



JULIANA MIGUEL VAZ

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS À BASE
DE ALGINATO DE DIFERENTES ESTRUTURAS POLIMÉRICAS
RETICULADOS COM CÁLCIO.**

Campinas

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

JULIANA MIGUEL VAZ

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS À BASE
DE ALGINATO DE DIFERENTES ESTRUTURAS POLIMÉRICAS
RETICULADOS COM CÁLCIO.**

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Co-orientadora: Dra. Mariana Altenhofen da Silva

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química na área de Engenharia de Processos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA MIGUEL VAZ E ORIENTADA PELO PROF. Dr. THEO GUENTER KIECKBUSCH.

**Campinas
2012**

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

V477p Vaz, Juliana Miguel
Preparação e caracterização de biofilmes ativos à base de alginato de diferentes estruturas poliméricas reticulados com cálcio / Juliana Miguel Vaz. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Theo Guenter Kieckbusch.
Coorientador: Mariana Altenhofen da Silva.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

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

Título em Inglês: Preparation and characterization of active biofilms based on alginate of different polymeric structures crosslinked with calcium

Palavras-chave em Inglês: Biofilm, Alginate, Crosslinking, Rheology, Effective diffusivity

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Theo Guenter Kieckbusch, Marisa Masumi Beppu, Florência Cecília Menegalli

Data da defesa: 30-11-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de mestrado defendida por Juliana Miguel Vaz e aprovada em 30 de novembro de 2012 pela banca constituída pelos seguintes doutores:



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



Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu – Titular
(FEQ/UNICAMP)



Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli – Titular
(FEA/UNICAMP)

*Aos meus pais Nilander (in memoriam)
e Maria Regina e ao meu irmão Luciano
pelo amor, amizade, apoio e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Mãe de Infinito Amor.

À minha mãe pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Ao meu irmão e a Fernanda, exemplos para mim.

Ao Prof. Theo Guenter Kieckbusch, pela orientação, paciência e pelos muitos ensinamentos transmitidos. Toda a minha gratidão e admiração.

A Mariana Altenhofen da Silva e Andréa Bierhalz, pela ajuda constante e incansável.

Às professoras Marisa Beppu e Florência Menegalli pelas sugestões apresentadas para a finalização deste trabalho.

Agradeço aos alunos Ambrósio Almeida, Thiago Ito e Andréa Shimojio pelo auxílio nas análises de espectrofotometria, reologia e cromatografia.

Aos amigos e colegas da FEQ, em especial a Sandra Pelinson e a Cynthia Mahl, pelos bons momentos e por tornar esta caminhada mais alegre.

A FMC Biopolymer pela doação das amostras de alginato.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

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

“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.”

(Pe. Sebastião)

RESUMO

Alginatos são polissacarídeos lineares compostos pela co-polimerização de unidades de β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G), arranjados em bloco homopoliméricos (poli-M ou poli-G) ou blocos em sequência alternada, capazes de formar filmes resistentes quando reticulados com cálcio. Pesquisas no LEPPbio/FEQ/UNICAMP conduziram a um protocolo próprio para a confecção destes filmes em dois estágios de reticulação, pelo qual alginatos de média viscosidade e baixo conteúdo em G, originam biofilmes que são transparentes, homogêneos, com boa resistência mecânica e pouco solúveis em água. O presente estudo compara o potencial de formação de filmes de alginatos contendo maior quantidade de Blocos M (provenientes das algas *Macrocystis pyrifera*) ou com alto teor de Blocos G (das algas *Laminaria hyperborea*) e usando amostras de média e de alta viscosidade. Os quatro diferentes tipos de alginato foram caracterizados quanto à relação M/G, massa molar e comportamento reológico. Filmes foram preparados por *casting* avaliando-se a influência da concentração de cálcio no primeiro e segundo estágios de reticulação, do plastificante e do tempo de reticulação sobre as características dos filmes. A adição de natamicina como agente antimicrobiano também foi investigada. Os resultados obtidos revelam que o comportamento dos filmes confeccionados com os quatro tipos de alginatos apresentam forte influência da massa molar do biopolímero. O limite de adição de íons cálcio no primeiro estágio de reticulação para a obtenção de estruturas homogêneas foi de 19,04 e 6,80 mg de Ca^{2+} /g alginato, para matrizes de alto M e de alto G, respectivamente. Filmes pré-reticulados com 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato na solução do 1º estágio, imersos durante 20 minutos em uma solução contendo 5% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% glicerol (2º estágio) apresentaram um adequado compromisso entre alta resistência mecânica, transparência, baixas solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água. Esta formulação foi selecionada para a confecção dos filmes ativos contendo natamicina. A adição da natamicina provocou um aumento na permeabilidade ao vapor de água, na solubilidade em água e na opacidade e redução na tensão na ruptura. Os ensaios de liberação de natamicina em água apresentaram bom ajuste ao modelo difusional da Lei de Fick. Esse estudo indicou que uma massa molar maior é um requisito mais importante do que uma alta relação G/M para a confecção de filmes de alginato direcionados para serem usados como embalagem ativa.

