de $0,6^\circ/\text{min}$ para $2\theta = 5 - 35^\circ$. As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/Unicamp)

4.3.15 Rugosidade

A rugosidade superficial dos filmes foi determinada em um rugosímetro digital (Mitutoyo, SJ-210, Japão) do Laboratório de Fluidodinâmica e Secagem (LFS/FEQ/Unicamp) e expressa em milímetros em termos do parâmetro Ra . Esta medida é a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento, dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição. Foi utilizado um comprimento total (L_n) de 5 mm e valor de *cut-off* (comprimento de amostragem) de 0,8 mm.

4.3.16 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada pela variação da massa em função da temperatura com o analisador termogravimétrico TGA Q500 (TA Instruments, New Castle, EUA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. As amostras, com aproximadamente 6 mg, foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas, a uma taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, desde a temperatura ambiente (cerca de 25°C) até 600°C . Os experimentos foram conduzidos em duplicata com atmosfera de nitrogênio (vazão de $40\text{ mL}/\text{min}$).

4.3.17 Espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR)

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas com o intuito de verificar possíveis modificações nas estruturas dos filmes após as diferentes reticulações e impregnações da natamicina. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 128 scans em um espectrofotômetro Jasco (modelo 4000, Reino Unido) com acessório de reflexão total atenuada ATR (MKII GoldenGate™ Single Reflexion ATR System, EUA) disponível do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

4.4 Ensaios de liberação

a) *Filme com natamicina liberada em água*

Para os ensaios de liberação em água foram utilizados recipientes com tampa contendo 25 mL água destilada que foram dispostos em um banho (*Shaker Bath Orbit*, Lab-Line, EUA) a 25°C e mantidos sob agitação (150 rpm) durante o experimento a fim de diminuir a possível resistência à convecção de massa. No tempo zero, a amostra de filme (dimensões 4 x 4 cm) contendo natamicina foi mergulhada no primeiro recipiente e, após um intervalo de tempo pré-determinado, foi rapidamente transferida para o segundo recipiente, e assim sucessivamente até o fim da liberação (Zactiti, 2004). Estes ensaios foram realizados em triplicata. A concentração do agente antimicrobiano foi determinada por espectrofotometria UV/Vis utilizando um espectrofotômetro (HP, modelo 8453, EUA), equipado com controlador de temperatura HP 89090A e software UV-Visible ChemStation. Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 290 a 350 nm e a concentração de natamicina foi determinada em terceira derivada pela amplitude do pico em 317 nm (Oliveira *et al.* 2007).

Para os filmes com natamicina impregnada pelo método supercrítico e por absorção/imersão, a liberação foi feita em amostras (1 cm²) imersas em 5 mL de água deionizada. Os recipientes foram mantidos sob agitação (150 rpm) em temperatura de 25°C. Em tempos pré-determinados, uma alíquota (2 mL) da solução era removida, analisada e rapidamente devolvida ao meio. As determinações de concentração foram realizadas em um espectrofotômetro Jasco (modelo 630, Japão) a 319 nm.

b) *Filme com natamicina liberada em soluções hidroalcoólicas*

Os ensaios de liberação de natamicina de filmes em contato com soluções hidroalcoólicas foram realizados a 25°C de forma a avaliar a influência da atividade de água do meio no processo difusivo. Filmes ativos (dimensões 2 x 2 cm) foram imersos em recipientes contendo 10 mL de soluções aquosas com etanol nas concentrações de 1, 4, 8 e 12% (v/v). Estas soluções foram caracterizadas quanto à atividade de água em um medidor Hygrolab (Rotronic, Suíça).

Os recipientes com as soluções e os filmes foram mantidos sob agitação de 150 rpm e em tempos pré-determinados, alíquotas de 2 mL eram retiradas da solução e devolvidas ao recipiente após a análise. As determinações de concentração foram realizadas em triplicata em um espectrofotômetro Bel Photonics (modelo SP 2000UV, Itália) no comprimento de onda de 319 nm.

c) *Filme com natamicina liberada em géis:*

Géis de ágar e de gelatina foram utilizados como simulantes de alimentos para os ensaios de liberação de natamicina de filmes em contato com meios sólidos.

Para a confecção dos géis, ágar na quantidade de 3 g foi solubilizado em 100 mL de água destilada a 80°C. A solução foi mantida sob agitação magnética e aquecimento durante 10 minutos. Após este período, alíquotas de 10 mL da solução foram colocadas em tubos *falcon* de fundo chato (12 mL) para gelificação. Os géis permaneceram armazenados a 8°C por 24 horas antes de serem utilizados. Os géis de gelatina foram obtidos pela adição de 30 g de gelatina em 100 mL de água destilada à temperatura ambiente (25°C). Após 1 hora de hidratação em repouso, a mistura foi colocada em banho-maria até que houvesse total dissolução dos grânulos de gelatina. Como no caso dos géis de ágar, a solução foi distribuída em tubos *falcon* e armazenada por 24 horas a 8°C.

O volume final dos géis foi de 9,70 cm³, com 1,4 cm de diâmetro e 6,3 cm de comprimento. A determinação da atividade de água das amostras dos géis utilizados foi feita a 25°C em um medidor Hygrolab (Rotronic, Suíça) a 25°C.

Após o período de gelificação, os géis foram mantidos em ambiente com temperaturas controladas de 8, 15 e 25°C, a fim de simular diferentes condições de armazenamento. Para impedir a desidratação, o sistema foi acondicionado nos mesmos tubos *falcon* nos quais os géis foram preparados e fechados com a tampa apropriada. No tempo zero de liberação, uma amostra circular de filme, com 1,4 cm de diâmetro, foi colocada na superfície superior livre dos géis (conforme ilustrado na Figura 4.8a) e o conjunto foi recolocado na temperatura do ensaio.

Após um tempo pré-determinado, o filme era removido do gel e a natamicina residual era quantificada em espectrofotômetro UV/Vis após dissolução dos filmes em 10 mL de solução de citrato de sódio 2%. Desta maneira a curva da liberação de natamicina do filme para os géis

foi determinada por pontos destrutivos, isto é, por meio de amostras diferentes (filme e gel) avaliados em cada intervalo de tempo. Cada ponto experimental corresponde à média aritmética de três repetições.

d) *Filme com natamicina liberada em queijo:*

Para os ensaios de liberação foram utilizadas 6 fatias de queijo em forma de discos, com 0,8 mm de espessura e 3,2 cm de diâmetro, colocadas uma sobre a outra, totalizando um cilindro de 4,8 mm de altura (Figura 4.8b). O queijo foi utilizado em fatias de forma a facilitar a determinação da profundidade até a qual ocorreu a migração da natamicina no alimento (ver Apêndice E).

No tempo zero, um filme, com o mesmo diâmetro do queijo, foi colocado sobre o cilindro e o conjunto foi embalado com filme de PVC, armazenado em placas de Petri fechadas e mantido nas temperaturas de 8,15 e 25°C.

A quantificação da natamicina residual no filme após tempos de contato pré-determinados foi feita conforme o método descrito no Item c.

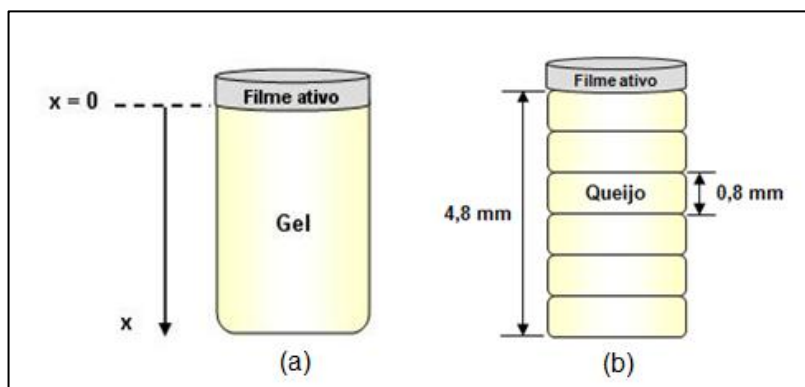


Figura 4.8: Esquema ilustrativo da posição do filme antimicrobiano no gel (a) e no queijo (b).

4.5 Modelagem matemática

a) *Difusividade da natamicina no filme em contato com a água e soluções hidroalcoólicas*

Para a determinação dos coeficientes de difusão da natamicina liberada em água e em soluções hidroalcoólicas foram utilizadas as Equações 3.3 e Equação 3.5. O modelo da Equação 3.7 também foi avaliado, uma vez que permite estimar o tempo de relaxação da matriz polimérica e o desvio do comportamento fickiano ideal.

O grau de ajuste dos modelos aos dados experimentais baseou-se na magnitude do coeficiente de determinação (R^2). Os parâmetros dos modelos foram obtidos por regressão não-linear com o auxílio do software *Statistica 7.0*.

b) Liberação da natamicina nos alimentos

Para avaliar o comportamento de liberação da natamicina contida nos filmes em contato com um meio sólido, como os géis de ágar e de gelatina, assim como o queijo, foi feito um ajuste do modelo dos dois meios semi-infinitos justapostos aos dados experimentais obtidos conforme descrito no Item 4.4 c e d.

A Equação 3.8 que contempla a variação temporal da concentração em qualquer posição do filme foi integrada em relação ao volume do filme, obtendo-se a variação da concentração média da natamicina neste filme em função do tempo t . A expressão final é a Equação 4.12 e a dedução da mesma está apresentada no Apêndice B.

$$\frac{\overline{C}_F}{C_0} = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \times \sqrt{\frac{D_F t}{\delta_F^2}} \times \frac{k_{F/A}}{1 + k_{F/A} \sqrt{\frac{D_F}{D_A}}} \quad (4.12)$$

onde $\overline{C}_F$ é a concentração média de migrante no filme no tempo t , C_0 é a concentração inicial de migrante no filme, D_F é a difusividade no filme, D_A é a difusividade no alimento, $k_{F/A}$ é o coeficiente de partição no equilíbrio entre o filme e o alimento e δ_F é a espessura do filme.

Para o ajuste desta equação aos dados experimentais, adotou-se como difusividade da natamicina no filme o valor de difusividade obtido nos ensaios de liberação em soluções hidroetanólicas de mesma atividade de água.

Na Equação 4.12, a difusividade da natamicina nos géis e no queijo, assim como os coeficientes de partição são os parâmetros de ajuste.

4.6 Determinação da eficiência antimicrobiana

A eficiência antimicrobiana dos filmes de alginato contendo natamicina foi avaliada contra os bolores *Aspergillus niger* (ACCT 6275), *Penicillium roqueforti* (NRLL 849), *Penicillium crustosum* (CCT 4462), *Penicillium chrysogenum* (ATCC 48905), *Cladosporium cladosporioides* (CCT 2825) e a levedura *Yarrowia lipolytica* (ATCC 8661). Todas as espécies são de ocorrência comum em queijos e foram adquiridas em *slants* da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas, SP.

4.6.1 Preparação do inóculo

Esta etapa se constituiu na inoculação das espécies fúngicas em placas de Petri contendo os meios de cultura específicos para o crescimento dos micro-organismos. Os meios de cultura utilizados foram: DG18 (dicloran glicerol agar) para *Aspergillus niger*; MEA (*Malt Extract Agar*) para *Penicillium roqueforti*; PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco, Becton Dickinson, EUA) para *Penicillium crustosum* e *chrysogenum*; MA (*Malt Agar*) para *Cladosporium cladosporioides* e YMA (*Yeast Malt Agar*) para *Yarrowia lipolytica*. Os materiais utilizados para a preparação dos meios de cultura utilizados estão apresentados no Apêndice C.

Com o auxílio de uma alça de Drigalski, retirou-se uma pequena quantidade do micro-organismo puro contido no *slant* e procedeu-se a inoculação em três pontos das placas com o meio de cultura já solidificado. Após a incubação a 25°C por 7 dias, fez-se uma raspagem com a alça, transferindo as colônias para 50 mL de uma solução de água peptonada 0,1% contendo 0,1% de Tween 80 (Synth, Brasil) e esferas de vidro. Esta suspensão foi agitada e filtrada com um funil contendo gaze estéril. A partir da solução inicial (solução mãe) foram feitas diluições decimais e contagem padrão em placas para a determinação da concentração (UFC/mL) e para a escolha da diluição adequada para o teste de difusão.

4.6.2 Teste de difusão em ágar

Para o teste de difusão em ágar, filmes equilibrados em umidade relativa de 52%, com 2,5 cm de diâmetro, foram previamente expostos à luz UV (254 nm) em câmara de fluxo laminar por 30 minutos de cada lado com o intuito de prevenir alguma contaminação por micro-organismos presentes nos filmes.

Os filmes foram colocados assepticamente sobre o centro da placa de Petri contendo o meio de cultura e o fungo previamente inoculado com 0,1 mL da diluição (10^5 a 10^6 UFC/mL) preparada conforme o Item 4.6.1. Estas placas foram incubadas em temperaturas de 28°C para *Yarrowia lipolytica* e 25°C para os demais micro-organismos durante 5 dias. A determinação do halo de inibição foi realizada medindo-se o diâmetro formado ao redor do filme com um paquímetro (Mitutoyo, Japão) (Türe *et al.*, 2008). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e como controle, foram utilizados filmes sem antimicrobiano e placas sem filme.

4.6.3 Determinação da eficiência antimicrobiana no queijo

Fatias de queijo prato também foram inoculadas com os mesmos micro-organismos alvo descritos no Item 4.6 com o intuito de investigar o potencial inibitório em um alimento real. A inoculação com 0,1 mL das suspensões contendo 10^6 UFC/mL foi feita no centro das fatias de queijo (5,5 x 6,0 cm), sem espalhamento. A fatia de queijo foi colocada entre filmes *Ca-Ca*, com e sem natamicina, em placas de Petri. Essas placas foram fechadas e embaladas individualmente com filme de PVC e armazenadas em estufa BOD a 8 e 25°C, fazendo-se periodicamente o monitoramento visual do crescimento microbiano. Para fins de comparação, queijos sem filme e também sem inóculo foram utilizados como controle.

Para as amostras de queijo inoculadas com os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti*, fez-se a quantificação do número de colônias formadas após o contato com os diferentes filmes conforme procedimento descrito por Pires *et al.* (2008). Após 2 e 7 dias de armazenamento a 25°C, os filmes foram assepticamente retirados e as fatias de queijo (5 g) foram coletadas em sacos estéreis (Nasco, EUA) contendo 45 mL de solução de citrato de sódio 2%. A mistura foi então homogeneizada por 10 min em um homogeneizador Stomacher (Biomaster, Inglaterra) e a partir desta solução obtida foram realizadas as diluições decimais em água peptonada. Após este procedimento, alíquotas de 0,1 mL das diluições foram inoculadas nas placas com os meios de cultura apropriados e estas foram incubadas a 25°C por 5 dias para a contagem das colônias formadas. As análises foram realizadas em triplicata.

4.7 Microscopia ótica

Fatias de queijo em contato com filmes com e sem natamicina foram armazenadas em placas de Petri a 8°C. Após 1 e 10 dias de contato, os filmes foram retirados e avaliados por microscopia ótica (Leica, modelo DMLM, Inglaterra). As análises foram feitas no modo de luz incidente e em campo claro com aumentos de 50, 100 e 200 vezes. Queijos armazenados sem nenhum tipo de filme também foram analisados para comparação.

4.8 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análises de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, o qual foi utilizado para determinar as diferenças significativas das médias, a um nível de probabilidade de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa computacional *SAS System* (SAS Institute Inc., EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos, inicialmente, os resultados experimentais obtidos para as propriedades funcionais dos filmes de alginato reticulados com íons cálcio e/ou bário em diferentes tempos de imersão. Definidas as melhores condições para as formulações, serão apresentados os resultados da caracterização dos filmes ativos contendo natamicina, ensaios de liberação em água e o efeito dos diferentes métodos de impregnação do agente antimicrobiano. Na última sessão serão apresentados os resultados sobre as liberações nos meios sólidos e as eficiências antimicrobianas in vitro e no queijo.

5.1 Otimização das condições de reticulação

Com o objetivo de obter filmes com adequadas propriedades de barreira e mecânicas para uma posterior aplicação em alimentos, foi realizada uma avaliação das condições de reticulação do alginato com os íons Ca^{2+} e Ba^{2+} . Para isto, estes dois agentes reticulantes foram utilizados individualmente ou em combinação no 1º e no 2º estágio, gerando quatro diferentes formulações (*Ca-Ca*, *Ca-Ba*, *Ba-Ca* e *Ba-Ba*), conforme apresentado na Tabela 4.1 do Capítulo Materiais e Métodos.

Durante os ensaios de reticulação foram observadas diferenças importantes entre as interações dos íons Ca^{2+} e Ba^{2+} com o alginato. Para o primeiro estágio, no qual os agentes reticulantes são adicionados diretamente à solução, a concentração de cálcio foi definida com base em um estudo anterior (Bierhalz, 2010), em que foi verificado que 0,27% de Ca^{2+} seria a maior concentração possível de ser utilizada na solução pré-reticuladora, resultando em solução filmogênica fluida e obtenção de filmes homogêneos. Esta concentração de agente reticulante no 1º estágio é crítica, uma vez que pequenos incrementos podem promover pontos de gelificação na solução e excessiva viscosidade que dificultam a moldagem e resultam em filmes heterogêneos.

Utilizando esta mesma concentração de bário (0,27%), no entanto, verificou-se que ocorria uma gelificação instantânea da solução filmogênica. Foi necessária a diminuição da concentração em 4,5 vezes para que fossem obtidas soluções com viscosidade adequada e sem pontos de gelificação. Este comportamento indica um maior poder reticulante do bário com

as cadeias do alginato, o que está de acordo com a classificação de Mørch *et al.* (2006), que estabelece que o bário possui maior poder gelificante que o cálcio.

O segundo estágio de tratamento consiste em imergir os filmes formados na primeira etapa em uma solução mais concentrada de íons reticulantes e glicerol (3% v/v). Nesta etapa, a concentração de cálcio também foi definida em estudo preliminar (Bierhalz, 2010) que apontou um limite máximo de 1,2% de Ca^{2+} na solução reticuladora. Acima desta concentração, as propriedades funcionais dos filmes eram prejudicadas devido a uma reticulação deficiente na parte interna do filme. Verificou-se que em altas concentrações ocorria um rápido bloqueio das camadas superficiais do filme, impedindo a difusão do cálcio para o interior da matriz. Ou seja, o filme era reticulado parcialmente, devido à dificuldade do reticulante em atingir as camadas internas da estrutura.

Em relação ao bário, o fator limitante no 2º estágio foi a aparência final dos filmes. Já nos primeiros instantes de contato com a solução reticuladora, observou-se a tendência dos filmes tornarem-se esbranquiçados e enrugados e, com maior tempo de exposição, tornavam-se também muito rígidos. Desta forma, a caracterização tornava-se muito difícil e sem reprodutibilidade dos resultados. A concentração de íons bário na solução de imersão teve que ser ajustada para a metade da concentração de cálcio para que os filmes tivessem um aspecto adequado e pudessem ser manuseados e suas propriedades avaliadas.

Como o tempo de imersão na solução reticuladora mostrou-se um parâmetro crítico para os filmes contendo bário, avaliou-se a influência desta variável nas propriedades de todos os filmes. O tempo de tratamento com os íons reticuladores presentes na solução deve ser suficiente para promover fortes ligações entre as cadeias poliméricas, resultando em alta coesividade sem, no entanto, comprometer o aspecto visual do filme.

Para filmes confeccionados com as formulações *Ca-Ca* e *Ba-Ca*, que não tinham a aparência modificada durante a imersão, foram avaliados tempos de contato na faixa de 1 a 60 minutos. Os filmes *Ca-Ba* mostraram-se mais sensíveis à exposição, sendo que somente foi possível avaliar o intervalo de 1 a 10 minutos. Para os filmes *Ba-Ba*, mesmo em concentrações muito baixas, não foi possível deixá-los imersos por mais de 1 minuto em solução sem que sua aparência ficasse indesejável e as propriedades, como espessura e permeabilidade ao vapor d'água, tivessem sua reprodutibilidade comprometida. Portanto, a comparação das propriedades em diferentes tempos de tratamento não foi realizada para esta formulação.

As diferenças no aspecto da formulação do filme *Ba-Ba* após as imersões em solução reticuladora de Ba^{2+} podem ser observadas na Figura 5.1.

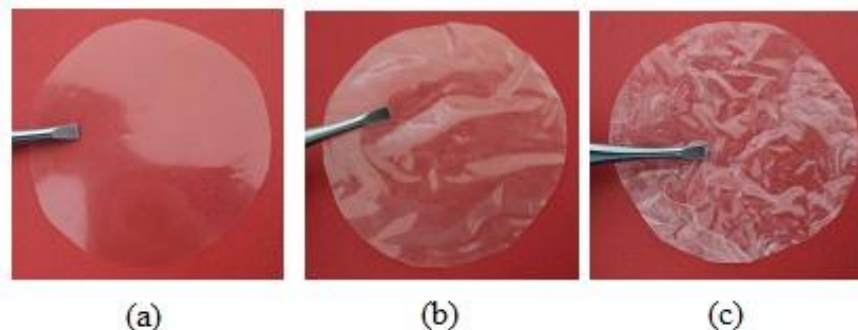


Figura 5.1: Fotografias dos filmes de alginato reticulados com bário no 1º estágio (a); 2º estágio com 1 minuto de imersão em solução de 0,06% de Ba^{2+} (b) e 2º estágio com 3 minutos de imersão nesta solução reticuladora (c).

Nas fotografias apresentadas na Figura 5.1 é possível observar que os filmes de 1º estágio (a) são lisos e homogêneos. Com 1 minuto de imersão na solução reticuladora (b) já ocorre uma pequena deformação enquanto que os filmes com 3 minutos de imersão adquirem um aspecto enrugado e são muito quebradiços, tendendo a influenciar negativamente também as propriedades mecânicas e de barreira.

Definidas as concentrações dos íons na solução reticuladora, foi realizada a caracterização dos filmes em relação ao tempo de imersão. Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados de espessura, teor de umidade, massa solubilizável em água e permeabilidade ao vapor de água das formulações em diferentes tempos de imersão na solução reticuladora do 2º estágio.

Os resultados apresentados na Tabela 5.1 indicam que não houve diferença significativa na espessura (δ) entre as diferentes formulações e, também, que os diferentes tempos de imersão não tiveram influência neste resultado. Este comportamento era esperado, uma vez que foi adicionada a mesma quantidade de solução formadora de filme (50g) nos moldes para todas as formulações. A equivalência de espessura entre as amostras é importante para a comparação entre as propriedades dos filmes, visto que algumas, como permeabilidade ao vapor de água e resistência mecânica são diretamente influenciadas por este parâmetro.

Para o teor de umidade (ω), observa-se que os filmes da formulação *Ca-Ba* apresentaram um valor significativamente menor do que as demais formulações. Somente estes filmes tiveram influência do tempo de imersão, uma vez que houve redução da umidade com o aumento do tempo de imersão de 1 para 5 minutos. Esta redução pode indicar que, com esta formulação, há a necessidade de maior tempo para os íons bário se difundirem para o interior da matriz, reticulando efetivamente as cadeias e induzindo a mudança na hidrofiliabilidade dos filmes. Os valores de umidade obtidos estão próximos aos valores geralmente observados em biofilmes. Filmes de alginato confeccionados por Rhim (2004) apresentaram conteúdo de umidade entre 15,7 e 17,7%. Também para filmes de alginato, da Silva *et al.* (2009) obtiveram filmes com 14% de umidade (reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol).

Tabela 5.1: Espessura (δ), umidade (ω), massa solubilizada (MS) e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de alginato reticulados com cálcio e/ou bário em diferentes tempos de imersão na solução do 2º estágio.

Filme	Tempo (min)	δ (μm)	ω (gH ₂ O/100g filme)	MS (g/100g massa seca)	PVA (g.mm/m ² .d.kPa)
<i>Ca-Ca</i>	1	31 ± 1,7 ^a	22,51 ± 1,24 ^a	21,70 ± 0,16 ^b	5,42 ± 0,09 ^{bc}
	5	32 ± 1,7 ^a	20,90 ± 2,41 ^{ab}	20,07 ± 0,28 ^{bc}	5,02 ± 0,15 ^c
	10	31 ± 1,9 ^a	21,49 ± 1,14 ^a	20,44 ± 0,33 ^{bc}	3,67 ± 0,17 ^d
	20	32 ± 2,7 ^a	21,82 ± 1,81 ^a	19,89 ± 0,65 ^c	3,79 ± 0,19 ^d
	30	31 ± 2,5 ^a	22,04 ± 0,79 ^a	20,11 ± 0,47 ^{bc}	3,88 ± 0,16 ^d
	60	33 ± 2,7 ^a	22,46 ± 0,63 ^a	21,36 ± 0,41 ^{bc}	3,93 ± 0,22 ^d
<i>Ca-Ba</i>	1	32 ± 3,4 ^a	18,73 ± 0,60 ^{bc}	19,15 ± 0,45 ^c	7,48 ± 0,37 ^a
	5	33 ± 2,5 ^a	15,35 ± 0,22 ^{cd}	17,92 ± 0,49 ^{cd}	4,79 ± 0,42 ^{bc}
	10	32 ± 1,8 ^a	14,87 ± 0,30 ^d	17,05 ± 0,10 ^d	4,97 ± 0,14 ^{bc}
<i>Ba-Ba</i>	1	29 ± 1,8 ^a	20,31 ± 0,17 ^a	33,35 ± 0,46 ^a	5,53 ± 0,16 ^{bc}
<i>Ba-Ca</i>	1	31 ± 1,8 ^a	21,90 ± 0,52 ^a	19,94 ± 0,11 ^c	5,98 ± 0,48 ^b
	5	31 ± 1,9 ^a	20,86 ± 0,11 ^a	18,73 ± 0,28 ^{cd}	6,15 ± 0,43 ^b
	10	32 ± 1,4 ^a	22,45 ± 0,92 ^a	19,15 ± 0,32 ^c	4,04 ± 0,19 ^d
	20	30 ± 1,8 ^a	21,25 ± 1,43 ^a	20,54 ± 0,79 ^c	3,94 ± 0,26 ^d
	30	33 ± 1,7 ^a	21,32 ± 1,23 ^a	19,50 ± 0,71 ^c	3,90 ± 0,35 ^d
	60	32 ± 1,8 ^a	20,51 ± 0,37 ^{ab}	20,33 ± 0,83 ^c	3,96 ± 0,40 ^d

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

A massa solubilizável em água (MS) deve ser a mais baixa possível de forma a não comprometer a integridade dos filmes durante a aplicação. Em relação a esta propriedade, observa-se que também houve uma diminuição significativa ao aumentar o tempo de imersão dos filmes *Ca-Ba* de 1 para 5 minutos. Esta formulação, com 5 e 10 minutos de imersão, apresentou os menores valores de massa solubilizável em água, podendo estar relacionada a uma reticulação mais eficiente, com maior compactação das cadeias, o que dificultaria a solubilização do filme em água. A massa solubilizável em água é um parâmetro crítico para o potencial de aplicação dos filmes. Altos valores podem comprometer a integridade do filme e sua atuação como barreira ou até como carreador de agentes ativos (Ollé Resa *et al.*, 2012).

Os menores valores de umidade e de massa solubilizável em água dos filmes *Ca-Ba* podem estar associados a um melhor preenchimento dos sítios ativos conforme esquema do modelo caixa-de-ovos apresentado na Figura 3.4, tendo em vista que o maior raio atômico do bário em relação ao cálcio tende a tornar a difusão de água para a matriz do filme mais lenta (Loh *et al.*, 2012).

Os filmes *Ba-Ba* apresentaram o maior valor de massa solubilizada em água, o que pode indicar que o tempo de imersão de 1 minuto não é suficiente para promover uma reticulação efetiva das cadeias. Os resultados também indicam que o íon utilizado no primeiro estágio não influencia estas propriedades, pois os valores obtidos para as formulações *Ca-Ca* e *Ba-Ca* não apresentaram diferenças significativas.

Para os resultados de permeabilidade ao vapor de água apresentados na Tabela 5.1, verifica-se que 10 minutos de exposição na solução reticuladora promoveram uma diminuição significativa da PVA dos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*. Para os filmes *Ca-Ba* houve diminuição da PVA com 5 minutos de imersão. Para estes casos, um maior tempo de tratamento promoveu ligações mais efetivas que melhoraram a barreira ao vapor de água. Em um outro trabalho com filmes de alginato, foi estudada a PVA em diferentes tempos de imersão (0, 1, 3, 5, 10 e 20 minutos) em solução aquosa de cálcio (1:9), e foi verificado que os melhores valores foram obtidos com 3 minutos de imersão (Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008).

Na Tabela 5.2 estão apresentados os resultados da resistência mecânica (tensão de ruptura e alongamento) medidos com filmes equilibrados a 52% U.R, grau de intumescimento (GI) e relação entre as espessuras antes e após o ensaio de absorção de água (δ_i/δ_f).

Tabela 5.2: Tensão de ruptura (TR), alongamento (A), grau de intumescimento (GI) e relação entre as espessuras antes e após a imersão em água ($\bar{\delta}_f/\bar{\delta}_i$), dos filmes de alginato reticulados com cálcio e/ou bário em diferentes tempos de imersão.

Filme	Tempo (min)	TR (MPa)	A (%)	GI (g H ₂ O/g filme)	$\bar{\delta}_f/\bar{\delta}_i$
<i>Ca-Ca</i>	1	111,27 ± 6,25 ^a	5,13 ± 1,04 ^{de}	0,86 ± 0,01 ^c	2,07 ± 0,08 ^b
	5	109,77 ± 6,13 ^a	5,34 ± 0,66 ^{de}	0,73 ± 0,03 ^d	2,04 ± 0,09 ^b
	10	112,23 ± 7,26 ^a	5,07 ± 0,79 ^{de}	0,66 ± 0,01 ^{de}	1,82 ± 0,05 ^{bc}
	20	108,95 ± 5,65 ^a	5,12 ± 0,84 ^{de}	0,50 ± 0,07 ^{ef}	1,60 ± 0,13 ^{cd}
	30	110,82 ± 3,51 ^a	5,22 ± 0,92 ^{de}	0,51 ± 0,04 ^{ef}	1,65 ± 0,06 ^{cd}
	60	111,34 ± 4,22 ^a	5,13 ± 0,85 ^{de}	0,49 ± 0,02 ^f	1,68 ± 0,15 ^{cd}
<i>Ca-Ba</i>	1	64,80 ± 6,40 ^c	12,34 ± 1,38 ^a	5,06 ± 0,11 ^b	7,16 ± 0,17 ^a
	5	79,35 ± 5,51 ^b	10,43 ± 0,67 ^b	0,55 ± 0,02 ^{ef}	1,75 ± 0,02 ^{bc}
	10	110,65 ± 6,67 ^a	4,75 ± 0,57 ^e	0,48 ± 0,02 ^f	1,55 ± 0,11 ^d
<i>Ba-Ba</i>	1	64,48 ± 7,21 ^c	8,48 ± 1,33 ^c	5,73 ± 0,19 ^a	7,49 ± 0,24 ^a
<i>Ba-Ca</i>	1	104,58 ± 10,03 ^a	6,29 ± 1,26 ^d	0,81 ± 0,04 ^{cd}	1,98 ± 0,16 ^{bc}
	5	97,76 ± 11,86 ^a	6,68 ± 1,05 ^d	0,81 ± 0,02 ^{cd}	1,79 ± 0,09 ^{bc}
	10	115,83 ± 5,41 ^a	6,41 ± 1,32 ^d	0,64 ± 0,01 ^{de}	1,68 ± 0,07 ^{cd}
	20	103,24 ± 7,82 ^a	6,70 ± 1,52 ^d	0,61 ± 0,04 ^{de}	1,77 ± 0,08 ^{bc}
	30	109,98 ± 6,04 ^a	7,06 ± 0,49 ^d	0,62 ± 0,06 ^{de}	1,88 ± 0,03 ^{bc}
	60	100,69 ± 5,99 ^a	6,51 ± 1,77 ^d	0,62 ± 0,06 ^{de}	1,82 ± 0,11 ^{bc}

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

A tensão de ruptura (TR) e o percentual de alongamento dos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca* não foram influenciados pelo tempo de exposição na solução reticuladora. Quando o tempo de 1 minuto de imersão é utilizado na comparação, observa-se que a tensão de ruptura dos filmes *Ba-Ba* e *Ca-Ba* é cerca de 60% do valor atingido pelas formulações *Ca-Ca* e *Ba-Ca*. Para os filmes *Ca-Ba*, porém, com 10 minutos de tratamento, a tensão de ruptura observada foi equivalente aos resultados dos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*.

Para filmes com diferentes tipos de alginato imersos em solução de 0,8% de CaCl₂, Sartori *et al.* (1997) verificaram que o processo de troca iônica é muito rápido, e que mais da metade da conversão entre o sódio e o cálcio ocorre nos primeiros 30 segundos, sendo que

após 30 minutos praticamente não há mais variação no conteúdo de íons cálcio. Em outro trabalho, Roger *et al.* (2006) relatam que mais da metade da conversão acontece nos primeiros 5 minutos e após 10 minutos, a concentração de cálcio no filme permanece constante. Nos instantes iniciais, todos os sítios ativos presentes nas cadeias do alginato estão disponíveis, já em tempos maiores, há uma resistência da difusão devido às ligações já existentes, fazendo com que o processo seja mais lento nos instantes finais. Al-Musa *et al.* (1999) também citam em seu trabalho que a reação de reticulação do alginato com o cálcio é rápida e não apresenta efeito em imersões acima de 30 minutos.

O maior tempo de imersão necessário para a reticulação das cadeias do alginato com íons bário pode estar relacionado ao seu raio atômico, que é de 1,35 Å contra 0,97 Å dos íons cálcio. Como a superfície dos filmes é reticulada quase que instantaneamente, a passagem dos íons bário para o interior da matriz seria dificultada, necessitando por isto, maior tempo de contato do filme com a solução reticuladora (Al-Musa *et al.*, 1999). A difusão dos íons cálcio, por seu menor tamanho, até as camadas internas do filme seria mais fácil e rápida, fazendo com que, para baixos tempos de imersão, as propriedades dos filmes de cálcio sejam melhores em relação às dos filmes de bário.

Nos resultados de alongamento mostrados na Tabela 5.2, também pode ser verificado que os filmes com menor tensão de ruptura apresentaram maior elasticidade. Este comportamento deve-se ao fato de que as cadeias, não estando completamente reticuladas, preservam certa mobilidade, que resulta em maior alongamento. As propriedades mecânicas dos filmes podem ser consideradas as mais restritivas para aplicação como embalagem. Os filmes devem ser resistentes à ruptura conferindo proteção e reforço e ainda, ser flexíveis, para adaptar-se a possíveis deformações sem se romper (Sobral, 2000).

De acordo com uma classificação estabelecida por Krochta e de Mulder-Johnston (1997), um filme com boa resistência mecânica deve apresentar valores de tensão de ruptura e alongamento superiores a 100 MPa e 50%, respectivamente. Filmes com alongamento inferiores a 10% são considerados de pobre flexibilidade. Neste sentido, verifica-se que o baixo alongamento é uma das maiores limitações dos biofilmes de alginato, se comparados aos filmes sintéticos convencionais. Alguns estudos reportam que filmes de polietileno de baixa densidade, por exemplo, podem apresentar alongamento de até 500% e tensões de ruptura de 13 MPa (McHugh e Krochta, 1994). Alto alongamento e baixa tensão de ruptura são frequentemente

obtidos com filmes de proteína. Gennadios *et al.* (1993) obtiveram filmes de glúten de trigo com TR de 0,7 MPa e alongamento de 229%.

Valores de resistência mecânica muito semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por Valero (2011). Para filmes reticulados com cálcio no 1º estágio e bário no 2º (*Ca-Ba*), nas mesmas concentrações e tempo de imersão de 1 minuto, foi obtida uma tensão de ruptura de 58,76 MPa e alongamento de 15,10%.

Deve-se ressaltar que além do grau de reticulação, outros fatores, como a umidade relativa do ambiente no qual os filmes estão expostos, podem influenciar fortemente a resistência mecânica. Diversos trabalhos avaliaram a influência da umidade relativa no comportamento mecânico dos filmes e observaram que a água atua como um plastificante em filmes hidrofílicos, sendo que altos valores de umidade relativa promovem aumento do alongamento e redução da tensão de ruptura (Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008).

Para os ensaios de intumescimento, os filmes foram imersos em água sob agitação e pesados em diferentes intervalos de tempo até que não houvesse mais alteração na massa total. Todas as formulações atingiram o equilíbrio em aproximadamente 5 minutos. Desta forma, os resultados apresentados na Tabela 5.3 para o grau de intumescimento e relação entre as espessuras (δ_t/δ_i), são relativos ao estado de equilíbrio. Após o período de imersão, os diâmetros dos filmes também foram medidos a fim de verificar diferenças em relação ao original, porém, nenhuma amostra apresentou alteração.

O intumescimento e a relação entre as espessuras dos filmes *Ca-Ca* foram influenciados pelo tempo de imersão na solução reticuladora, sendo recomendado o uso de tempos superiores a 10 minutos para que a absorção de água seja baixa. A maior influência pôde ser observada para os filmes *Ca-Ba*. Enquanto que em 1 minuto de imersão, o grau de intumescimento dos filmes era de 5,06, o aumento do tempo para 5 minutos, fez com que o grau de intumescimento fosse de apenas 0,55.

Darrabie *et al.* (2006) verificaram que os agentes reticulantes (cálcio e bário) exercem grande influência sobre o intumescimento de partículas de alginato. Os autores observaram que partículas de vários tipos de alginato reticuladas com cálcio apresentavam maior grau de intumescimento do que as reticuladas com bário, sugerindo que o cálcio é mais higroscópico. Também em estudo com micropartículas, Mørch *et al.* (2006) estabeleceram que a influência do agente reticulante depende do tipo de alginato. Para alginatos com alto teor de ácido

gulurônico (blocos G), o bário promove um aumento na estabilidade e na resistência das micropartículas enquanto que o cálcio é mais eficiente para alginatos com maior conteúdo de ácido manurônico (blocos M).

Os filmes *Ba-Ba* não apresentaram resultados satisfatórios para o grau de intumescimento, sendo observado quase 600% de aumento de massa após a imersão em água. Devido à reticulação deficiente, ocorreu uma rápida difusão de moléculas de solvente para o interior dos filmes, provocando um colapso no arranjo espacial das cadeias com o conseqüente aumento do volume. Também foram observados altos valores para a relação entre as espessuras do filme antes e após o ensaio em água.

De forma geral, a análise dos resultados indicou que o bário apresenta potencialidade para seu uso em filmes de alginato somente se a reticulação for combinada com a dos íons cálcio. Os filmes reticulados com bário no 1º e no 2º estágio (*Ba-Ba*) tiveram alta solubilidade em água e intumescimento, o que representa uma limitação para aplicações com liberação de natamicina.

Devido às propriedades mais adequadas, as formulações *Ca-Ca*, *Ba-Ca* e *Ca-Ba* com 10 minutos de imersão foram selecionadas para as subseqüentes avaliações complementares em filmes contendo o antimicrobiano natamicina.

5.2 Confeção e caracterização dos filmes ativos antimicrobianos

Para a confecção dos filmes ativos convencionais, em que o antimicrobiano é adicionado diretamente à solução formadora de filme, natamicina foi utilizada como agente antimicrobiano na concentração de 4% em relação à massa total de biopolímero (0,04g/g biopolímero) segundo recomendação de da Silva (2009). Estes filmes foram caracterizados e os resultados comparados com os respectivos filmes sem antimicrobiano, a fim de avaliar a influência da adição do antimicrobiano nas propriedades dos filmes com os diferentes reticulantes.

5.2.1 Morfologia

As micrografias da superfície e da seção transversal dos filmes com e sem natamicina das diferentes formulações estão apresentadas nas Figuras 5.2 a 5.4.