Palavras-chave: biofilme, alginato, reticulação, reologia, difusividade.

ABSTRACT

Alginates are linear copolymers of (1,4)-linked β -D-mannuronate (M) and α -L-guluronate (G) units, arranged as homopolymeric blocks (poly-M and poly-G) and blocks with alternating sequence. Researches at the LEPPBIO/FEQ/UNICAMP conducted to a defined protocol for the confection in a two-stage crosslinking process, of transparent, homogeneous, mechanically resistant and with low solubility in water biofilms structured with alginates of medium viscosity and low G-content. In the present study, the film-forming potential of alginates with higher M content (from *Macrocystis pyrifera*) and of higher G content (obtained from *Laminaria hyperborea*) were compared. For both alginates, samples of medium and of high viscosity were tested. The four different types of alginates were characterized by the M/G ratio, molar mass and rheological behavior. Films were prepared by casting and the influence of the plasticizer, contact times and of the calcium concentration in the two reticulation stages were considered. The addition of natamycin, an antimicrobial agent, was also investigated. The results revealed that the physical attributes of the films confectioned with the four different types of alginate are strongly dependent of the molar mass. The calcium added to the first crosslinking stage should be limited to 19.04 and 6.80 mg Ca^{+2}/g alginate, for high M and high G matrices, respectively, in order to obtain homogeneous structures. Films pre-reticulated with 6.80 mg Ca^{+2}/g alginate in the solution of the 1st stage, immersed for 20 minutes in a solution of 5% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 3% glycerol (2nd stage) showed an adequate compromise between high mechanical resistance, good appearance, and low water solubility. This formulation was selected to produce active films containing natamycin. The addition of natamycin resulted in an increase in the water vapor permeability, in the solubility in water and in opacity and a reduction in tensile strength. Natamycin release tests in water showed good fitting to Fick's diffusional model. This study indicates that a higher molar mass is more important than a high G/M ratio in alginates, in order to obtain films intended to be used as foodstuffs active wrappings.

Key-words: biofilms, alginate, crosslinking, rheology, diffusivity.

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------|
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| NOMENCLATURA | xviii |
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 05 |
| 2.1 O USO DE BIOFILMES COMO EMBALAGENS DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS | 05 |
| 2.2 BIOFILMES ATIVOS..... | 08 |
| 2.2.1 Agentes antimicrobianos | 09 |
| 2.2.2 Transporte de substâncias ativas em filmes poliméricos | 12 |
| 2.3 MATERIAS-PRIMAS USADAS NO PREPARO DE BIOFILMES ANTIMICROBIANOS .. | 15 |
| 2.3.1 Alginato | 16 |
| 2.3.1.1 Origem, obtenção e comercialização..... | 16 |
| 2.3.1.2 Composição química e características físico-químicas do alginato | 18 |
| 2.3.1.3 Mecanismo de reticulação (<i>crosslinking</i>) | 21 |
| 2.3.1.4 Filmes de alginato de cálcio | 23 |
| 2.3.2 Agentes plastificantes | 24 |
| 2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ALGINATOS | 26 |
| 2.4.1 Determinação da composição | 26 |
| 2.4.2 Determinação da massa molar..... | 27 |
| 2.4.3 Determinação da viscosidade intrínseca (η_{int})..... | 28 |
| 2.4.4 Propriedades reológicas..... | 30 |
| 2.5 CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS..... | 31 |
| 2.5.1 Aspectos visual e tátil | 32 |
| 2.5.2 Espessura (δ)..... | 32 |
| 2.5.3 Propriedades mecânicas | 33 |
| 2.5.4 Propriedades de barreira – permeabilidade ao vapor de água (<i>PVA</i>) | 34 |
| 2.5.5 Solubilidade | 36 |
| 2.5.6 Intumescimento (<i>I</i>) | 37 |
| 2.5.7 Observações microscópicas..... | 38 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 3.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES | 39 |
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ALGINATOS | 40 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.1 | Determinação da composição | 40 |
| 3.2.2 | Determinação da massa molar..... | 41 |
| 3.2.3 | Determinação da viscosidade intrínseca (η_{int})..... | 41 |
| 3.2.4 | Caracterização reológica..... | 43 |
| 3.3 | PREPARO DOS FIMES DE ALGINATO DE CÁLCIO | 45 |
| 3.3.1 | Preparo dos filmes: definição do 1º estágio de reticulação..... | 47 |
| 3.3.2 | Preparo dos filmes: definição do 2º estágio de reticulação..... | 49 |
| 3.3.3 | Confeção dos filmes ativos de alginato..... | 50 |
| 3.4 | CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES..... | 50 |
| 3.4.1 | Aspecto visual | 51 |
| 3.4.2 | Espessura (δ)..... | 51 |
| 3.4.3 | Conteúdo de umidade (ω)..... | 51 |
| 3.4.4 | Massa solubilizada em água (MS)..... | 51 |
| 3.4.5 | Intumescimento (I) | 52 |
| 3.4.6 | Permeabilidade ao vapor de água (PVA) | 52 |
| 3.4.7 | Propriedades mecânicas..... | 54 |
| 3.4.8 | Determinação do conteúdo de cálcio | 55 |
| 3.4.9 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 55 |
| 3.4.10 | Cor e Opacidade | 55 |
| 3.5 | ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA NATAMICINA EM ÁGUA | 57 |
| 3.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS..... | 58 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 59 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DOS ALGINATOS | 59 |
| 4.1.1 | Determinação da composição | 59 |
| 4.1.2 | Determinação da massa molar..... | 61 |
| 4.1.3 | Determinação da viscosidade intrínseca (η_{int}) | 63 |
| 4.1.4 | Teste reológico dinâmico-oscilatório | 64 |
| 4.1.4.1 | Caracterização viscoelástica dos alginatos em água (AA)..... | 65 |
| 4.1.4.2 | Caracterização reológica das soluções de alginato e glicerol (AG) | 68 |
| 4.1.4.3 | Caracterização reológica das soluções de alginato reticuladas com íons cálcio (AAC)..... | 70 |
| 4.1.4.4 | Caracterização reológica dos alginatos em água contendo o glicerol como plastificante e íons cálcio como agente reticulante (AAGC)..... | 76 |
| 4.2 | PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE ALGINATO DE CÁLCIO | 78 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1 Preparo dos filmes: definição do 1º estágio de reticulação..... | 78 |
| 4.2.1.1 Caracterização dos filmes de alginato de cálcio pré-reticulados (um estágio)..... | 82 |
| 4.2.2 Preparo dos filmes: definição do 2º estágio de reticulação..... | 84 |
| 4.2.2.1 Caracterização dos filmes de alginato de cálcio com dois estágios de reticulação | 85 |
| 4.2.2.1.1 Influência do tempo de imersão..... | 90 |
| 4.2.2.2 Definição da concentração de glicerol na solução reticuladora do 2º estágio..... | 93 |
| 4.2.2.3 Definição da concentração de íons cálcio na solução reticuladora do 2º estágio..... | 96 |
| 4.2.3 Determinação do conteúdo de cálcio | 99 |
| 4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO NATAMICINA COMO AGENTE ANTIFÚNGICO..... | 100 |
| 4.3.1 Intumescimento (<i>l</i>) | 104 |
| 4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 106 |
| 4.3.3 Cor e opacidade..... | 111 |
| 4.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA NATAMICINA EM ÁGUA | 115 |
| 4.4.1 Ensaios de liberação da natamicina – tempos curtos | 115 |
| 4.4.2 Ensaios de liberação da natamicina – liberação completa | 119 |
| 5 CONCLUSÕES | 121 |
| 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 123 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 124 |
| APÊNDICE A – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN | 139 |
| APÊNDICE B – Cromatografia por exclusão de tamanho - SEC..... | 140 |

NOMENCLATURA

A Alongamento do filme [%]

A_e Área exposta do filme [m²]

A_s Área da seção transversal do filme [m²]

C Croma [adimensional]

c é a concentração do polímero na solução [g/dL]

d Distância final da separação das garras [mm]

d₀ Distância inicial da separação das garras [mm]

D Difusividade efetiva [cm²/s]

G' Módulo de perda [Pa]

G'' Módulo de armazenamento [Pa]

F Fator de correção [adimensional]

F_G Fração molar dos Blocos G

F_M Fração molar dos Blocos M

F_{GG}, *F_{GM}*, *F_{MM}* e *F_{MG}* Frações molares das sequências GG; GM; MM e MG

F_m Força máxima no momento da ruptura [N]

G Taxa de massa [g/dia]

GA alginato alta viscosidade e maior quantidade de Blocos G

GM alginato média viscosidade e maior quantidade de Blocos G

I Intumescimento [g água/g filme seco]

I_{5,05}, *I_{4,67}*, *I_{4,45}* Intensidade dos picos de RMN

H Ângulo Hue [°]

k Constante difusional [s⁻¹]

*L**, *a**, *b** Parâmetros de cor [adimensional]

*L_p**, *a_p**, *b_p** Parâmetros de cor do filme padrão [adimensional]

MA alginato alta viscosidade e maior quantidade de Blocos M

MM alginato média viscosidade e maior quantidade de Blocos M

M_∞ Massa de soluto liberada em tempo infinito [g]

MEV Microscopia eletrônica de varredura

m_f Massa final da amostra [g]

m₀ Massa inicial da amostra [g]