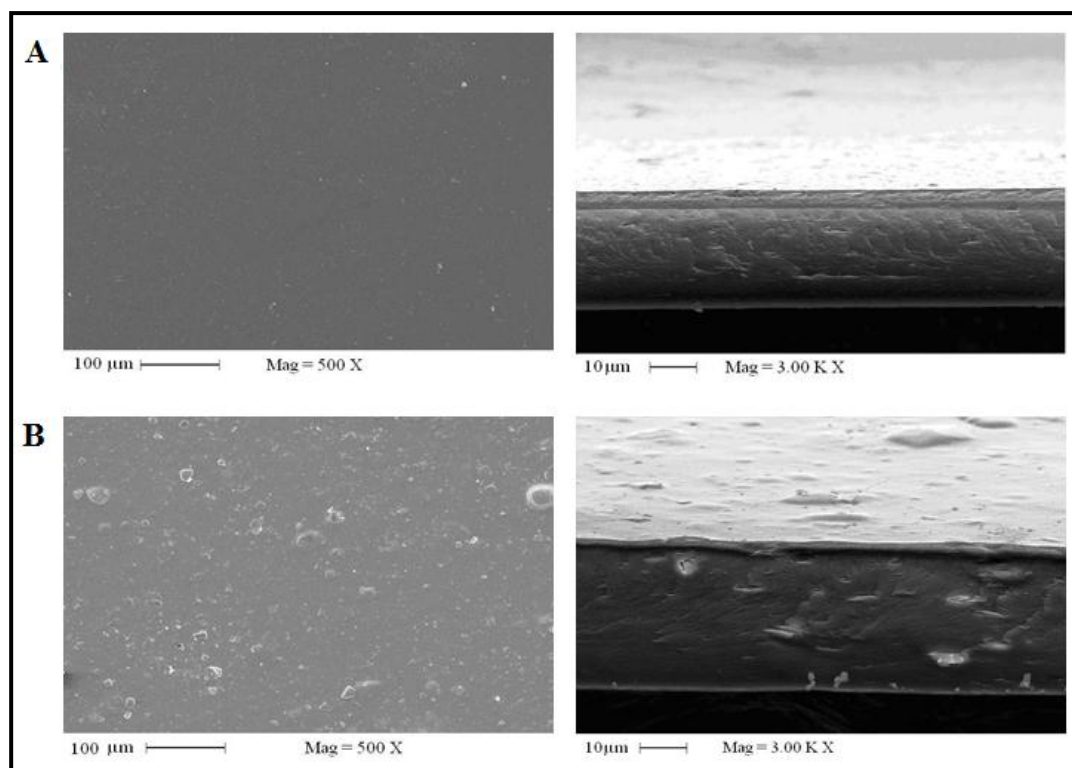


Figura 5.2: Superfície e seção transversal dos filmes *Ca-Ca* sem antimicrobiano (A) e com natamicina (B).

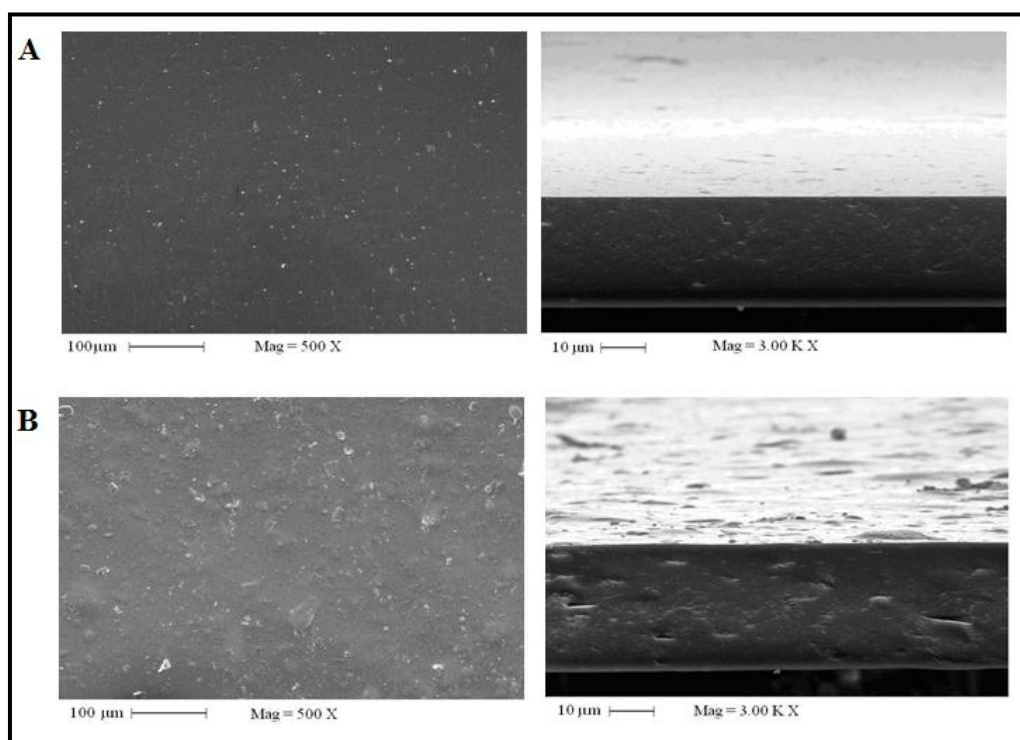


Figura 5.3: Superfície e seção transversal dos filmes *Ba-Ca* sem antimicrobiano (A) e com natamicina (B).

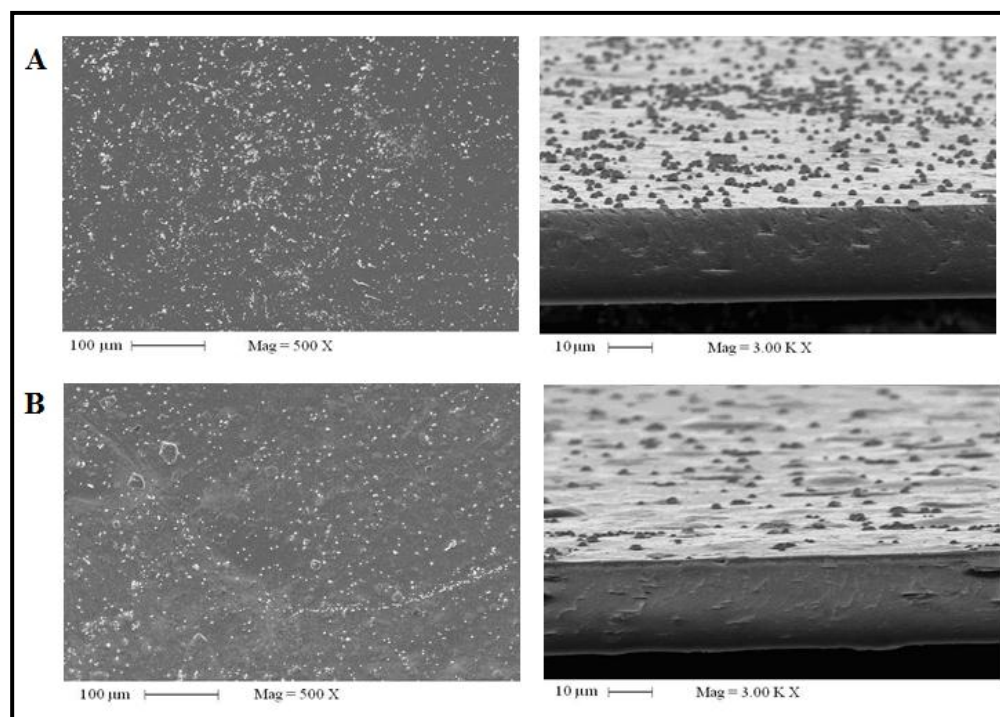


Figura 5.4: Morfologia da superfície e seção transversal dos filmes *Ca-Ba* sem antimicrobiano (A) e com natamicina (B).

Observa-se que a incorporação da natamicina aos filmes provocou grande alteração na superfície, sendo encontrados grânulos e cristais de natamicina depositados nos mesmos, principalmente nas formulações *Ca-Ca* e *Ba-Ca*. Nas micrografias das fraturas, também são verificadas superfícies irregulares e descontinuidade. Já se havia constatado visualmente que os filmes ativos eram menos transparentes e apresentavam a superfície levemente áspera. Isto pode ter sido ocasionado pela baixa solubilidade da natamicina na solução filme-formadora. Durante a confecção dos filmes, o antimicrobiano era adicionado à solução pré-reticulada em uma temperatura de 70°C, o que facilitava a solubilização. No entanto, após o resfriamento e secagem dos filmes, ocorria a cristalização. A análise das seções transversais nas micrografias indica, de maneira geral, a existência de uma estrutura bem compactada, sem indícios de separação de fases.

Estruturas cristalinas também foram verificadas em filmes de glúten contendo natamicina (Türe *et al.*, 2008) e em filmes de metilcelulose adicionados de natamicina, nisina ou a combinação dos dois agentes antimicrobianos (Pires *et al.*, 2008). Ollé Resa *et al.* (2012) avaliaram filmes de fécula de mandioca com e sem natamicina por microscopia de força atômica e observaram uma superfície mais lisa e homogênea nos filmes sem antimicrobiano enquanto que os filmes ativos apresentavam mais picos e depressões. Filmes de cloreto de polivinilideno tiveram sua estrutura modificada com a adição de nisina, sorbato de potássio e ácido sórbico (Limjaroen *et al.*, 2003).

Além dos cristais de natamicina, as microscopias dos filmes reticulados com bário no 2º estágio (Figura 5.4) ainda revelam diversas irregularidades cobrindo toda a superfície. Estes grânulos não estavam presentes nos demais filmes e podem estar relacionados a partículas de bário precipitadas pela saturação do sistema. As figuras indicam que esses cristais se encontram ancorados na camada superficial dos filmes e não se formaram no interior do filme. Deve ser levado em consideração o fato de que a solubilidade do cloreto de bário é a metade daquela do cloreto de cálcio e à medida que a solução aderente ao filme se concentra devido à secagem, pode ocorrer a precipitação do cloreto de bário.

Al-Musa *et al.* (1999) também obtiveram uma morfologia muito semelhante, com uma grande quantidade de partículas de bário anexadas à superfície. Estes autores atribuíram como resultado desta ocorrência a dificuldade dos íons bário em penetrarem no interior do filme pelo seu grande tamanho.

5.2.2 Análise elementar qualitativa (EDS)

A análise elementar qualitativa foi realizada com o intuito de verificar a composição das heterogeneidades presentes nos filmes observados por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 5.5 A corresponde ao resultado da análise geral do filme *Ca-Ca* com natamicina, e na Figura 5.5 B está apresentada uma avaliação pontual em um dos cristais presentes na superfície. Filmes *Ba-Ca* apresentaram resultados equivalentes aos filmes *Ca-Ca*.

Ao comparar as Figuras 5.5 A e B verifica-se somente um aumento na quantidade de carbono e uma diminuição na quantidade de oxigênio. Como a quantidade de cálcio praticamente não foi alterada, conclui-se que os cristais presentes na superfície são referentes à natamicina.

Nas Figuras 5.6 A e B estão apresentados, respectivamente, os resultados da análise geral e de um ponto cristalizado na superfície de um filme *Ca-Ba*. Diferentemente dos resultados obtidos para os cristais da formulação *Ca-Ca*, a análise qualitativa elementar indicou maior presença de bário nos pontos brancos da superfície das formulações *Ca-Ba*, indicando tratar-se de bário precipitado na forma de sulfato. Estes resultados corroboram com a hipótese de que o bário permanece anexado à superfície do filme, por não conseguir migrar para o interior da matriz polimérica.

A origem do enxofre provavelmente está relacionada às impurezas do alginato de sódio, uma vez que não foi detectada a presença deste elemento em outras matérias-primas utilizadas para a confecção dos filmes.

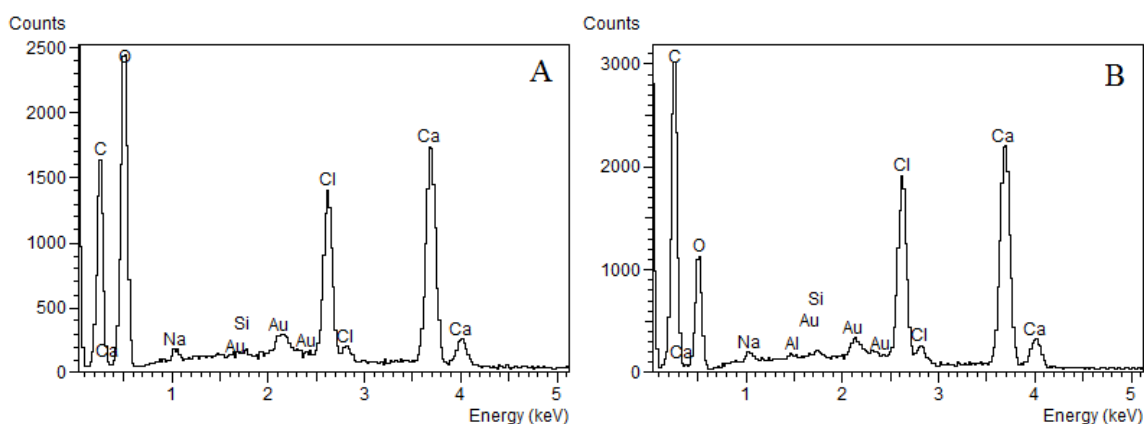


Figura 5.5: Análise elementar qualitativa geral do filme *Ca-Ca* com natamicina (A) e do cristal presente no filme (B).

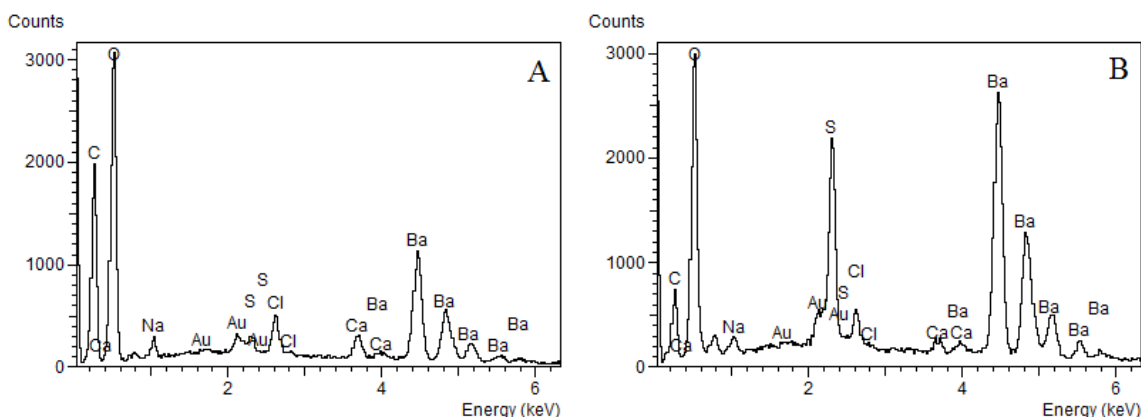


Figura 5.6: Análise elementar qualitativa geral do filme *Ca-Ba* (A) e qualitativa do cristal/partícula branca presente no filme (B).

5.2.3 Espessura e permeabilidade ao vapor de água

Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados de espessura e PVA dos filmes confeccionados com e sem natamicina. O teste de Tukey foi realizado comparando os valores de cada propriedade entre as formulações (colunas) e em relação à presença do antimicrobiano (linhas).

Tabela 5.3: Espessura (δ) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) de filmes de alginato sem antimicrobiano (controle) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	δ (μm)		PVA ($\text{g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$)	
	Controle	4% natamicina	Controle	4% natamicina
<i>Ca-Ca</i>	$31 \pm 1,9^{a,A}$	$35 \pm 2,7^{a,A}$	$3,67 \pm 0,17^{b,B}$	$4,14 \pm 0,07^{a,A}$
<i>Ca-Ba</i>	$32 \pm 1,8^{a,A}$	$36 \pm 2,9^{a,A}$	$4,97 \pm 0,14^{a,A}$	$4,99 \pm 0,14^{b,A}$
<i>Ba-Ca</i>	$32 \pm 1,4^{a,A}$	$34 \pm 3,6^{a,A}$	$4,04 \pm 0,19^{b,A}$	$4,20 \pm 0,13^{a,A}$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Observa-se que a presença da natamicina não alterou a espessura dos filmes de forma significativa. A adição do antimicrobiano aumenta a quantidade total de sólidos, no entanto, este percentual é baixo e não afeta esta característica dos filmes. Resultado semelhante foi

observado por Zactiti e Kieckbusch (2009) em filmes de alginato com a adição de sorbato de potássio como antimicrobiano.

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) não foi alterada significativamente para os filmes contendo bário como reticulante. Este resultado também foi observado em filmes de glúten de trigo e metil celulose (Türe *et al.*, 2009), amido (Ollé Resa *et al.*, 2012), proteína de soro de leite (Ramos *et al.*, 2012) e quitosana (Fajardo *et al.*, 2010) com adição de natamicina.

Para os filmes *Ca-Ca* houve um aumento significativo da PVA após a adição do antimicrobiano. Neste caso, a reticulação com o cálcio pode ter sido prejudicada com a adição da natamicina, resultando em uma modificação na estrutura polimérica.

O transporte de água em materiais poliméricos ocorre através da difusão molecular em um processo que envolve três etapas: a absorção na matriz polimérica; a migração através dos poros formados na cadeia polimérica e a posterior dessorção a partir da outra superfície do filme (Kester e Fennema, 1986). Desta forma, fatores que afetam as interações entre as cadeias poliméricas e o volume livre, como o grau de reticulação e a presença de plastificantes, exercem forte influência na permeabilidade ao vapor d'água. Matrizes contendo maior porcentagem de estruturas mais cristalinas e formadas por cadeias poliméricas lineares tendem a apresentar menores valores de PVA.

Diversos trabalhos reportam o aumento no valor desta propriedade após a adição de antimicrobianos, muitas vezes, devido ao caráter hidrofílico do agente ativo. Limjaroen *et al.* (2003), por exemplo, atribuíram um aumento de quase 8 vezes na PVA de filmes de cloreto de polivinilideno com sorbato de potássio ao caráter hidrofílico deste antimicrobiano. Em filmes de quitosana, a incorporação de sorbato de potássio ou nisina em altas concentrações provocou o aumento da PVA. Para estes filmes, os agentes antimicrobianos seriam responsáveis por diminuir as interações intermoleculares e a compactação das cadeias poliméricas (Pranoto *et al.*, 2005b). Shen *et al.* (2010) observaram que concentrações de sorbato de potássio acima de 5% aumentavam em quase 300% a PVA de filmes de amido com quitosana.

No entanto, até mesmo a adição de componentes hidrofóbicos pode levar a um aumento da PVA. Em filmes de alginato reticulados por imersão com 1% de cálcio, Pranoto *et al.* (2005a) obtiveram PVA de 20,32 g.mm/m².d.kPa e ao incorporar 0,4% de óleo de alho, um agente antimicrobiano natural, o valor aumentou para 30,89 g.mm/m².d.kPa. Segundo os

autores, o óleo pode contribuir para a diminuição das interações intermoleculares, facilitando a passagem de umidade através da matriz do filme.

Baixos valores de PVA são desejáveis principalmente quando houver aplicação em alimentos com alto teor de umidade, visando retardar sua perda e aumentar a vida de prateleira do produto. Os valores de PVA obtidos neste trabalho com os filmes de alginato são inferiores comparados a outros filmes biodegradáveis à base de polissacarídeos, como a pectina e metilcelulose (Fontes *et al.*, 2011) ou à base de proteínas (Ramos *et al.*, 2012). Porém, a PVA do alginato ainda é cerca de 180 vezes maior do que a de filmes sintéticos como polietileno de alta densidade ($0,02 \text{ g.mm/m}^2\text{.dia.kPa}$) e baixa densidade ($0,08 \text{ g.mm/m}^2\text{.dia.kPa}$). Marcos *et al.* (2010) por exemplo, compararam a PVA de filmes de alginato reticulados com cálcio e filmes de PVOH, ambos com enterocina, e verificaram uma PVA 6 vezes maior para o filme de alginato. Isto expõe a deficiência dos filmes biodegradáveis em relação aos sintéticos e os classifica como filmes de moderada barreira à umidade (valores de PVA entre 0,1 e $10 \text{ g.mm/m}^2\text{.dia.kPa}$). Em geral, filmes e coberturas que possuem grupos hidroxila, ester ou outros grupos polares, tendem a apresentar alta permeabilidade à água (McHugh *et al.* 1993).

5.2.4 Grau de intumescimento

Os resultados do grau de intumescimento e relação entre as espessuras antes e após a absorção de água estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Grau de intumescimento (GI) e a relação da espessura (δ_f/δ_i) dos filmes sem antimicrobiano (controle) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	GI (g H ₂ O/ g filme)		δ_f/δ_i	
	Controle	4% natamicina	Controle	4% natamicina
Ca-Ca	$0,66 \pm 0,01^{a,A}$	$0,71 \pm 0,04^{a,A}$	$1,82 \pm 0,05^{a,A}$	$1,76 \pm 0,08^{a,A}$
Ca-Ba	$0,48 \pm 0,02^{b,A}$	$0,49 \pm 0,03^{b,A}$	$1,55 \pm 0,11^{b,A}$	$1,49 \pm 0,07^{b,A}$
Ba-Ca	$0,64 \pm 0,01^{a,A}$	$0,68 \pm 0,03^{a,A}$	$1,68 \pm 0,07^{ab,A}$	$1,78 \pm 0,08^{a,A}$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

O grau de intumescimento e a relação de espessura dos filmes ativos não apresentaram diferenças significativas em relação aos filmes controle e também atingiram o equilíbrio de hidratação em aproximadamente 5 minutos. Esta propriedade é importante, pois as modificações na matriz polimérica causadas pelo intumescimento influenciarão na difusividade da natamicina através do filme e as crescentes espessuras influenciarão a taxa de liberação do soluto.

Zactiti (2004) verificou que o grau de intumescimento dos filmes de alginato aumentava com a quantidade de sorbato de potássio adicionada. Da Silva (2009) obteve, para filmes de alginato com natamicina, um aumento proporcional ao da formulação *Ca-Ca*, porém ao contrário do presente trabalho, este aumento foi significativo. Este comportamento resulta da baixa reprodutibilidade da técnica de determinação do intumescimento, que requer a remoção manual do excesso de água do filme antes das pesagens. Esta remoção é feita pressionando o filme entre folhas de papel-filtro e, portanto, dependendo da força aplicada pelo analista, pode-se ter resultados diferentes e não reprodutíveis.

5.2.5 Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água

Na Tabela 5.5 estão dispostos os resultados do conteúdo de umidade e massa solubilizável em água dos diferentes filmes acondicionados em ambiente com umidade relativa de 52%. A comparação entre os resultados indica que o conteúdo de umidade aumentou significativamente somente para os filmes *Ca-Ba*. Para as demais amostras, a umidade e a massa solubilizável em água não foram alterados após a adição da natamicina.

Tabela 5.5: Umidade (ω) e massa solubilizável em água (MS) dos filmes de alginato sem antimicrobiano (controle) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	ω (g H ₂ O/100 g filme)		MS (g/100 g massa seca)	
	Controle	4% natamicina	Controle	4% natamicina
<i>Ca-Ca</i>	21,49 ± 1,14 ^{a,A}	20,59 ± 0,47 ^{a,A}	20,44 ± 0,33 ^{a,A}	20,09 ± 1,64 ^{a,A}
<i>Ca-Ba</i>	14,87 ± 0,30 ^{b,B}	17,31 ± 0,19 ^{b,A}	17,05 ± 0,10 ^{b,A}	17,50 ± 0,35 ^{b,A}
<i>Ba-Ca</i>	22,45 ± 0,92 ^{a,A}	21,15 ± 0,54 ^{a,A}	19,15 ± 0,32 ^{a,A}	19,09 ± 0,47 ^{a,A}

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

Resultado semelhante foi obtido para filmes de amido, que não tiveram a massa solubilizável em água alterada após adição de diferentes concentrações de natamicina à formulação. Os valores variaram de 18 a 24% (Ollé Resa *et al.*, 2012). Para filmes de proteína de soro de leite, a incorporação de natamicina não promoveu aumento na umidade e solubilidade (Ramos *et al.*, 2012).

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

5.2.6 Resistência mecânica

Na Tabela 5.6 estão apresentados os resultados de tensão na ruptura e alongamento na ruptura dos filmes ativos e dos filmes simples sem antimicrobiano.

Tabela 5.6: Tensão de ruptura (TR) e alongamento (A) dos filmes de alginato sem antimicrobiano (controle) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	TR (MPa)		A (%)	
	<i>Controle</i>	<i>4% natamicina</i>	<i>Controle</i>	<i>4% natamicina</i>
<i>Ca-Ca</i>	112,23 (7,26) ^{a,A}	94,10 (5,62) ^{a,B}	5,07 (0,79) ^{a,A}	5,38 (0,69) ^{a,A}
<i>Ca-Ba</i>	110,65 (5,41) ^{a,A}	94,91 (3,87) ^{a,B}	4,75 (0,57) ^{a,A}	5,59 (1,37) ^{a,A}
<i>Ba-Ca</i>	115,83 (4,47) ^{a,A}	95,73 (4,77) ^{a,B}	6,41 (1,32) ^{a,A}	5,55 (0,87) ^{a,A}

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

A tensão na ruptura de todos os filmes teve seu valor reduzido significativamente com a adição da natamicina às formulações, possivelmente, devido à modificação da estrutura e à presença de cristais de natamicina observados pelo MEV (Figuras 5.2 a 5.4).

Apesar da redução da TR, o alongamento manteve a mesma tendência dos filmes confeccionados sem o antimicrobiano. A diminuição das forças coesivas entre as cadeias geralmente promove o aumento da elasticidade do filme, porém, no presente trabalho, a redução na tensão de ruptura pode ter sido pequena para que ocorresse uma mudança significativa no alongamento dos filmes. Ao avaliarem o efeito da umidade relativa na resistência mecânica de filmes de alginato, Olivas e Barbosa-Cánovas (2008) reportam que um aumento significativo no alongamento somente é obtido quando a tensão de ruptura é diminuída em mais de 50% em relação ao valor inicial.

A perda da resistência mecânica a partir da incorporação de natamicina também foi verificada por Pires *et al.* (2008) em filmes de celulose, com redução de 93,86 N para 57,27 N. Os filmes tornaram-se menos elásticos, registrando uma redução no alongamento de 4,54 para 1,69%. Os autores atribuíram a redução à modificação da estrutura polimérica, afetada pelo antimicrobiano. Em filmes de amido, a adição da natamicina também promoveu uma perda significativa nas propriedades mecânicas, o que seria devido à formação de uma estrutura polimérica menos organizada (Ollé Resa *et al.*, 2012).

Em outro estudo, Limjaroen *et al.* (2003) produziram filmes de cloreto de polivinilideno contendo ácido sórbico, sorbato de potássio e nisina e observaram uma redução na tensão na ruptura (aproximadamente 35%) com o aumento da concentração de antimicrobiano. Todavia, assim como no presente trabalho, o alongamento para estes filmes não sofreu alteração. Segundo os autores, a formação de zonas de concentração heterogênea de antimicrobiano na estrutura polimérica poderia provocar a diminuição da tensão na ruptura dos filmes.

Cha *et al.* (2002) também verificaram uma grande redução da resistência à tração e da elasticidade ao compararem filmes de alginato com e sem adição de diversos antimicrobianos e atribuíram este comportamento à modificação da rede polimérica dos filmes. Para filmes adicionados de nisina, a redução foi de aproximadamente 50%. Pranoto *et al.* (2005b) avaliaram o efeito da adição de sorbato de potássio ou de nisina sobre as propriedades mecânicas de filmes de quitosana e verificaram, que para ambos agentes, houve grande redução na tensão na ruptura com aumento no alongamento. A redução da tensão na ruptura chegou a 60% quando altas concentrações de antimicrobiano foram utilizadas. Estes autores verificaram que o efeito foi ainda maior quando maiores concentrações do agente foram utilizadas e salientaram que a incorporação de qualquer outro aditivo que não seja um agente reticulante, geralmente provoca a diminuição da tensão na ruptura.

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

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

5.2.7 Ângulo de contato e rugosidade

Os diferentes filmes com e sem natamicina também foram caracterizados quanto à rugosidade da superfície e ao ângulo de contato, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Rugosidade e ângulo de contato dos filmes sem antimicrobiano (controle) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	Rugosidade, R_a (μm)		Ângulo de contato ($^\circ$)	
	Controle	4% natamicina	Controle	4% natamicina
<i>Ca-Ca</i>	$0,13 \pm 0,03^{b,B}$	$0,44 \pm 0,05^{b,A}$	$47,05 \pm 3,46^{a,B}$	$69,59 \pm 5,10^{a,A}$
<i>Ca-Ba</i>	$0,28 \pm 0,04^{a,B}$	$0,63 \pm 0,09^{a,A}$	$32,31 \pm 3,23^{b,B}$	$45,55 \pm 5,07^{b,A}$
<i>Ba-Ca</i>	$0,23 \pm 0,05^{ab,B}$	$0,48 \pm 0,07^{b,A}$	$30,63 \pm 2,51^{b,B}$	$44,27 \pm 4,13^{b,A}$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

Comparando os valores dos filmes sem antimicrobiano, é possível observar que os filmes *Ca-Ca* apresentaram uma rugosidade significativamente menor do que os filmes *Ca-Ba* e *Ba-Ca*. Uma vez que a rugosidade é caracterizada por reentrâncias e/ou saliências presentes na superfície do material, este resultado indica que os filmes *Ca-Ca* apresentam a superfície mais lisa e homogênea. Este comportamento condiz com observações subjetivas, pois após o 2º estágio de reticulação com bário, constatou-se tendência de formação de uma superfície mais irregular e enrugada. A adição do antimicrobiano natamicina promoveu um aumento significativo da rugosidade dos filmes, consequência da formação de cristais na superfície do filme conforme observado nas micrografias. Subjetivamente, também foi possível verificar que a

superfície dos filmes ativos era mais áspera ao contato e em virtude disto, apresentaram maior rugosidade.

Em filmes de caseinato de sódio, Fabra *et al.* (2009) observaram um aumento expressivo na rugosidade ao adicionar uma mistura de cera de abelha e ácido oleico na formulação. Tendência semelhante foi obtida por Santiago-Silva *et al.* (2009), que verificaram de forma subjetiva que a adição do antimicrobiano pediocina tornava os filmes de celulose mais rugosos. Em filmes de alginato e quitosana, da Silva (2009) verificou um aumento da rugosidade (Ra) de 0,20 para 0,73 μm dos filmes após adicionar 4% de natamicina.

O ângulo de contato representa o valor em graus medido na interface formada entre uma determinada substância líquida e a superfície sólida e pode ser um bom indicador do grau de hidrofiliicidade e da molhabilidade da superfície dos filmes, sendo de altos valores quando a hidrofiliicidade é baixa (Guerrero *et al.*, 2011). Em termos quantitativos, superfícies que formam ângulos de contato com a água maiores do que 65° podem ser consideradas hidrofóbicas. Filmes de polietileno de baixa densidade, por exemplo, exibem ângulos de contato superiores a 90° (Karbowski *et al.*, 2006).

Observa-se nos dados da Tabela 5.7 que, tanto para os filmes sem natamicina quanto para os filmes ativos, a formulação *Ca-Ca* apresentou maior ângulo de contato, o que indica uma superfície mais hidrofóbica do que os demais filmes contendo bário na reticulação. Este resultado, no entanto, não corrobora com os resultados de conteúdo de umidade e grau de intumescimento, que apontam os filmes *Ca-Ba* como menos hidrofílicos. Além disso, o ângulo de contato deve ser relacionado diretamente com a rugosidade superficial dos filmes (Jayasekara *et al.*, 2004). Isto também não foi observado, uma vez que os filmes *Ca-Ca*, com maior ângulo de contato, apresentaram menor rugosidade. Os resultados de da Silva (2009) também indicaram que os filmes com menor massa solubilizada em água e menor intumescimento apresentaram maior ângulo de contato.

A falta de correlação entre os valores dos ângulos de contato e as demais propriedades sugere que os filmes *Ca-Ca* podem apresentar uma barreira inicial ao espalhamento e absorção de água, uma vez que as medidas são obtidas logo após a queda da gota sobre o filme. Após períodos maiores de contato com água, como nos casos das determinações de intumescimento e teor de umidade, a barreira é rompida e então a absorção de água tende a ser maior em relação aos outros filmes.

Os dados na Tabela 5.7 também apontam um aumento significativo do ângulo de contato com a adição da natamicina. Estes resultados correlacionam bem com a rugosidade e também no sentido de que, a natamicina possuindo baixa solubilidade em água, torna a superfície do filme mais hidrofóbica.

5.2.8 Cor e opacidade

Os resultados de opacidade dos filmes com e sem natamicina estão apresentados na Figura 5.7. Estas propriedades são importantes e devem ser avaliadas uma vez que influenciam a aceitação do produto no qual os filmes são aplicados (Marcos *et al.*, 2010).

A partir da análise realizada verificou-se que os filmes *Ca-Ba* foram os mais opacos entre as formulações sem o antimicrobiano, seguido dos filmes *Ba-Ca* e *Ca-Ca*. Estes resultados estão de acordo com as microscopias (ver Figura 5.4), onde é possível observar que os filmes *Ca-Ba* apresentaram uma grande quantidade de grânulos na superfície.

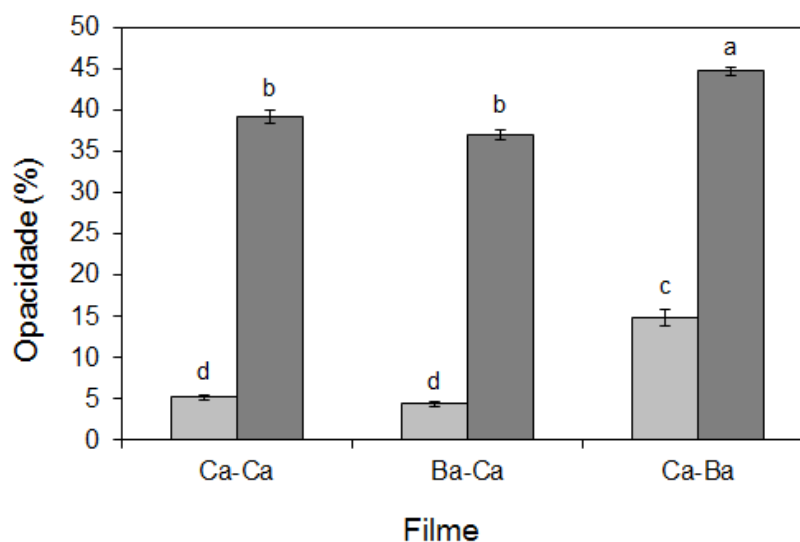


Figura 5.7: Opacidade dos filmes de alginato sem antimicrobiano (■) e dos filmes com natamicina (■) reticulados com cálcio e bário.

Para todas as formulações, a incorporação da natamicina aos filmes provocou um grande aumento na opacidade (aumento médio de 7 vezes). Visualmente, já era possível observar que os filmes contendo natamicina eram mais opacos do que os filmes sem o antimicrobiano, como mostra a foto comparando os filmes na Figura 5.8.

A maior opacidade verificada nos filmes ativos pode ser explicada pela estrutura química da natamicina, que apresenta simultaneamente em sua molécula, uma fração hidrofílica e outra hidrofóbica, que faz com sua solubilidade em água seja baixa. De forma semelhante, Fajardo *et al.* (2010) obtiveram um aumento de quase 50% na opacidade ao adicionar natamicina em coberturas de quitosana. De acordo com Fabra *et al.* (2010), em filmes contendo compostos imiscíveis, o tamanho das partículas da fase dispersa, a heterogeneidade de sua distribuição e as diferenças entre os índices de refração das fases afetam a transparência do filme.

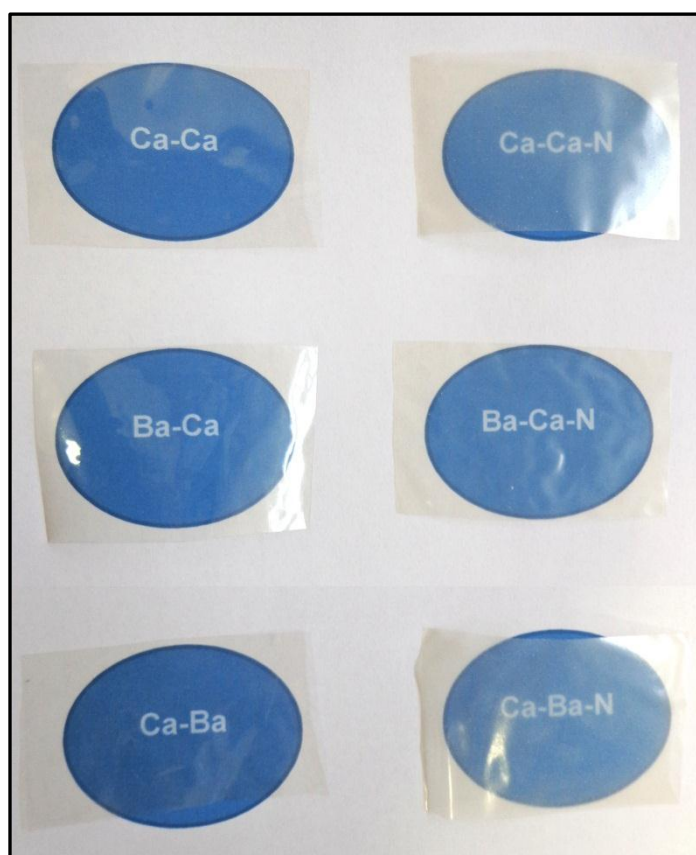


Figura 5.8: Fotografias dos filmes sem antimicrobiano (*Ca-Ca*, *Ba-Ca* e *Ca-Ba*) e dos filmes com natamicina (*Ca-Ca-N*, *Ba-Ca-N*, *Ca-Ba-N*).

Vários trabalhos relatam o aumento da opacidade dos filmes devido à adição de substâncias hidrofóbicas. Yang e Paulson (2000), por exemplo, verificaram que a adição de lipídios aos filmes de gelatina torna-os mais opacos e com coloração esbranquiçada. Ozdemir e Floros (2008) observaram um aumento na opacidade de filmes de proteína de soro de leite com

adição de cera de abelha, sendo que a adição do antimicrobiano sorbato de potássio promoveu a diminuição da opacidade desses filmes.

Apesar do aumento da opacidade dos filmes ativos, a simulação da aplicação dos filmes em um alimento, como um queijo, por exemplo, demonstra que o aspecto visual do conjunto não fica comprometido (Figura 5.9).

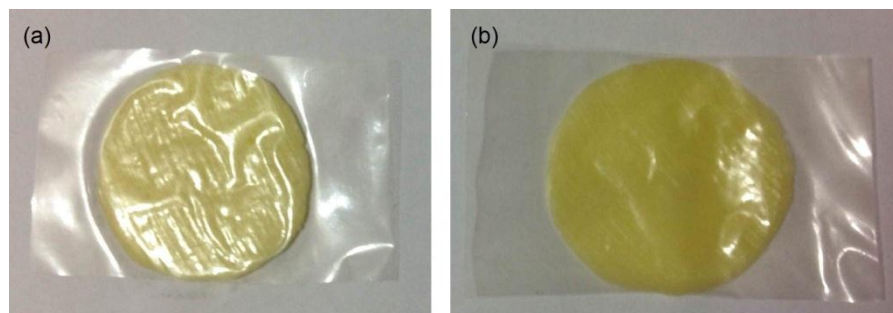


Figura 5.9: Fotografias dos filmes *Ca-Ca* sem antimicrobiano (a) e com natamicina (b) sobre uma amostra de queijo.

Os parâmetros de cor, L^* , a^* e b^* dos filmes estão dispostos na Tabela 5.8, bem como os resultados obtidos no cálculo da diferença total de cor ΔE^* . A diferença total de cor foi calculada para as formulações dos filmes ativos, utilizando-se como padrão os filmes comuns equivalentes.

A análise dos dados revela que a adição da natamicina provocou uma diminuição na luminosidade L^* dos filmes. Este parâmetro representa a qualidade pela qual se distingue uma cor clara de uma cor escura. Os resultados do parâmetro b^* indicaram que a natamicina provoca um aumento significativo na tonalidade amarela dos filmes.

Tendência semelhante foi verificada por Pranoto *et al.* (2005a). A adição do antimicrobiano natural de óleo de alho aos filmes de alginato afetou a aparência dos filmes em relação à transparência e também à cor. Os filmes apresentaram menor luminosidade e tenderam ao amarelo, sendo que o parâmetro b^* aumentou de -3,35 (filme sem antimicrobiano) para 4,65 com a adição do óleo. Marcos *et al.* (2010) adicionaram enterocina em filmes de alginato e observaram uma diminuição do parâmetro L^* e um aumento do b^* , indicativo de um filme mais amarelado.

Tabela 5.8: Parâmetros de cor L^* , a^* e b^* dos filmes de alginato sem antimicrobiano (0%) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário e diferença total de cor (ΔE) dos filmes ativos em relação aos filmes sem natamicina.

Filme	Natamicina (%)	L^*	a^*	b^*	ΔE
<i>Ca-Ca</i>	0	$96,31 \pm 0,23^a$	$-0,03 \pm 0,01^c$	$1,32 \pm 0,01^{bc}$	3,14
	4	$93,73 \pm 0,32^b$	$0,21 \pm 0,06^{ab}$	$3,10 \pm 0,09^a$	
<i>Ba-Ca</i>	0	$96,54 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,03^b$	$1,43 \pm 0,03^b$	3,81
	4	$93,51 \pm 0,25^b$	$0,30 \pm 0,05^a$	$3,06 \pm 0,58^a$	
<i>Ca-Ba</i>	0	$96,34 \pm 0,03^a$	$0,16 \pm 0,03^b$	$1,37 \pm 0,02^b$	3,37
	4	$93,39 \pm 0,10^b$	$0,26 \pm 0,06^{ab}$	$3,00 \pm 0,07^a$	

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A diferença total de cor (ΔE), que compara de forma geral os parâmetros ópticos do filme com natamicina e os filmes padrões, mostra que os filmes *Ca-Ca* com natamicina apresentam uma coloração mais próxima a do filme original.