*M*S Massa solubilizável em água [g /100g filme]
M_t Massa liberada no tempo t [g]
M_t /M_∞ Fração liberada [adimensional]
m_u Massa de filme úmido [g]
n Coeficiente difusional
PVA Permeabilidade ao vapor de água [g.mm/m².dia.kPa]
R Coeficiente de correlação
RMN Ressonância Magnética Nuclear
T_R Tensão na ruptura [MPa]
Y Opacidade do filme em modo de transmitância [%]
Y_b Opacidade em relação a um padrão branco
Y_p Opacidade em relação a um padrão preto
*ΔE** Diferença total de cor
ΔPH₂O Diferença de pressão parcial de vapor de água [kPa]

Letras gregas

δ Espessura do filme [mm]
η_r Viscosidade relativa [adimensional]
η_{esp} Viscosidade específica [adimensional]
η_{esp.red} é a viscosidade específica reduzida [dL/g]
η_{ine} é a viscosidade inerente [dL/g]
η_{int} é a viscosidade intrínseca [dL/g]
ω Conteúdo de umidade % [g H₂O/100g filme]

Este capítulo apresenta uma breve introdução sobre biopolímeros e sua aplicação como biofilmes alimentícios, em especial biofilmes de alginato e suas características. Apresenta também a justificativa e a relevância do estudo desenvolvido, bem como os seus objetivos.

Polímeros naturais de cadeia longa e alta massa molar, em sua grande maioria, podem ser empregados como matéria-prima na fabricação de biofilmes por formarem uma estrutura intermolecular contínua quando submetidos ao tratamento físico ou químico, resultando em uma matriz filmogênica coesa.

O desenvolvimento de filmes biodegradáveis visando aplicações na indústria de alimentos tem sido muito estudado, pois visa manter e melhorar a qualidade dos produtos como também reduzir os efeitos nocivos do acúmulo de embalagens não biodegradáveis no meio ambiente.

Biofilmes ativos podem ser considerados uma evolução das embalagens alimentícias, pois interagem com o alimento liberando uma taxa constante de uma determinada substância ao longo do tempo, aumentando a qualidade e a segurança do alimento.

O alginato é um polissacarídeo hidrofílico que estruturalmente apresenta-se como um copolímero linear, composto de resíduos do ácido β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G) unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-4) (DRAGET *et al.*, 1997).

A massa molar assim como a proporção e distribuição dos Blocos M e G dependem da fonte originária do alginato. Além disso, os processos de extração e

purificação também podem gerar polímeros com diferentes massas molares e, conseqüentemente, diferentes viscosidades. A variabilidade na estrutura e na composição dos alginatos tem grande influência nas propriedades físico-químicas, reológicas e mecânicas do polímero (GARCIA-CRUZ *et al.*, 2008).

Segundo Mancini *et al.* (1996), a qualidade dos filmes de alginato de cálcio depende do tipo de alginato, do grau de substituição do sódio pelo cálcio, da fonte de íons cálcio e dos métodos de preparação. Os alginatos originados da alga *Laminaria hyperborica* contêm maior proporção de ácido gulurônico (G) em sua estrutura possuindo maior tendência à reticulação do que os alginatos originados da alga *Macrocystis pyrifera* a qual possui uma estrutura polimérica onde predomina o ácido manurônico (M) em relação ao ácido gulurônico (G) (SMIDSRØD, 1974).

Nesse contexto, desde 2000, o Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos (LEPPbio) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp vem desenvolvendo estudos que visam a produção e a caracterização de biofilmes ativos para embalagens de alimentos tendo o alginato de sódio de média viscosidade, extraído da alga *Macrocystis pyrifera*, como matriz. Esses estudos levaram ao desenvolvimento de um processo próprio de produção de filmes de alginato que consiste em dois estágios de reticulação com íons cálcio (Ca^{2+}) (ZACTITI; KIECKBUSCH, 2005) originando filmes fortes, com alta resistência mecânica, porém pouco flexíveis.

Visando amenizar a rigidez apresentada pelos filmes, várias alternativas foram aplicadas, como a produção de filmes de alginato com pectina ou com quitosana, o emprego de vários agentes plastificantes e diversos reticulantes, porém, estes não produziram os resultados esperados (da SILVA, 2009; SANTANA, 2010; BIERHALZ, 2010; TURBIANI *et al.*, 2011).

Para dar continuidade à busca por um processo que gere filmes de alginato de baixa solubilidade e adequada permeabilidade ao vapor de água, mantendo uma resistência mecânica apropriada, é preciso controlar o grau de reticulação

com o íon Ca^{2+} evitando que esses filmes fiquem muito rígidos e conseqüentemente, necessitem de grande quantidade de agente plastificante. Neste sentido, a confecção de filmes utilizando alginatos oriundos da alga *Laminaria hyperboria* pode ser uma alternativa na confecção de filmes resistentes e com maior maleabilidade visto que sua reticulação necessita de uma quantidade menor de íons Ca^{2+} .