Na Tabela 5.9, estão apresentados os resultados para a tonalidade cromática (ângulo Hue) e o Croma dos filmes.

Tabela 5.9: Ângulo Hue e Croma dos filmes de alginato sem antimicrobiano (0%) e com natamicina (4%) reticulados com cálcio e bário.

Filme	Natamicina (%)	$^\circ\text{Hue}$	Croma
<i>Ca-Ca</i>	0	$88,56 \pm 0,51^a$	$1,33 \pm 0,01^b$
	4	$79,32 \pm 0,70^b$	$3,12 \pm 0,09^a$
<i>Ca-Ba</i>	0	$88,34 \pm 0,58^a$	$1,37 \pm 0,01^b$
	4	$73,13 \pm 1,22^c$	$3,02 \pm 0,06^a$
<i>Ba-Ca</i>	0	$88,26 \pm 0,26^a$	$1,43 \pm 0,03^b$
	4	$79,67 \pm 1,00^b$	$3,07 \pm 0,06^a$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O ângulo Hue dos filmes variou entre 73,13 e 88,56°. Verifica-se, de acordo com o diagrama CIELab (Figura 4.4), que os filmes possuem o ângulo Hue orientado para o 1°

quadrante, entre a (+) e o b (+). O valor do croma indica a intensidade da cor representada pelo valor do Hue, cujo valor máximo é 16. Desta forma, observa-se que a cor dos filmes ativos é de maior intensidade. Da Silva (2009) obteve características gerais de cor semelhantes aos encontrados neste trabalho, para filmes de alginato com natamicina. O ângulo Hue situou-se entre 85,70 e 92,55° e houve um aumento no parâmetro b^* com a incorporação do agente ativo.

5.2.9 **Análise termogravimétrica**

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com o intuito de avaliar a influência da reticulação com bário e cálcio e da adição da natamicina no processo de decomposição térmica dos filmes de alginato, bem como ter um indicativo da temperatura a que podem ser submetidos em uma possível aplicação.

Na Figura 5.10 estão apresentadas as curvas termogravimétricas (TGA) de perda de massa em função da temperatura para os filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) com e sem natamicina. Para melhor visualização dos eventos térmicos, foram sobrepostas as curvas da primeira derivada da perda de massa (DTGA). Os picos destas derivadas correspondem ao ponto de inflexão na TGA e indicam a temperatura à qual ocorreu maior variação de massa.

Para todos os filmes foram observados três eventos térmicos, representados por T_1 , T_2 e T_3 , cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.10.

O estágio inicial de perda de massa (T_1) que vai até a região próxima de 200°C, está relacionado à desidratação do filme, ou seja, uma perda de massa de água adsorvida ou água ligada (Soares *et al.*, 2004, Xiao *et al.*, 2002). Variações na área do pico (relacionada à quantidade de perda de água) e/ou a posição da temperatura de máxima velocidade de perda de massa indicam que estes sistemas diferem em sua capacidade de ligação de água e na força de interação entre a água e o polímero.

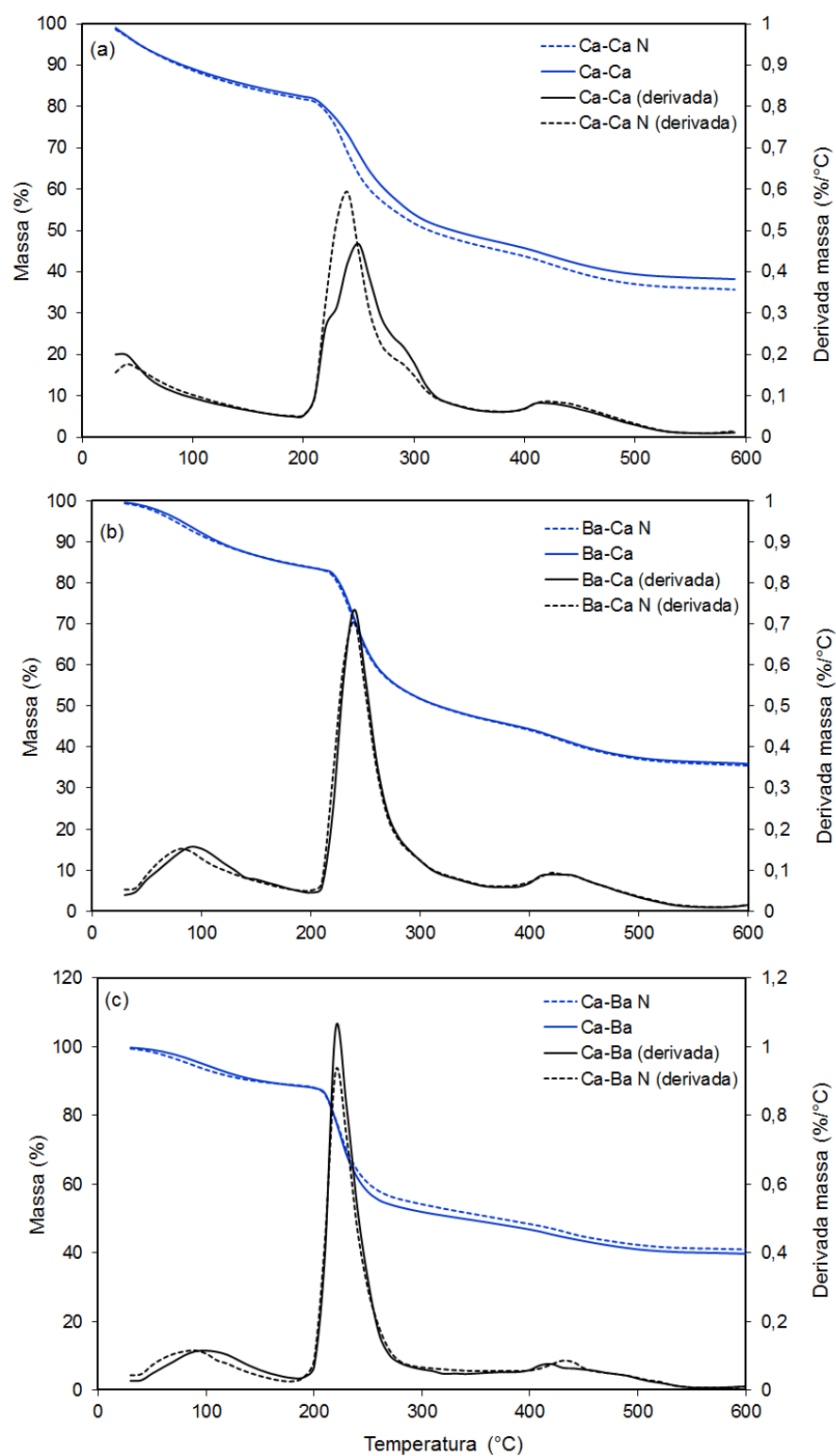


Figura 5.10: Termogramas dos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) sem tratamento antimicrobiano (—) e com natamicina (---).

Tabela 5.10: Eventos termogravimétricos dos filmes de alginato sem antimicrobiano (0%) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	Natamicina (%)	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	T ₃ (°C)	Perda massa 100°C (%)	Resíduo a 600°C (%)
<i>Ca-Ca</i>	0	68,6 ± 0,5	246,6 ± 0,4	415,3 ± 0,8	11,8 ± 0,2	37,8 ± 0,6
	4	57,8 ± 0,4	237,1 ± 0,9	416,1 ± 0,4	12,2 ± 0,5	35,0 ± 0,7
<i>Ba-Ca</i>	0	89,1 ± 0,6	239,5 ± 0,9	432,1 ± 0,5	8,5 ± 0,3	36,0 ± 0,3
	4	77,4 ± 0,8	238,3 ± 0,7	421,5 ± 0,9	8,6 ± 0,3	36,1 ± 0,4
<i>Ca-Ba</i>	0	95,2 ± 1,0	220,3 ± 0,5	415,2 ± 0,7	6,1 ± 0,1	39,5 ± 0,5
	4	89,6 ± 0,7	221,3 ± 0,8	434,4 ± 1,1	6,5 ± 0,4	40,9 ± 0,9

Média ± erro padrão das repetições.

Observa-se que os valores de T₁ foram mais baixos para os filmes *Ca-Ca*, indicando uma ligação mais fraca da água por pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila do alginato. O percentual de perda de massa a 100°C foi determinado (Tabela 5.10) e mostra que estes filmes também apresentaram maior perda, seguido dos filmes *Ba-Ca* e *Ca-Ba*. Na determinação de umidade, os filmes *Ca-Ba* também apresentaram o menor valor, no entanto, esta foi próxima de 15% para o filme sem natamicina. A comparação entre os filmes com e sem natamicina revela que, para todas as formulações, houve uma redução na temperatura desta transição com a adição do antimicrobiano. O percentual de perda de massa, no entanto, não sofreu alteração significativa. A diminuição da temperatura após a adição do antimicrobiano pode ter enfraquecido as ligações da água com o polímero, fazendo que esta fosse eliminada mais rapidamente.

Os dois eventos térmicos seguintes (T₂ e T₃) são atribuídos às duas etapas de degradação do filme. Em T₂, ocorre a degradação por desidratação dos anéis sacarídicos, rompimento das ligações C-H e quebra das ligações glicosídicas C-O-C na cadeia principal do alginato (Phang *et al.*, 2011). Comparando as diferentes reticulações, observa-se que os filmes *Ca-Ba* apresentaram menor temperatura de degradação do que os demais filmes, o que pode estar relacionado com a reticulação deficiente da matriz polimérica. De acordo com Xiao *et al.* (2002), a reticulação pode melhorar a estabilidade térmica dos filmes. Estes autores observaram um aumento de 50°C na estabilidade térmica de filmes de alginato e carboximetil glucomanana após a reticulação com íons cálcio.

A adição da natamicina aos filmes *Ca-Ca* provocou uma diminuição da temperatura de degradação T_2 de aproximadamente 10°C. Esta temperatura não sofreu alteração significativa para os demais tratamentos. De forma geral, os resultados observados em T_2 indicam que os filmes poderiam ser submetidos a temperaturas próximas a 220°C, sem que houvesse prejuízos na sua estabilidade ou degradação.

A segunda etapa de degradação (T_3) ocorreu entre 415,2 a 434,5 °C e está relacionada à formação de Na_2CO_3 e outros materiais carbonáceos (Phang *et al.*, 2011). Nesta etapa os filmes *Ba-Ca* apresentaram maior estabilidade e não foi observada uma tendência definida em relação à presença da natamicina. Ao final do processamento térmico, em 600 °C, os filmes apresentaram resíduos de 35 a 40,9%. As temperaturas de degradação T_2 e T_3 estão próximas aos valores observados na literatura para filmes de alginato (Sarmiento *et al.*, 2006; Phang *et al.*, 2011 e Soares *et al.*, 2004).

5.2.10 Permeabilidade ao oxigênio

Os resultados obtidos do coeficiente de permeabilidade ao oxigênio dos filmes com e sem natamicina estão apresentados na Figura 5.11. Resultados mais realistas e bem correlacionados com a aplicação final seriam obtidos para filmes em ambiente com umidade relativa de 52%. Porém, nestas condições os filmes tornavam-se muito quebradiços no equipamento utilizado, inviabilizando as medidas. Devido a isto, as determinações foram realizadas com o equipamento operando em ambiente a 75% UR.

De acordo com McHugh e Krochta (1994), a permeabilidade ao oxigênio de filmes comestíveis aumenta exponencialmente com o aumento da umidade relativa. Assim, pode-se esperar que o coeficiente de permeabilidade seja ainda menor em ambientes de armazenamento, no qual o filme será utilizado (UR em torno de 50%). O trabalho de McHugh e Krochta (1994) com filmes de proteína de soja ilustram o efeito da umidade relativa nesta propriedade. Ao diminuir a umidade relativa de 70 para 40%, a permeabilidade ao O_2 diminuiu de 43,3 para somente $0,7\text{cm}^3\cdot\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$.

Uma análise dos resultados indica que os filmes *Ca-Ba* apresentaram permeabilidade ao oxigênio significativamente maior que os demais filmes. Este resultado pode estar associado a uma reticulação limitada no interior do filme, consequência da dificuldade dos íons bário atravessarem a superfície compacta dos filmes. Uma redução no empacotamento da

macromolécula aumenta o volume livre, aumentando a permeabilidade. Um esquema ilustrativo destas possíveis diferenças na acomodação dos íons cálcio e bário nas cadeias do filme de alginato está apresentado na Figura 5.12.

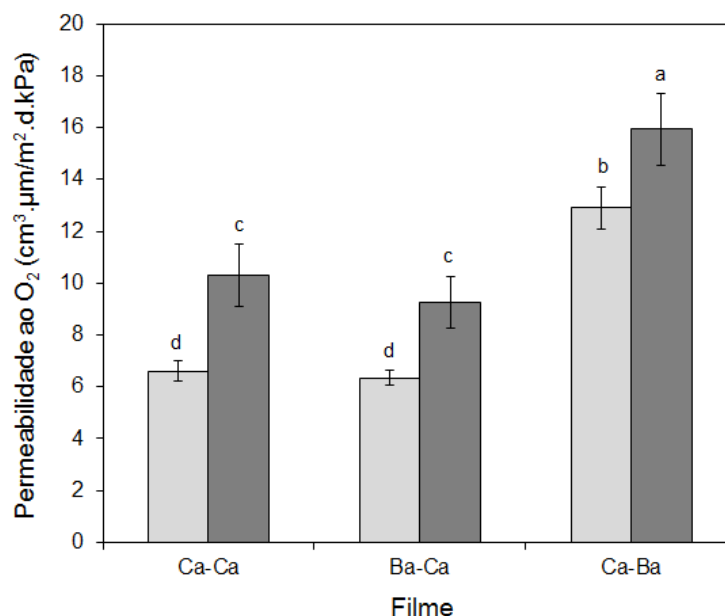


Figura 5.11: Permeabilidade ao oxigênio dos filmes sem antimicrobiano (■) e filmes com natamicina (■) a 75% UR.

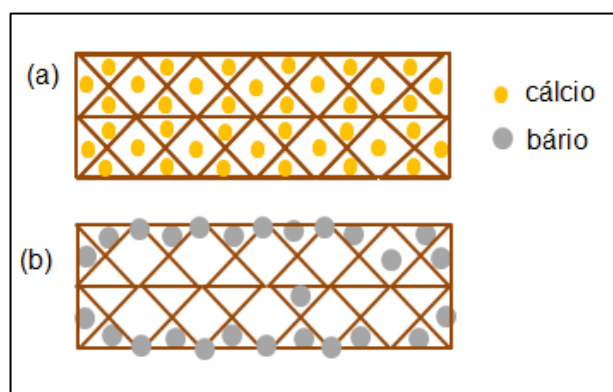


Figura 5.12: Ilustração da acomodação dos íons cálcio (a) e bário (b) nas cadeias do alginato.

Para fins de comparação, na Tabela 5.11 estão apresentados os valores de permeabilidade ao O₂ obtidos da literatura para diversos filmes sintéticos e naturais. Ao avaliar

os dados, torna-se evidente a maior eficiência dos biofilmes em relação aos filmes sintéticos nesta propriedade de barreira. A permeabilidade ao O₂ dos filmes *Ca-Ca* do presente trabalho foi cerca de 180 vezes menor do que o filme sintético de polietileno de baixa densidade e semelhante aos filmes de PVDC e EVOH, que são comercialmente utilizados como barreira ao oxigênio.

Tabela 5.11: Dados da literatura de permeabilidade ao oxigênio (PO₂) para diferentes filmes.

Filme	Condições do ensaio	PO ₂ (cm ³ .µm/m ² .d.kPa)	Referência
Polietileno alta densidade	23°C/50% UR	427	Salame (1986)*
Polietileno baixa densidade	23°C/50% UR	1870	Salame (1986)*
Proteína de soja	23°C/70% UR	43,3	McHugh e Krochta (1994)
Proteína de soja	23°C/40% UR	0,7	McHugh e Krochta (1994)
Alginato	23°C/50% UR	0,55	Hartman <i>et al.</i> (2006)
Alginato + glicerol	23°C/50% UR	4,56	Hartman <i>et al.</i> (2006)
Alginato + purê maçã	23°C/50% UR	10,20	Fontes <i>et al.</i> (2011)
Alginato	23°C/50% UR	5,66	Fontes <i>et al.</i> (2011)
Pectina	23°C/50% UR	19,44	Fontes <i>et al.</i> (2011)
PVDC	23°C/50% UR	0,4-5,1	Miller e Krochta (1997)
EVOH	23°C/95% UR	12	Miller e Krochta (1997)

* Citado por McHugh e Krochta (1994).

A adição da natamicina ocasionou um aumento na permeabilidade ao O₂ em todas as amostras. Para os filmes *Ca-Ca* e *Ca-Ba*, este aumento foi de aproximadamente 50% e, para os filmes *Ca-Ba*, de 23%. Mesmo com estes aumentos observados após a adição do antimicrobiano, o valor de permeabilidade ao O₂ obtido é atraente em comparação a outros materiais.

Em filmes de quitosana, Fajardo *et al.* (2010) também observaram um pequeno aumento na permeabilidade ao O₂ ao adicionarem natamicina. Aumento mais pronunciado, de mais de 10000 vezes, foi verificado por Shen *et al.* (2010) ao adicionar 15% de sorbato de potássio a filmes de quitosana.

5.2.11 Isotermas de sorção

As isotermas de sorção têm sido amplamente utilizadas para descrever matematicamente o comportamento entre o conteúdo de umidade e a atividade de água de diversos materiais biológicos, inclusive filmes biodegradáveis. Esta determinação é importante, uma vez que os filmes à base de polissacarídeos ou proteínas são muito suscetíveis a absorver água do ambiente e sofrer alterações nas suas propriedades de barreira e na sua funcionalidade em geral.

Na Figura 5.13 estão dispostos os pontos experimentais das isotermas de sorção a 25°C e os ajustes baseados no modelo de GAB (Equação 4.10) para os filmes com as três diferentes reticulações. Nas Figuras 5.14 a 5.16 estão apresentados o comportamento da isoterma para os diferentes filmes com e sem natamicina.

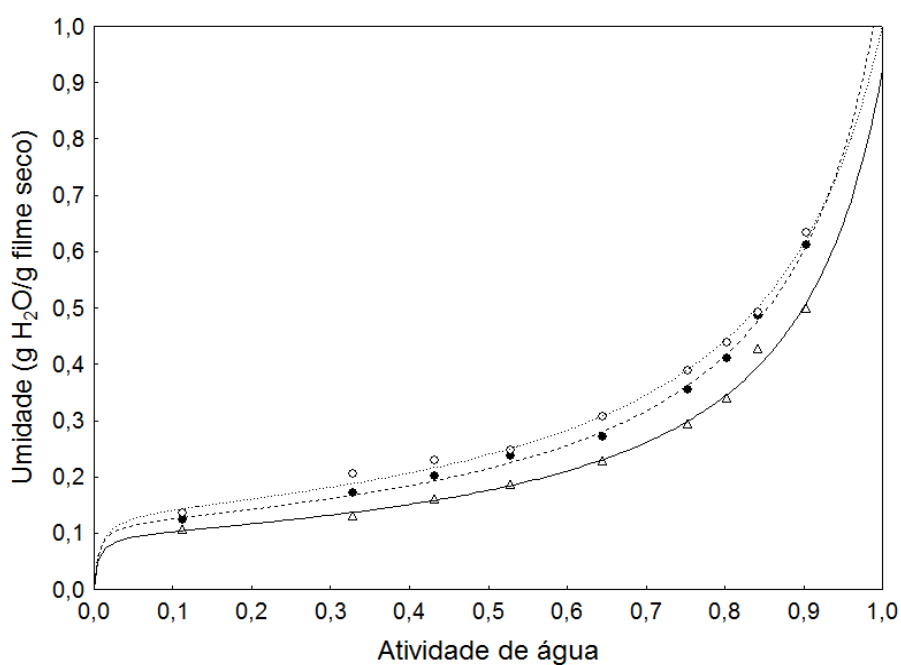


Figura 5.13: Isotermas de sorção para os filmes *Ca-Ca* (●), *Ba-Ca* (○) e *Ca-Ba* (Δ) reticulados em 10 minutos de imersão. Modelo de GAB (—).

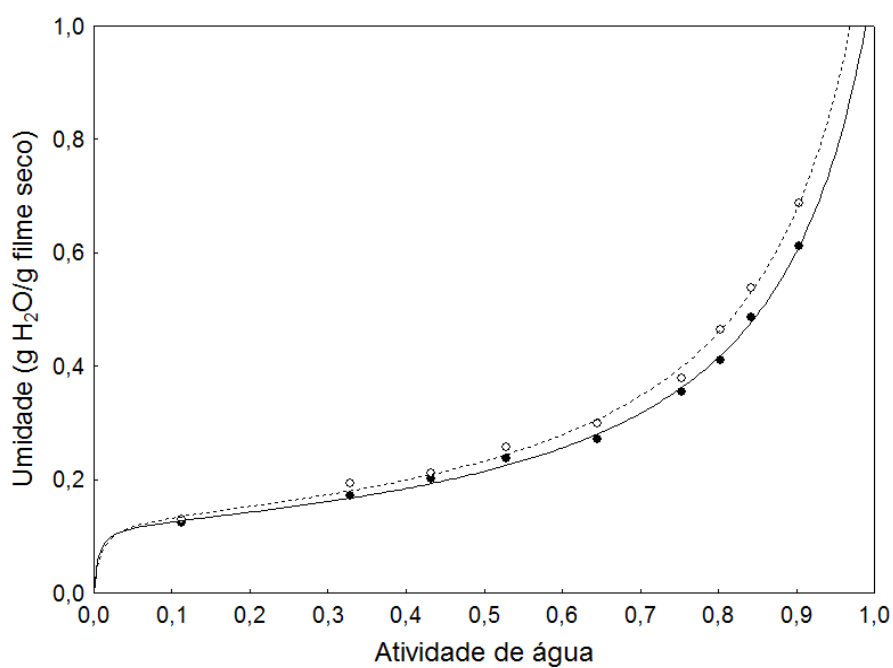


Figura 5.14: Isotermas de sorção para os filmes *Ca-Ca* sem natamicina (●) e com natamicina (○) reticulados em 10 minutos de imersão. Modelo de GAB (—).

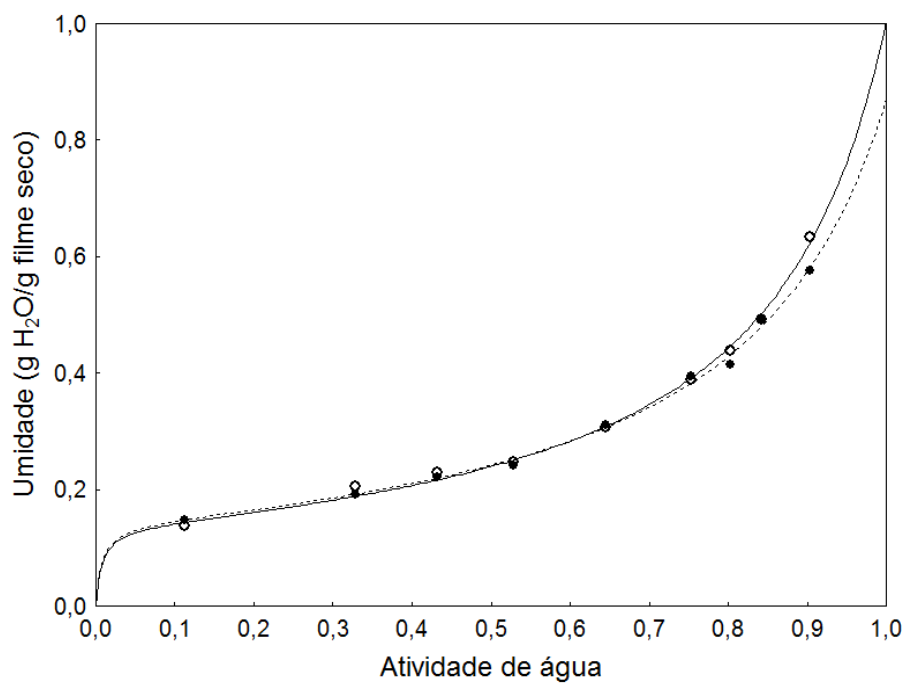


Figura 5.15: Isotermas de sorção para os filmes *Ba-Ca* sem natamicina (●) e com natamicina (○) reticulados em 10 minutos de imersão. Modelo de GAB (—).

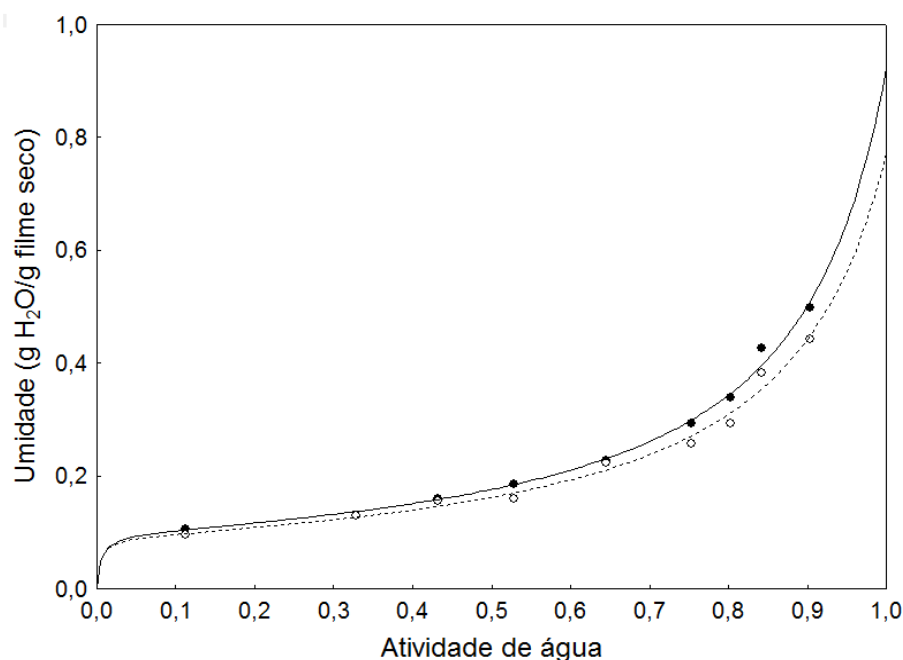


Figura 5.16: Isotermas de sorção para os filmes *Ca-Ba* sem natamicina (●) e com natamicina (○) reticulados em 10 minutos de imersão. Modelo de GAB (—).

Observa-se nas figuras que todas as curvas apresentaram um perfil sigmoideal, revelando um baixo aumento na umidade de equilíbrio até atividades de água em torno de 0,7, seguido de um aumento acentuado em altas atividades de água. Este comportamento deve-se ao fato de que em baixas umidades relativas, o efeito plastificante é muito pequeno e a mobilidade das regiões amorfas é restrita. Com o aumento da umidade relativa, há uma formação de agrupamentos de moléculas de água na matriz polimérica, seguido de intumescimento, o que ocasiona a exposição de um número maior de sítios de ligação disponíveis para a sorção de água (Al-Muhtaseb *et al.*, 2004).

Estas isotermas, de acordo com a classificação de Brunauer, são do Tipo II e indicam que a água é adsorvida em camadas multimoleculares. Este tipo de isoterma é característico de materiais poliméricos e tem sido observado em outros trabalhos envolvendo filmes de alginato reticulados com cálcio (Rhim *et al.*, 2004; Olivas e Barbosa-Cánovas, 2008) e outros biopolímeros como zeína (Gennadios e Weller, 1994), amido de tapioca (Chen *et al.*, 2013) e metilcelulose (de la Cruz *et al.*, 2001).

De forma geral, as isotermas foram influenciadas pelo agente reticulante. Observa-se na Figura 5.13, que para mesmas atividades de água, o filme reticulado com bário no 2º estágio (*Ca-Ba*) apresentou umidade de equilíbrio em base seca menor do que os filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*.

Os filmes *Ca-Ba* também apresentaram menores valores para o conteúdo de umidade na monocamada (X_m), que está apresentado com os demais parâmetros obtidos do modelo de GAB, na Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Parâmetros do modelo GAB (X_m , C , k), coeficiente de determinação (R^2) e desvio relativo médio (DRM) para dos dados de sorção dos filmes de alginato sem antimicrobiano (0%) e com natamicina (4% na solução filme-formadora) reticulados com cálcio e bário.

Filme	Natamicina (%)	X_m	C	k	R^2	DRM (%)
<i>Ca-Ca</i>	0	0,119	213,45	0,8902	0,9988	2,72
	4	0,129	132,97	0,8987	0,9968	2,89
<i>Ba-Ca</i>	0	0,137	176,08	0,8635	0,9980	2,91
	4	0,142	162,85	0,8373	0,9953	2,01
<i>Ca-Ba</i>	0	0,091	272,35	0,8941	0,9962	2,74
	4	0,098	260,76	0,8824	0,9945	4,73

A umidade da monocamada (X_m) está relacionada com a quantidade máxima de água que pode ser adsorvida em uma única camada por grama de filme seco (Cho e Rhee, 2002). Valores mais baixos deste coeficiente indicam que uma menor quantidade de sítios ativos está disponível para a adsorção de água por pontes de hidrogênio, entre os grupos hidroxila e carboxila (Chen *et al.*, 2013).

O parâmetro C , que está relacionado à diferença no potencial químico entre monocamada e as subsequentes, em um dado sítio de sorção (Timmermann *et al.*, 2001), foi maior para os filmes *Ca-Ba*, seguido dos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*. Segundo Chen *et al.* (2013), quanto maior o valor de C , maior é a energia necessária para a adsorção das moléculas de água nos sítios ativos dos filmes, o que implica em um grau de hidrofiliidade menor. Desta forma, os resultados sugerem que os filmes reticulados com bário no segundo estágio são mais hidrofóbicos, o que está de acordo com os valores obtidos para conteúdo de umidade, massa solubilizada em água, grau de intumescimento e análise termogravimétrica obtidos inicialmente.

Os filmes com natamicina apresentaram a mesma tendência sigmoidal dos filmes sem antimicrobiano (Figura 5.14 a 5.16). No entanto, os valores do conteúdo de umidade na monocamada (X_m) foram ligeiramente superiores aos dos filmes sem antimicrobianos, indicando que a adição da natamicina aumentou a quantidade de sítios ativos para a adsorção de água. O valor de C diminuiu para todos os filmes com antimicrobiano, sugerindo que a adsorção de água nos filmes ativos é mais fácil. Estas observações podem estar relacionadas ao fato da natamicina promover uma mudança estrutural nos filmes, conforme já havia sido constatado nos resultados de tensão de ruptura.

O parâmetro k é um fator de correção das propriedades das moléculas da monocamada e é independente da composição do filme (Phan *et al.*, 2005). Os altos coeficientes de determinação (R^2) e os valores dos desvios relativos médios (DRM) inferiores a 5%, indicam um excelente ajuste do modelo de GAB aos dados experimentais de sorção de água dos filmes de alginato.

5.2.12 FTIR - ATR

Com o objetivo de avaliar possíveis interações entre a natamicina e o alginato, bem como modificações na estrutura provocadas pela reticulação com os íons cálcio e bário, foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros obtidos para os diferentes filmes estão apresentados na Figura 5.17.

Em todos os espectros é possível observar os picos característicos dos filmes de alginato (Papageorgiou *et al.*, 2010), como nas regiões de 1590 e 1400 cm^{-1} que representam, respectivamente, as vibrações assimétricas e simétricas do grupo carboxilato (COO^-). Abaixo dos 1500 cm^{-1} situa-se a chamada região de impressão digital, única para cada composto. Nesta zona encontram-se uma série complexa de bandas que muitas vezes não podem ser atribuídas sem ambiguidade a uma vibração em particular, pois estas são o resultado da interação de vários sistemas vibracionais complexos.

Os espectros dos filmes também apresentam uma banda larga na região de 3200 cm^{-1} , referente ao estiramento dos grupos O-H e às pontes de hidrogênio. Estas ligações estão associadas a interações polares entre os componentes do filme e a água livre presente na matriz polimérica (Petrusic, 2012). Para os filmes reticulados com bário no 2º estágio, inclusive

os filmes ativos, observa-se uma grande redução na intensidade destes picos. Como a reticulação promove um aumento nas ligações intermoleculares, uma redução na intensidade do pico O-H pode estar relacionada a uma redução das interações polímero-água e absorção de umidade (Salmieri *et al.*, 2006). Este comportamento é consistente com o conteúdo de umidade, massa solubilizada em água, isothermas de sorção e grau de intumescimento observado para os filmes *Ca-Ba*.

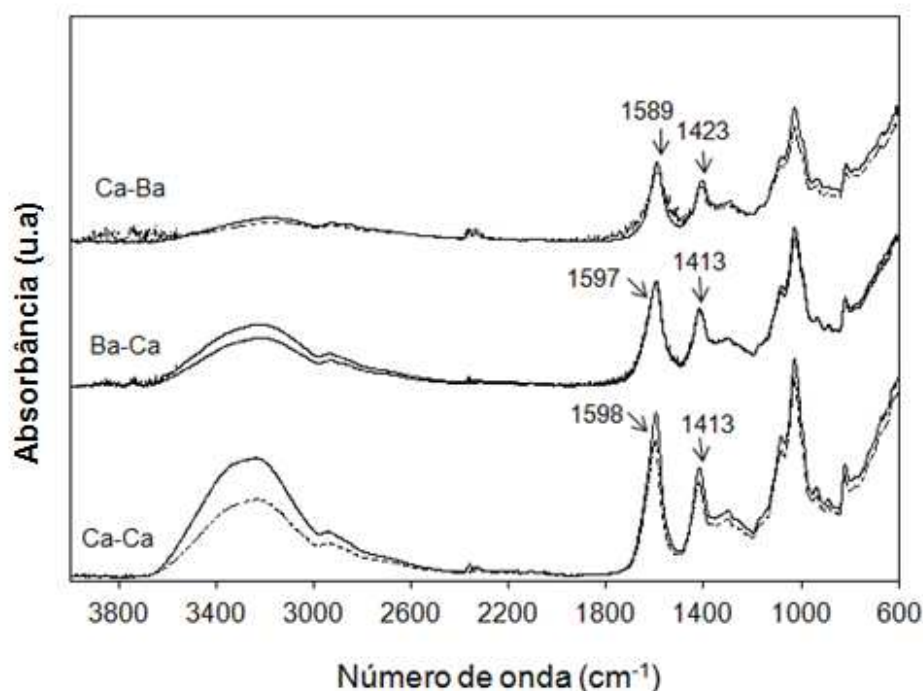


Figura 5.17: Espectros FTIR-ATR dos filmes de alginato reticulados com cálcio e/ou bário sem antimicrobiano (—) e com natamicina (---). Colocar

Também foi observado que a reticulação com bário no 2º estágio promoveu deslocamentos nos picos de vibração simétrica e assimétrica COO^- . O pico de vibração assimétrica ocorreu em 1598 cm^{-1} para os filmes *Ca-Ca*; 1597 cm^{-1} para os filmes *Ba-Ca* e 1589 cm^{-1} para os filmes *Ca-Ba*. Já os picos simétricos *Ca-Ca* ocorreram a 1413 cm^{-1} para *Ca-Ca* e *Ba-Ca* e 1423 cm^{-1} para os filmes *Ca-Ba*. De acordo com a literatura, o aumento da força da interação iônica entre as cadeias do alginato e os agentes reticulantes são caracterizadas principalmente por um deslocamento do pico assimétrico para valores de energia mais baixos, um deslocamento do pico simétrico para valores mais altos e uma redução geral na intensidade

destes picos (Tam *et al.*, 2011; Lawrie *et al.*, 2007, Salmieri *et al.*, 2006, Pascalau *et al.*, 2012, Sartori *et al.*, 1996). Desta forma, os resultados comprovam que o bário apresenta maior afinidade ao alginato do que o cálcio.

Lawrie *et al.* (2007) também observaram maior força de interação iônica em filmes de alginato reticulados com Ba^{2+} . Enquanto picos assimétricos para o alginato de sódio foram obtidos em 1596 cm^{-1} , a reticulação com cálcio e bário deslocou os picos para 1586 e 1581 cm^{-1} , respectivamente.

Para filmes de alginato, Sartori *et al.* (1996) observaram que os picos das vibrações simétricas COO^- foram deslocadas para valores superiores e diminuíram sua intensidade com o aumento do percentual de Ca^{2+} , ou seja, quanto maior a reticulação, maior a interação iônica. Semelhantemente, Vidal-Urquiza *et al.* (2012) avaliaram a intensidade das interações dos reticulantes pelo deslocamento do pico assimétrico. Filmes de alginato de sódio apresentaram pico em 1597 cm^{-1} enquanto que a vibração para filmes reticulados ocorreu em 1589 cm^{-1} para cálcio e em 1585 cm^{-1} para o bário.

Não foram observadas mudanças relevantes nas características estruturais após a adição da natamicina. Picos na região de 3500 a 3300 cm^{-1} são também atribuídos às ligações N-H, características da natamicina, mas provavelmente foram sobrepostas pelos picos O-H.

5.2.13 Cristalinidade

A cristalinidade dos filmes contendo natamicina com os diferentes reticulantes foi determinada por difração de raios X, conforme apresentado na Figura 5.18. Para os filmes *Ca-Ca*, observa-se um pico pronunciado em torno $13,5^\circ$ cuja intensidade diminui para as outras amostras. Este resultado indica que os filmes *Ca-Ca* possuem um maior grau de organização das moléculas e uma maior cristalinidade. Isto pode ser consequência de uma reticulação mais efetiva promovida pelos íons cálcio.

A existência de uma estrutura mais amorfa nos filmes *Ca-Ba* ajuda a explicar os maiores valores de PVA e de permeabilidade ao O_2 obtidos para estas amostras. A transferência de massa do oxigênio em um polímero é altamente afetada pela estrutura polimérica e é uma função da fase amorfa, uma vez que a fase cristalina pode ser considerada impermeável (Miller e Krochta, 1997). Nos filmes de polietileno, por exemplo, um aumento na cristalinidade de 43%

para 74% diminui a permeabilidade ao oxigênio em 5 vezes. Desta forma, uma reticulação mais eficiente dos íons cálcio, induz a um aumento da cristalinidade dos filmes, dificultando a permeabilidade.

Os espectros dos filmes sem antimicrobiano ficaram totalmente sobrepostos aos dos filmes ativos e, devido a isto, não estão apresentados. A sobreposição dos espectros demonstra que a adição do antimicrobiano não influencia no grau de organização das cadeias poliméricas.

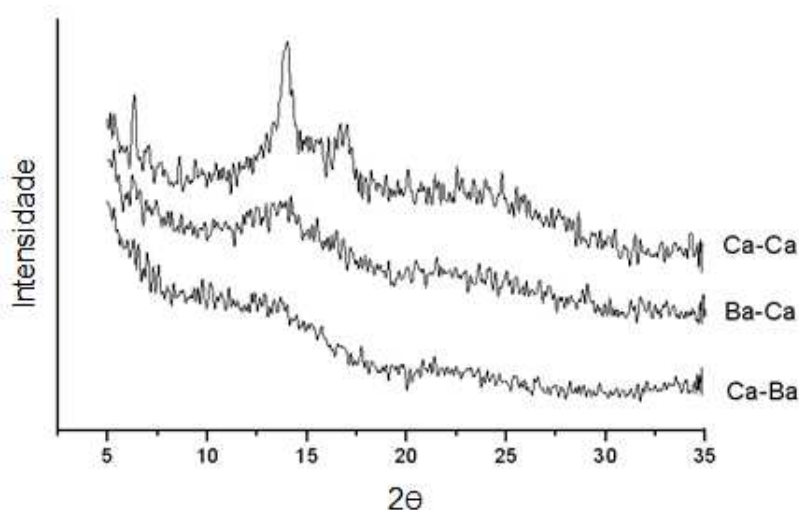


Figura 5.18: Difratogramas de raios-X dos filmes de alginato com natamicina.

5.3 Ensaios de liberação de natamicina em água

Os filmes ativos foram submetidos aos ensaios de liberação em água a 25°C utilizando a sequência de imersões em recipientes conforme procedimento descrito no Item 4.4a. Na Figura 5.19 estão apresentados os resultados da evolução da fração de natamicina liberada com o tempo de filmes *Ca-Ca*, *Ba-Ca* e *Ca-Ba*.

Uma comparação entre as curvas indica que a liberação da natamicina foi mais rápida para os filmes *Ca-Ba*. Para esta formulação, cerca de 80% da natamicina presente no filme foi liberada nas primeiras 55 h. Este tempo aumenta para 95 h e 290 h para os filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*, respectivamente. A liberação mais rápida dos filmes *Ca-Ba* está de acordo com a sua menor cristalinidade e reforça a hipótese de que o tratamento com íons bário no segundo estágio promove uma reticulação deficiente no interior do filme. Al-Musa *et al.* (1999) estudaram a liberação do fármaco cloridrato de metoclopramida a partir de filmes de alginato reticulados

com íons bário, alumínio ou cálcio e observaram uma liberação mais rápida para os filmes com bário. Os autores atribuíram este comportamento a uma reticulação limitada no interior do filme, devido à dificuldade de difusão destes íons através da camada superficial.

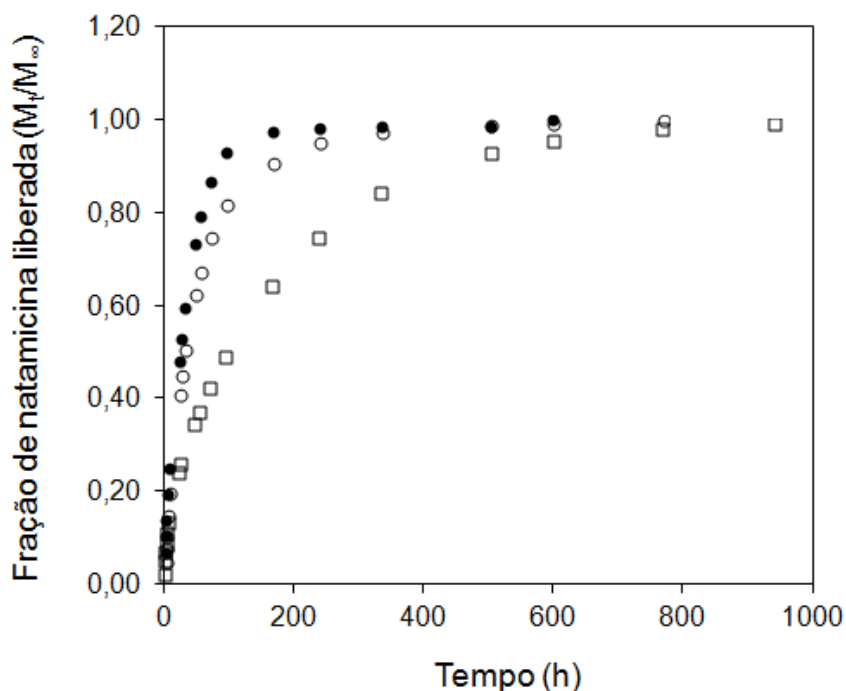


Figura 5.19: Fração de natamicina liberada com o tempo de filmes *Ca-Ba* (●), *Ca-Ca* (○), *Ba-Ca* (□).

A liberação mais lenta foi observada para os filmes *Ba-Ca*. Esta tendência indica que a interação entre a natamicina e as cadeias do alginato nestes filmes é mais forte. Como as características físicas e mecânicas dos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca* foram similares, o resultado obtido sugere que o agente reticulante utilizado no primeiro estágio pode influenciar fortemente o processo difusivo sem, no entanto, promover modificações substanciais nas propriedades funcionais dos filmes.

Para a certificação de que toda a massa de natamicina presente no filme havia sido liberada, fez-se a quantificação desta antes do processo de liberação, ou seja, determinou-se a massa total presente em uma amostra de filme com a mesma área das amostras submetidas aos ensaios em água. Este procedimento foi feito pela dissolução do filme em solução de citrato de sódio e leitura em espectrofotômetro UV/Vis. Os resultados da massa total inicial (M_{inicial}), a massa total liberada (M_{∞}) de cada filme bem como suas respectivas espessuras, estão apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Espessuras inicial e final, relação entre as espessuras e quantidade total de natamicina antes e após o ensaio de liberação.

Filme	δ_i (μm)	δ_f (μm)	δ_i/δ_f	M_{inicial} (mg/g filme)	M_{∞} (mg/ g filme)
<i>Ca-Ca</i>	$33 \pm 2,9^a$	$57 \pm 3,1^a$	1,72	$17,74 \pm 1,20^{a,A}$	$16,07 \pm 0,10^{a,A}$
<i>Ba-Ca</i>	$34 \pm 1,9^a$	$55 \pm 0,6^a$	1,62	$14,93 \pm 1,20^{a,A}$	$15,48 \pm 1,05^{a,A}$
<i>Ca-Ba</i>	$38 \pm 2,6^a$	$58 \pm 5,0^a$	1,53	$17,71 \pm 1,51^{a,A}$	$15,10 \pm 0,83^{a,A}$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e maiúsculas em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os valores da relação entre as espessuras final e inicial para os filmes são semelhantes aos obtidos pela análise de intumescimento (Tabela 5.4). Estes resultados indicam que, mesmo após o longo período em que os filmes estiveram imersos em água, o valor do grau intumescimento de equilíbrio não foi alterado. Para os cálculos das difusividades, utilizou-se a espessura final dos filmes, uma vez que o tempo para o equilíbrio do intumescimento (~ 5 minutos) é considerado pequeno em relação ao tempo total de liberação.

Verificou-se, ainda, que a massa inicial de natamicina dos filmes antes de serem submetidos à liberação (M_{inicial}) e os valores determinados ao final do experimento (M_{∞}) foram estatisticamente iguais ($p < 0,05$), confirmando que praticamente toda a massa de antimicrobiano presente no filme é liberada.

Alguns autores usam os valores médios da massa de soluto remanescente em cada fase para calcular concentrações de equilíbrio, sem atentar para os erros experimentais. Esses erros são amplificados pela grande diferença de massa total das fases, pois a amostra de filme tem cerca de 80 mg, enquanto que o total de líquido usado foi de 25 mL, e desta maneira coeficientes de partição pouco realistas são encontrados.

O procedimento adotado neste trabalho faz com que o filme entre em contato com amostras renovadas de água sem natamicina e, portanto, a concentração de equilíbrio na superfície do filme pode ser assumida como zero, evitando a necessidade do uso de coeficientes de partição.

Os coeficientes de difusão da natamicina nos filmes foram estimados através do ajuste da solução em série da 2ª lei de Fick (Equação 3.3) aos pontos experimentais dos ensaios de liberação. O modelo de difusão em sólidos semi-infinitos (tempos curtos) (Equação 3.5) também

foi ajustado aos dados experimentais, a fim de determinar a difusividade nos instantes iniciais de liberação (M_t/M_∞). Para este caso, os valores para a fração de massa liberada devem exibir ajuste linear em função da raiz quadrada de t . As curvas obtidas pelo ajuste das Equações 3.3 e 3.5 aos dados experimentais para os filmes estudados estão apresentadas nas Figuras 5.20 e 5.21, respectivamente.

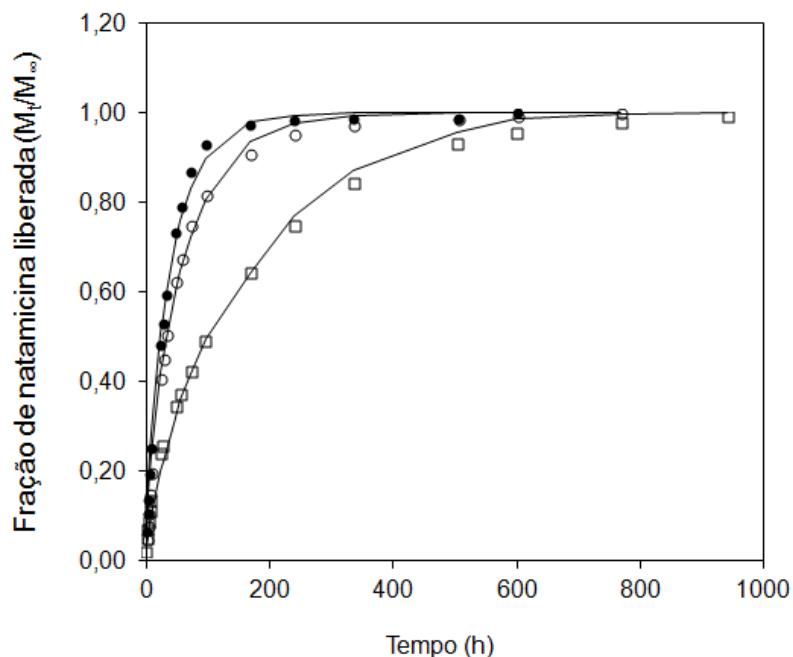


Figura 5.20: Ajuste ao modelo em série da 2ª Lei de Fick (Equação 3.3) para os filmes *Ca-Ba* (●), *Ca-Ca* (○) e *Ba-Ca* (□).

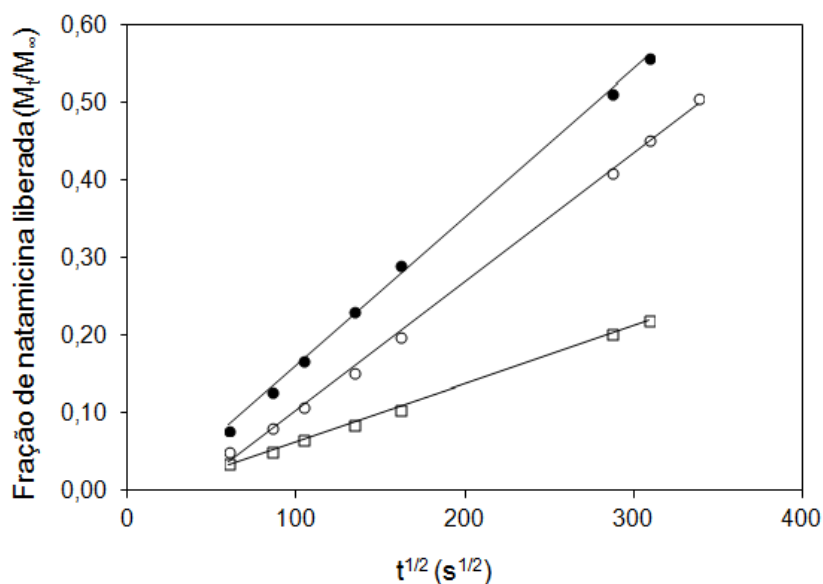


Figura 5.21: Ajuste ao modelo de sólidos semi-infinitos (Equação 3.5) para filmes *Ca-Ba* (●), *Ca-Ca* (○), *Ba-Ca* (□).

Na Tabela 5.14 estão dispostos os resultados obtidos no cálculo da difusividade pelas duas equações, bem como os respectivos coeficientes de determinação (R^2) dos ajustes aos modelos.

Tabela 5.14: Coeficientes de difusão (D) e coeficientes de determinação (R^2) dos filmes de alginato reticulados com cálcio e bário.

Filme	$D_1 (x 10^{11}) (cm^2/s)$	R_1^2	$D_2 (x 10^{11}) (cm^2/s)$	R_2^2
<i>Ca-Ca</i>	$1,27 \pm 0,18^{b,A}$	0,9971	$1,46 \pm 0,26^{b,A}$	0,9984
<i>Ca-Ba</i>	$1,88 \pm 0,18^{a,A}$	0,9969	$1,74 \pm 0,10^{a,A}$	0,9992
<i>Ba-Ca</i>	$0,61 \pm 0,01^{c,A}$	0,9988	$0,40 \pm 0,02^{c,B}$	0,9972

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e maiúsculas em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

¹Coeficiente de difusão e coeficiente de determinação estimados pela Equação 3.3.

²Coeficiente de difusão e coeficiente de determinação estimados pela Equação 3.5.

Conforme esperado, os coeficientes de difusão foram maiores para os filmes *Ca-Ba*, seguido dos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*, respectivamente. Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 mostram que os ajustes dos modelos foram bons. As

difusividades encontradas pela equação de tempos curtos estão relativamente próximas às obtidas pela solução em série, o que indica baixa influência do processo de embebição e aumento do volume da matriz na difusividade.

De forma geral, os valores de difusividade encontrados são mais baixos comparados aos dados publicados na literatura sobre liberação de agentes antimicrobianos. Franssen *et al.* (2004) determinaram coeficientes de difusão da natamicina em filmes de proteína de soro de leite entre $3,76 \times 10^{-9}$ a $6,16 \times 10^{-10}$ cm²/s, dependendo da concentração de glicerol na formulação. Hanusová *et al.* (2010) também obtiveram coeficientes nesta ordem de grandeza para filmes de polietileno/PVC com natamicina. Valores de difusividade de ácido sórbico em filmes de alginato são da ordem de 10^{-6} cm²/s (Torres e Karel, 1985) e 10^{-8} cm²/s em filmes de glúten de trigo (Redl *et al.*, 1996). Para sorbato de potássio e lisozima, valores típicos de difusividade são da ordem de 10^{-8} (Buonocore *et al.* 2003a, Ozdemir e Floros, 2001).

Pela capacidade de reticulação com íons divalentes, os filmes de alginato confeccionados pelo grupo de pesquisas do LEPPBio são os que proporcionam menores difusividades da natamicina em filmes. Uma liberação rápida, e conseqüentemente, altos coeficientes de difusão não são desejáveis, uma vez que apresentarão um período de atividade menor e podem promover a migração para partes internas do alimento, reduzindo a proteção na superfície (Appendini e Hotchkiss, 2002).

Com o objetivo de avaliar o mecanismo envolvido no processo de difusão, utilizou-se o Modelo da Lei da Potência (Equação 3.6) que relaciona a perda de soluto no período inicial de liberação ($M_t/M_\infty < 0,60$) com o tempo. Para todas as formulações foi plotado o gráfico $\ln(M_t/M_\infty)$ versus $\ln(t)$, conforme apresentado na Figura 5.22. Com a linearização, o expoente difusional n foi obtido a partir do coeficiente angular das retas enquanto a constante difusional k foi calculada a partir do coeficiente linear. A difusão fickiana é caracterizada por um coeficiente difusional igual a 0,5, ou seja, o processo de transferência de massa é controlado pelo coeficiente de difusão. Em casos em que a difusão é muito rápida comparada ao processo de relaxação da matriz polimérica, o coeficiente difusional será igual a 1. Valores de n entre 0,5 e 1 são característicos da difusão anômala, caso em que a taxa de difusão do soluto e a relaxação do polímero são de magnitude equivalentes.

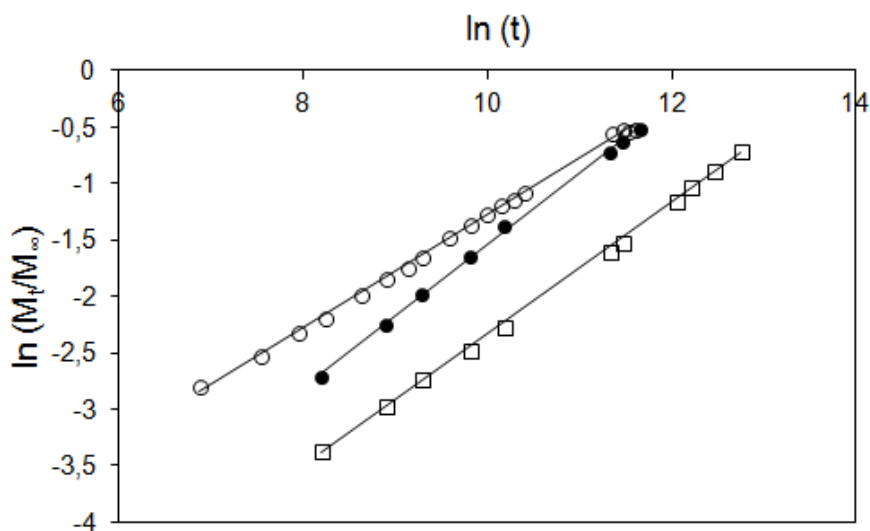


Figura 5.22: Curva $\ln (M_t/M_{\infty})$ vs $\ln (t)$ para filmes Ca-Ba (●), Ca-Ca (○), Ba-Ca (□).

Os valores do expoente difusional, da constante difusional e os coeficientes de determinação de todas as formulações estão apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15: Expoente difusional (n) e constante difusional (k) dos filmes reticulados com cálcio e bário após a liberação em água.

Filme	n	$k \text{ (s}^{-1}\text{)}$	R^2
<i>Ca-Ca</i>	$0,67 \pm 0,004$	$2,1 \times 10^{-4}$	0,9994
<i>Ca-Ba</i>	$0,62 \pm 0,02$	$5,4 \times 10^{-4}$	0,9989
<i>Ba-Ca</i>	$0,58 \pm 0,002$	$2,6 \times 10^{-4}$	0,9992

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) indicam que o modelo da lei da potência obteve um bom ajuste aos dados experimentais. Os expoentes difusionais variaram entre 0,58 e 0,67, valores característicos do comportamento anômalo, porém próximos ao comportamento fickiano. Pequenos desvios em relação ao comportamento fickiano indicam que o fenômeno de relaxação do polímero é pouco relevante, mas pode influenciar a liberação da natamicina nos primeiros instantes do processo. Este resultado é coerente com a proximidade observada para os valores de difusividade obtida pelo modelo de tempos curtos e pelo modelo em série.

Mecanismo de difusão anômalo foi obtido por Zactiti e Kiebusch (2009) para filmes de alginato reticulados com cálcio com sorbato de potássio cujo valor do expoente difusional foi aproximadamente 0,80. No entanto, 95% da liberação do sorbato de potássio nos filmes acontecia nos primeiros 4 minutos de contato com água, ou seja, ainda no período de intumescimento dos filmes. Da Silva (2009) obteve um expoente difusional de 0,608 para os filmes de alginato incorporando 4% de natamicina. Ozdemir e Floros (2001) obtiveram expoente difusional entre 0,55 e 0,86 para liberação de sorbato de potássio em filmes de proteína de soro de leite e cera de abelha.

Em relação à constante k , quanto maior forem os valores, menor é o tempo para liberação do agente ativo. O maior valor desta constante foi obtido para os filmes *Ca-Ba*, que liberaram a natamicina em menor tempo. No entanto, para os demais filmes, os valores de k foram próximos e não seguiram a tendência prevista.

O modelo que leva em consideração a relaxação da matriz polimérica (Equação 3.7) também foi avaliado. Os resultados do coeficiente X_F , que é uma medida do desvio do mecanismo de transporte em relação ao comportamento fickiano, do tempo de relaxação da matriz polimérica (τ) e dos coeficientes de difusão (D) obtidos por este modelo estão apresentados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16: Desvio do comportamento fickiano (X_F), tempo de relaxação da matriz polimérica (τ) e difusividade (D) obtidos a partir do ajuste do modelo da Equação 3.7 aos dados experimentais de liberação em água.

Filme	X_F	τ (s)	D (cm ² /s)	R^2
<i>Ca-Ca</i>	0,349	36	$3,67 \times 10^{-11}$	0,9989
<i>Ca-Ba</i>	0,996	9	$2,51 \times 10^{-11}$	0,9976
<i>Ba-Ca</i>	1,000	16,2	$0,38 \times 10^{-11}$	0,9967

Neste modelo, quanto menor o valor do parâmetro X_F e maior o tempo de relaxação polimérica (τ), mais relevante é o intumescimento no processo difusivo, ou seja, o sistema está mais distante do equilíbrio de intumescimento quando colocado em contato com o meio de liberação (Fajardo *et al.*, 2010). Pode-se observar pelos dados da Tabela 5.16, que os filmes *Ca-Ca* apresentaram esta característica mais fortemente que as demais amostras. Pelo coeficiente X_F de 1, os filmes *Ca-Ba* e *Ba-Ca* apresentariam um comportamento fickiano, em

que a relaxação polimérica não exerce influência na liberação. Embora os filmes *Ca-Ba* tenham apresentado uma liberação mais rápida, seu grau de intumescimento é mais baixo do que os dos demais filmes, corroborando com os resultados de X_F .

Em um filme de quitosana contendo natamicina que apresentava um elevado intumescimento no meio de liberação, Fajardo *et al.* (2010) obtiveram um X_F de 0,36 e tempo de relaxação polimérica de 400 s.

Os coeficientes de determinação indicam que o modelo teve um bom ajuste aos dados experimentais. A comparação entre os coeficientes de difusão obtidos pelo modelo convencional (apresentados na Tabela 5.14) e este, revela que os valores foram mais diferentes para os filmes *Ca-Ca*. De acordo com o valor de X_F , esta diferença deve estar relacionada ao fenômeno de relaxação polimérica, uma vez que este filme apresentou o maior desvio em relação ao comportamento Fickiano. Para os filmes *Ca-Ca*, portanto, o modelo da Equação 3.7 seria mais adequado, pois leva em consideração este fenômeno, corrigindo o coeficiente de difusão.

5.4 Morfologia após a liberação

Observações microscópicas da morfologia da superfície e da seção transversal dos filmes após 90 dias de imersão em água (período após o qual não havia mais liberação de natamicina) foram realizadas com o intuito de avaliar possíveis modificações microestruturais ocorridas após este processo. Os resultados estão apresentados na Figura 5.23.

As micrografias mostram que os filmes mantiveram sua integridade, com uma estrutura contínua, regular, bem compacta e sem poros após os 90 dias em contato com a água. Na superfície dos filmes verificam-se pequenas depressões, local onde se situavam os cristais de natamicina, dissolvidos durante o ensaio de liberação.

Em relação aos filmes *Ca-Ba* (c), uma comparação com a micrografia realizada antes da liberação (Figura 5.4) revela que as partículas brancas, atribuídas ao bário na superfície, foram lixiviadas após a imersão por 90 dias em água. Este resultado indica que houve uma deposição superficial do excesso de bário no filme e que uma lavagem mais vigorosa após a imersão na solução do 2º estágio de reticulação deve ser avaliada, de forma a evitar sua transferência para o meio de liberação.

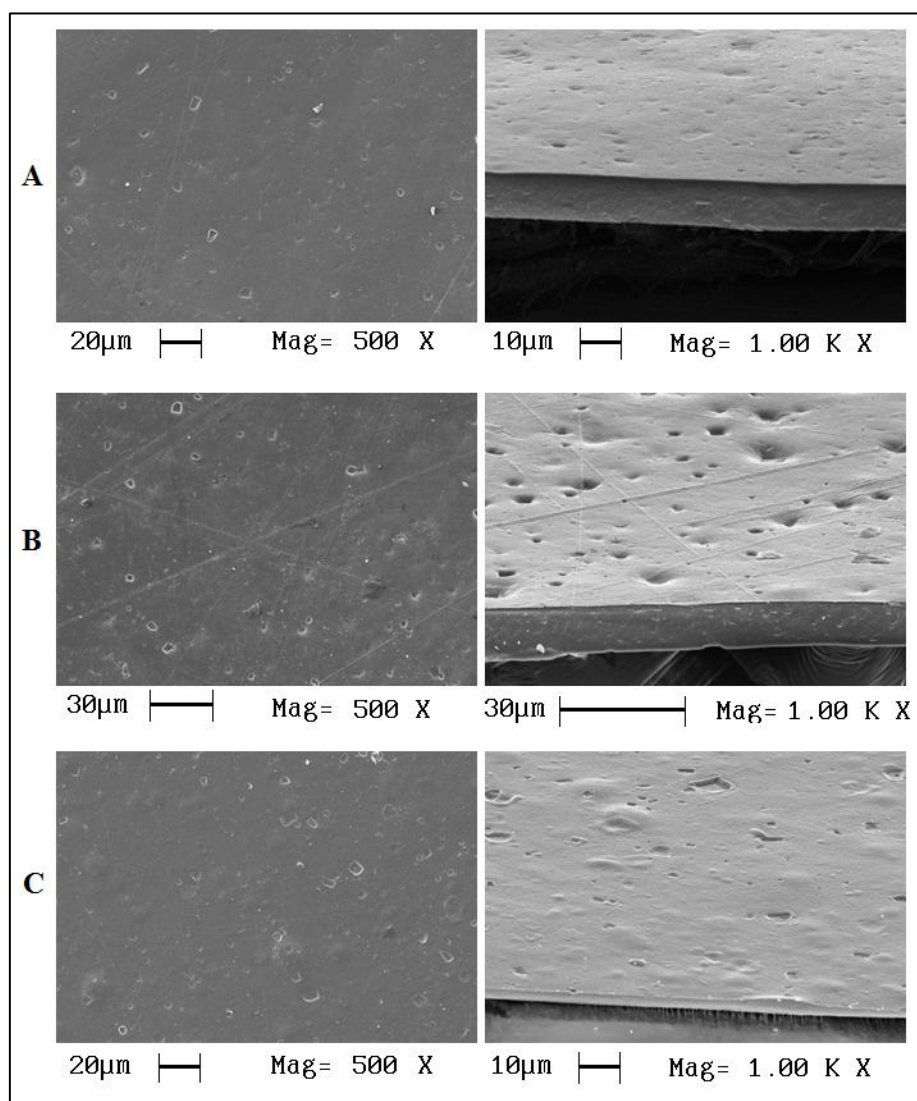


Figura 5.23: Superfície e seção transversal dos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) após 90 dias de imersão em água.

5.5 Teor de bário e cálcio

Os filmes não submetidos à liberação, com as diferentes reticulações, foram solubilizados em solução de citrato de sódio e analisados por espectrometria de absorção atômica com o intuito de quantificar o teor de cálcio e bário presente nas matrizes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.17.

Os valores apresentados na Tabela 5.17 indicam que os filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca* não apresentaram diferenças significativas de teor de cálcio, possivelmente pela baixa quantidade

de reticulante utilizada no primeiro estágio. Não foi possível determinar a concentração de bário presente no filme *Ba-Ca*, pois a quantidade utilizada (4,5 vezes menor que a quantidade de cálcio) foi inferior ao limite de detecção do equipamento.

Tabela 5.17: Teor de cálcio e bário nos filmes após o 2º estágio de reticulação.

Filme	Cálcio ($\mu\text{mol/mg}$ filme seco)	Bário ($\mu\text{mol/mg}$ filme seco)
<i>Ca-Ca</i>	$4,64 \pm 0,05^a$	-
<i>Ba-Ca</i>	$4,29 \pm 0,08^a$	Não detectado
<i>Ca-Ba</i>	$0,39 \pm 0,002^b$	$1,08 \pm 0,04$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

No filme *Ca-Ba*, em que a reticulação no 2º estágio de tratamento é feita com íons bário, observou-se que a concentração deste reticulante nos filmes foi aproximadamente 4 vezes menor do que a concentração de cálcio. Este resultado reforça a hipótese de que existe uma maior dificuldade de reticulação das cadeias do alginato pelos íons bário, podendo, os filmes acabados, apresentarem uma reticulação limitada no interior da matriz.

Após o 2º estágio de reticulação, os filmes *Ca-Ba* foram submetidos a lavagens por diferentes tempos em água contendo glicerol (3% m/v) a fim de verificar as variações do teor de bário e comparar os resultados com os filmes que haviam sido submetidos a 90 dias de imersão em água. Os resultados obtidos para o teor de bário nas diferentes condições estão apresentados na Tabela 5.18. Os filmes de lavagem rápida foram utilizados nos ensaios de liberação e na caracterização dos filmes e são referentes a uma rápida imersão na solução de lavagem.

Embora as micrografias dos filmes *Ca-Ba* após a liberação (Figura 5.23c) tenham evidenciado a perda de bário da superfície, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de reticulante entre as amostras. Uma hipótese para esta discordância é a de que o teor de bário que estava visível microscopicamente na superfície dos filmes, seja muito baixo e, portanto, não detectável nas leituras de espectrometria de absorção atômica. No entanto, testes mais aprofundados devem ser realizados para a certificação de que não haveria migração destes íons para a superfície na qual o filme estaria em contato em situações de liberação controlada.

Tabela 5.18: Teor de bário nos filmes *Ca-Ba* após diferentes tempos de lavagem.

Lavagem do filme	Bário ($\mu\text{mol/mg}$ filme seco)
Sem lavagem	$1,09 \pm 0,01^a$
Lavagem rápida (~5 s)	$1,08 \pm 0,04^a$
1 min de imersão	$1,04 \pm 0,03^a$
5 min de imersão	$1,00 \pm 0,05^a$
15 min de imersão	$1,07 \pm 0,01^a$
90 dias (após liberação)	$1,13 \pm 0,01^a$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

5.6 Métodos alternativos de incorporação da natamicina

O procedimento convencional de obtenção dos filmes ativos, que consiste na adição do antimicrobiano diretamente à solução polimérica, apresentou algumas limitações devido à baixa solubilidade da natamicina em água. Os filmes apresentavam cristais nas superfícies que prejudicaram, sobretudo, a transparência e as propriedades mecânicas. Com o intuito de conseguir filmes com atributos funcionais adequados através de uma melhor homogeneização da natamicina, métodos alternativos foram avaliados.

5.6.1 Impregnação no 2º estágio de reticulação

Filmes pré-reticulados com Ca^{2+} ou Ba^{2+} foram imersos em uma solução contendo cloreto de cálcio, glicerol e natamicina, na concentração de 0,06% (m/v). A concentração do antimicrobiano nesta solução foi selecionada de forma que fosse a mesma utilizada na formulação da solução formadora dos filmes convencionais. A impregnação durante a reticulação com bário no 2º estágio (para formar o filme *Ca-Ba*) não foi avaliada, uma vez que o tempo máximo possível de imersão destes filmes (10 minutos) era insuficiente para incorporar uma quantidade significativa de antimicrobiano. Acima de 10 minutos de imersão, o aspecto visual destes filmes tornava-se pouco atraente, com grande opacidade e zonas enrugadas e quebradiças.

Durante o contato com a solução reticulante contendo o antimicrobiano, foram retiradas amostras de filme em diferentes intervalos de tempo para quantificar a taxa de natamicina impregnada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19: Massa de natamicina impregnada pela imersão dos filmes em solução reticuladora de 2º estágio (5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3% de glicerol, 0,06% natamicina).

Filme (1º estágio)	Tempo (minutos)	Massa impregnada (mg natamicina/g filme)
Ca	15	$1,64 \pm 0,11^e$
	30	$2,03 \pm 0,20^e$
	60	$4,27 \pm 0,27^{cd}$
	120	$5,78 \pm 0,43^a$
	180	$5,62 \pm 0,41^a$
	240	$5,13 \pm 0,34^a$
Ba	15	$3,53 \pm 0,35^d$
	30	$4,07 \pm 0,24^{bc}$
	60	$3,36 \pm 0,26^d$
	120	$3,97 \pm 0,31^{cd}$
	180	$3,57 \pm 0,37^{cd}$
	240	$4,53 \pm 0,42^{bcd}$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os valores apresentados na Tabela 5.19 indicam baixo nível de impregnação, tanto para os filmes pré-reticulados com cálcio quanto para os filmes com bário. Este comportamento pode ser atribuído à rápida reação de reticulação do alginato com os íons cálcio e bário, que costuma ocorrer em aproximadamente 10 minutos. Este processo se desenvolve até que todos os sítios de ligação disponíveis estejam saturados, porém, após este período, íons reticulantes remanescentes na solução ainda podem competir com a natamicina, dificultando a impregnação.

Observa-se que a incorporação da natamicina foi significativamente maior para os filmes com cálcio e que, para estas amostras, houve aumento de massa impregnada com o

aumento do tempo de imersão. Este resultado pode estar relacionado com uma reticulação mais eficiente do bário no 1º estágio, que dificultou a incorporação da natamicina.

5.6.2 Impregnação no filme acabado

Os ensaios realizados com os filmes de baixa reticulação indicam que o processo de impregnação dos filmes com natamicina é lento, necessitando de um prévio intumescimento para acelerar. Além disso, o aspecto mais limitante é a baixa solubilização da natamicina em água. A fim de aumentar a solubilidade da natamicina e poder promover uma incorporação mais homogênea nos filmes, duas outras técnicas foram avaliadas para os filmes acabados e estão descritas a seguir.

5.6.2.1 Imersão em solução hidroetanólica contendo natamicina

Neste processo foram utilizadas soluções aquosas com diferentes concentrações de etanol (2 a 8% molar). Ensaios preliminares indicaram que, em concentrações de etanol de 1% (molar) e inferiores, havia uma dissolução incompleta da natamicina e, consequentemente, baixa impregnação. Concentrações acima de 8% favoreciam a dissolução da natamicina, porém, os filmes não intumesciam quando imersos nestas soluções, dificultando a impregnação.

A concentração de natamicina na solução foi de 0,1% (m/v), uma vez que esta foi a máxima quantidade possível de ser solubilizada em todas as condições estudadas. Acima desta concentração, a solubilização era incompleta nas soluções com baixas frações de etanol e o resíduo não dissolvido se depositava na superfície dos filmes. Para que as características dos filmes não fossem prejudicadas pela lixiviação de plastificante durante a imersão, foi adicionado glicerol à solução de impregnação na concentração de 3% (m/v).

Uma avaliação visual dos filmes, após o procedimento de imersão e secagem, revelou que todos eles apresentaram uma aparência mais atraente do que os filmes impregnados de forma convencional, principalmente em relação à transparência.

Na Figura 5.24 estão apresentados os valores de massa total de natamicina impregnada nos filmes *Ca-Ca*, *Ba-Ca* e *Ca-Ba* nas diferentes condições estudadas. A tabela dos resultados com a respectiva análise estatística está apresentada no Apêndice D. Uma

comparação simples com os valores da Tabela 5.19 indica que o grau de impregnação praticamente duplicou em relação ao contato com a solução sem etanol.

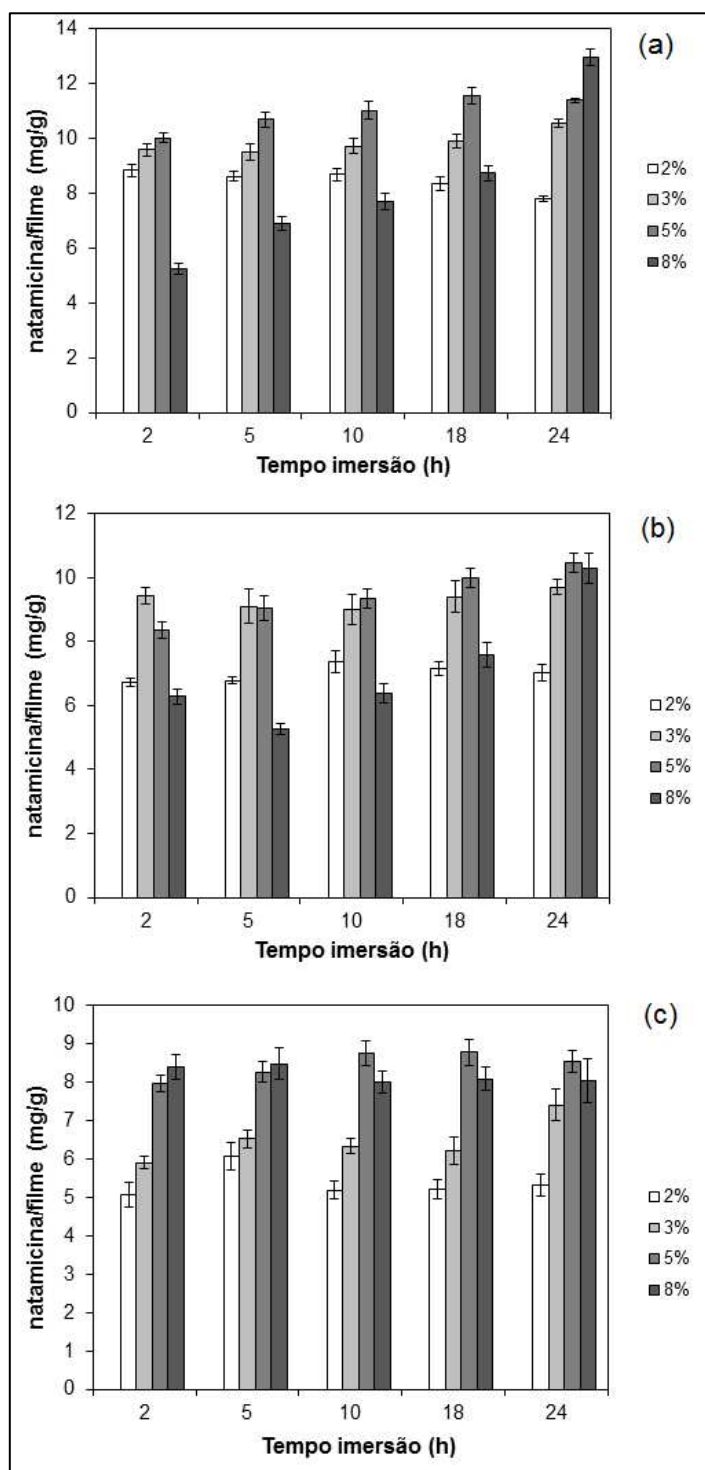


Figura 5.24: Quantidade total de natamicina impregnada nos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) imersos em diferentes concentrações de etanol (% molar).

Os resultados evidenciaram que o tempo para que o sistema atingisse o equilíbrio, ou seja, não houvesse mais alteração detectável da quantidade de natamicina impregnada no filme, variou de acordo com a concentração de etanol na solução. Para os filmes *Ca-Ca* (Figura 5.24a), por exemplo, quando em contato com a solução de 2 mol% de etanol, o equilíbrio já foi atingido em menos de 2 horas, mas serão necessárias mais de 24 horas nas imersões em soluções de 8 mol% de etanol. Este comportamento pode estar relacionado ao intumescimento dos filmes nas soluções alcoólicas.

Para avaliar a relação da eficiência de incorporação da natamicina com o grau de intumescimento dos filmes nas soluções de impregnação, foram realizados ensaios de intumescimento (Seção 4.3.5c) em soluções hidroetanólicas. Os filmes permaneceram imersos nas soluções durante 24 horas, porém o equilíbrio de hidratação foi atingido nos primeiros minutos, não havendo alterações significativas após este período inicial. Os resultados do grau de intumescimento de equilíbrio para as diferentes amostras estão apresentados na Tabela 5.20.

Tabela 5.20: Grau de intumescimento de equilíbrio (GI) dos filmes imersos em soluções de impregnação com concentrações de etanol.

Etanol (mol%)	GI (g H ₂ O/g filme)		
	<i>Ca-Ca</i>	<i>Ba-Ca</i>	<i>Ca-Ba</i>
2	0,38 ± 0,02 ^b	0,32 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,02 ^b
3	0,23 ± 0,05 ^c	0,21 ± 0,02 ^c	0,22 ± 0,03 ^c
5	0,17 ± 0,02 ^c	0,18 ± 0,01 ^c	0,17 ± 0,01 ^c
8	0,08 ± 0,01 ^d	0,10 ± 0,01 ^d	0,10 ± 0,01 ^d
0	0,66 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,02 ^a	0,64 ± 0,01 ^a

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Para todos os filmes ocorreu uma diminuição do grau de intumescimento à medida que a concentração de etanol na solução foi aumentada. Esta tendência explica o aumento do tempo exigido para que o sistema atingisse o equilíbrio em concentrações elevadas de etanol.

Este comportamento pode ser atribuído à diminuição da atividade de água no meio e uma conseqüente redução na quantidade de água que penetra a matriz polimérica. Tendência

semelhante foi observada em outros trabalhos envolvendo membranas de alginato (Xu *et al.*, 2003).

Pelos gráficos da Figura 5.24, observa-se que para os 3 tipos de filme, a quantidade de natamicina impregnada aumentou significativamente com o aumento da fração de etanol na solução, principalmente acima de 3 mol%, possivelmente pela melhor solubilização da natamicina, elevando assim a diferença de potencial químico entre as fases.

Comparando as diferentes amostras, a análise dos resultados indica que os filmes *Ca-Ca* apresentaram maiores quantidades impregnadas do que os demais. Esta tendência pode ser melhor visualizada na Figura 5.25, em que se compara a massa de natamicina impregnada nas diferentes amostras na imersão em solução com 5 mol% de etanol.

Como os filmes nesta condição apresentaram intumescimentos equivalentes, não era esperado que houvesse diferenças na quantidade de natamicina impregnada. No entanto, diferenças de reticulação entre os filmes também podem ter interferido na absorção da natamicina. Uma vez que o bário possui maior tamanho, pode levar à diminuição do número de sítios de ligação disponíveis, principalmente na superfície do filme, saturando mais rapidamente a estrutura polimérica e, conseqüentemente, impedindo a incorporação de outros agentes à matriz.

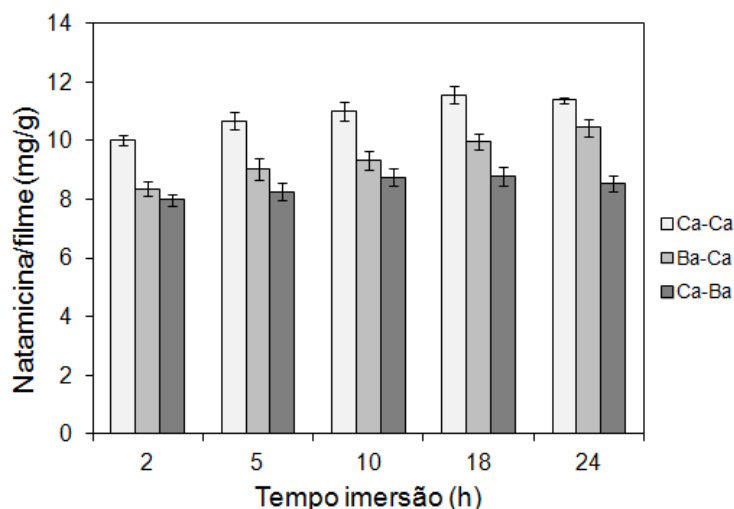


Figura 5.25: Quantidade total de natamicina impregnada nos diferentes filmes utilizando solução de etanol 5% (molar).