Este estudo teve por objetivo confeccionar filmes ativos antimicóticos (natamicina) à base de alginato de sódio provenientes das algas *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria hyperboria* reticulados com íons cálcio e avaliar a influência da massa molar e proporção dos ácidos β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G) nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos filmes bem como na difusão do antifúngico. O glicerol foi o agente plastificante utilizado.

Para organizar o desenvolvimento deste estudo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterizar a estrutura química de alginatos provenientes das algas *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria hyperboria* quantificando a distribuição de blocos homopoliméricos e heteropoliméricos dos ácidos β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G), massa molar e a viscosidade correspondente;
- b) Avaliar a influência da distribuição de blocos homopoliméricos e heteropoliméricos dos ácidos β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G) e da massa molar no comportamento reológico dos alginatos estudados;
- c) Buscar formulações adequadas das soluções filmogênicas e determinar a quantidade de íons cálcio limite para os alginatos estudados visando uma estruturação organizada no pré-filme (1º estágio);

d) Confeccionar filmes de alginato pré-reticulados com íons cálcio e caracterizar suas propriedades mecânicas e físico-químicas visando avaliar o efeito da concentração dos íons cálcio;

e) Determinar o efeito da concentração dos íons cálcio, do plastificante e do tempo de contato na solução reticuladora do 2º estágio nos atributos funcionais dos filmes e realizar a caracterização mecânica e físico-química dos filmes;

f) Com base nas melhores formulações, confeccionar filmes ativos de alginato reticulados com íons cálcio, usando a natamicina como agente antifúngico e realizar a caracterização mecânica e físico-química dos filmes;

g) Realizar os ensaios de liberação em água da natamicina e estimar o coeficiente de difusão da natamicina no filme com base na segunda Lei de Fick;

h) Analisar os resultados avaliando a influência da especificidade dos alginatos no comportamento reológico, no processo de confecção dos filmes e em suas propriedades físico-químicas e mecânicas, bem como o efeito no mecanismo de liberação da natamicina.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo inicia-se com uma breve revisão da literatura sobre o desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos como embalagens alimentícias. Apresenta as características físico-químicas e reológicas dos alginatos provenientes de diferentes fontes, bem como as propriedades funcionais e físico-químicas de seus filmes reticulados com Ca^{2+} . Neste capítulo também são tratados os aspectos relacionados aos filmes ativos de alginato e o processo de liberação controlada do agente antimicrobiano, a natamicina. Para permitir situar a presente pesquisa no desenvolvimento de filmes de alginato do LEPPbio, é dada ênfase aos trabalhos produzidos por este grupo de pesquisa.

2.1 O USO DE BIOFILMES COMO EMBALAGENS DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

A qualidade dos produtos alimentícios depende da manutenção de suas características sensoriais, nutricionais e higiênicas. O emprego de técnicas como a salga, o congelamento e o recobrimento não é recente, pois há séculos o homem utiliza estes métodos buscando conservar os alimentos por mais tempo.

Na China, desde o século XII, frutas eram recobertas com cera visando assim evitar a sua desidratação enquanto que na Europa, no século XVI, gordura animal era utilizada para recobrir pedaços de carne e sacarose era aplicada em nozes e avelãs visando minimizar a oxidação e a ação de microrganismos (BALDWIN *et al.*, 1997).

Entretanto, benefícios como a redução na perda de alimentos, o aumento da segurança alimentar e o acesso da população mais distante aos produtos

industrializados apenas foram efetivamente alcançados com o desenvolvimento e a aplicação dos polímeros sintéticos como embalagens convencionais (GARCIA, 2005).

Embalagens poliméricas convencionais em sua grande maioria possuem boas propriedades mecânicas e de barreira, porém, são inertes e de difícil degradação gerando efeitos nocivos ao ambiente quando descartadas (DEBEAUFORT *et al.*, 1998; BASTIOLI, 2001).

Nas últimas décadas, polímeros biodegradáveis, à base de recursos renováveis naturais, têm sido explorados para o desenvolvimento de coberturas e biofilmes alimentícios, visando manter e/ou melhorar a qualidade dos alimentos e reduzir os prejuízos ambientais causados pelo descarte das embalagens sintéticas (GUILBERT *et al.*, 1996; OLABARRIETA, 2005).

Coberturas, também chamadas de revestimentos, são produzidas através da aplicação direta de uma suspensão ou emulsão polimérica na superfície do alimento, e que quando secas dão origem a uma fina película sobre o produto. Conceitualmente filmes divergem das coberturas por serem estruturas poliméricas mecanicamente autossustentáveis formadas separadamente do alimento e posteriormente aplicadas sobre ele (DEBEAUFORT *et al.*, 1998; THARANATHAN, 2003).

O mecanismo para a formação de filmes envolve ligações inter e intramoleculares ou a reticulação das cadeias poliméricas com a formação de uma rede tridimensional semi-rígida que retém e imobiliza o solvente. O grau de coesão entre as moléculas depende da estrutura do polímero, do solvente usado, da temperatura de processamento e da presença e do tipo de aditivos como os plastificantes e agentes reticulantes (GUILBERT *et al.*, 1996).