De forma geral, os resultados sugerem que a concentração ótima de etanol a ser utilizada no procedimento de impregnação a úmido deve promover uma alta solubilidade da natamicina, permitir o intumescimento do filme e a incorporação no menor tempo possível. Uma vez que a quantidade impregnada não foi fortemente alterada em concentrações acima de 5% (molar) de etanol e 5 horas de imersão, esta condição foi selecionada para as caracterizações posteriores.

5.6.2.2 Impregnação com CO₂ supercrítico

A técnica de impregnação com solvente supercrítico também foi realizada como alternativa à impregnação convencional. Neste processo, foi avaliada a impregnação da natamicina aos filmes utilizando CO₂ em condições supercríticas (200 bar e 40 °C). Foram utilizados diferentes tempos de impregnação (2,5, 4 e 14 h) empregando-se uma taxa de despressurização de 5 bar/min e, além disso, também foi avaliado o efeito do uso do etanol (10% molar) como cossolvente.

As amostras processadas com CO₂ supercrítico não apresentaram alteração na cor e mantiveram-se homogêneas, sem bolhas e com a transparência original (filme sem natamicina). Após a despressurização, observou-se que os filmes tornavam-se mais rígidos do que os originais. Esta característica, no entanto, suavizou-se após as amostras serem mantidas em dessecador com umidade controlada (52%).

Na Figura 5.26 estão apresentados os resultados de massa de natamicina impregnada nos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) nas diferentes condições de operação. Observa-se que houve um aumento significativo da incorporação de natamicina com o aumento do tempo de processamento, tanto na impregnação com CO₂ quanto no processo com uso de etanol como cossolvente. A função dos cossolventes é aumentar a solubilidade do composto a ser impregnado e melhorar a interação do CO₂ com a matriz polimérica. Além do etanol, foram realizados estudos preliminares com glicerol e com água como cossolventes, mas que não resultaram em uma boa eficiência.

A utilização de etanol como cossolvente aumentou significativamente a quantidade de natamicina incorporada, principalmente nos filmes *Ca-Ca*. A natamicina possui uma natureza anfifílica, sendo que a cadeia que contém os dois grupos hidroxila apresenta características hidrofílicas e hidrofóbicas, enquanto que a cadeia com 4 duplas ligações é completamente

hidrofóbica (Thomas *et al.*, 1976). Devido a isto, a natamicina é mais facilmente solubilizada em solventes orgânicos fortemente polares. Como o etanol é polar e solúvel em CO₂ supercrítico, sua adição em pequenas quantidades como cossolvente pode aumentar a polaridade geral da mistura supercrítica e, conseqüentemente, a solubilidade da substância é aumentada (Costa *et al.*, 2010). Além disso, uma pequena quantidade de cossolvente permite manter a mistura como uma fase homogênea e no estado supercrítico. Os longos tempos de processamento (14 h), mesmo não sendo muito adequados do ponto de vista prático, melhoraram a eficiência de incorporação, provavelmente devido à baixa difusão do CO₂ supercrítico na matriz polimérica.

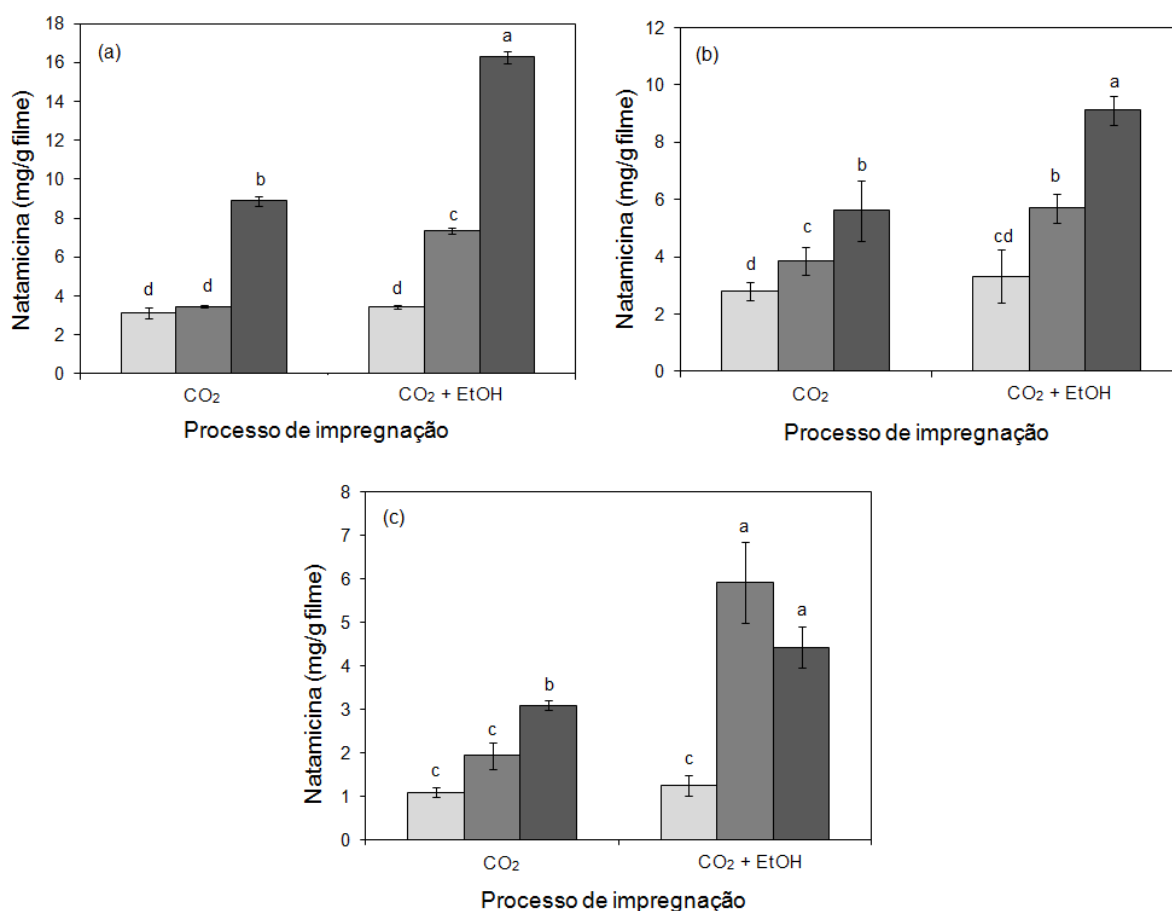


Figura 5.26: Quantidade de natamicina impregnada nos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) durante 2,5 (■), 4 (■) e 14 h (■).

Ensaio de impregnação com outras densidades de CO₂-sc em 14 h de processamento também foram realizados nos filmes *Ca-Ca*, com o intuito de verificar se a quantidade

impregnada era melhorada. Os resultados obtidos para cada densidade de CO₂ utilizada estão dispostos na Tabela 5.21.

Tabela 5.21: Concentração final de natamicina nos filmes *Ca-Ca* após processamento por 14 horas em diferentes densidades de CO₂ com etanol como cossolvente.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade CO ₂ (kg/m ³)*	Concentração natamicina (mg/g filme)
100	40	628	3,90 ± 0,22 ^c
150	40	780	10,91 ± 1,14 ^b
200	40	839	16,29 ± 0,31 ^a
300	40	909	16,71 ± 0,45 ^a

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.* Fonte: NIST (2011).

Observa-se que a concentração de natamicina aumentou significativamente até o CO₂ alcançar a densidade de 839 kg/m³, confirmando que o aumento da densidade do CO₂-sc aumenta a solubilização e a impregnação de compostos na matriz. No entanto, acima desta condição, não houve alteração na quantidade incorporada. Devido a isto, a condição de processamento dos filmes na densidade de 839 kg/m³ foi mantida nas avaliações posteriores.

5.6.3 Comparação entre os métodos de impregnação

Na Tabela 5.22 estão apresentadas as quantidades máximas incorporadas em cada método alternativo para fins de comparação com o método convencional, em que a natamicina é adicionada diretamente à solução formadora de filme.

O uso do cossolvente com CO₂ supercrítico em 14 horas de processamento promoveu o aumento da incorporação de natamicina nos filmes *Ca-Ca*, sendo que a quantidade total foi equivalente à quantidade adicionada pelo método convencional. Para os demais filmes, o processamento com fluido supercrítico não se mostrou eficiente, ficando em níveis de impregnação semelhantes ao obtido pela imersão do filme já acabado, provavelmente pelas diferenças na reticulação e pelo baixo intumescimento do filme nas condições do processamento.

Tabela 5.22: Concentração de natamicina incorporada pelos filmes nas diferentes condições de impregnação.

<i>Método de impregnação</i>	Concentração total de natamicina no filme (mg/g filme)		
	<i>Ca-Ca</i>	<i>Ba-Ca</i>	<i>Ca-Ba</i>
Convencional (4g/100 g alginato)	17,74 ± 1,20 ^a	14,93 ± 1,20 ^a	17,71 ± 1,51 ^a
Imersão em solução 5% EtOH por 5 h	10,68 ± 0,29 ^b	9,05 ± 0,38 ^b	8,27 ± 0,28 ^b
CO ₂ -sc por 14 h (20 MPa e 40°C)	8,89 ± 0,24 ^c	5,61 ± 0,51 ^c	3,10 ± 0,10 ^c
CO ₂ -EtOH-sc por 14 h (20 MPa e 40°C)	16,29 ± 0,31 ^a	9,11 ± 1,05 ^b	4,43 ± 0,47 ^c

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A concentração final da natamicina no filme é importante, pois deve ser suficiente para promover a inibição de bolores e leveduras. Desta forma, os filmes *Ca-Ba* e *Ba-Ca* impregnados com os métodos alternativos não foram considerados nas caracterizações subsequentes, uma vez que a quantidade final no filme poderia não ser eficiente contra micro-organismos.

Ressalta-se que a solubilidade da natamicina em CO₂ supercrítico não é conhecida, mas presume-se que a eficiência de incorporação poderia ser aumentada pelo uso de natamicina com maior pureza (pimaricina). A natamicina comercial utilizada neste trabalho é composta de 50% de lactose (solúvel em água), que pode influenciar na solubilidade do produto no CO₂ supercrítico.

5.6.3.1 Observações morfológicas

Os filmes selecionados foram observados por microscopia eletrônica de varredura com o intuito de avaliar possíveis modificações morfológicas após os diferentes processamentos de impregnação. As micrografias da superfície e da seção transversal dos filmes processados por CO₂ supercrítico, CO₂ supercrítico + etanol e imersão estão apresentados na Figura 5.27a, b e c, respectivamente.

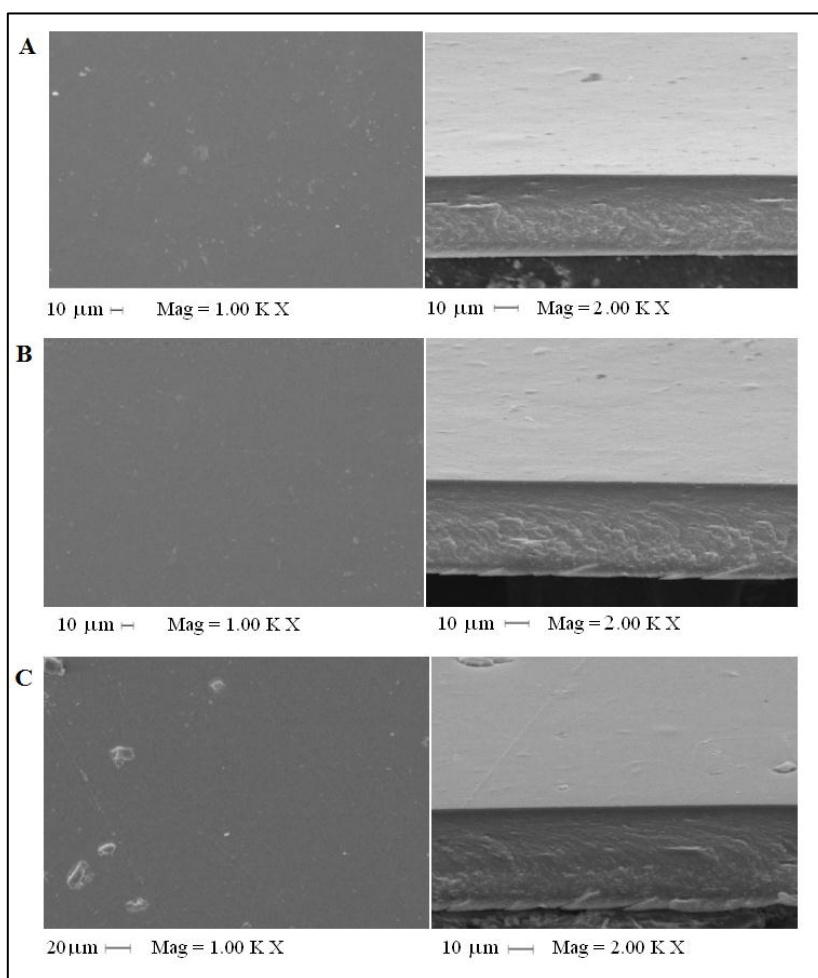


Figura 5.27: Micrografias dos filmes *Ca-Ca* com natamicina incorporada pelo método de CO₂ supercrítico (a) e CO₂+ etanol supercrítico (b) e imersão (c).

A comparação entre as micrografias dos filmes *Ca-Ca* controle (sem natamicina) e dos convencionais apresentadas no Item 5.2.1, havia revelado uma estrutura irregular e heterogênea nos filmes ativos, consequência da baixa solubilidade em água do antimicrobiano. Na Figura 5.27c, referente aos filmes de imersão, também são observados alguns cristais na superfície, porém em menor quantidade. As micrografias dos filmes processados com CO₂ supercrítico, com etanol como cossolvente (Figura 5.27b), exibiram uma estrutura muito similar aos filmes controle, sem heterogeneidades e sem cristais na superfície. Estas observações confirmam uma incorporação homogênea, provavelmente, devido a uma maior solubilização e micronização da natamicina durante o processamento (Kerč *et al.*, 1999).

5.6.3.2 Atributos físicos dos filmes

Os filmes *Ca-Ca* com natamicina incorporada pelos diferentes métodos foram submetidos às caracterizações físico-químicas e mecânicas, de modo a avaliar a influência destas técnicas nos atributos funcionais dos filmes. Os valores de espessura, ângulo de contato, rugosidade e diferença total de cor estão listados na Tabela 5.23. Para facilitar a comparação em termos de análise estatística, as propriedades dos filmes controle (sem natamicina) e convencionais (natamicina adicionada à solução) estão rerepresentadas.

Tabela 5.23: Espessura, rugosidade, ângulo de contato e diferença total de cor (ΔE) em relação aos filmes controle dos filmes *Ca-Ca* com natamicina impregnada pelos diferentes processos após armazenamento em ambiente 52% UR por 72 horas.

Método de impregnação	Espessura (μm)	Rugosidade (μm)	Ângulo de contato ($^\circ$)	ΔE
Convencional	$31 \pm 2,7^a$	$0,44 \pm 0,06^a$	$69,6 \pm 5,1^a$	$4,71 \pm 0,11^a$
Imersão (5 h)	$28 \pm 0,8^a$	$0,26 \pm 0,06^b$	$72,3 \pm 4,7^a$	$2,70 \pm 0,08^b$
CO ₂ -sc	$28 \pm 0,3^a$	$0,22 \pm 0,03^b$	$54,4 \pm 2,4^b$	$1,61 \pm 0,03^c$
CO ₂ -EtOH-sc	$29 \pm 1,9^a$	$0,19 \pm 0,04^{bc}$	$57,8 \pm 2,9^b$	$1,55 \pm 0,05^c$
Controle	$31 \pm 1,9^a$	$0,13 \pm 0,03^c$	$47,1 \pm 3,5^c$	-

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

A análise dos resultados indica que, estatisticamente, a espessura dos filmes não variou com o método de processamento. Em relação à rugosidade, os maiores valores foram observados nos filmes obtidos pelo método convencional, o que corrobora com as observações das micrografias. A rugosidade dos filmes processados pelos métodos alternativos foi menor, sendo que os filmes processados com etanol como cossolvente apresentaram valores equivalentes aos dos filmes sem natamicina. Estes resultados confirmam que a impregnação com solvente supercrítico pode ser utilizada como um método alternativo para obter uma distribuição homogênea de solutos, devido à sua capacidade de micronização (Kerč *et al.*, 1999).

Os valores de ângulo de contato dos filmes processados com solvente supercrítico foram os mais próximos aos dos filmes controle. Entre os diferentes filmes, os maiores valores

foram verificados nos filmes processados por impregnação por imersão em soluções contendo antimicrobiano.

A diferença total de cor (ΔE) dos filmes com natamicina em relação aos filmes controle foi menor para os filmes com natamicina impregnada com CO₂ supercrítico (com e sem cossolvente), indicando que estes filmes possuem um aspecto e transparência muito similares aos filmes sem antimicrobiano.

Os resultados da permeabilidade ao vapor de água (PVA), grau de intumescimento em água e propriedades mecânicas estão apresentados na Tabela 5.24. A adição de natamicina provocou um aumento significativo na PVA em todas as condições de impregnação. Os dados indicam que o maior aumento foi obtido para os filmes com impregnação por imersão. Como glicerol foi adicionado à solução de impregnação a fim de impedir a lixiviação do plastificante já contido no filme, o longo tempo de contato pode ter provocado uma captura de plastificante pelo filme, aumentando o volume livre no interior da estrutura polimérica, o que aumenta a permeabilidade.

Tabela 5.24: Permeabilidade ao vapor d'água (PVA), grau de intumescimento (GI), tensão de ruptura (TR) e alongamento (A) de filmes *Ca-Ca* com natamicina impregnada pelos diferentes métodos.

Método de impregnação	PVA (g.mm/m ² .d.kPa)	GI (g H ₂ O/g filme)	TR (MPa)	A (%)
Convencional	4,05 ± 0,07 ^b	0,54 ± 0,05 ^c	94,1 ± 5,42 ^b	5,38 ± 0,69 ^b
Imersão (5 h)	6,10 ± 0,13 ^a	0,76 ± 0,03 ^a	97,8 ± 5,74 ^b	7,55 ± 0,16 ^a
CO ₂ -sc	4,31 ± 0,06 ^b	0,59 ± 0,04 ^{cb}	87,9 ± 3,91 ^{b*}	2,67 ± 0,56 ^{c*}
CO ₂ -EtOH-sc	4,11 ± 0,23 ^b	0,60 ± 0,02 ^{cb}	90,2 ± 2,75 ^{b*}	2,99 ± 0,25 ^{c*}
Controle	3,67 ± 0,17 ^c	0,66 ± 0,01 ^b	112,2 ± 7,26 ^a	5,07 ± 0,79 ^b

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey na propriedade estudada.

* Resultados para filmes processados com fluido supercrítico, sem impregnação de natamicina.

Os resultados do grau de intumescimento de equilíbrio em água apresentaram uma tendência semelhante à PVA. Os filmes processados por imersão apresentaram maior intumescimento, reforçando a hipótese de que houve absorção de glicerol após o tratamento. Filmes processados com solvente supercrítico apresentaram intumescimento equivalente ao dos filmes controle e convencional.

Os dados de tensão de ruptura apresentados na Tabela 5.24 mostram que os diferentes métodos de impregnação provocaram diminuição em relação aos filmes controle. No entanto, não é possível fazer uma avaliação detalhada porque os resultados desta propriedade para os filmes processados com solvente supercrítico ($\text{CO}_2\text{-sc}$ e $\text{CO}_2\text{-EtOH-sc}$) são referentes a filmes sem natamicina. A impregnação em filmes com as dimensões exigidas para o ensaio mecânico (10 x 2,54 cm) era inviável devido a limitações operacionais do equipamento e a avaliação do efeito do processamento com CO_2 supercrítico sobre esta propriedade foi feita em filmes sem natamicina.

Os diferentes processos de impregnação afetaram fortemente o alongamento dos filmes. Para as amostras expostas ao ambiente com fluido supercrítico, o alongamento foi significativamente menor (redução de 41 e 47%) comparado ao dos filmes controle. Com isto, pode-se supor que uma fração de glicerol e/ou de umidade, contido inicialmente no filme, foi extraído pelo fluido supercrítico durante o processamento, o que provavelmente induz um aumento na temperatura de transição vítrea e, portanto, a uma diminuição do alongamento dos filmes. Em contrapartida, os filmes impregnados por imersão apresentaram o maior alongamento na ruptura (aumento de 49%), reforçando a hipótese de conter um maior teor de plastificante. Uma comparação entre os dados de propriedades mecânicas na Tabela 5.24 confirma que uma possível variação na concentração de plastificante pode exercer um efeito substancial sobre o alongamento do filme, mas apenas um efeito moderado sobre a tensão de ruptura, conforme reportado por da Silva *et al.* (2009).

Para filmes processados por imersão, análises de FTIR (Figura 5.28) mostraram que os picos na região de 2940 cm^{-1} , referentes à ligação C-H, foram deslocados para valores inferiores (2920 cm^{-1}) e as bandas das ligações O-H (região de 3200 cm^{-1}) foram deslocadas para valores superiores. De acordo com Cerqueira *et al.* (2012), o aumento da concentração de glicerol pode ser responsável por este comportamento. Estes resultados complementam a lista de evidências que apontam para um aumento de glicerol e teor de água no filme tratado por esta técnica.

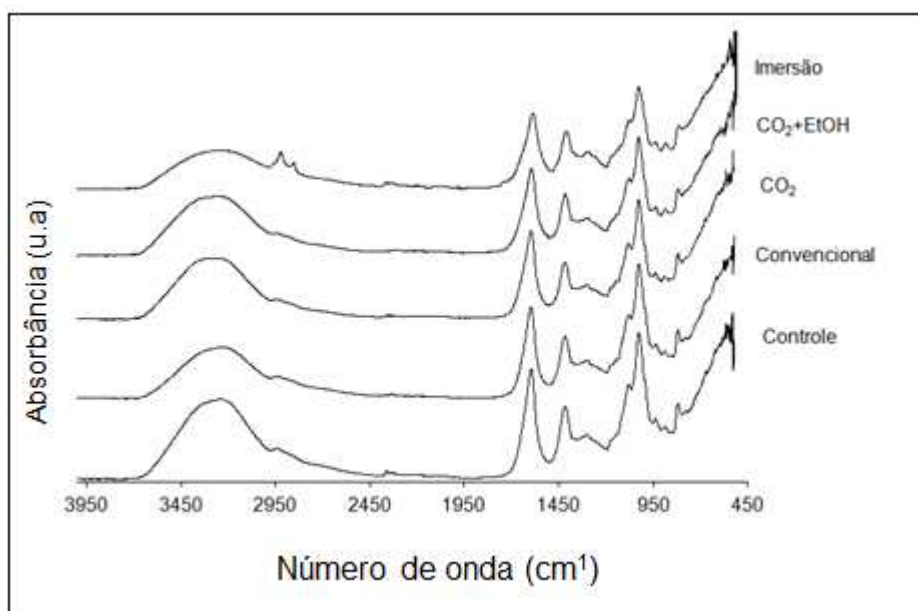


Figura 5.28: Espectros de FTIR para os filmes com natamicina impregnada pelas diferentes técnicas.

5.6.3.3 Liberação da natamicina em água

O processo difusivo da migração da natamicina nos filmes ativos *Ca-Ca* obtidos usando os diferentes métodos de impregnação foi comparado pelos ensaios de liberação em água. Os testes foram conduzidos com amostras de 1 cm² de área em 5 mL de água, sem renovação do meio de liberação, ou seja, após a leitura para determinação da concentração de natamicina liberada, a alíquota utilizada era devolvida para o recipiente.

A Figura 5.29 mostra a massa de natamicina liberada dos filmes obtidos pelos 4 métodos de impregnação.

A comparação entre as curvas indica que os filmes em que a incorporação do antimicrobiano foi feita pelo método convencional liberam a natamicina muito mais lentamente do que as demais amostras. A liberação da natamicina em filmes obtidos pelo método de imersão e pelo tratamento com CO₂-sc (com e sem etanol) atingiram o equilíbrio em 4-5 horas, enquanto que este período aumentou para aproximadamente 140 horas para os filmes convencionais.

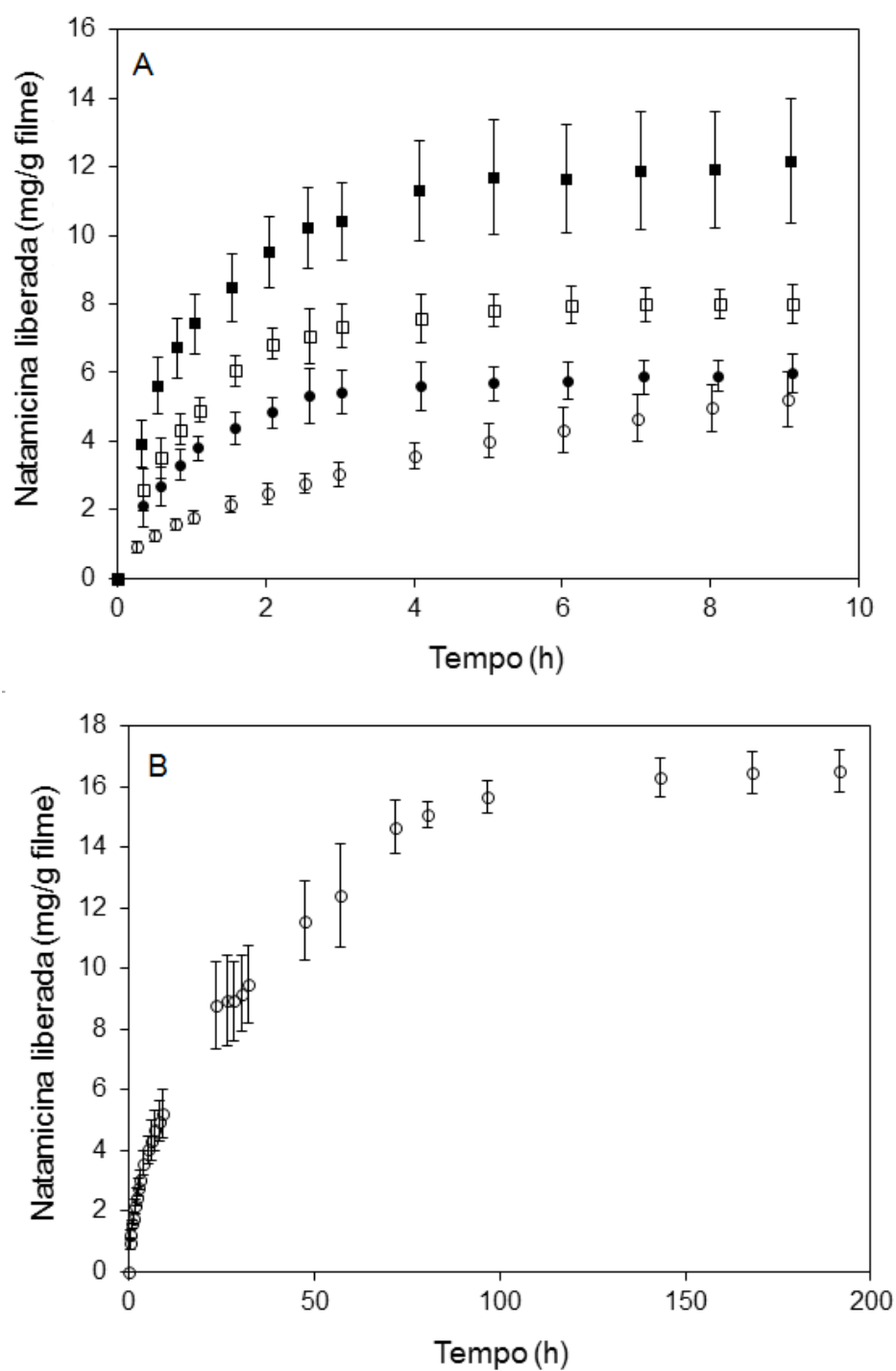


Figura 5.29: Massa de natamicina liberada com o tempo. Filmes Ca-Ca com natamicina impregnada por CO₂ supercrítico e etanol (■), CO₂ supercrítico (□), imersão (●) e método convencional (○) durante 9 horas (A) e até o equilíbrio para o filme convencional (B).

Como já descrito anteriormente, os filmes obtidos pelo método convencional contém mais cristais dispersos na estrutura polimérica (observados pelo MEV, Figura 5.2). Como estes cristais primeiro necessitam ser dissolvidos para então migrar para o meio, a cinética de liberação é reprimida. A difusão do agente ativo é dependente de características como tamanho, forma, polaridade bem como da estrutura química e do nível de reticulação dos filmes (Zactiti e Kieckbusch, 2006, Sanches-Silva *et al.*, 2009).

O reduzido tamanho da partícula nos filmes processados pela técnica supercrítica aumentou a área superficial total e a grande curvatura destas partículas também pode ter contribuído, pelo efeito de Gibbs-Thomson, na intensificação de sua solubilização. Em diversos estudos, a micronização das substâncias, principalmente fármacos de baixa solubilidade em água, utilizando CO₂ supercrítico, foi utilizada como alternativa para aumentar a solubilidade, reduzindo o tamanho da partícula sem o uso de solventes orgânicos (Kerč *et al.*, 1999).

A quantidade total de natamicina liberada de cada amostra de filme (M_{∞}) está apresentada na Tabela 5.25. Uma comparação entre os valores de M_{∞} e a massa de natamicina inicial contida no filme (Tabela 5.22) que, com exceção dos filmes cuja natamicina foi impregnada pelo processo de imersão, pode-se considerar que toda a massa do antimicrobiano adicionada aos filmes foi liberada.

Tabela 5.25: Massa total (M_{∞}) de natamicina liberada, tempo (t_{∞}), coeficientes de difusão (D_1 and D_2) e coeficiente de determinação (R^2) para os filmes *Ca-Ca*.

Método de impregnação	M_{∞} (mg/ gfilme)	t_{∞} (h)	D_1 (cm ² /s)	R_1^2	D_2 (cm ² /s)	R_2^2
Convencional	16,51 ± 0,69	191,4	$1,64 \times 10^{-11}$	0,9991	$1,81 \times 10^{-11}$	0,9987
Imersão	6,65 ± 0,23	30,2	$1,06 \times 10^{-10}$	0,9673	$1,30 \times 10^{-10}$	0,9932
CO ₂ -sc	8,13 ± 0,21	6,1	$2,06 \times 10^{-10}$	0,9883	$2,45 \times 10^{-10}$	0,9965
CO ₂ -EtOH- sc	14,06 ± 0,93	23,4	$1,43 \times 10^{-10}$	0,9744	$1,93 \times 10^{-10}$	0,9882

Os coeficientes de difusão da natamicina nos filmes de alginato foram estimados pelo ajuste da série derivada da Lei de Fick (Equação 3.3) e também do modelo de tempos curtos (Equação 3.5) aos dados experimentais e estão apresentados na Tabela 5.25. Como esperado, os coeficientes dos filmes convencionais foram uma ordem de grandeza menor do que os filmes obtidos com as demais técnicas. As maiores difusividades correspondem aos filmes

processados com solvente supercrítico, confirmando a maior facilidade de solubilização da natamicina.

Uma comparação entre os resultados do coeficiente de difusão no filme convencional obtido pelo método experimental de renovação do meio (apresentado na Tabela 5.14) e sem renovação (Tabela 5.25) indica uma diferença de aproximadamente 20% para ambos os modelos (série completa e tempos curtos). Os maiores valores de difusividade foram observados para os filmes submetidos ao ensaio de liberação sem renovação do meio. No entanto, o resultado mais interessante é relativo ao expoente difusional (n) do modelo da Lei da Potência. Quando o experimento foi conduzido com renovação do meio (Tabela 5.15), este parâmetro foi de 0,67, característico de uma difusão anômala. Para o experimento sem renovação (Tabela 5.26), o parâmetro foi de exatamente 0,5, coeficiente que indica que a difusão segue o comportamento fickiano e a maior parte da liberação ocorre na matriz já intumescida. Estes resultados são mais coerentes tendo em vista que a análise de intumescimento indica que o equilíbrio é atingido em um tempo muito curto em relação ao tempo de liberação. Além disso, a renovação constante do meio de liberação pode ter prejudicado a avaliação do processo difusivo, levando a erros nos coeficientes e parâmetros determinados.

Tabela 5.26: Expoente difusional (n), constante difusional (k) e coeficiente de determinação (R^2) da liberação da natamicina estimados pelo Modelo da Lei da Potência (Equação 3.4).

Método de impregnação	n	$k \times 10^3 (s^{-1})$	R^2
Convencional	0,50	1,8	0,9986
Imersão	0,57	5,0	0,9943
CO ₂ -sc	0,57	5,3	0,9954
CO ₂ -EtOH-sc	0,52	5,0	0,9917

Em relação aos parâmetros das demais técnicas de impregnação, verifica-se que os expoentes mantiveram-se próximos a 0,5. A constante difusional k foi menor nos filmes convencionais, o que é consistente com os coeficientes de difusão e os valores de tempo total de liberação.

De forma geral, o estudo dos métodos alternativos de impregnação revelou que a tecnologia supercrítica, até então nunca utilizada para natamicina e para filmes de aplicação em alimentos, é promissora, tendo em vista que permite a incorporação de quantidades adequadas

de natamicina aos filmes *Ca-Ca*, e corrige o problema da opacidade dos filmes ativos convencionais. No entanto, esta técnica ainda é dispendiosa e deve ser aprimorada em diversos aspectos, como por exemplo, em relação à capacidade de processamento de filmes com maiores dimensões e com menor tempo de impregnação. Por estas razões, as análises posteriores do efeito antimicrobiano e de liberação em meios sólidos foram realizadas utilizando-se filmes com a impregnação de natamicina pelo método convencional.

5.7 Efeito antimicrobiano - *in vitro*

A efetividade antimicrobiana da natamicina contra micro-organismos de ocorrência comum em queijos foi avaliada na temperatura de 25°C pela medida do diâmetro de inibição formado ao redor dos filmes ativos convencionais quando discos dos mesmos foram depositados sobre meio de cultura em placas de Petri. Como controle, foram utilizados filmes sem natamicina. Os resultados dos halos de inibição para os diferentes micro-organismos após 5 dias de incubação podem ser visualizados nas Figuras 5.30 a 5.32.

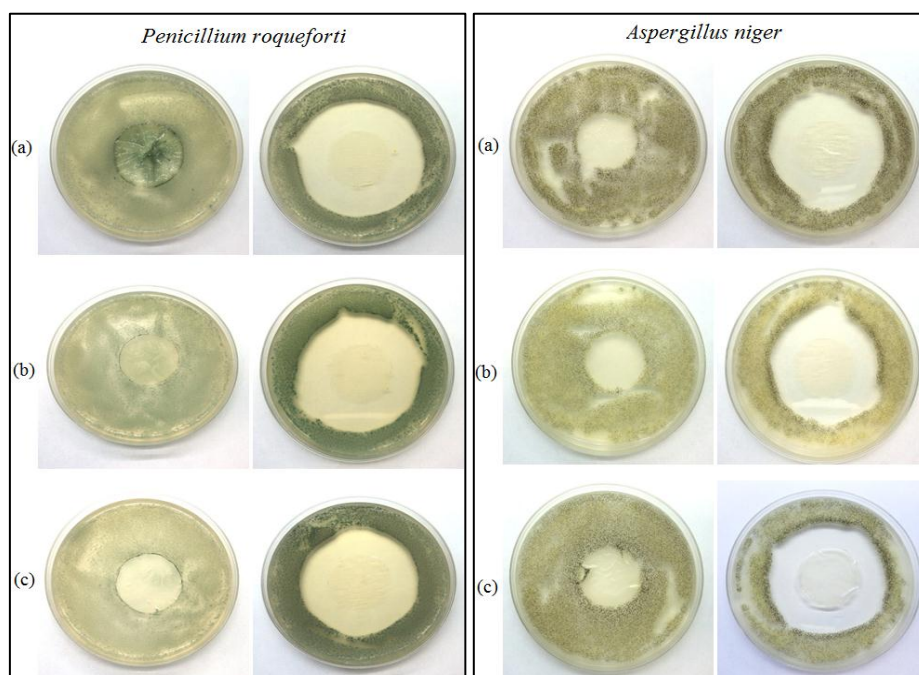


Figura 5.30: Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) contra *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger* após 5 dias de incubação a 25°C. As colunas da esquerda são referentes aos filmes sem natamicina (controle) e as colunas da direita, aos filmes ativos.

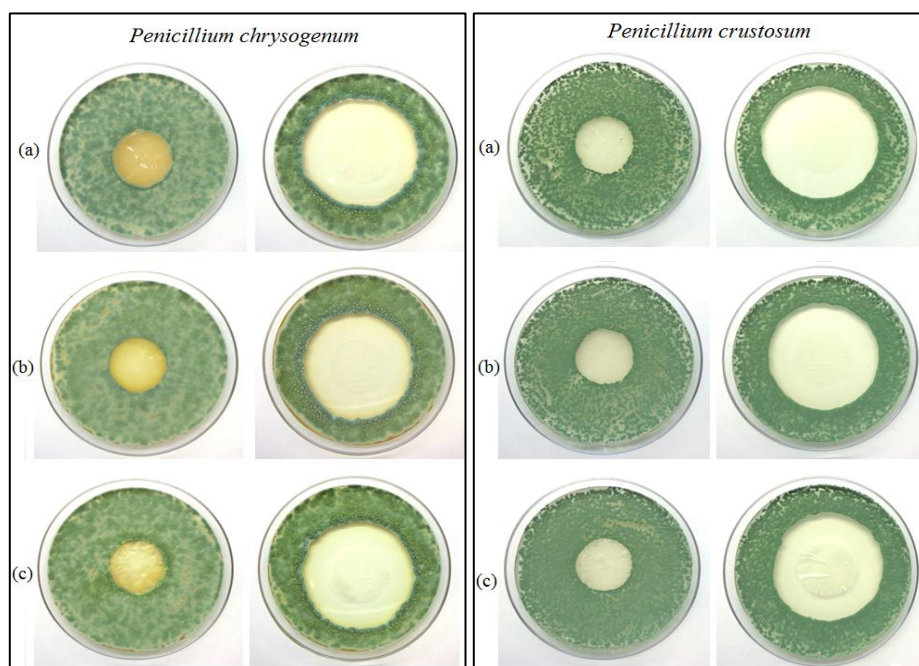


Figura 5.31: Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) contra *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium crustosum* após 5 dias de incubação a 25°C. As colunas da esquerda são referentes aos filmes sem natamicina (controle) e as colunas da direita, aos filmes ativos.

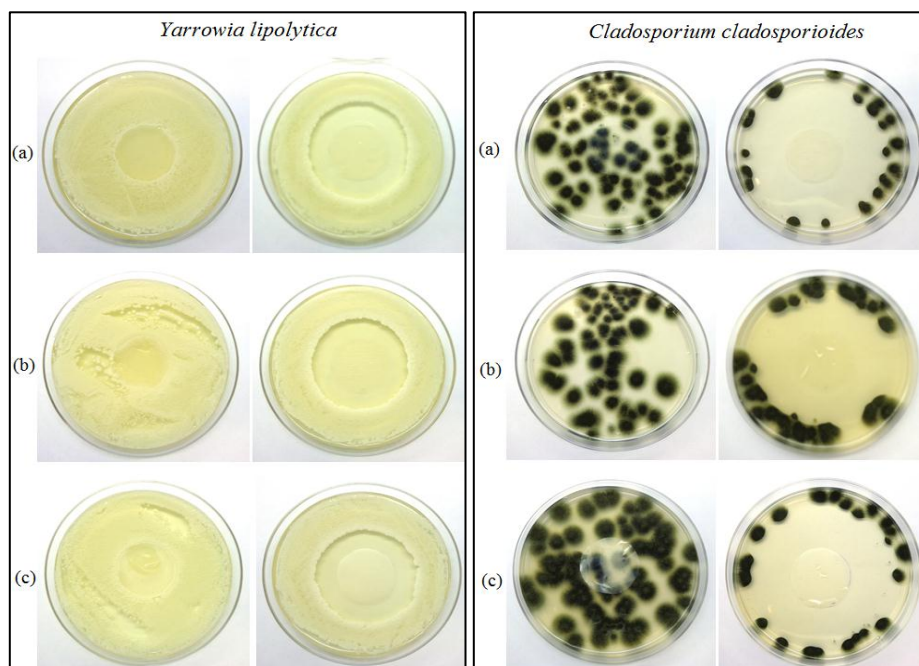


Figura 5.32: Avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes *Ca-Ca* (a), *Ba-Ca* (b) e *Ca-Ba* (c) contra *Yarrowia lipolytica* e *Cladosporium cladosporioides* após 5 dias de incubação a 25°C. As colunas da esquerda são referentes aos filmes sem natamicina (controle) e as colunas da direita, aos filmes ativos.