São várias as técnicas que podem ser usadas na produção de filmes, porém sua aplicação deve levar em conta o tipo de polímero empregado. Para o preparo de filmes hidrocóloids, técnicas como a extrusão, a laminação e o *casting* são largamente empregadas. Nos filmes preparados por *casting* as moléculas

poliméricas são solubilizadas geralmente em água, etanol ou ácido acético originando uma solução filmogênica. Aditivos como plastificantes, reticulantes e agentes antimicrobianos podem ser incorporados a esta solução, a qual é vertida em um molde e seca em condições controladas de temperatura e umidade relativa (THARANATHAN, 2003; LACROIX; TIEN, 2005; MÜLLER *et al.*, 2008).

De maneira geral, os filmes e coberturas biodegradáveis devem ser isentos de substâncias tóxicas, possuir propriedades mecânicas adequadas capazes de proteger a integridade do alimento. As propriedades de barreira devem atuar especificamente no controle da migração de água, de lipídios e na permeabilidade dos gases e vapores, retardando os processos de oxidação e a ação de microrganismos, mantendo a estabilidade bioquímica e físico-química do alimento (DEBEAUFORT *et al.*, 1998).

Os filmes e coberturas comestíveis também devem apresentar atributos sensoriais, como sabor e aroma imperceptíveis ou compatíveis com as do alimento embalado e sua coloração deve ser uniforme e atrativa ao consumidor. Os filmes produzidos à base de hidrocolóides geralmente são mais neutros que os formados a partir de lipídios ou derivados de ceras, os quais se apresentam frequentemente opacos e pouco consistentes (GUILBERT *et al.*, 1996; DEBEAUFORT *et al.*, 1998).

Atualmente um grande número de estudos têm se dedicado ao desenvolvimento tecnológico de filmes e coberturas biodegradáveis empregados como embalagens para carnes, aves, mariscos, frutas, verduras, sementes revelando que esta classe de materiais poliméricos é eficaz na preservação destes alimentos mantendo sua firmeza, a aparência fresca e seu brilho característico (KESTER; FENNEMA, 1986; McHUGH; KROCHTA, 1994; THARANATHAN, 2003).

O grande desafio no desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis como embalagens alimentícias é que estes devem ser seguros e estáveis durante o tempo em que são requisitados não permitindo que o alimento sofra alterações

e, somente após o término de sua função, quando descartados, é que o processo de degradação deve se iniciar. Neste sentido, as embalagens biodegradáveis antimicrobianas podem melhorar e aumentar o tempo de vida do produto e quando descartadas sofrerem rápida degradação (KROCHTA, 2002; CAGRI *et al.*, 2004; TAPIA *et al.*, 2008; OLIVEIRA; SOLDI, 2009).

2.2 BIOFILMES ATIVOS

É crescente a tendência do mercado consumidor em buscar alimentos minimamente processados e com menor quantidade de conservantes. O desenvolvimento de embalagens ativas visa atender a essa exigência latente dos consumidores possibilitando o uso de menores quantidades de conservantes se comparada às quantidades necessárias quando estes são incorporados diretamente nos alimentos (POTHAKAMURY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1995; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; HAN, 2005; da SILVA *et al.*, 2009).

A tecnologia de liberação controlada foi concebida na indústria farmacêutica visando melhorar principalmente a eficácia e a segurança na administração de um princípio ativo ou de uma droga. O conceito proposto por essa tecnologia visa manter em um nível constante a concentração de determinada substância evitando as oscilações convencionais entre níveis tóxicos e ineficazes observadas ao longo do tempo.

Na área alimentícia, substâncias antimicrobianas, vitaminas, aromas, sabores, antioxidantes, nutrientes e corantes podem ser incorporados à matriz polimérica durante o processo de confecção dos biofilmes e liberados em uma quantidade constante quando em contato com o alimento garantindo a estabilidade, a qualidade e a funcionalidade do alimento embalado (LABUZA; BREENE, 1989; BUONOCORE *et al.*, 2003; RHIM; NG, 2007).

Embalagem antimicrobiana é uma categoria de embalagem ativa que tem o seu desenvolvimento diretamente relacionado com o tempo de prateleira de produtos como leite, carne e seus derivados. Esses alimentos apesar de serem submetidos a processos de inativação microbiológica são susceptíveis à recontaminação microbiana a qual geralmente se inicia em sua superfície ou em áreas danificadas causando rápida deterioração e aumentando o risco de transmissão de doenças. A liberação do agente antimicrobiano em concentração constante permite a manutenção das características do alimento e um maior tempo de conservação (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

Algumas características são desejáveis para o desenvolvimento de filmes ativos antimicrobianos como baixa taxa de difusão do agente antimicrobiano no biofilme para evitar a sua rápida lixiviação da matriz polimérica, manutenção de uma taxa mínima de liberação e permanência da concentração do antimicrobiano na superfície de contato filme-alimento acima da concentração inibitória mínima evitando o crescimento do microrganismo (HAN, 2000).