Filmes controle (sem natamicina) apresentaram inibição por contato somente nos ensaios com fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium crustosum*, como pode ser observado nas Figuras 5.30 e 5.31. Nestes dois casos, houve crescimento dos fungos por toda a extensão da placa, exceto na região que estava em contato com os filmes. Este resultado pode ter sido promovido pela baixa permeabilidade ao oxigênio destes filmes, privando esses micro-organismos de seu desenvolvimento aeróbio. Para todos os demais casos, é possível visualizar nitidamente o crescimento dos fungos e da levedura, inclusive sob os filmes.

Não foram encontrados registros na literatura sobre efeito inibitório de um filme de alginato sem que houvesse a presença de antimicrobianos na formulação. Em outras matrizes, este tipo de observação também é escasso. Türe *et al.* (2008), por exemplo, também avaliaram o efeito inibitório de filmes de metilcelulose e glúten com e sem natamicina contra o fungo *Aspergillus niger* e não observaram inibição por contato pelos filmes sem antimicrobiano. A maioria dos registros de inibição por contato está limitada a filmes de quitosana, que segundo diversos autores, possui um efeito antimicrobiano intrínscio, principalmente contra bactérias (Pranoto *et al.*, 2005b; Rodríguez-Nuñez *et al.*, 2012). Da Silva *et al.* (2012), entretanto, estudando o efeito de filmes de quitosana contra bolores e leveduras, não observaram inibição por contato.

Nas figuras também é possível observar que todos os filmes contendo natamicina inibiram o crescimento dos micro-organismos testados, com formação de halos cujos diâmetros medidos estão apresentados na Tabela 5.27.

Estatisticamente, a comparação entre o desempenho dos filmes reticulados com diferentes cátions indica que os filmes *Ba-Ca* desenvolveram menores diâmetros de inibição para os fungos *P. roqueforti*, *P. chrysogenum* e *C. cladosporioides*. Estes resultados estão de acordo com os coeficientes de difusão, que foram menores para estes filmes. A migração mais lenta da natamicina para o meio de cultura resulta em uma menor inibição do crescimento microbiano.

Da Silva *et al.* (2012) compararam os efeitos antimicrobianos de filmes de alginato e alginato/quitosana contendo natamicina contra as espécies *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* e observaram a mesma correlação entre cinética de liberação lenta e menor diâmetro de inibição.

Tabela 5.27: Diâmetros dos halos de inibição dos filmes controle e ativos contra os diferentes micro-organismos alvo.

Micro-organismo	Diâmetro de inibição (cm)					
	<i>Ca-Ca</i>		<i>Ba-Ca</i>		<i>Ca-Ba</i>	
	<i>Controle*</i>	<i>Ativo</i>	<i>Controle*</i>	<i>Ativo</i>	<i>Controle*</i>	<i>Ativo</i>
<i>A. niger</i>	+	5.7 ± 0.1 ^a	+	5.0 ± 0.1 ^b	+	5.2 ± 0.2 ^b
<i>P. roqueforti</i>	-	6.0 ± 0.1 ^a	-	5.2 ± 0.1 ^b	-	6.0 ± 0.2 ^a
<i>P. chrysogenum</i>	-	5.7 ± 0.1 ^a	-	5.3 ± 0.1 ^b	-	5.7 ± 0.1 ^a
<i>P. crustosum</i>	+	5.8 ± 0.1 ^a	+	5.7 ± 0.1 ^a	+	5.5 ± 0.2 ^a
<i>C. cladosporioides</i>	-	6,8 ± 0.1 ^a	-	5,9 ± 0.2 ^b	-	6,8 ± 0.2 ^a
<i>Y.lipolytica</i>	-	5,0 ± 0.1 ^a	-	4,7 ± 0.1 ^a	-	5,0 ± 0.1 ^a

*Com inibição (+) e sem inibição por contato (-).

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Diversos trabalhos na literatura relatam o efeito inibitório da natamicina incorporada em diferentes matrizes poliméricas, como por exemplo, filmes de proteína de soro de leite (Pintado *et al.*, 2010), metilcelulose e glúten (Türe *et al.*, 2008), fécula de mandioca (Ollé-Resa *et al.*, 2012), proteína isolada de soja (Ramos *et al.*, 2012) e polietileno (Hanusová *et al.*, 2010). No entanto, a maioria destes estudos limita-se à avaliação antimicrobiana *in vitro*, sem análise conjunta das propriedades funcionais dos filmes e sem quantificação da massa de natamicina migrada, condições importantes para aplicação em um alimento.

5.8 Efeito antimicrobiano – em queijos

Amostras de queijo tipo Prato em forma de fatias (5,5 x 6,0 cm) também foram inoculadas com os mesmos micro-organismos alvo utilizados no item anterior com o intuito de investigar o potencial inibitório em um alimento real. A fatia de queijo foi colocada em placas de Petri entre filmes *Ca-Ca* com e sem natamicina e, para fins de comparação, queijos sem filme foram utilizados como controle. As placas contendo os queijos inoculados foram mantidas tampadas a 8°C (em geladeira) e a 25°C (em estufa BOD), fazendo-se periodicamente o monitoramento visual do crescimento microbiano.

A temperatura de 8°C simula a temperatura de armazenamento normal do queijo em refrigerador doméstico. Não foi visualizado nenhum crescimento microbiano nas amostras por até 14 dias de avaliação. Com o objetivo de verificar se alguma mudança microscópica havia ocorrido neste período, as amostras de queijo foram analisadas por microscopia ótica, conforme será apresentado no item 5.9. Como não se observou modificações macroscópicas quando o armazenamento foi a 8°C, foram realizados testes acelerados, a 25°C. A temperatura de 25°C, por sua vez, simula uma condição drástica de armazenamento e também serve como comparação com o ensaio de difusão em ágar, discutido no Item 5.7. Nas Figuras 5.33 a 5.38 estão apresentadas as fotografias das fatias de queijo em diferentes tempos de armazenamento a 25°C.

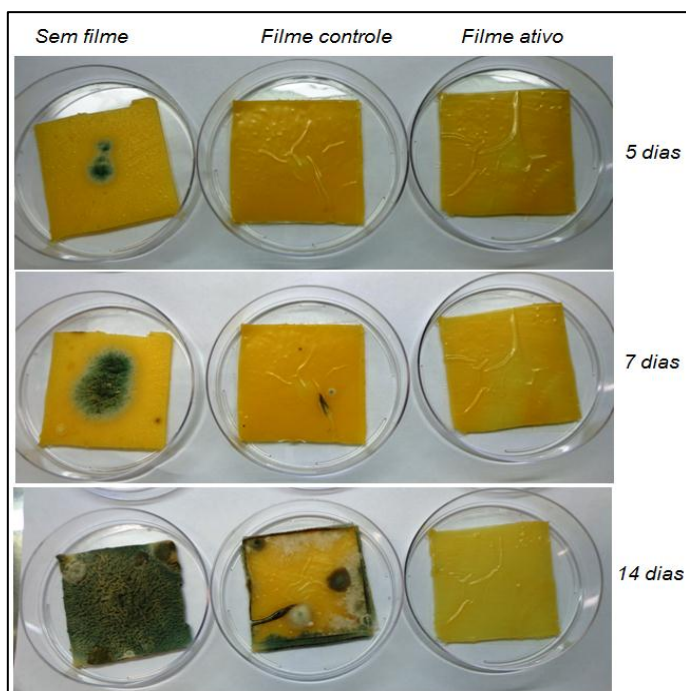


Figura 5.33: Fotografias das fatias de queijo inoculadas com *Penicillium roqueforti* em diferentes tempos de armazenamento a 25°C.

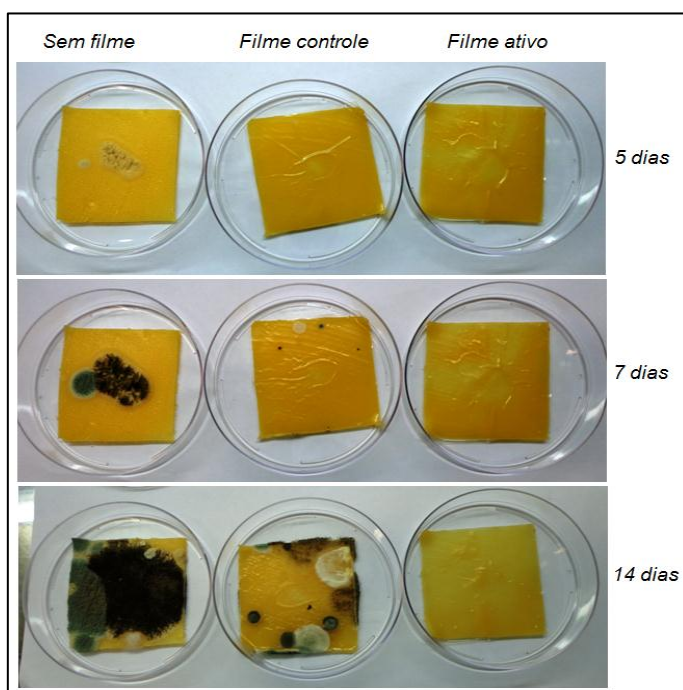


Figura 5.34: Fotografias das fatias de queijo inoculadas com *Aspergillus niger* em diferentes tempos de armazenamento a 25°C.

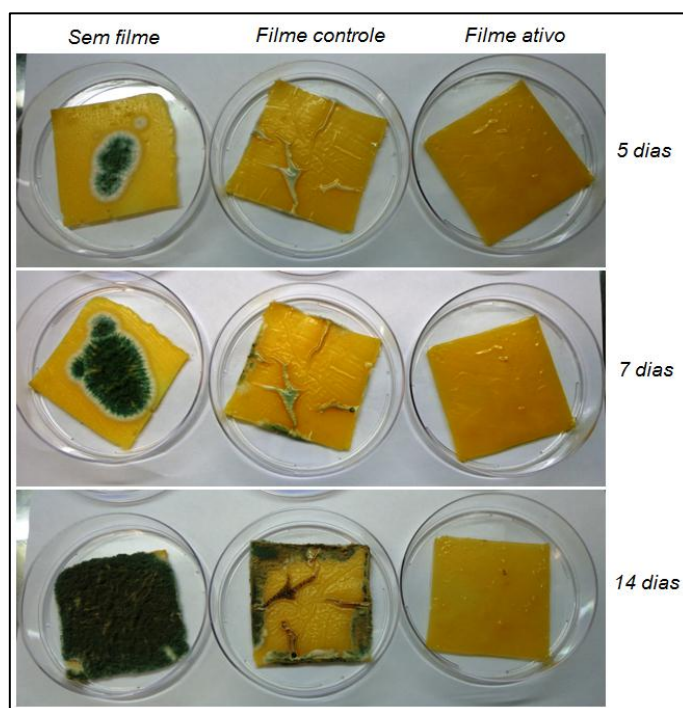


Figura 5.35: Fotografias das fatias de queijo inoculadas com *Penicillium crustosum* em diferentes tempos de armazenamento a 25°C.

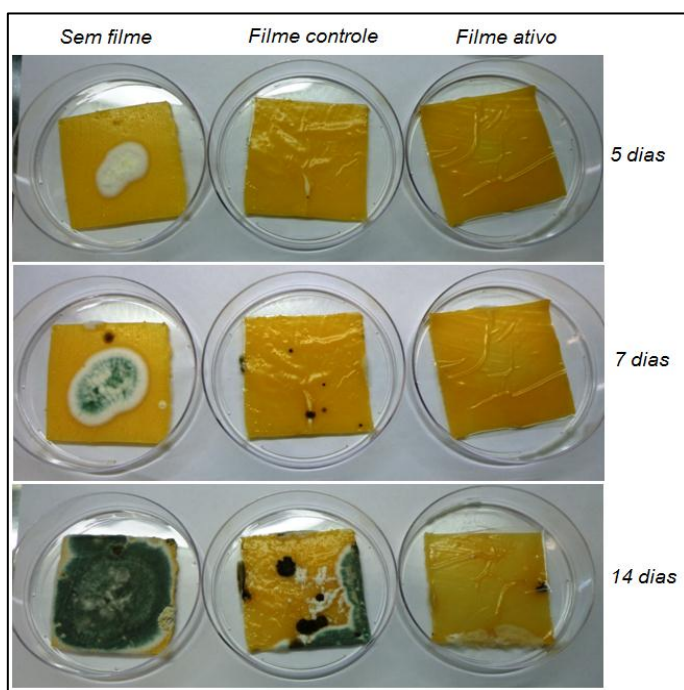


Figura 5.36: Fotografias das fatias de queijo inoculadas com *Penicillium chrysogenum* de armazenamento a 25°C.

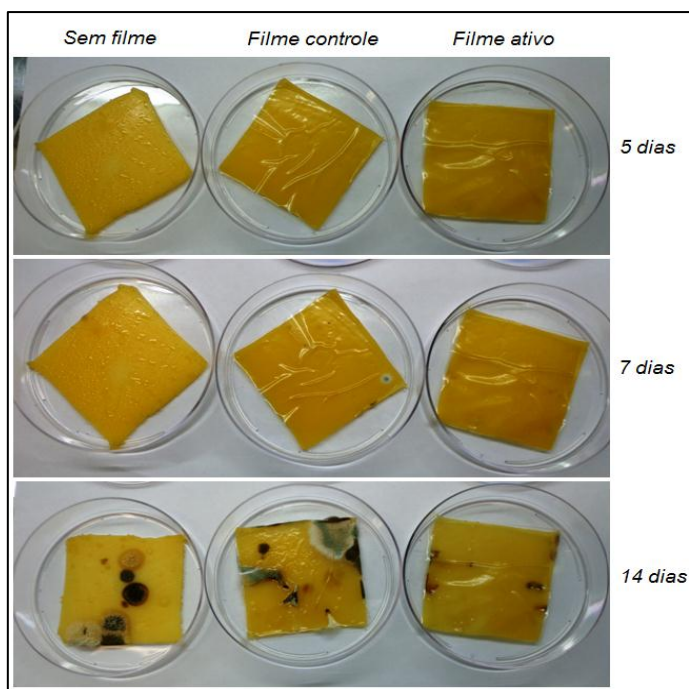


Figura 5.37: Fotografias das fatias de queijo inoculadas com *Cladosporium cladosporioides* em diferentes tempos de armazenamento a 25°C.

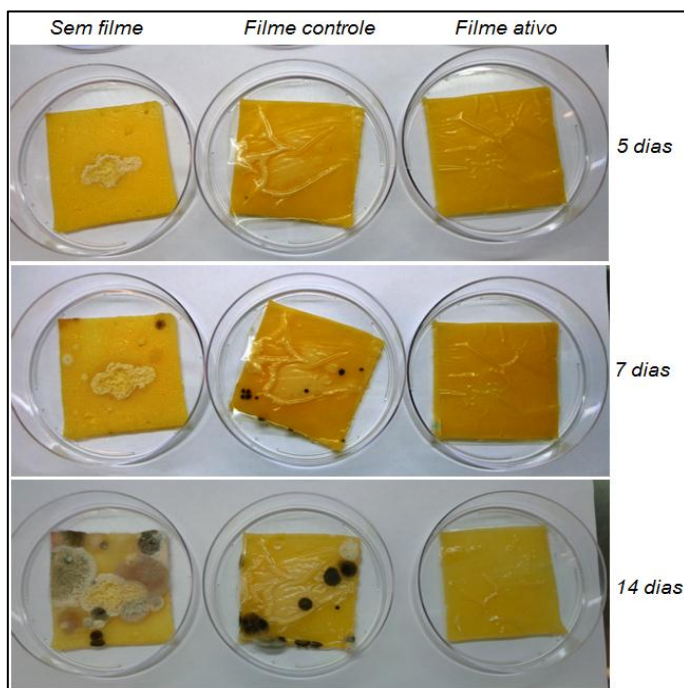


Figura 5.38: Fotografias das fatias de queijo inoculadas com *Yarrowia lipolytica* em diferentes tempos de armazenamento a 25°C.

As fotografias revelam que em 5 dias de armazenamento, as placas com os queijos sem filmes já apresentavam crescimento dos micro-organismos inoculados. Nas amostras com aplicação de filmes (com e sem antimicrobianos) não foi observado crescimento na superfície durante este período.

Na amostra de queijo com aplicação do filme controle verifica-se um pequeno crescimento em 5 dias, mas somente para o fungo *Penicillium crustosum*. O crescimento, no entanto, ocorreu em uma pequena área em que o filme enrugou e não manteve a total aderência ao queijo. Como grande parte dos bolores e leveduras é aeróbia, pode ter havido seu desenvolvimento nestes espaços. Este comportamento destaca a importância da baixa permeabilidade ao oxigênio dos filmes, pois mesmo sem conter antimicrobianos, sua função de barreira dificulta a contaminação nos primeiros dias de armazenamento. Os resultados dos filmes controle também apontam para a importância de se avaliar a eficiência antimicrobiana em um alimento real. Enquanto somente 2 fungos, *Aspergillus niger* e *Penicillium crustosum*, apresentaram inibição por contato nos testes de difusão em ágar em 5 dias (ver Item 5.7), praticamente nenhum fungo conseguiu se desenvolver nas fatias de queijo recobertas com filmes sem natamicina.

Em 7 dias de armazenamento a 25°C, foi observado um crescimento considerável do micro-organismo inoculado e também de outras espécies fúngicas nas amostras de queijo com filmes sem antimicrobiano. Este crescimento se intensificou em 14 dias. Ao final do período avaliado, as fatias de queijo sem filme ficaram totalmente deterioradas, com crescimento por toda a extensão do alimento. As amostras que foram armazenadas entre os filmes ativos permaneceram sem crescimento, com exceção àquela exposta ao fungo *Cladosporium cladosporioides*.

Foram necessários cerca de 30 dias para que as fatias de queijo com filme ativo apresentassem crescimento microbiano. Estes resultados comprovam o potencial de aplicação dos filmes ativos, que podem contribuir para a manutenção da integridade do alimento, inclusive em condições não favoráveis e prolongar sua vida-de-prateleira.

Fajardo *et al.* (2010) imergiram queijos Saloio em uma solução de quitosana com natamicina para a formação de coberturas antimicrobianas. Os autores avaliaram o efeito contra *Aspergillus niger*, a 25°C por 7 dias. Os queijos com cobertura não apresentaram contaminação, ao contrário dos queijos sem cobertura. Var *et al.* (2006) trataram amostras de um queijo típico da Turquia com uma solução de natamicina e utilizaram embalagens de PVC e *Sperdex* durante o período de maturação. Foi verificado que a natamicina previne o crescimento de bolores durante os 2 meses de maturação quando combinada com *Sperdex*, não apresentando eficiência na presença do PVC.

Um filme sintético a base de polietileno contendo natamicina e nisina foi aplicado sobre dois tradicionais queijos tchecos por Hanusová *et al.* (2010). O sistema foi capaz de prevenir o crescimento do fungo *Penicillium expansum* por 18 dias a 23°C; no entanto, mesmo em altas concentrações de nisina, o filme não foi eficiente contra a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*.

Em outra pesquisa, filmes de celulose contendo natamicina e nisina foram aplicados entre fatias de queijo mussarela e armazenados a 12°C durante 15 dias. A cada 3 dias foi realizada uma contagem geral de bolores e leveduras, sendo observado que já no 3º dia de armazenamento os queijos sem antimicrobianos eram impróprios para o consumo. Os filmes inibiram o crescimento até o 9º dia. Após este período, a contagem não apresentou diferenças entre o queijo controle e o queijo com filme ativo (Pires *et al.*, 2008).

Este tipo de filme também foi aplicado em queijos gorgonzola e comparado com o tratamento por imersão em solução de natamicina 0,2% e avaliado após 45 dias de maturação. Os autores observaram maior inibição ao *Penicillium roqueforti* no queijo embalado com o filme. No entanto, o crescimento foi observado apenas nas partes em que o filme não ficou totalmente aderido ao queijo, devido a este apresentar uma superfície ondulada (Oliveira *et al.*, 2007).

Türe *et al.* (2011) aplicaram filmes de metilcelulose e glúten contendo natamicina em amostras de um queijo semi-duro turco inoculado com *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti*. Além do exame visual, foi quantificado o número de esporos durante 30 dias de armazenamento a 10°C e obteve-se uma redução no crescimento do *Aspergillus niger* em queijos tratados com natamicina em relação aos queijos sem cobertura. Porém, na comparação entre o efeito dos dois biopolímeros, foi observado que a maior inibição ocorreu quando os filmes de glúten, cuja permeabilidade ao O₂ é maior, foram utilizados. Segundo os autores, este comportamento é contrário ao esperado, uma vez que os micro-organismos se desenvolvem com maior facilidade em ambientes com mais oxigênio. Isto teria ocorrido porque os filmes de glúten também absorviam uma quantidade maior de umidade do queijo, que atuou como um plastificante e facilitou a maior liberação de natamicina.

Neste mesmo trabalho de Türe *et al.* (2011), foi observado que filmes de metilcelulose com natamicina não causaram nenhuma redução na população do *Penicillium roqueforti* durante 30 dias de armazenamento do queijo a 10°C, embora a inibição tenha sido comprovada anteriormente em testes *in vitro*. Estes autores ressaltam a importância da avaliação da eficiência antimicrobiana em alimentos reais. Para filmes de glúten, concentrações de 2 mg de natamicina/10 g de solução filmogênica foram eficientes nos ensaios *in vitro*, enquanto que no queijo foi necessária uma concentração de 5 mg/ 10 g solução para se obter inibição. Concentrações acima de 5 mg não aumentaram a eficiência de inibição. Segundo os autores, a temperatura de refrigeração e as próprias condições do queijo criaram um ambiente favorável para o desenvolvimento deste fungo. No presente trabalho, a concentração de natamicina utilizada foi equivalente a 5,58 mg/ 10 g solução filmogênica, portanto, similar à concentração mínima inibitória obtida pelos autores citados acima.

Amostras de queijos sem inóculo também foram avaliados nas mesmas condições de armazenamento que os queijos inoculados (25°C). Na Figura 5.39 está apresentado o resultado visual após 7 dias de armazenamento. Observa-se a contaminação de diversas espécies fúngicas na placa contendo o queijo sem o filme e com o filme controle. A amostra de queijo

que possuía o filme com natamicina manteve-se sem crescimento na superfície por até 30 dias. Na amostra de queijo contendo o filme controle, o crescimento microbiano foi visualizado após 5 dias de armazenamento.

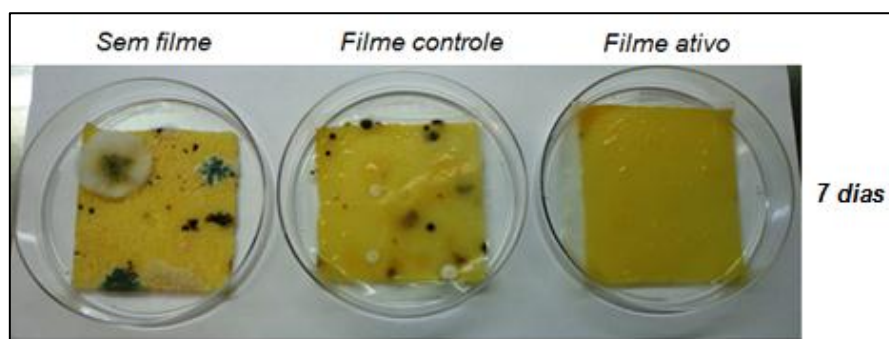


Figura 5.39: Fotografias dos queijos sem inoculação após 7 dias de armazenamento a 25°C.

De forma a se obter uma estimativa quantitativa do efeito inibitório dos filmes, para as amostras de queijo inoculadas com os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti*, fez-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias após o contato com os filmes Ca-Ca por 2 e 7 dias a 25°C. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.28.

Tabela 5.28: Contagem das colônias nas amostras de queijo inoculadas com os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti* armazenadas por 2 e 7 dias a 25°C.

Amostra de queijo	Tempo (dias)	Contagem x 10 ⁶ (UFC/g)	
		<i>A. niger</i>	<i>P. roqueforti</i>
Sem filme	2	4,27 x 10 ⁷	4,36 x 10 ⁷
	7	5,91 x 10 ⁷	5,64 x 10 ⁷
Filme controle	2	1,36 x 10 ⁷	1,18 x 10 ⁷
	7	2,00 x 10 ⁷	1,64 x 10 ⁶
Filme ativo	2	3,64 x 10 ⁶	5,45 x 10 ⁶
	7	8,18 x 10 ⁶	8,29 x 10 ⁶

Em conformidade com a inibição observada visualmente, os resultados da contagem do número de unidades formadoras de colônia indicam que a carga microbiana das amostras de queijo armazenadas com filme ativo se manteve mais baixa (1 ciclo logarítmico) em relação às amostras sem filme. Para os filmes controle, apesar da contagem ter sido mais baixa, não foi observada a redução de um ciclo logarítmico em relação às amostras sem filme.

Deve-se ressaltar que esta análise foi realizada em condições drásticas de armazenamento com o intuito de avaliar o potencial máximo dos filmes antimicrobianos. Em estudos sem inoculação e em uma temperatura de armazenamento normal ($< 8^{\circ}\text{C}$), é provável que nos primeiros dias houvesse pouca diferença na contagem das colônias entre as diferentes amostras. Isto foi observado por Fajardo *et al.* (2010) ao aplicarem coberturas de quitosana com e sem natamicina em queijos Saloio armazenados a 4°C . Foram obtidas diferenças significativas na contagem de bolores e leveduras somente após 27 dias de armazenamento. Os autores relatam que o efeito protetor da natamicina é mais evidente em condições que excedam a temperatura de refrigeração normal ou em situações de contaminação durante o armazenamento.

Em temperaturas de armazenamento de 12°C , Pires *et al.* (2008) avaliaram o efeito de filmes de celulose contendo nisina e natamicina sobre queijos muzzarella (não inoculados). Foram obtidas diferenças na contagem de bolores e leveduras após 3 dias de armazenamento, sendo que após 9 dias, a redução das colônias nas amostras com filmes chegou a 2 ciclos logarítmicos em relação às amostras sem filme. Após 12 dias, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras.

5.9 Microscopia ótica dos queijos armazenados a 8°C .

Queijos armazenados sob refrigeração a 8°C por 10 dias não apresentaram colônias de crescimento visíveis macroscopicamente. Para confirmar um possível início de contaminação, utilizou-se a microscopia ótica, para investigar alterações e diferenças na estrutura dos queijos que tiveram a superfície coberta ou não com os filmes. Nas Figuras 5.40 e 5.41 estão apresentadas as micrografias óticas da superfície dos queijos após 1 dia (queijos sem filme) e 10 dias de armazenamento a 8°C , respectivamente.

É possível visualizar em todos os aumentos das micrografias da Figura 5.41 que a fatia de queijo que havia sido armazenada entre filmes ativos permaneceu com um aspecto semelhante ao da fatia de queijo após 1 dia de armazenamento (Figura 5.40), com a estrutura mais lisa e regular do que as demais amostras. A fatia com o filme controle exibiu um aspecto irregular intermediário. Já o queijo que foi armazenado sem filme apresentou uma estrutura com irregularidades e um aspecto poroso, que podem ser indícios de um maior ressecamento e/ou deterioração incipiente.

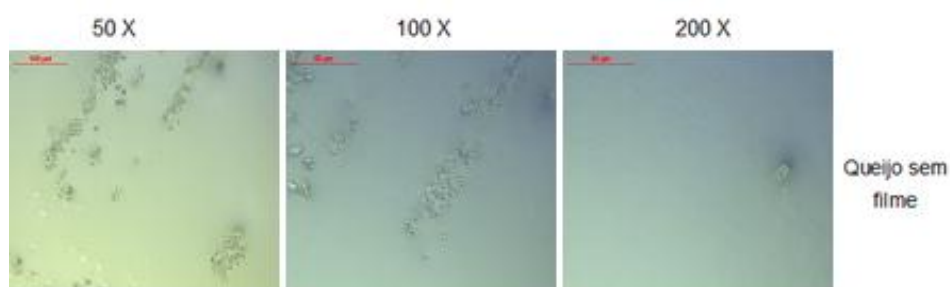


Figura 5.40: Microscopia ótica dos queijos sem aplicação de filme após armazenamento por 1 dia a 8°C.

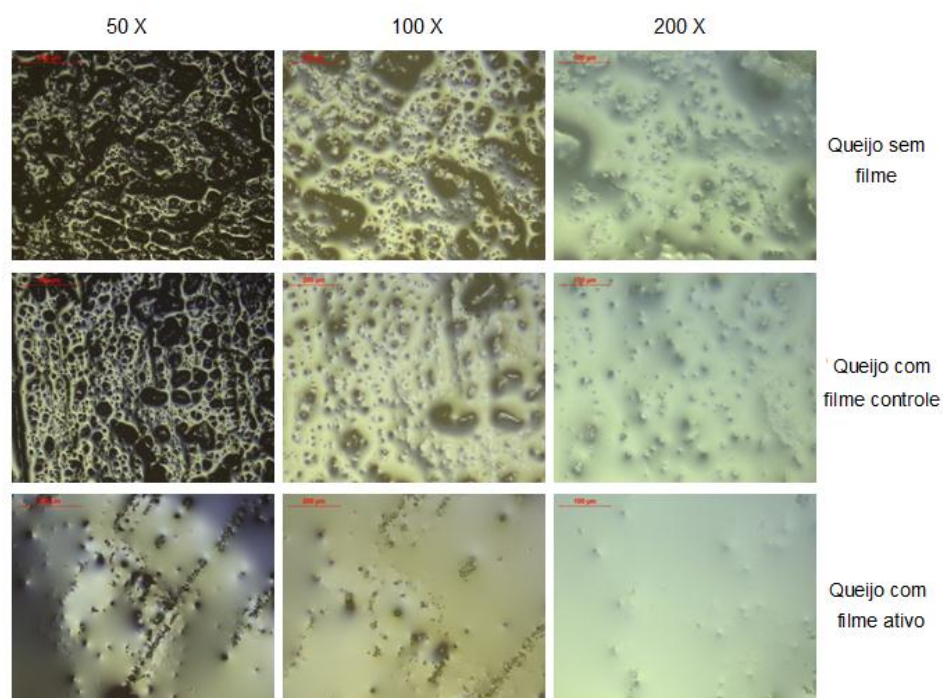


Figura 5.41: Microscopia ótica dos queijos após armazenamento por 10 dias a 8°C.

Estes resultados indicam que o filme ativo tende também a proteger o alimento quando armazenado a 8°C e os sinais visíveis de deterioração microbiana, quando surgirem, ocorrerão antes e serão mais intensos nos queijos sem proteção.

5.10 Liberação em soluções hidroetanólicas

Ensaio de liberação de natamicina foram conduzidos tendo soluções agitadas de etanol como sorvedouro. A agência americana responsável pelo controle de alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration*, 2007) recomenda que soluções etanólicas sejam utilizadas como simulantes de alimentos, mas no presente caso, o objetivo era averiguar o efeito da atividade de água do meio sobre a difusividade. Além disso, conforme visto no Item 5.6, soluções etanólicas mostraram ter excelente poder de solubilização da natamicina, fazendo com que o coeficiente de partição filme-solução permaneça muito baixo, permitindo determinar o coeficiente de difusão da natamicina no filme de forma mais precisa. No presente trabalho, foram selecionadas soluções de etanol com concentrações de 1, 4, 8 e 12% (v/v), fornecendo atividades de água de 0,997, 0,980, 0,971 e 0,957, respectivamente.

Na Figura 5.42 estão apresentadas as curvas de liberação da natamicina a partir dos filmes em contato com as diferentes soluções, bem como o ajuste ao modelo em série da 2ª Lei de Fick (Equação 3.3).

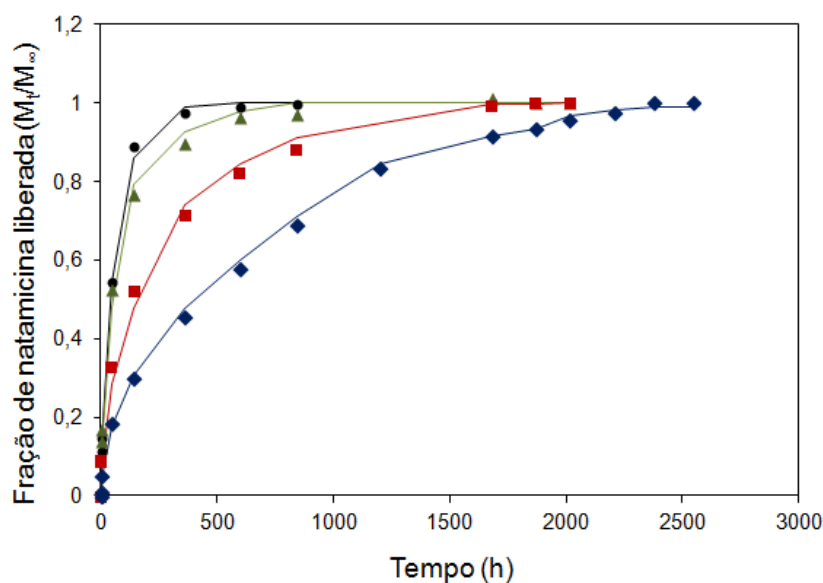


Figura 5.42: Fração de natamicina liberada com o tempo de filmes em contato com soluções de atividade de água 0,997 (●), 0,980 (▲), 0,971 (■) e 0,957 (◆).

A análise do perfil das curvas de liberação da natamicina indica que houve aumento considerável no tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio com a diminuição da

atividade de água. Este resultado é coerente uma vez que a absorção de água pelo filme e, consequentemente, a migração da natamicina é dificultada em baixas atividades de água.

Na Tabela 5.29 estão apresentados os resultados da espessura final e o grau de intumescimento dos filmes ao término da liberação nas diferentes soluções. Para comparação, também estão incluídos os valores obtidos na liberação em água pura ($a_w=1$).

Tabela 5.29: Espessura final (δ), relação entre as espessuras (δ_f/δ_i) e grau de intumescimento (GI) de filmes de alginato *Ca-Ca* em contato com soluções de etanol a 25°C.

Atividade de água	δ_f (μm)	δ_f/δ_i	GI (g H ₂ O/g filme)
1,000	57 ± 3^a	$1,72 \pm 0,08^a$	$0,71 \pm 0,04^a$
0,997	42 ± 2^b	$1,13 \pm 0,05^b$	$0,63 \pm 0,06^a$
0,980	40 ± 1^b	$1,08 \pm 0,03^b$	$0,39 \pm 0,04^b$
0,970	38 ± 1^b	$1,02 \pm 0,03^b$	$0,39 \pm 0,05^b$
0,960	38 ± 2^b	$1,03 \pm 0,05^b$	$0,25 \pm 0,01^b$

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Após o período de contato com as diferentes soluções etanólicas, não foram observadas diferenças na espessura final dos filmes. Já o grau de intumescimento foi significativamente maior para os filmes que permaneceram em contato com a solução de maior atividade de água. O menor grau de intumescimento dos filmes antevê a liberação mais lenta do antimicrobiano nos meios com menores atividades de água, pois nestes casos é necessário um maior tempo para que o solvente penetre a matriz polimérica, dissolvendo os cristais de natamicina.

Ao final do processo de liberação, verificou-se que toda a massa de natamicina presente no filme havia sido liberada, permitindo determinar o coeficiente de difusão de forma simplificada pelo modelo em série da 2ª Lei de Fick (Equação 3.3) e pela equação de tempos curtos (Equação 3.5) sem a necessidade do coeficiente de partição. Os resultados obtidos pela aplicação de ambos os modelos, o coeficiente de determinação (R^2), bem como o resultado obtido no ensaio com água estão apresentados na Tabela 5.30.

Tabela 5.30: Coeficientes de difusão (D_1 e D_2) da liberação da natamicina de filmes de alginato Ca-Ca em contato com soluções de etanol a 25°C e coeficiente de determinação (R^2).

Atividade de água	$D_1 \times 10^{12} \text{ (cm}^2\text{/s)}$	R_1^2	$D_2 \times 10^{12} \text{ (cm}^2\text{/s)}$	R_2^2
1,000	$12,70 \pm 1,80^{b,A}$	0,9971	$14,60 \pm 2,60^{b,A}$	0,9984
0,997	$5,30 \pm 0,35^{a,A}$	0,9921	$4,99 \pm 0,27^{a,A}$	0,9989
0,980	$3,71 \pm 0,29^{a,A}$	0,9889	$3,14 \pm 0,22^{a,A}$	0,9954
0,970	$1,28 \pm 0,00^{a,A}$	0,9905	$1,39 \pm 0,12^{a,A}$	0,9990
0,960	$0,52 \pm 0,08^{a,A}$	0,9897	$0,45 \pm 0,05^{a,A}$	0,9910

D_1 estimado pela série da lei de Fick (Eq. 3.3)

D_2 estimado pela equação de tempos curtos (Eq. 3.5)

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Seguindo a tendência observada nos perfis de liberação, os valores dos coeficientes de difusão diminuíram significativamente com uma pequena diminuição da atividade de água do meio de liberação. A influência da atividade de água do meio sobre a difusividade fica evidenciada ao comparar os valores obtidos com os do ensaio de liberação em água. Esta comparação está apresentada na Figura 5.43. Com relação à água pura, uma diminuição de 0,003 na atividade de água diminui o valor da difusividade para menos da metade. Após esse degrau inicial, a relação entre a_w e D tende a ser linear.

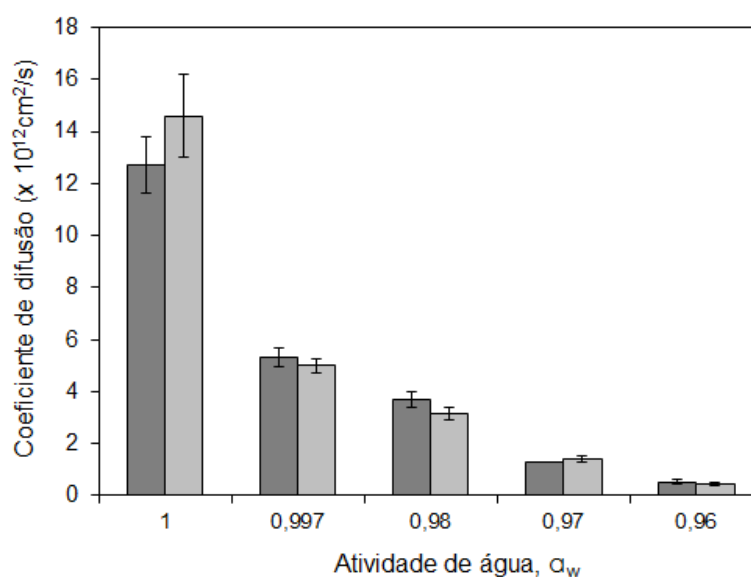


Figura 5.43: Coeficientes de difusão D_1 (■) e D_2 (▒) obtidos para liberação de natamicina de filmes Ca-Ca em contato com soluções de diferentes atividades de água.

Os valores das difusividades D_1 e D_2 apresentados na Tabela 5.29 para os meios alcóolicos foram correlacionados com as respectivas atividades de água por meio das Equações exponenciais 5.1 e 5.2:

$$D_1 = 12 \times 10^{-12} a_w^{76,8} \quad (5.1)$$

$$D_2 = 11 \times 10^{-12} a_w^{70} \quad (5.2)$$

A liberação mais lenta de agentes ativos com a diminuição da atividade água do meio no qual o filme é colocado em contato foi relatada em diversos trabalhos. Petersson *et al.* (2007) estudaram a liberação de diversos açúcares de filmes de kafirina, uma proteína do sorgo, em géis de gelatina e sacarose com atividades de água de 0,85 e de 0,95. Foi observado que a difusividade dos açúcares em atividades de água de 0,85 foi aproximadamente 10 vezes menor do que em atividade de água de 0,95.

Diminuição ainda mais expressiva foi observada por Fajardo *et al.* (2010), que estudaram coberturas de quitosana contendo natamicina. Na liberação em solução de PBS (tampão fosfato salino), a difusividade obtida foi de $3,6 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ e em queijos Saloio, houve uma redução para $1,29 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$. Os experimentos foram conduzidos a 4°C . Ressalta-se, porém, que os filmes de quitosana não possuem uma cadeia reticulada e o intumescimento em solução de PBS foi de 1717%.

O mecanismo envolvido no processo difusivo foi avaliado, levando-se em consideração o Modelo da lei da Potência (Equação 3.6) e os resultados estão apresentados na Tabela 5.31.

Tabela 5.31: Expoente difusional (n), constante difusional (k) e coeficiente de determinação (R^2) da liberação da natamicina de filmes em contato com diferentes soluções etanólicas.