O desenvolvimento de biofilmes antimicrobianos de alginato é uma alternativa potencial na redução do uso das embalagens convencionais e na proteção dos alimentos aumentando a qualidade e o seu tempo de vida através da liberação controlada de um antimicótico, inibindo o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (da SILVA, 2009; BIERHALZ *et al.*, 2012).

2.2.1 Agentes antimicrobianos

Agentes antimicrobianos quando incorporados a um biofilme alimentício permitem reduzir, inibir ou retardar o crescimento dos microrganismos através da redução da taxa de crescimento, aumento da fase *lag* do microrganismo alvo ou inativando a sua ação através do contato, melhorando assim a qualidade e a

segurança alimentar (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

Em geral, os agentes antimicrobianos utilizados na indústria alimentícia são os ácidos orgânicos e seus sais, sulfitos, nitritos, antibióticos, álcoois, benzoato de sódio e sorbato de potássio. Substâncias químicas como alguns gases, enzimas, ácido propiônico, peróxidos, ozônio, óxido clorídrico, eugenol, lisozima, nisina, EDTA têm sido estudadas e avaliadas para que também possam ser empregadas como preservantes alimentares (HAN, 2000; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; SEBTI *et al.*, 2002).

Segundo Han (2005), havendo certo grau de compatibilidade entre o polímero e o agente ativo é possível que uma quantidade significativa de antimicrobiano possa ser empregada na embalagem sem que haja prejuízos às suas propriedades físicas e mecânicas. O excesso de agente antimicrobiano que não é capaz de ser incorporado ao material pode originar heterogeneidades que podem diminuir a resistência física e a integridade mecânica da embalagem.

Da Silva (2009) trabalhando com filmes de alginato contendo sorbato como agente antimicrobiano verificou que este agente ativo forma sais insolúveis com o cálcio os quais se depositavam na superfície do filme. Além disso, o sorbato apresenta alta lixiviação, e ensaios realizados com culturas de microrganismos não apresentaram resultados satisfatórios. Em suas pesquisas da Silva (2009) também trabalhou com a natamicina incorporada em filmes de alginato de cálcio e obteve resultados promissores observando que a sua liberação em meios aquosos ocorre de maneira lenta e gradativa.

A natamicina é um agente antimicótico poliênico (Figura 2.1), produto da fermentação da bactéria *Streptomyces natalensis* que têm apresentado resultados positivos quando incorporada em biofilmes voltados principalmente para o tratamento de queijos e embutidos, inibindo o crescimento de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cândida* (DANISCO, 2012).

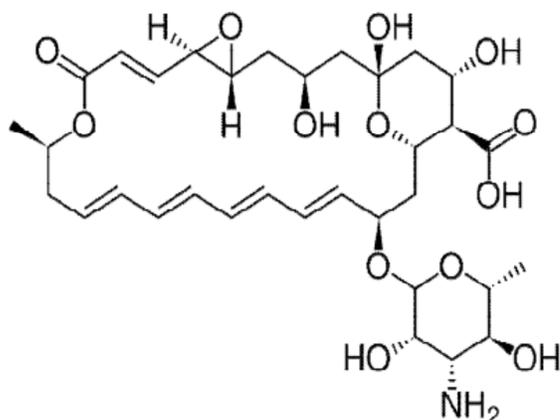


Figura 2.1 - Estrutura química da natamicina (da SILVA, 2009).

Diferentemente dos sorbatos, a baixa solubilidade da natamicina em água permite sua permanência na superfície do alimento, não influenciando negativamente o processo de maturação e não causando alterações no sabor e na textura dos alimentos, (DANISCO, 2012).

São vários os trabalhos relatados na literatura que evidenciam resultados promissores da aplicação da natamicina em filmes antimicrobianos. Türe *et al.* (2009) avaliaram as propriedades físicas de filmes de glúten de trigo e de metilcelulose incorporados com natamicina e não observaram mudanças consideráveis nas propriedades mecânicas e na permeabilidade ao vapor de água que pudessem afetar a aplicação destes filmes.

Testes microbiológicos realizados por Oliveira *et al.* (2007), Türe *et al.* (2008) e Pintado *et al.* (2010) avaliaram a ação inibitória da natamicina (incorporada em filmes biodegradáveis) na superfície de queijos tipo gorgonzola e muzzarella sendo satisfatórios os resultados contra os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti* e *Geotrichum sp.*

2.2.2 Transporte de substâncias ativas em filmes poliméricos

Em filmes poliméricos ativos, a compreensão do mecanismo de transporte, a quantificação do agente antimicrobiano utilizado, bem como a sua taxa de migração da embalagem para o alimento permitem prever a provável quantidade necessária deste agente para produzir o efeito de inibição que se deseja. Alguns fatores bioquímicos tais como a atividade antimicrobiana e a cinética das reações químicas envolvidas com as demais substâncias podem afetar esta transferência de massa característica de substâncias antimicrobianas (STRANDBURG *et al.*, 1990).