Atividade de água	n	$k(\text{s}^{-1})$	R^2
0,997	0,52	0,46	0,9980
0,980	0,48	0,012	0,9974
0,970	0,43	0,0027	0,9947
0,960	0,50	0,0003	0,9994

Os valores dos coeficientes difusionais obtidos para a natamicina nos filmes estudados encontram-se entre 0,43 e 0,52, confirmando que a difusão fickiana tende a ser o mecanismo predominante e que, conforme já constatado com o modelo de tempos curtos, o intumescimento exerce pouca influência no processo difusivo. A constante k seguiu a tendência prevista de que maiores valores estão relacionados à liberação mais rápida.

5.11 Liberação em sólidos

Para se obter a perspectiva mais ampla do processo difusivo da natamicina no filme em contato com um alimento semi-sólido, ensaios de liberação foram realizados em géis de ágar e de gelatina e em um queijo Prato, conforme descrito nos itens 4.4c e 4.4d. Na Tabela 5.32 estão apresentadas as atividades de água de cada meio sólido estudado. Como pode ser observado, os géis possuem atividades de água inferiores a 1,0 e, desta maneira, podem simular um sistema alimentício real.

Tabela 5.32: Atividade de água (a_w) dos géis de ágar, gelatina e do queijo a 25°C.

Meio	a_w
Gel de ágar (3g/100 mL H ₂ O)	0,996 ± 0,00 ^a
Gel de gelatina (30g/100 mL H ₂ O)	0,990 ± 0,01 ^b
Queijo Prato	0,965 ± 0,01 ^c

Média ± desvio padrão das repetições. Letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Três diferentes temperaturas (8, 15 e 25°C) foram utilizadas nestes ensaios de liberação. Após o intervalo de tempo pré-determinado, o filme era removido do gel e do queijo e dissolvido em solução de citrato de sódio para determinar a massa de natamicina residual. Esta massa foi então subtraída da massa inicial presente nos filmes, tendo como resultado, a massa de natamicina liberada. Conhecendo o volume final do filme, calculava-se a concentração média de natamicina remanescente no filme, no tempo t de contato com o alimento. As curvas que demonstram a evolução da liberação da natamicina em filmes em contato com géis de ágar, gelatina e queijo podem ser visualizadas nas Figuras 5.44 a 5.46.

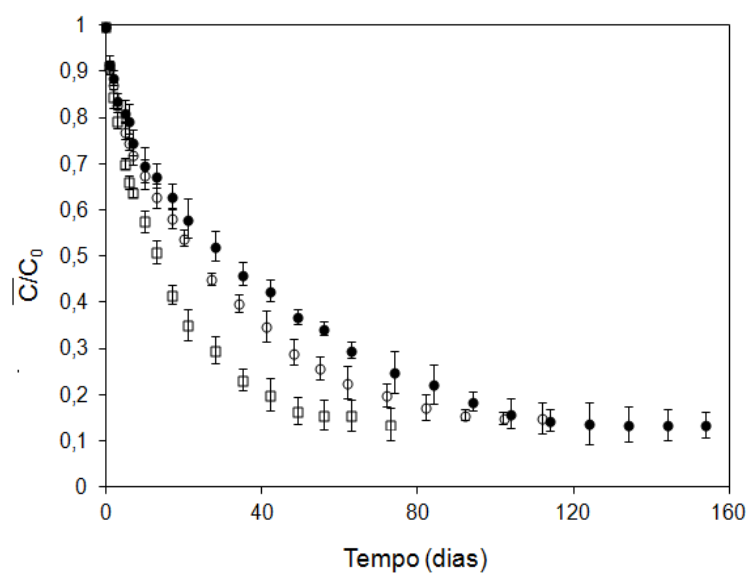


Figura 5.44 - Liberação de natamicina de filmes em contato com gel de ágar 3% a 8°C (●), 15°C (○) e 25°C (□).

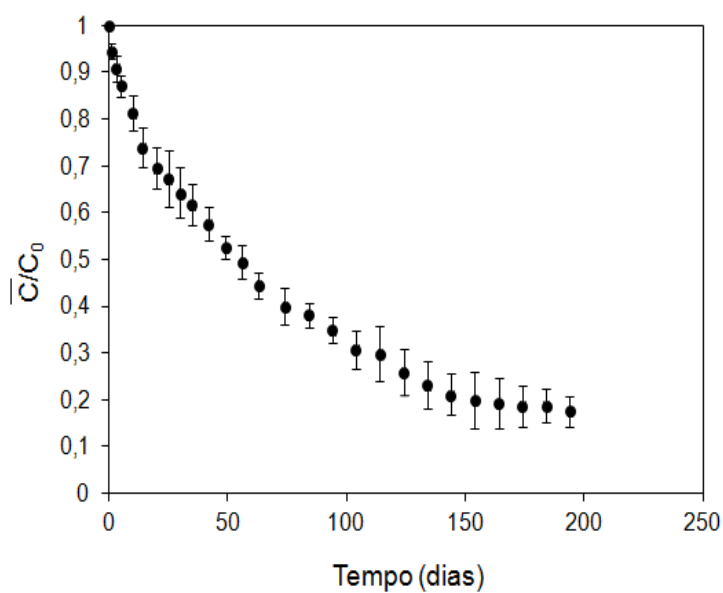


Figura 5.45 - Liberação de natamicina de filmes em contato com gel de gelatina a 8°C (●).

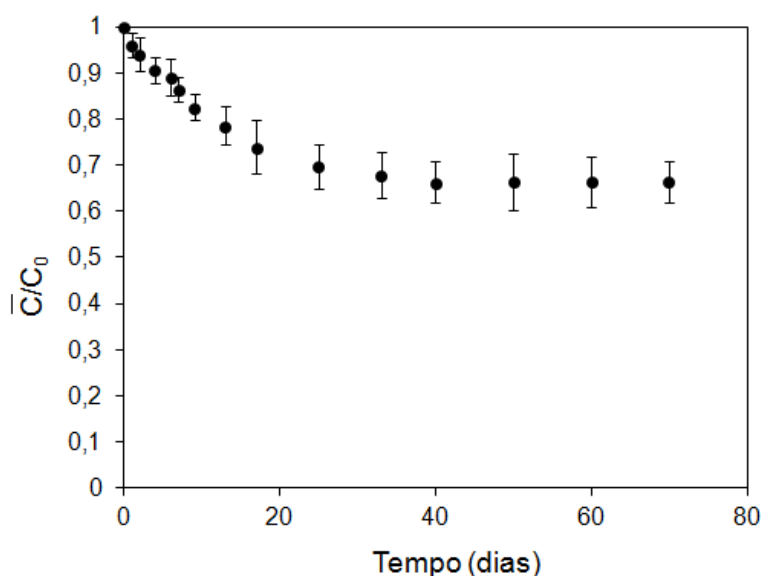


Figura 5.46 - Liberação de natamicina de filmes em contato com amostra de queijo a 8°C (●).

As curvas de liberação têm o formato típico de um processo difusivo, como as já apresentadas na Figura 5.42. Mas é importante entender que a forma de obter os pontos experimentais é diferente. Nas Figuras 5.44 a 5.46, cada ponto corresponde à média de três determinações e cada determinação foi obtida com um conjunto individual filme-produto. Desta maneira foi preciso aproximadamente 60 dispositivos de liberação, considerando-se como tempo zero o momento em que o filme foi colocado em contato com o gel ou o queijo.

A excelente continuidade dos pontos experimentais nas curvas das Figuras 5.43 a 5.46 confirmam a boa precisão obtida com esse procedimento.

Infelizmente, nos ensaios com gel de gelatina a 15 e 25°C, os longos tempos de liberação provocaram sua degradação, impedindo que o experimento fosse conduzido até o final. De forma semelhante, após alguns dias de contato nas temperaturas de 15 e 25°C, observou-se degradação das amostras de queijo, inviabilizando a quantificação da natamicina e a caracterização das amostras nestas condições. A superfície do queijo ficava com aspecto pastoso, não sendo possível remover o filme da amostra. Estes problemas evidenciam a importância de se obter um simulante de alimento representativo e estável, para que se possam estudar diferentes condições sem que ocorram alterações na amostra durante o experimento.

As curvas revelam que a taxa de liberação de natamicina foi maior nos filmes em contato com os géis de ágar em comparação com os géis de gelatina e o queijo. Este resultado

também pode ser atribuído às diferentes atividades de água nos meios. No caso do gel de ágar, que possui maior atividade de água do que os géis de gelatina, os filmes absorveram mais umidade, facilitando a migração da natamicina. O queijo, além de uma atividade de água menor do que os outros sistemas, tem um teor considerável de sólidos e de gordura, que dificulta as comparações.

Os resultados do percentual de natamicina liberado, da espessura final e do grau de intumescimento dos filmes ao término dos ensaios estão apresentados na Tabela 5.33.

Tabela 5.33: Espessura final (δ) grau de intumescimento (GI), relação entre as espessuras (δ_f/δ_i) e percentual de natamicina liberada dos filmes Ca-Ca em contato com ágar, gelatina e queijo.

Meio	T (°C)	δ (μm)	GI (g H ₂ O/g filme)	δ_f/δ_i	% liberado
Ágar	8	90 ± 2^b	$1,75 \pm 0,07^b$	$2,71 \pm 0,08^a$	86,4
	15	100 ± 4^{ab}	$1,95 \pm 0,07^{ab}$	$3,11 \pm 0,15^a$	85,1
	25	100 ± 4^{ab}	$2,12 \pm 0,05^a$	$3,02 \pm 0,18^a$	86,4
Gelatina	8	110 ± 3^a	$1,71 \pm 0,11^b$	$2,75 \pm 0,13^a$	84,9
Queijo	8	40 ± 1^c	$0,33 \pm 0,02^c$	$1,05 \pm 0,09^b$	33,6

Média $\pm$ desvio padrão das repetições. Letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Para os géis de ágar e gelatina, verifica-se que os valores de intumescimento e a relação entre as espessuras final e inicial são maiores do que os obtidos nos ensaios de liberação em água (apresentados na Tabela 5.4). Este comportamento não era esperado, uma vez que os filmes tendem a apresentar maior intumescimento em meios com maiores atividades de água. No entanto, deve-se ressaltar que houve uma dificuldade na determinação do intumescimento, sobretudo no caso da gelatina, pois ao retirar o filme do sólido, uma camada de gel ficava aderida ao filme. A massa de sólidos pastoso era muito difícil de ser retirada sem que o filme fosse danificado, fato que deve ter contribuído para o aumento do valor do intumescimento.

Os filmes em contato com o queijo apresentaram menor espessura final e intumescimento, o que está coerente com a menor atividade de água deste sistema.

O resultado mais surpreendente é a baixa porcentagem de natamicina liberada. Aproximadamente 86% da massa presente inicialmente no filme migrou para os géis e, somente 33,6% para o queijo. Este resultado difere dos ensaios realizados em água e em soluções alcoólicas. Uma hipótese plausível para explicar essa alta retenção é atribuí-la aos cristais de natamicina (ver Figura 5.2), que não tem condições adequadas para sua solubilização devido ao baixo conteúdo de água existente no filme pouco intumescido. Desta maneira o mecanismo de liberação passa a ser controlado pela lenta taxa de solubilização, criando uma situação de pseudo-equilíbrio, conforme apresentam a curva da Figura 5.46.

No queijo, outros fatores como o conteúdo de gordura podem interferir na migração da natamicina, uma vez que se trata de um sistema mais complexo do que um gel. Em filmes a base de polietileno, Cruz *et al.* (2008) avaliaram a migração de aditivos em três tipos de queijo com diferentes teores de umidade e gordura. Os autores observaram que a difusividade diminuiu com o aumento do teor de gordura e de umidade, mas ressaltaram que outras propriedades físico-químicas do alimento podem influenciar a difusão.

Petersson *et al.* (2007) observaram que, para atividades de água de 0,95, entre 40 e 60% dos açúcares presentes em um filme de kafirina haviam migrado para o gel, enquanto que este percentual ficou entre 20 e 40% para atividades de água de 0,85.

5.12 Modelagem da liberação em sólidos

O modelo físico-matemático descrito pela Equação 4.12 foi utilizado na modelagem apresentada a seguir. Ele assume que as duas fases em contato se comportam como meios semi-infinitos e se baseia no ajuste da curva da variação da concentração média de natamicina no filme, com o tempo. Os resultados experimentais já apresentados nas Figuras 5.44 a 5.46 são reapresentados, mas sem as barras de erro. Nestas figuras estão traçadas as curvas correspondentes ao ajuste ao modelo.

Os parâmetros utilizados na modelagem estão baseados em suposições simplificadas e os resultados devem ser considerados como preliminares. As principais limitações são:

1. A difusividade no filme foi assumida como sendo igual à obtida com filmes expostos às soluções etanólicas de mesma atividade de água a 25°C (Equação 5.2). É aceitável supor que o grau de intumescimento (função da atividade de água) controle a difusão no filme, mas o fato da maior parte dos ensaios ter sido realizado a 8°C, e não a 25°C pode conduzir a erros.

2. Infelizmente, o coeficiente de partição da natamicina entre o filme e os géis e entre o filme e o queijo não foi determinado experimentalmente na presente pesquisa. Não são conhecidos valores da partição da natamicina entre filmes de polissacarídeos e alimentos. Em relação a plastificantes encontrados em embalagens de poliolefinas, valores do coeficiente de partição variam de 9 a 360 (Cruz *et al.*, 2008) entre a embalagem e queijos e de 19 a 40 para filmes em contato com alimentos como farinha, arroz, leite em pó e torradas (Sanches-Silva *et al.*, 2009). A diretiva europeia sobre a migração de componentes de embalagens para alimentos (European Commission, 2003) recomenda que o coeficiente de partição seja considerado igual a 1000 quando a substância não é solúvel no alimento ou simulante. No resultado da simulação apresentado aqui, o valor do coeficiente de partição (k) entre o filme e os géis de ágar e de gelatina foi assumido igual a 2,0. É uma hipótese plausível, baseada na experiência de ensaios de liberação da natamicina de filmes em água. A estimativa do coeficiente de partição entre filmes e queijo é mais difícil. É intuitivo assumir que a solubilidade da natamicina no queijo seja muito mais baixa do que no filme, mas não existe embasamento científico nesta afirmação. Em princípio, adotou-se $k=3$. Uma varredura usando $k>3$ indicou pouca variação nos ajustes.

3. A geometria das fatias de queijo e dos géis permite assumir, sem erro, a situação de sólido semi-infinito, isto é, uma difusão livre. Mas os filmes (40 μm em contato com o queijo e em torno de 100 μm em contato com os géis) só tem comportamento de meio semi-infinito nos primeiros dias de contato. O ajuste considerou, portanto, apenas os primeiros pontos experimentais.

4. A concentração inicial, C_0 , foi calculada proporcional à quantidade de natamicina adicionada por ocasião da confecção dos filmes, e dividida pelo volume final da amostra de filme utilizada. Desconsiderou-se, portanto, o tempo necessário para o intumescimento por ser muito pequeno em relação ao tempo da 1ª medição.

5. A resistência de contato foi assumida igual à zero, pois uma excelente aderência foi observada entre o filme e as superfícies.

6. A presença de cristais de natamicina e a hipótese de considerar a necessidade de uma resistência adicional à transferência de massa devido à lenta dissolução destes cristais não foi incluída no modelo.

Os parâmetros utilizados em cada situação, assim como os coeficientes de difusão no sólido (D_A) estimados pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto (Equação 4.12)

estão apresentados na Tabela 5.34. As curvas obtidas pelo ajuste do modelo supracitado aos dados da liberação estão traçadas nas Figuras 5.47 a 5.49.

Tabela 5.34: Difusividade no filme (D_F), coeficiente de partição (k), difusividade no sólido (D_A) e coeficiente de determinação (R^2).

Meio sólido	D_F (cm ² /s)	$k_{F/A}$	D_A (cm ² /s)	R^2
Ágar 8°C	$8,31 \times 10^{-12}$	2	$2,62 \times 10^{-11}$	0,9923
Ágar 15°C	$8,31 \times 10^{-12}$	2	$4,22 \times 10^{-11}$	0,9975
Ágar 25°C	$8,31 \times 10^{-12}$	2	$1,76 \times 10^{-10}$	0,9852
Gelatina 8°C	$5,46 \times 10^{-12}$	2	$1,09 \times 10^{-11}$	0,9919
Queijo 8°C	$0,92 \times 10^{-12}$	3	$0,70 \times 10^{-12}$	0,9431

Uma análise destes resultados, em termos absolutos, está prejudicada devido às suposições listadas acima. O modelo, entretanto, confirma as tendências de forma adequada.

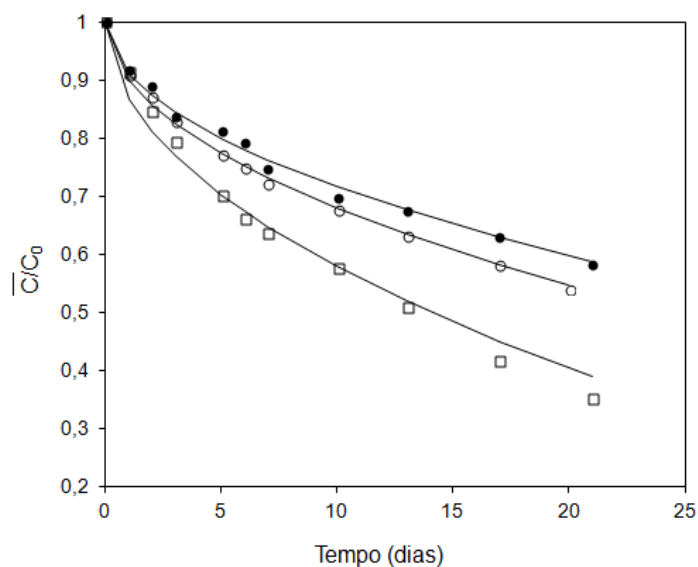


Figura 5.47: Ajuste da Equação 4.12 aos dados experimentais de liberação de natamicina de filmes em contato com géis de ágar a 8 (●), 15 (○) e 25°C (□).

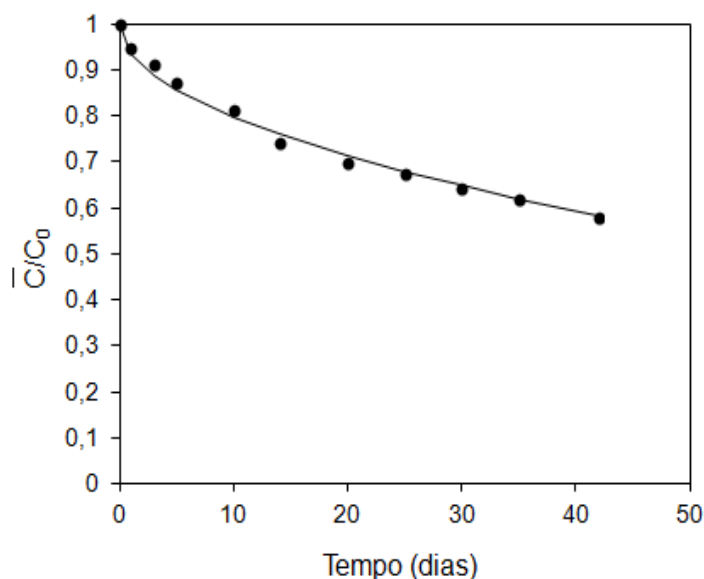


Figura 5.48: Ajuste da Equação 4.12 aos dados experimentais de liberação de natamicina de filmes em contato com gel de gelatina a 8°C.

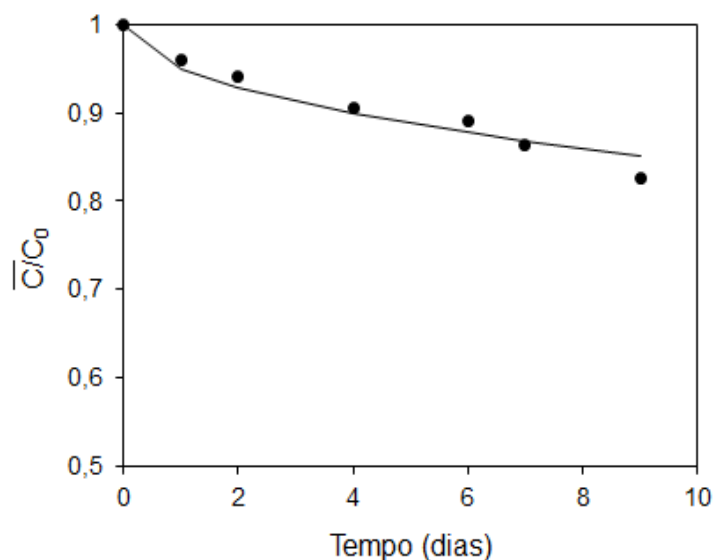


Figura 5.49: Ajuste da Equação 4.12 aos dados experimentais de liberação de natamicina de filmes em contato com queijo a 8°C.

Seguindo a tendência observada na liberação em soluções hidroetanólicas, os valores de difusividade nos sólidos (D_A) estimados pelo modelo foram maiores nos meios com maior atividade de água. Nos géis de ágar, observa-se que as difusividades aumentaram com o aumento da temperatura. Este resultado era esperado, uma vez que maiores temperaturas

aumentam o grau de mobilidade das moléculas, facilitando a migração do soluto para o meio (Rossí-Marquez *et al.*, 2009). Este comportamento já foi observado em diversos trabalhos envolvendo a migração de compostos a partir de filmes poliméricos, como por exemplo, sorbato de potássio em filmes de carragena (Choi *et al.*, 2005), ácido acético e ácido propiônico em filmes de quitosana (Ouattara *et al.*, 2000) e nisina em filmes de proteína (Teerakarn *et al.*, 2002).

Os elevados valores dos coeficientes de determinação (R^2) para os géis de ágar e gelatina indicam que o modelo é adequado para a predição dos coeficientes de difusão da natamicina nestes meios. O ajuste do modelo à curva de liberação de natamicina do filme em contato com o queijo apresentou menor qualidade, o que pode estar relacionado ao fato da difusividade no filme ter sido determinada somente em função da atividade de água. Como o queijo é um meio mais complexo do que os géis de ágar e gelatina, sua composição pode ter influência significativa no mecanismo difusivo. Além disto, o efeito da diferença de temperatura entre a realização do ensaio de liberação no queijo pode ter sido mais significativo, assim como a indefinição quanto ao valor do coeficiente de partição.

Em trabalhos envolvendo a migração de substâncias de filmes poliméricos para meios sólidos, os coeficientes de partição são frequentemente altos e obtidos por modelos matemáticos que consideram o meio de liberação como um meio agitado. Nestes, são observados valores entre 9 e 360 para filmes em contato com queijos (Cruz *et al.*, 2008). No presente trabalho, no entanto, a simulação do modelo com altos valores de coeficiente de partição não promoveu mudanças significativas na qualidade do ajuste.

Considerando os resultados dos coeficientes de difusividade da natamicina no filme e no queijo apresentados na Tabela 5.34, foi possível obter os perfis de concentração para diferentes tempos de armazenamento pelas Equações 3.8 e 3.9. Na Figura 5.50 estão apresentados os resultados da simulação para 5, 10 e 20 dias de armazenamento.

Apesar de corresponderem a uma aproximação, os perfis obtidos confirmam que a quantidade de natamicina migrada para o queijo é baixa e permanece a curta distância da superfície. A concentração da natamicina na face exposta do filme (40 μm) se mantém constante, igual a inicial, por pelo menos 20 dias, indicando que mesmo o limite mais restrito da aplicação do modelo de tempos curtos foi obedecido (ver Apêndice A).

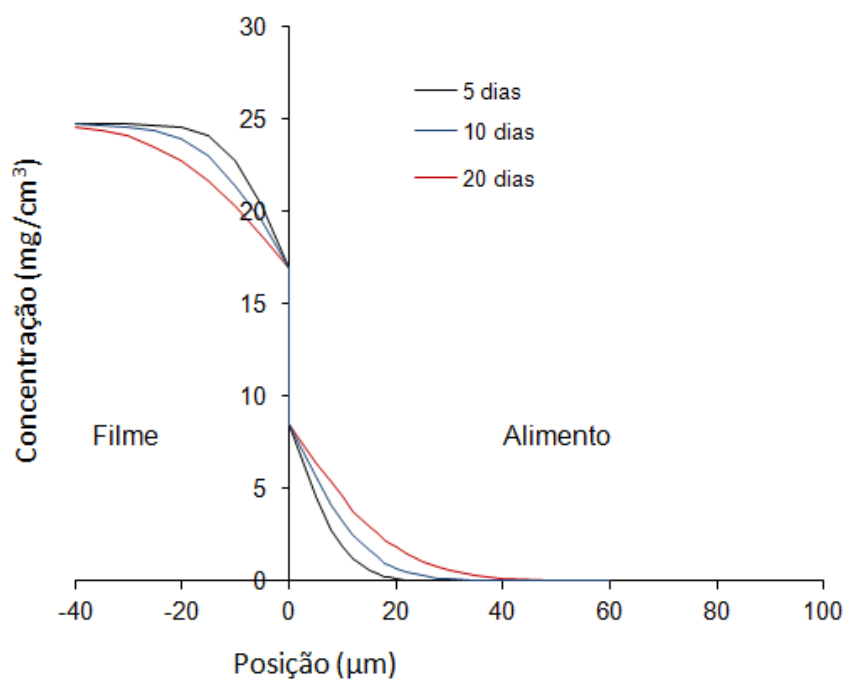


Figura 5.50: Simulação dos perfis de concentração no filme e no alimento em 5, 10 e 20 dias de contato.

O modelo indica também que em 20 dias de contato, a penetração da natamicina no queijo alcançou apenas uma profundidade de cerca de 40 μm . Este resultado é satisfatório levando em consideração que, segundo a legislação, a natamicina pode estar presente somente até 2 mm de profundidade em queijos.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões gerais

Esta pesquisa permite afirmar que filmes de alginato de sódio reticulados com Ca^{2+} no primeiro e no segundo estágios (filmes *Ca-Ca*) formam estruturas atraentes com características físico-químicas e mecânicas adequadas para uso geral em embalagens ativas de alimentos.

Filmes de alginato em que o Ba^{2+} foi usado como reticulante no 1º estágio e Ca^{2+} no 2º estágio (filmes *Ba-Ca*) apresentaram potencial para uso em embalagem ativa, mas em aplicações mais restritas. Os resultados desta pesquisa não recomendam o uso de bário como reticulante no 2º estágio (em filmes *Ca-Ba*, e sobretudo, em filmes *Ba-Ba*).

Ensaio *in vitro* e no alimento indicaram que os filmes contendo natamicina como antimicrobiano apresentam excelente perspectiva para aplicação como filmes ativos para alimentos.

A liberação da natamicina mostrou-se dependente da atividade de água do meio e o consequente intumescimento dos filmes. Um modelo matemático que considera que as duas fases em contato se comportam como meios semi-infinitos permitiu estimar a difusividade da natamicina no sólido, com bom ajuste aos dados experimentais. A penetração da natamicina no queijo alcançou uma profundidade de cerca de 40 μm , valor inferior ao máximo estipulado pela legislação.

6.1 Conclusões específicas

Conclusões específicas obtidas pela análise das tendências observadas na avaliação de características, atributos e do comportamento destes sistemas com atividade de liberação controlada e que conduziram às conclusões gerais acima estão apresentadas a seguir.

a) *Em relação aos procedimentos de reticulação:*

A reticulação do alginato com íons Ba^{2+} no 2º estágio provoca mudanças drásticas no aspecto visual dos filmes. Estas mudanças são intensificadas para filmes pré-reticulados com Ba^{2+} e com o aumento do tempo de imersão na solução reticuladora.

As propriedades dos filmes *Ca-Ba* foram influenciadas pelo tempo de imersão na solução reticuladora. Estes filmes apresentaram, em comparação aos filmes *Ca-Ca* e *Ba-Ca*, maior permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, maior opacidade e rugosidade, consequência de uma reticulação ineficiente da estrutura interna do filme.

O processo de reticulação do alginato com íons Ca^{2+} no 2º estágio é rápido, não havendo mais alterações nas propriedades após 5 minutos de imersão na solução.

b) Em relação aos métodos de impregnação da natamicina

Filmes ativos confeccionados pelo método convencional apresentaram cristais na superfície que influenciaram negativamente a transparência, rugosidade e resistência mecânica.

A impregnação por imersão dos filmes em solução hidroetanólica contendo natamicina foi dependente da concentração de etanol e do tempo de contato, sendo ineficiente devido à baixa quantidade de antimicrobiano incorporada.

Filmes com natamicina impregnada com CO_2 supercrítico (200 bar, 40°C) e o uso de etanol como cossolvente (10 % molar) apresentaram uma carga adequada de antimicrobiano e foram visualmente mais atrativos do que os filmes convencionais, porém menos elásticos e com alto tempo de processamento. Para os filmes reticulados com íons Ba^{2+} , o processamento com CO_2 supercrítico não foi eficiente.

c) Em relação à liberação da natamicina

A difusividade foi fortemente influenciada pelo agente reticulante utilizado no 1º estágio. Para ensaios de liberação em água, os coeficientes de difusão obtidos foram de 0,61, 1,27 e $1,88 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ para os filmes *Ba-Ca*, *Ca-Ca* e *Ca-Ba*, respectivamente. O mecanismo envolvido no processo de liberação da natamicina de filmes de alginato em água é predominantemente difusivo, tendo pouca influência do intumescimento polimérico.

Entre os diferentes métodos de impregnação de natamicina nos filmes *Ca-Ca*, os menores coeficientes de difusão foram obtidos para os filmes convencionais ($10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$), devido à presença de cristais de natamicina. Os métodos de impregnação por imersão e por processamento em CO_2 supercrítico promoveram melhor solubilização da natamicina na matriz polimérica, acelerando a sua liberação. Os coeficientes de difusão para estes dois métodos foram da ordem de $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Para filmes ativos em contato com amostras de queijo Prato, a difusividade da natamicina estimada pelo modelo dos dois meios semi-infinitos justapostos foi de $0,92 \times 10^{-12}$ cm²/s no filme e de $0,70 \times 10^{-12}$ cm²/s no queijo.

d) *Em relação à atividade antimicótica de filmes ativos contendo natamicina*

Todos os filmes ativos apresentaram inibição *in vitro* frente às espécies *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium crustosum*, *Pencicillium roqueforti* e *Yarrowia lipolytica*. Na aplicação em queijos tipo Prato inoculados com os mesmos micro-organismos, os filmes controle (sem natamicina) foram capazes de inibir o crescimento por 5 dias a 25°C, devido à baixa permeabilidade ao O₂. Os filmes ativos foram eficientes por até 30 dias. Amostras de queijo em contato com filmes ativos apresentaram uma carga microbiana um ciclo logarítmico menor do que as amostras sem filme.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para continuidade deste trabalho, sugere-se:

- Avaliar o uso de um polímero sintético, como a policaprolactona (PCL), como um dos constituintes do filme visando o aumento do alongamento;
- Fazer a contagem microbiana geral de bolores e leveduras em alimentos não inoculados, embalados com os filmes e em diferentes temperaturas para avaliação do potencial de aplicação dos filmes em condições reais de armazenamento;
- Estudar o processamento dos filmes em CO₂ supercrítico em maior escala para a determinação mais precisa das propriedades mecânicas dos filmes impregnados.
- Fazer a quantificação de Ba²⁺ migrado dos filmes para o alimento de forma a confirmar a segurança do uso deste agente reticulante.
- Avaliar o efeito do pH sobre a cinética de liberação e sobre o potencial antimicrobiano dos filmes ativos contendo natamicina. O aumento do pH acima de 5,5 em alimentos, como queijos, favorece a deterioração microbiana, o que pode exigir uma maior taxa de liberação de natamicina dos filmes.
- Fazer um estudo aprofundado da migração da natamicina de filmes para sólidos para determinação experimental, de forma independente, da difusividade no alimento e do coeficiente de partição.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M., ALBOOFETILEH, M., REZAEI, M., BEHROOZ, R. Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, v. 32, n.2, p. 416-424, 2013.
- AL-MUHTASEB, A.H., MCMINN, W.A.M., MAGEE, T.R.A. Water sorption isotherms of starch powders: Part 1: mathematical description of experimental data. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 297-307, 2004.
- AL-MUSA, S., FARA, D. A., BADWAN, A. A. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 223-232, 1999.
- ANDRADE, S. A. C., GUERRA, T. M. B., RIBEIRO, M. A., GUERRA, N. B. Emprego de revestimentos comestíveis de alginato e pectina de baixa metoxilação em alimentos: Revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 26, p. 41-50, 2008.
- ANVISA. Portaria MAPA nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, 11 de março de 1996, seção 1, p. 3977.
- ANVISA. Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001. Aprova a extensão do uso da Natamicina (Pimaricina), como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos. *Diário Oficial da União*, 02 de março de 2001, seção 1, p.15-16.
- ANVISA. Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. *Diário Oficial da União*, 23 de setembro de 2005.
- ANVISA. Resolução RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. *Diário Oficial da União*, 21 de novembro de 2012.
- APPENDINI, P., HOTCHKISS, J. H., Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 3, p. 113–126, 2002.

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

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

ASTM. Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector. *Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, F 1927-07, 2007.

AZEREDO, H.M.C., MIRANDA, K.W.E., RIBEIRO, H.L., ROSA, M.F., NASCIMENTO, D.M. Nanoreinforced alginate-acerola puree coatings on acerola fruits. *Journal of Food Engineering*, v. 113, n. 4, p.505-510, 2012.

BAJPAI, S. K., SHARMA, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, v. 59, p. 129-140, 2004.

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

BIERHALZ, A.C.K. *Confecção e caracterização de biofilmes à base de pectina BTM e pectina BTM/alginate reticulados com íons cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 135p. Dissertação (Mestrado).

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

BRAGA, M. E. M., PATO, M. T. V., COSTA SILVA, H. S. R., FERREIRA, E. I., GIL, M. H., DUARTE, C. M. M., DE SOUSA, H. C. Supercritical solvent impregnation of ophtalmic drugs on chitosan derivatives. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 44, n. 2, p. 245-257, 2008.

BRANDSCH, J., MERCEA, P., RÜTER, M., TOSA, V., PIRINGER, O. Migration modeling as a tool for quality assurance of food packaging. *Food Additives & Contaminants*, v.19, n.1, p. 29-41, 2002.

- BUONOCORE, G. G., DEL NOBILE, M. A., PANIZZA, A., BOVE, S., BATTAGLIA, LG., NICOLA, L. Modeling the Lysozyme Release Kinetics from Antimicrobial Films Intended for Food Packaging Applications. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 4, p. 1365-1370, 2003a.
- BUONOCORE, G. G., DEL NOBILE, M. A., PANIZZA, A., CORBO, M. R. A general approach to describe the antimicrobial release from highly swellable films intended for food packaging applications. *Journal of Controlled Release*, v. 90, p. 97-107, 2003b.
- BUONOCORE, G.G., CONTE, A., CORBO, M.R., SINIGAGLIA, M., DEL NOBILE, M.A. Mono- and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.6, n.1, p.459-464, 2005.
- CAMPOS, C. A., GERSCHENSON, L. N., FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, p. 849 – 875, 2011.
- CANSELL, F., AYMINIER, C., LOPPINET-SERANI, A. Review on materials science and supercritical fluids. *Current Opinion in Solid State and Materials*, v.7, n.4-5, p.331-340, 2003.
- CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 175-184, 2012.
- CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Ficha de informação toxicologia Bário. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/bario.pdf>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2014.
- CHA, D. S., CHOI, J. H., CHINNAN, M. S., PARK, H. J. Antimicrobial films based on Na-alginate and κ-carrageenan. *LWT – Food Science and Technology*, v. 35, n. 8, p. 715-719, 2002.
- CHEN, C-H., KUO, W-S., LAI, L-S. Development of tapioca starch/decolorized Hsian-Tsao leaf gum-based antimicrobial films: physical characterization and evaluation against *Listeria monocytogenes*. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 1516-1525, 2013.
- CHEN, G-Q., LU, F-P., DU, L-X. Natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus* based on statistical optimization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 5057-5061, 2008.
- CHIRIFE, J., IGLESIAS, H.A. Equations for fitting water sorptions isotherms of foods. A Review. *Journal of Food Techology*, v. 13, p. 159-174, 1978.

- CHO, S.Y., RHEE, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *LWT – Food Science and Technology*, v. 35, p. 151-157, 2002.
- CHOI, J.H., CHOI, W.Y., CHA, D.S., CHINNAN, M.J., PARK, H.J., LEE, D.S., PARK, J. M. Diffusivity of potassium sorbate in κ -carrageenan based antimicrobial film. *LWT – Food Science and Technology*, v. 38, p. 417-423, 2005.
- CHUNG, D., PAPADAKIS, S.E., YAM, K.L. Simple models for assessing migration from food-packaging films. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, n. 6, p. 611-617, 2002.
- CONG, F., ZHANG, Y., DONG, W. Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, v. 46, p. 71-75, 2007.
- COSTA, V. P., BRAGA, M. E. M., GUERRA, J. P., DUARTE, A. R. C., DUARTE, C. M. M., LEITE, E. O. B., GIL, M. H., SOUSA, H. C. Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, p. 306-316, 2010.
- CRUZ, J.M., SANCHES SILVA, A., SENDÓN GARCÍA, R., FRANZ, R., PASEIRO LOSADA, P. Studies of mass transport of model chemicals from packaging into and within cheeses. *Journal of Food Engineering*, v. 87, p. 107-115, 2008.
- CUSSLER, E. L. *Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems*. 3^a ed. New York: Cambridge University Press, 2009. 631 p.
- DA SILVA, M. A. *Confecção e caracterização de filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina como agente antimicrobiano*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 200p. Tese (Doutorado).
- DA SILVA, M. A., BIERHALZ, A. C. K., KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 736-742, 2009.
- DA SILVA, M.A., IAMANAKA, B.T, TANIWAKI, M.H., KIECKBUSCH, T.G. Evaluation of the antimicrobial potential of alginate and alginate/chitosan films containing potassium sorbate and natamycin. *Packaging Technology and Science*, DOI 10.1002/pts.2000, 2012.

- DANISCO. Natamax antimicrobials. Disponível em: <http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/product%20range/antimicrobials/antimicrobial%20ingredients/natamax%20antimicrobials/natamax_antimicrobials_en.htm> Acesso em: 29 de maio de 2011.
- DARRABIE, M.D., KENDALL, W.F., OPARA, D.D. Effect of alginate composition and gelling cation on microbead swelling. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, n. 6, p. 613-621, 2006.
- DE LA CRUZ, G.V., TORRES, J.A., MARTÍN-POLO, M.O., Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films. *Journal of Food Engineering*, v. 48, pp. 91-94, 2001.
- DEBEAUFORT, F., QUEZADA-GALLO, J-A., VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science*, v. 38, n. 4, p. 299-312, 1998.
- DONATI, I., HOLTAN, S., MØRCH, Y.A., BORGOGNA, M., DENTINI, M., SKJÅK-BRÆK, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, v.6, n.2, p. 1031-1040, 2005.
- DONATI, I., PAOLETTI, S. Material Properties of Alginates. In: *Alginates: Biology and Applications*. Ed. REHM, B.A.A.p.1-53. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 1-53, 2009.
- DONG, Z., WANG, Q., DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, v. 280, p. 37-44, 2006.
- DRAGET, K. I., SMIDSRØD, O., SKJÅK-BRÆK, G. Alginates from Algae. Eds. STEINBÜCHEL, A., RHEE, S. K. In: *Polysaccharides and polyamides in the food industry, properties, production and patents*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 1-30, 2005.
- DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal*, v. 45, p. 141-148, 2009.
- EFSA (European Food Safety Agency). Scientific opinion on the use of natamycin (E 235). *EFSA Journal*, n.7, p. 1412-1437, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Food contact materials, a practical guide for users of European directives. *Annex I: Mathematical models*, p. 58-66, 2003.

FABRA, M.J., TALENS, P., CHIRALT, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, n.23, p. 676-683, 2009.

FAJARDO, P., MARTINS, J. T., FUCIÑOS, C., PASTRANA, L., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloya cheese. *Journal of Food Engineering*, v. 101, p. 349-356, 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Part 165 – Beverages*. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=165.110>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2014.

FLETOURIS, D.J., BOTSSOGLLOU, N.A., MANTIS, A.J. Rapid spectrophotometric method for analyzing natamycin in cheese and cheese rind. *Journal of AOAC International*. v. 78, n. 4, p. 1024–1029, 1995.

FLORES, S., CONTE, A., CAMPOS, C. GERSCHENSON, L., DEL NOBILE, M. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. *Journal of Food Engineering*, v. 81, p. 580-586, 2007.

FONTES, L. C. B., RAMOS, K. K ., SIVI, T. C., QUEIROZ, F. P .C. Biodegradable edible films from renewable sources-potential for their application in fried foods. *American Journal of Food Technology*, v. 6, p. 555-567, 2011.

FRANSSEN, L. R., RUMSEY, T. R., KROCHTA, J. M. Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science*, v.69, n.5, p.347-350, 2004.

GALDEANO, M. C., MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., YAMASHITA, F., GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. *Materials Science and Engineering*, v. 29, p. 532-538, 2009.

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

- GEMILI, S., YEMENICIOGLU, A., ALTINKAYA, S. A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*, v. 90, p. 453-462, 2009.
- GENNADIOS, A., BRANDENBURG, A. H., WELLER, C. L., TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.41, p.1835-1839, 1993.
- GENNADIOS, A., WELLER, C. L. Moisture adsorption by grain protein films. *Transactions of American Society of Agricultural Engineers*, v. 37, p. 535–539, 1994.
- GEORGE, S., THOMAS, S. Transport phenomena through polymeric systems. *Progress in Polymer Science*, v. 26, p. 985-1017, 2001.
- GRAZIOLI, G., GUIA, T. R. M., LABRIOLA, L., LISBÔA, A. C. V. C., RODRIGUES, A. L. C., SOGAYAR, M. C. *Biopolymer composition for encapsulating cells, method for producing a biopolymer composition for encapsulating cells, method for promoting cell cytoprotection and use of a biopolymer composition for encapsulating cells*. Pedido de patente WO2012079142, 2012.
- GUERRERO, P., STEFANI, P.M., RUSECKAITE, R.A., DE LA CABA, K. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*, v. 105, p. 65-72, 2011.
- HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, v. 54, n. 3, p. 56-65, 2000.
- HAN, J. H., FLOROS, J. D. Potassium sorbate diffusivity in American Processed and Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 3, p. 435-437, 1998.
- HAN, J. H., GENNADIOS, A. Edible films and coatings: a review. In: *Innovations in Food Packaging*. Ed. HAN, J. H. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 239-262, 2005.
- HANUSOVÁ, K. STASTNÁ, M., VOTAVOVÁ, L., KLAUDISOVÁ, K., DOBIÁS, J., VOLDRICH, N., MAREK, M. Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering*, v. 99, p. 491–496, 2010.

HARTMAN, J., ALBERTSSON, A-C., LINDBLAD, M.S., SJÖBERG, J. Oxygen barrier materials from renewable sources: Material properties of softwood hemicellulose-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 100, n. 4, p. 2985-2991, 2006.

HARTMANN, M., DENTINI, M., DRAGET, K. I. SKJÅK-BRÆK, G. Enzymatic modification of alginates with mannuronan C-5 epimerase AlgE4 enhances their solubility at low pH. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 257-262, 2006.

HOUTKOOPEL, L., FARRELL, V. A. Calcium supplement guidelines. *The University of Arizona Cooperative Extension*, p. 1-4, 2011.

HUNTER ASSOCIATES LABORATORY. *Universal software, version 3.2*, Reston , 1997.

INCHEM – INTERNATIONAL PROGRAMME OF CHEMICAL SAFETY. *Environmental Health Criteria 107, Barium*, 1990. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc107.htm>. Acesso em 30 de janeiro de 2014.

IRISSIN-MANGATA, J., BAUDUIN, G., BOUTEVIN, B., GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, v. 37, p. 1533-1541, 2001.

JAYASEKARA, R., HARDING, I., BOWATER, I., CHRISTIE, G. B. Y., LONERGAN, G. T. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films. *Polymer Testing*, v. 23, p. 17-27, 2004.

KARBOWIAK, T., DEBEAUFORT, F., CHAMPION, D., VOILLEY, A. Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based films. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 294, n. 2, p. 400-410, 2006.

KERČ, J., SRČIČ, S., KNEZ, Ž, SENČAR-BOŽIČ, P. Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 182, p. 33-39, 1999.

LAMBRECH, M. V. P., SORRIVAS, V., VILLAR, M. A., LOZANO, J. E. Structure and permeability of low-methoxylpectin (LMP)–sodium alginates (NaAlg) films. *Chemical Engineering Transactions*, v. 17, p. 1765-1770, 2009.

LAWRIE, G., KEEN, I., DREW, B., CHANDLER-TEMPLE, A., RINTOUL, L., FREDERICKS, P., GRØNDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LEE, K.Y., MOONEY, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. v. 37, n.1, p. 106-126, 2012.

LENCINA, S.M.M., ANDREUCETTI, N.A., GÓMEZ, C.G., VILLAR, M.A. Recent studies on alginates based blends, composites and nanocomposites. In: *Advances in Natural Polymers: Composites and nanocomposites*. Eds.: THOMAS, S., VISAKH, P.M., MATHEW, A.P. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 18, p.193-254, 2013.

LIMJAROEM, P., RYSER, E., LOCKHART, H., HARTE, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. *Journal of Plastic Films and Sheeting*, v. 19, p. 95-109, 2003.

LOH, Q.L., WONG, Y.Y., CHOONG, C. Combinatorial effect of different alginate compositions, polycations, and gelling ions on microcapsule properties. *Colloid and Polymer Science*, v. 290, p. 619-629, 2012.

LOMAURO, C. J., BAKSHI, A. S., LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I. Fruit, vegetable and meat products. *LWT – Food Science and Technology*, v. 18, p. 111-117, 1985.

LONDOÑO, M.M.D., ABREU, L.R. *Fabricação de queijo prato*. Lavras: UFLA, 1998 15 p.

MARCOS, B., AYMERICH, T., MONFORT, J.M., GARRIGA, M. Physical performance of biodegradable films intended for antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 8, p. 502-507, 2010.

MASTROMATTEO, M. CONTE, A., DEL NOBILE, M.A. Packaging strategies to prolong the shelf life of fresh carrots (*Daucus carota L.*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 13, p. 215-220, 2012.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos, situação atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n.11, p.42-46, 1999.

McHUGH, H. T., AVENA-BUSTILLOS, R., KROCHTA, J. M. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, v. 58, n.4, p. 899–903, 1993.

- McHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, n. 4, p. 841-845, 1994.
- MILLER, K.S., KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 228-237, 1997.
- MILLETTE, M., LE TIEN, C., SMORAGIEWICS, W., LACROIX, M. Inhibition of *staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, v. 18, n. 7, p. 878-884, 2007.
- MØRCH, Ý., DONATI, I. STRAND, B.L., SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 1471-1480, 2006.
- MÜLLER, J. M., SANTOS, R. L., BRIGIDO, R. V. Produção de alginatos por microorganismos. *Polímeros*, v. 21, p. 305-310, 2011.
- NIST - National Institute of Standards and Technology - NIST. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=124389>> Acesso em 10/11/2011.
- NORAJIT, K., KIM, K. M., RYU, G.H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, v. 98, p. 377-384, 2010.
- OGUNBANWO, S. T., OKANLAWON, B. M. Microbial and sensory changes during the cold storage of chicken meat treated with bacteriocin from *L. Brevis* OG1. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 5, p. 601-605, 2006.
- OLIVAS, G. I., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate-calcium filmes: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT – Food Science and Technology*, v. 41, p. 359-366, 2008.
- OLIVAS, G. I., MATTINSON, D. S., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate coatings for preservation of minimally processed ‘Gala’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, v. 45, p. 89-96, 2007.

- OLIVEIRA, T. M., SOARES, N. F. F., PEREIRA, R. M., FRAGA, K. F, Development and evaluation of antimicrobial Natamycin – incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science*, v. 20, n. 2, p. 147-153, 2007.
- OLLÉ RESA, C.P., GERSCHENSON, L.N., JAGUA, R.J. Effect of natamycin on physical properties of starch edible films and their effect on *Saccharomices cerevisiae* activity. *Food Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-012-0960-0, 2012.
- ONSØYEN, E. Alginates. In: *Thickening and gelling agents for food*. Ed. IMENSON, A. Cap.11. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional. p. 230-260. 1997.
- OUATTARA, B., SIMARD, R.E., PIETTE, G., BÉGIN, A., HOLLEY, R.A. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 65, n. 5, p. 768-773, 2000.
- OZDEMIR, M., FLOROS, J. D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, v. 47, p.149-155, 2001.
- OZDEMIR, M., FLOROS, J. D. Film composition effects on diffusion of potassium sorbate through whey protein films. *Journal of Food Science*, v. 68, p.511-516, 2003.
- OZDEMIR, M., FLOROS, J. D. Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, p. 185-193, 2004.
- OZDEMIR, M., FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, v. 84, p.116-123, 2008.
- PAPAGEORGIOU, S.K., KOUVELOU, E.P., FAVVAS, E.P., SAPALIDIS, A.A., Metal–carboxylate interactions in metal–alginate complexes studied with FTIR spectroscopy, *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 469-473, 2010.
- PAȘCALĂU, V., POPESCU, V., POPESCU, G. L., DUDESCU, M. C., BORODI, G., DINESCU, A., PERHAITA, I. T., PAUL, M. The alginate/ κ -carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 536, p. S418-S423, 2012.

- PAVLATH, A. E., ROBERTSON, G. H. Biodegradable polymers vs. recycling: what are the possibilities. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 29, p. 231-241, 1999.
- PEDERSEN, J.C. Natamycin as a fungicide in agar media. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 3, p.1064-1066, 1992.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PETERSSON, M., HAGSTRÖM, J., NILSSON, K., STADING, M. Kinetics release from kafirin films. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 1256-1264, 2007.
- PETRUSIC, S., LEWANDOWSKI, M., GIRAUD, S., JOVANCIC, P., BUGARSKI, B., OSTOJIC, S., KONCAR, V. Development and characterization of thermosensitive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide) and calcium alginate. *Journal of Applied Polymer Science*, v.124, p. 890–903, 2012.
- PHAN, T.D., DEBEAUFORT, F., LUU, D., VOILLEY, A. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n.4, p. 973-981, 2005.
- PHANG, Y-N., CHEE, S-Y., LEE, C-O., THE, Y-L. Thermal and microbial degradation of alginate-based superabsorbent polymer. *Polymer Degradation and Stability*, v. 96, n. 9, p. 1653-1661, 2011.
- PINTADO, C. M. B. S., FERREIRA, M. A. S. S., SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, v. 21, p. 240-246, 2010.
- PIRES, A. C. S., SOARES, N. F. F., ANDRADE, N. J., SILVA, L. H. M., CAMILLOTO, G. P., BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, v. 21, n. 7, p. 375-383, 2008.
- PRANOTO, Y., SALOKHE, V. M., RAKSHIT, S. K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, v. 38, p. 267–272, 2005a.

- PRANOTO, Y., RAKSHIT, S. K., SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT – Food Science and Technology*, v. 38, p. 859-865, 2005b.
- RAMOS, O.L., SILVA, S.I., SOARES, J.C, FERNANDES, J.C., POÇAS, M.F., PINTADO, M.E., XAVIER MALCATA, F. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolated formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, v. 45, p. 351-361, 2012.
- REDL, A., GONTARD, N., GUILBERT, S. Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films, *Journal of Food Science*, v. 61, p. 116-120, 1996.
- REMUÑÁN-LÓPEZ, C., BODMEIER, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, v. 44, p. 215-225, 1997
- REPS, A., JEDRYCHOWSKI, L., TOMASIK, J., WISNIEWSKA, K. Natamycin in ripening cheeses. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 1, p. 243-247, 2002.
- RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT – Food Science and Technology*, v. 37, n. 3, p. 323-330, 2004.
- RIPOCHE, A.C., CHOLLET, E., PEYROL, E., SEBTI, I. Evaluation of nisin diffusion in a polysaccharide gel: Influence of agarose and fatty content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 7, p. 107-111, 2006.
- RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J.R., LÓPEZ-CERVANTES, J., SÁNCHEZ-MACHADO, D.I., RAMÍREZ-WONG, B., TORRES-CHAVEZ, P., CORTEZ-ROCHA, M.O. Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 47, n.10, p. 2127-2133, 2012.
- ROGER, D., TALBOT, D., BEE, A. Preparation and effect of Ca^{2+} on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 305, p. 221-227, 2006.
- ROONEY, M. L. Introduction to active food packaging technologies. In: *Innovations in Food Packaging*. Ed. HAN, J. H. San Diego: Elsevier Academic Press ,2005.

- ROSSÍ-MÁRQUEZ, G., HAN, J.H., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B., CASTAÑO-TOSTADO, E., REGALADO-GONZÁLEZ, C. Effect of temperature, ph and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, n. 14, p. 2492-2497, 2009.
- RUSSO, R. MALINCONICO, M. SANTAGATA, G. Effect of cross-linking with calcium Ions on the physical properties of alginate films. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 3193-319, 2007.
- RUSSO, R., ABBATE, M., MALINCONICO, M., SANTAGATA, G. Effect of polyglycerol and the crosslinking on the physical properties of a blend alginate-hydroxyethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 4, p. 1061-1067, 2010.
- SALMIERI, S., LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 10205-10214, 2006.
- SANCHES SILVA, A., CRUZ FREIRE, J.M., SENDÓN, R., FRANZ, R., PASEIRO LOSADA, P. Migration and diffusion of diphenylbutadiene from packages into foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 10225-10230, 2009.
- SANTANA, A. A. KIECKBUSCH, T. G. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, p. 835-845, 2013.
- SANTIAGO-SILVA, P., SOARES, N.F.F., NÓBREGA, J.E., JÚNIOR, M.A.W., BARBOSA, K.B.F., VOLP, A.C.P., ZERDAS, E.R.M.A., WÜRLITZER, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, v. 20, p. 85-89, 2009.
- SARMENTO, B., FERREIRA, D., VEIGA, F., RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, v.66, n.1, p. 1-7, 2006.
- SARTORI, C., FINCH, D.S., RALPH, B., GILDING, K. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR.spectroscopy. *Polymer*, v. 38, p. 43-51, 1997

SEAPLANTS HANDBOOK. Disponível em: <<http://www.seavegetables.com/handbook/genera/browns/Macrocytis/Macrocytis.htm>> Acesso em 15/05/2011.

SEBTI, I., CARNET, A.R., BLANC, D., SAUREL, R., COMA, V. Controlled diffusion of an antimicrobial peptide from a biopolymer film. *Trans IChemE*, v.81, part A, p. 1099-1104, 2003.

SHEN, X.L., WU, J.W., CHEN, Y., ZHAO, G. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, v, 24, p. 285-290, 2010.

SIEPMANN, J., PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p.139-157, 2001.

SIRAGUSA, G. R., DICKINSON, J. S. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef muscle tissue lactic or acetic acid contained in calcium alginate gels. *Journal of Food Safety*, v.13, n. 2, p. 147-158, 1993.

SOARES, J.P., SANTOS, J.E., CHIERICE, G.O., CAVALHEIRO, E.T.G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, v. 29, n. 2, p. 53-56, 2004.

SOARES, N. F. F., SILVA, W. A., PIRES, A. C. S., CAMILLOTO, G. P., SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, v. 56, p. 370-378, 2009.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1-14, 2000.

SOTHORNVIT, R., KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. In: *Innovations in Food Packaging*. Ed. HAN, J. H. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

SOUZA, A. C., DIAS, A. M. A., SOUSA, H. C., TADINI, C. C. Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of foodactive packaging. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p. 830-837, 2014.

SPIESS, W. E. L., WOLF, W. R. The results of the COST 90 project on water activity. Eds. ESCHER, F., HALLSTROM, B., MEFFERT, H. S., SPIESS, W. E. L., VOSS, G. In: *Physical Properties of Foods*, New York: Applied Science Publishers, p. 65-97, 1983.

SRIAMORNSAK, P., KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 358, p. 205-213, 2008.

SULLOF, E.C. *Comparative study of semisynthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of shredded cheddar cheese*. Thesis submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 1999. Disponível em: <<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-120399-111506/unrestricted/thesisetd.pdf>> Acesso em: 30/05/2010.

TAM, S.K., DUSSEAU, J., BILODEAU, S., LANGLOIS, G., HALLE, J-P., YAHIA, L. Factors influencing alginate gel biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.98A, n.1, p.40-52, 2011.

TEERAKARN, A., HIRT, D.E., ACTON, J.C., RIECK, J.R., DAWSON, P.L. Nisin diffusion in protein films: Effects of film type and temperature. *Journal of Food Science*, v.67, n.8, p.3019-3025, 2002.

THOMAS, A. H. Analysis and assay of polyene antifungal antibiotics. *The Analyst*, v. 101, p. 321-339, 1976.

TIMMERMAN, E.O., CHIRIFE, J., IGLESIAS, H.A. Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering*, v. 48, n.1, p. 19-31, 2001.

TORRES, J.A., KAREL, M. Microbial stabilization of intermediate food surfaces. III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 9, p. 107-119, 1985.

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

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

TÜRE, H., EROĞLU, E., ÖZEN, B., SOYER, F. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, p. 154-160, 2011.

VALERO, L.M.S. *Elaboração e caracterização de filme a base de alginato de sódio, reticulados com íons bário (Ba^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}) ou alumínio (Al^{3+})*. Campinas: Faculdade de Engenharia Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2011. 103p. Dissertação (Mestrado).

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

VAZ, J.M. *Preparação e caracterização de biofilmes ativos à base de alginato de diferentes estruturas poliméricas reticuladas com cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. 154p. Dissertação (Mestrado).

VIDAL-URQUIZA, T. K., BLAGG, A., PERALES-PÉREZ. Structural and termo-mechanical characterization of calcium and barium alginate films. *Cleantech*, p. 357-360, 2012.

VOSS, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society Colour Chant. *Hortscience*, v.27, n.12, p.256- 1260, 1992.

WELSCHER, Y.M., NAPEL, H.H., BALAGUÉ, M.M., SOUZA, C., RIEZMAN, H. KRUIJFF, B., BREUKINK, E. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 283, n.10, p. 6393-6401, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Barium in drinking water*, 2004. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/barium.pdf. Acesso em: 30 de janeiro de 2014.

- XIAO, C., WENG, L., ZHANG, L. Improvement of physical properties of crosslinked alginate and carboxymethyl konjac glucomannan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*. v. 84, n. 13, p. 2554-2560, 2002.
- XU, J. B., BARTLEY, J. P., JOHNSON, R. A. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water-soluble carbodiimide (WSC). *Journal of Membrane Science*, v. 28, n. 2, p.131-146, 2003.
- YAN, Q., ZHANG, J., DONG, H., HOU, H., GUO, P. Properties and antimicrobial activities of starch-sodium alginate composite films incorporated with sodium dehydroacetate or rosemary extract. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 127, n.3, p, 1951-1958, 2013.
- YAÑEZ, F., MARTIKAINEN, L., BRAGA, M. E. M., ALVAREZ-LORENZO, C., CONCHEIRO, A., DUARTE, C. M. M., GIL, M. H., DE SOUSA, H. C. S. Supercritical fluid-assisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery. *Acta Biomaterialia*, v. 7, p. 1019-1030, 2011.
- YANG, L., PAULSON, A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, v.33, p.571-578, 2000.
- YENER, F. Y. G., KOREL, F., YEMENICIOGLU, A. Antimicrobial activity of lactoperoxidase system into crosslinked alginate films. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 2, p. M73-79, 2009.
- ZACARCHENCO, P.B., TRENTO, F.K.H.S., SPADOTI, L.M., GALLINA, D.A., SILVA-ALVES, A.T. Bolores e leveduras em queijos. *Leite e Derivados*, v.20, n.129, p. 92-99, 2011.
- ZACTITI, E. M. *Desenvolvimento, caracterização de filmes biodegradáveis de alginato de cálcio sem e com sorbato de potássio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 154p. Tese (Doutorado).
- ZACTITI, E. M., KIECKBUSCH, T. G. Processo de produção de filmes plásticos ativos biodegradáveis de alginato de cálcio de baixa solubilidade. Pedido de Privilégio de Patente. INPI, Prot. 01850064015 - 12/2005.
- ZACTITI, E.M., KIECKBUSCH, T.G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, v. 77, p. 462-467, 2006.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

Meios semi-infinitos

O modelo de difusão livre (sem restrições geométricas) ou difusão em um meio semi-infinito se ajusta bem aos eventos de transferência de massa em regime transiente, devido aos baixos valores da difusividade de massa, em líquidos e em sólidos.

De acordo com a Figura A.1, o soluto penetra na matriz pela face $x=0$, e o modelo matemático assume que ele jamais atingirá a face $x=L$. Essa face, portanto, manterá sua concentração inicial.

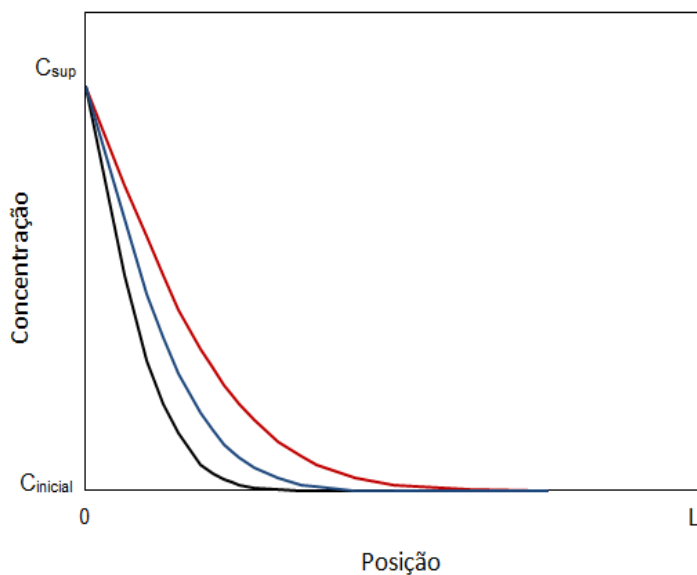


Figura A.1: Perfis de concentração de um soluto em uma matriz.

Nestes casos, a integração da 2ª Lei de Fick (Equação 3.2), utilizando a condição inicial $[t=0, C=C_{\text{inicial}}]$ e as condições de contorno:

$$\begin{array}{ll} x=0 & C=C_{\text{sup}} \\ x=L \ (\rightarrow \infty) & C=C_{\text{inicial}} \end{array}$$

Conduz a:

$$\frac{C_{x,t} - C_{inicial}}{C_{sup} - C_{inicial}} = 1 - \operatorname{erf}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (\text{A.1})$$

Se a difusão livre ocorrer em um meio finito com uma distância máxima para a difusão, L , demonstra-se que a concentração média do soluto, $\bar{C}$, nesta matriz, no instante t , é calculável por:

$$\frac{\bar{C} - C_{inicial}}{C_{sup} - C_{inicial}} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{Fo} \quad (\text{A.2})$$

onde Fo é o tempo adicional ($D.t.L^{-2}$) e conhecido como Número de Fourier de massa.

Uma questão a ser definida é o limite de Fo que mantém a Equação A.2 válida. Na Figura A.2 estão comparadas as curvas de liberação de um soluto contido em um meio, calculadas pela Equação (A.2) e pela solução em séries de Fourier da 2ª Lei de Fick para esta situação, aqui re-escrita como Equação A.3.

$$\frac{\bar{C} - C_{inicial}}{C_{sup} - C_{inicial}} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{n \rightarrow \infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(- (2n+1)^2 \frac{\pi^2}{4} Fo\right) \quad (\text{A.3})$$

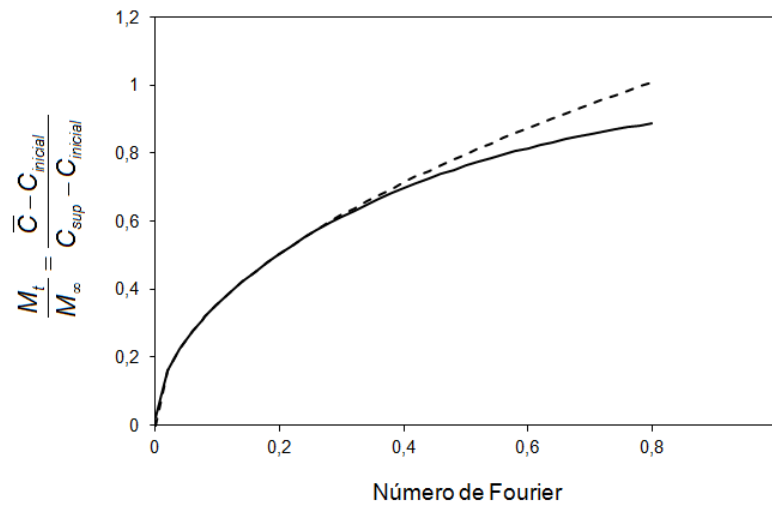


Figura A.2: Relação entre a fração de soluto liberada e o número de Fourier calculada pela solução em série (—) e pela solução para meios semi-infinitos (- -).

Observa-se pela Figura A.2, que até uma liberação de 60% da massa total do soluto que poderia difundir, as duas curvas se mantêm praticamente superpostas. Desta maneira, assumindo um Fo limite de 0,30, ter-se-ia um erro menor do que 0,8% se a Equação A.2 fosse usada para calcular a massa total transferida.

Caso $Fo \leq 0,40$ (isto é, $M_t/M_\infty = 0,70$) fosse adotado como limite, o erro máximo seria 2,25%.

Esses limites foram definidos em relação à massa transferida ou concentração média. A integração do perfil de concentração tende a atenuar o desvio. Se a concentração pontual for importante, e assumindo um erro de máximo 1% da variação possível da concentração na posição $x=L$, tem-se, pela Equação A.1:

$$\frac{1}{100} = 1 - \operatorname{erf}\left(\frac{L}{2\sqrt{Dt}}\right)$$

Essa igualdade fornece $Fo \leq 0,075$ como limite. Voltando à Figura A.1, observa-se que nesse caso, o limite de massa transferida seria apenas 0,30.

É pertinente observar que para uma difusividade fixada pela estrutura física do evento, Número de Fourier pode ser mantido baixo caso o L seja grande, tendendo ao infinito, ou um t baixo. Por causa disto, a Equação A.2 também é chamada de solução para tempos curtos.

APÊNDICE B

Derivação da Equação 4.12.

Considere dois meios infinitos justapostos conforme a Figura B.1.

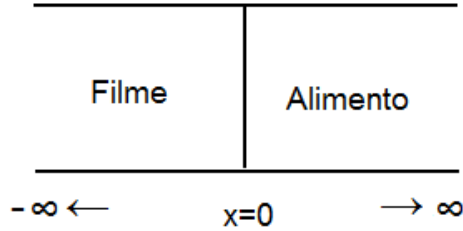


Figura B.1: Representação de dois meios infinitos justapostos.

Assumindo que no tempo zero o princípio ativo esteja uniformemente distribuído no filme e sua concentração seja zero no alimento, Crank (1975) obteve a seguinte equação para o perfil de concentração neste filme:

$$C_F = \frac{kC_0}{(1 + kh)} \left[1 - \operatorname{erf} \frac{x}{2\sqrt{D_F t}} \right] \quad (\text{B.1})$$

onde C_F é a concentração de migrante no filme, C_0 é a concentração inicial de migrante no filme, k é o coeficiente de partição da concentração de equilíbrio entre o filme e o alimento (C_F/C_A), $h = (D_F/D_A)^{0.5}$, sendo D_F e D_A as difusividades do migrante no filme e no alimento, respectivamente.

Combinando as variáveis x e t em η , sendo: $\eta = \frac{x}{2\sqrt{D_F t}}$

$$\text{Tem-se: } \frac{dC_F}{d\eta} = -\frac{C_0 k}{1 + kh} \frac{d}{d\eta} [\operatorname{erf} \eta] \quad (\text{B.2})$$

Sendo $\text{erf}\eta$ a função erro, $\text{erf}\eta = \frac{2}{\pi} \int_0^\eta e^{-\zeta^2} d\zeta$

O fluxo instantâneo do soluto ativo (N_F) em qualquer posição x no filme é calculável pela Lei de Fick:

$$N_F = -D_F \frac{\partial C_F}{\partial x} = -D_F \frac{dC_F}{d\eta} \frac{\partial \eta}{\partial x} = -\sqrt{\frac{D_F}{4t}} \frac{dC_F}{d\eta}$$

A derivada da concentração C_F em relação a η é obtida da Equação B.2:

$$N_F = \sqrt{\frac{D_F}{4t}} \frac{C_0 k}{1 + kh} \frac{d}{d\eta} (\text{erf}\eta) \quad (\text{B.3})$$

Usando a definição da função erro e aplicando a Regra de Leibnitz para a derivada de uma integral como limites chega-se a:

$$\frac{d}{d\eta} [\text{erf}\eta] = \frac{2}{\sqrt{\pi}} e^{-\eta^2}$$

Fazendo a substituição na Equação (B.3) tem-se a expressão do fluxo instantâneo em qualquer posição x , no instante t .

$$N_F = \sqrt{\frac{D_F}{4t}} \left[\frac{C_0 k}{1 + kh} \frac{2}{\sqrt{\pi}} e^{-\frac{x^2}{4D_F t}} \right]$$

O fluxo do migrante pela interface ($x=0$) é o mais importante.

$$N_{F(x=0)} = \frac{C_0 k}{1 + kh} \sqrt{\frac{D_F}{\pi t}}$$

O fluxo médio é obtido pela integral:

$$\overline{N_F} = \frac{1}{t} \int_0^t N_F dt = \sqrt{\frac{4D_F}{\pi t}} \frac{C_0 k}{1 + kh} \quad (\text{B.4})$$

onde $\overline{N_2}$ são gramas que atravessam a área A_{TM} da interface no intervalo de tempo entre 0 e t .

Portanto, a massa de soluto difundida neste intervalo de tempo será:

$$M_t = \overline{N_F} A_{TM} t \quad (B.5)$$

A massa difundida que saiu do filme durante esse mesmo período de tempo também pode ser calculada em função da variação da concentração média.

$$M_t = [C_0 - \overline{C_F}] Volume$$

Sabendo que o volume do filme é o produto $A_{TM} \times \delta$, tem-se:

$$M_t = [C_0 - \overline{C_F}] A_{TM} \delta \quad (B.6)$$

Igualando-se as duas expressões, D.5 e D.6, para M_t chega-se a:

$$[C_0 - \overline{C_F}] A_{TM} \delta = \overline{N_F} A_{TM} t$$

Substituindo a expressão do fluxo médio (Equação B.4) e rearranjando, obtém-se a equação que relaciona a difusividade do princípio ativo no alimento com a variação de sua concentração média no filme:

$$\frac{\overline{C_F}}{C_0} = 1 - \left(\frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{D_F t}{\delta^2}} \frac{k}{1 + kh} \right) \quad (B.7)$$

A Equação B.7 corresponde à Equação 4.12. Nesta equação, $D_F t / \delta^2$ é o Número de Fourier de massa do filme.

APÊNDICE C

Formulação dos meios de cultura utilizados nos ensaios de eficiência antimicrobiana *in vitro*

Tabela C.1: Formulação do meio de cultura MEA (*Malt dextrose agar*).

Ingrediente	Quantidade
Extrato de malte (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	20 g
Peptona (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	1 g
Glicose (Synth, Brasil)	20 g
Ágar (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	20 g
Água destilada	1 L

Tabela C.2: Formulação do meio de cultura DG18 (dicloran glicerol ágar).

Ingrediente	Quantidade
Glicerol (Synth, Brasil)	220 g
Glicose (Synth, Brasil)	10 g
Peptona (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	5 g
Fosfato de potássio monobásico (Merck, Alemanha)	1 g
Sulfato de magnésio (Merck, Alemanha)	0,5 g
Dicloran (0,2% m/v, em etanol)	1 mL
Ágar (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	15 g
Cloranfenicol (Inlab, Brasil)	0,1 g
Água destilada	1 L

Tabela C.3: Formulação do meio de cultura MA (*Malt Agar*)

Ingrediente	Quantidade
Extrato de malte (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	20 g
Ágar (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	20 g
Água destilada	1 L

Tabela C.4: Formulação do meio de cultura YMA (*Yeast malt agar*)

Ingrediente	Quantidade
Extrato de levedura (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	3 g
Extrato de malte (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	3 g
Peptona (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	5 g
Glicose (Synth, Brasil)	10 g
Ágar (Bacto, Becton Dickinson, EUA)	20 g
Água destilada	1 L

APÊNDICE D

Dados da impregação por imersão

Tabela D.1: Massa de natamicina impregnada utilizando soluções com diferentes concentrações molares de etanol e diferentes tempos de imersão.

Etanol (% mol)	Tempo (horas)	Ca-Ca	Ba-Ca	Ca-Ba
1	2	2,58 ± 0,13 ^m	6,67 ± 0,12 ^{gh}	4,28 ± 0,41 ^{jk}
	5	2,45 ± 0,09 ^m	7,55 ± 0,23 ^{efg}	5,34 ± 0,55 ^{ghi}
	10	2,54 ± 0,09 ^m	6,92 ± 0,16 ^{fgh}	4,99 ± 0,32 ^{ijk}
	18	2,66 ± 0,19 ^m	7,76 ± 0,34 ^{ef}	4,75 ± 0,29 ^{ijk}
	24	2,72 ± 0,16 ^m	6,84 ± 0,19 ^{fgh}	5,18 ± 0,33 ^{hi}
2	2	8,83 ± 0,21 ^{hi}	6,72 ± 0,14 ^{gh}	5,06 ± 0,32 ^{hij}
	5	8,62 ± 0,19 ⁱ	6,79 ± 0,10 ^{fgh}	6,07 ± 0,37 ^{fg}
	10	8,69 ± 0,23 ⁱ	7,38 ± 0,35 ^{efg}	5,19 ± 0,42 ^{hij}
	18	8,34 ± 0,25 ⁱ	7,15 ± 0,31 ^{fgh}	5,22 ± 0,25 ^{hij}
	24	7,80 ± 0,08 ^j	7,03 ± 0,26 ^{fgh}	5,33 ± 0,29 ^{hij}
3	2	9,58 ± 0,22 ^g	9,43 ± 0,26 ^{bc}	5,90 ± 0,16 ^{fgh}
	5	9,49 ± 0,31 ^{gh}	9,10 ± 0,54 ^{cd}	6,52 ± 0,23 ^{ef}
	10	9,71 ± 0,28 ^g	9,02 ± 0,47 ^{cd}	6,33 ± 0,19 ^f
	18	9,92 ± 0,25 ^g	9,41 ± 0,49 ^{bc}	6,21 ± 0,36 ^{ef}
	24	10,55 ± 0,17 ^{def}	9,71 ± 0,22 ^{abc}	7,41 ± 0,42 ^{bcd}
5	2	10,02 ± 0,17 ^{efg}	8,36 ± 0,25 ^{de}	7,98 ± 0,22 ^{abc}
	5	10,68 ± 0,29 ^{cde}	9,05 ± 0,38 ^{cd}	8,27 ± 0,28 ^{ab}
	10	11,01 ± 0,33 ^{bc}	9,34 ± 0,31 ^{bc}	8,76 ± 0,31 ^a
	18	11,57 ± 0,30 ^b	9,98 ± 0,29 ^{abc}	8,71 ± 0,34 ^a
	24	11,39 ± 0,09 ^{bc}	10,45 ± 0,30 ^a	8,54 ± 0,27 ^a
8	2	5,24 ± 0,20 ^l	6,29 ± 0,24 ^h	8,39 ± 0,33 ^a
	5	6,88 ± 0,25 ^k	5,25 ± 0,17 ⁱ	8,48 ± 0,41 ^a
	10	7,69 ± 0,31 ^j	6,39 ± 0,29 ^h	7,99 ± 0,29 ^{abc}
	18	8,74 ± 0,27 ⁱ	7,60 ± 0,38 ^{efg}	8,09 ± 0,31 ^{ab}
	24	12,95 ± 0,29 ^a	10,29 ± 0,46 ^{ab}	8,04 ± 0,57 ^{ab}

Média ± desvio padrão das repetições. Letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

APÊNDICE E

E.1 - Ensaios de penetração de natamicina em queijo

a) Em contato com solução de natamicina

Foram feitos ensaios preliminares para determinar a capacidade de penetração da natamicina no queijo. Os resultados obtidos, entretanto, foram insatisfatórios devido à dificuldades na amostragem e nas análises químicas e apenas confirmaram a difusividade extremamente baixa da natamicina no queijo. A seguir, são apresentados os procedimentos adotados para servir como guia inicial para ensaios futuros. Nestes ensaios, uma face do queijo foi colocada em contato com uma solução agitada contendo o antimicrobiano conforme o esquema ilustrado na Figura E.1, baseada em Han e Floros (1998). A solução de 10% de etanol, além de favorecer a dissolução de natamicina não provocou alterações significativas nos sólidos. A concentração de natamicina utilizada foi de 0,1% m/v.

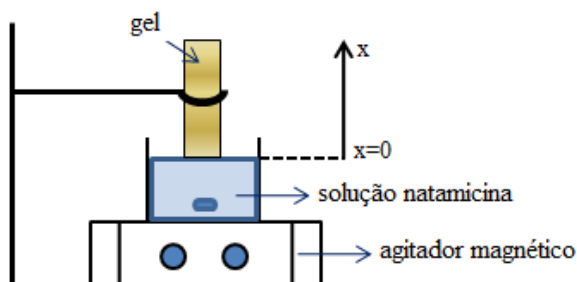


Figura E.1: Esquema ilustrativo da posição do sólido (queijo) na solução etanólica (10% v/v) contendo natamicina (0,1% m/v).

As laterais do queijo foram cobertas com filme de PVC e as amostras colocadas no interior de um tubo plástico de seção quadrada (1cm x 1cm x 10 cm). O tubo contendo o sólido foi fixado por uma garra em uma posição de forma a permitir que somente sua extremidade inferior ficasse em contato com a solução agitada. O sólido ficou em contato com a solução agitada durante diferentes períodos e então foi retirado do tubo e cortado manualmente com um bisturi em fatias de 0,8 mm para análise da concentração de natamicina.

A determinação da natamicina no queijo foi realizada de acordo com o método de Fletouris *et al.* (1995), em que as amostras são dissolvidas em uma solução contendo

acetonitrila e ácido fosfórico (4:1), homogeneizadas e filtradas para posterior medida em espectrofotômetro UV/Vis a 319 nm.

Estes ensaios, no entanto, foram de pouca reprodutibilidade e não forneceram um resultado satisfatório. A presença de natamicina foi detectada somente na primeira camada de queijo (0,8 mm) e não se pode descartar a possibilidade de contaminação do queijo pela solução. A dificuldade em se obter fatias mais finas pelo uso de um micrótomo, por exemplo, impediu o levantamento do perfil de concentração no sólido. Além dos problemas relatados, após períodos de aproximadamente 20 dias, a integridade da superfície do queijo em contato com a solução ficava comprometida. Esta técnica está sendo aprimorada, pois permitirá confirmar valores de difusividade obtidos pelo Modelo dos dois meios semi-infinitos. Han e Floros (1998) conseguiram determinar a difusividade de sorbato de potássio em queijos com esta metodologia porque além de poderem usar concentrações mais altas, a difusividade do sorbato é 5 ordens de grandeza maior do que a encontrada no queijo.

a) Em contato com filmes contendo natamicina

Para a determinação da quantidade de natamicina presente no alimento após ensaios de liberação, as amostras de filmes ativos foram colocados em contato com uma das faces de um conjunto de 6 fatias de queijo, cada uma com 0,8 mm de espessura e 3,2 cm de diâmetro. O sistema foi armazenado em temperatura de 8°C e após diferentes períodos de contato, as fatias foram analisadas individualmente para a quantificação de natamicina conforme descrito no item anterior.

Na Figura E.2 estão apresentados os resultados obtidos em diferentes tempos para a primeira camada de queijo, ou seja, em 0,8 mm de profundidade. A partir da segunda camada de queijo, não foi detectada a presença de natamicina. No entanto, não é possível afirmar que a migração ocorreu até 0,8 mm de profundidade. Para isto seria necessário subdividir a amostra em camadas com menor espessura.

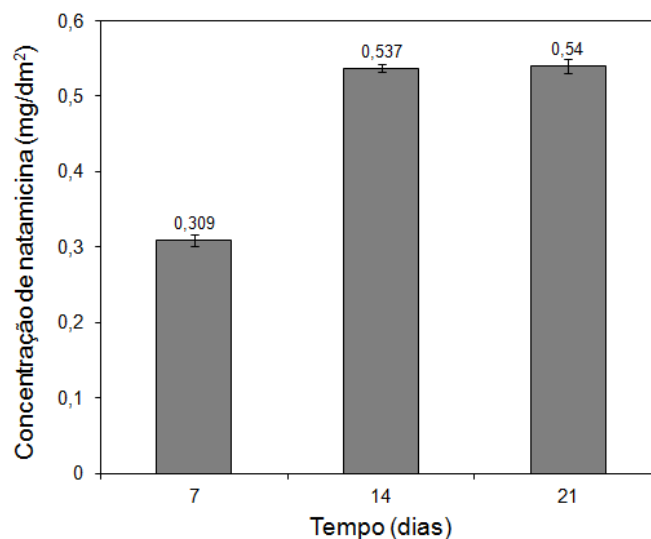


Figura E.2: Concentração de natamicina presente em uma fatia de queijo de 0,8 mm de espessura, após diferentes tempos de contato com o filme ativo.

A quantidade de natamicina por área de queijo aumentou com o aumento do tempo de contato de 7 para 14 dias e permaneceu sem alteração significativa após este período. A quantidade de natamicina observada (0,54 mg/dm²) é aproximadamente metade da quantidade máxima permitida pela legislação, que é 1 mg/dm² (Brasil, 2001). Estes resultados em conjunto com as análises antimicrobianas no queijo mostram que a aplicação dos filmes de alginato neste alimento é viável.