A movimentação de um soluto que se encontra dissolvido na matriz de um polímero ocorre por difusão. Devido a um gradiente de concentração as moléculas do soluto migram da região de maior concentração para a região menos concentrada até que o estado de equilíbrio seja alcançado. A taxa de migração é influenciada pela difusividade, parâmetro cinético que descreve o modo com que as moléculas do soluto se movem dentro do polímero e pela sua solubilidade, propriedade de equilíbrio que descreve a compatibilidade entre o soluto e o polímero. Quando a difusão ocorre em regime transiente o fluxo e o gradiente de concentração do soluto variam com o tempo numa dada posição. Este tipo de difusão é descrita pela 2ª Lei de Fick conforme a Equação 2.1 (CUSSLER, 1997).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde: D é a difusividade da substância ativa [cm^2/s]; C é a concentração da substância ativa no filme [g/cm^3].

Experimentalmente, a taxa de difusão de um soluto, em uma matriz polimérica pode ser determinada através da imersão do filme em uma solução agitada como água ou outro tipo de sorvedouro. O monitoramento periódico da concentração deste agente antimicrobiano permitirá o cálculo da fração de massa

liberada com o tempo. Fatores como polaridade, solubilidade, massa molar, dimensão e a forma das moléculas da substância ativa bem com a estrutura, a flexibilidade e o volume livre entre as cadeias poliméricas, o grau de reticulação, a cristalinidade, a adição de plastificantes e outras substâncias podem influenciar o processo de migração do agente antimicótico através da matriz polimérica de um filme ativo (HAN, 2000; GEORGE; THOMAS, 2001).

Em seus estudos Zactiti *et al.* (2009), observaram que filmes ativos de alginato reticulados com íons cálcio apresentaram redução da difusividade do sorbato de potássio à medida que o grau de reticulação dos filmes aumentava. Carulo (2005) observou comportamento semelhante trabalhando com filmes de alginato contendo ácidos graxos e reticulados com íons cálcio. O grau de reticulação e a presença de lipídios promoveram uma maior compactação da estrutura do filme dificultando a mobilidade do sorbato de potássio refletindo em uma menor difusividade.

Através da integração da Equação 2.1, considerando constantes a difusividade e a espessura do filme e admitindo que a migração do agente ativo ocorre pelas duas faces do filme é possível obter a massa total de soluto transferida (M_t) em um intervalo de tempo de $0 \rightarrow t$ através da Equação 2.2 (CUSSLER, 1997).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[-(2n+1)^2 \frac{\pi^2 D}{\delta^2} t \right] \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde: M_∞ é a massa de soluto que seria liberada em um tempo infinito; δ é a espessura do filme.

Considerando que os filmes apresentam características semelhantes a de um sistema plano, o mecanismo envolvido no processo de difusão pode ser identificado através da construção da curva de liberação nos instantes iniciais do

processo de liberação, através da aplicação do Modelo da Lei da Potência, descrito pela Equação 2.3.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad (\text{Equação 2.3})$$

onde: k constante característica para a estrutura e geometria dos dispositivos; n define o mecanismo de liberação apresentado pela matriz.

Para $n = 1$ a liberação do agente ativo é controlada pelo intumescimento e desestruturação do filme e a taxa de liberação torna-se independente do tempo, correspondendo a uma cinética de ordem zero. Quando $0,5 < n < 1,0$ o mecanismo de liberação pode ser considerado anômalo indicando que há uma superposição dos fenômenos de difusão e relaxação da estrutura polimérica. Para $n = 0,5$ o mecanismo de liberação é Fickiano e o coeficiente de difusão pode ser calculado através do Modelo de Sólido Semi-Infinitos ou Solução de Tempos Curtos, representado pela Equação 2.4 (CRANK, 1975; SIEPMANN; PEPAS, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\delta^2 \pi}} \quad (\text{Equação 2.4})$$

De maneira geral, os filmes podem sofrer um elevado intumescimento nos primeiros minutos em que são colocados em contato com a água o que poderia afetar os resultados do cálculo de difusividade, principalmente das determinações por tempos curtos. Turbiani *et al.* (2011) entretanto, trabalhando com filmes de alginato contendo benzoato de cálcio e da Silva (2009) estudando a difusão da natamicina em filmes de alginato reticulados com íons cálcio concluíram que a solução da 2ª Lei de Fick é válida para tempos curtos fornecendo com boa precisão os valores da difusividade do antimicótico no filme.

2.3 MATÉRIAS-PRIMAS USADAS NO PREPARO DE BIOFILMES ANTIMICROBIANOS

A escolha das substâncias poliméricas que estruturam o filme é função dos objetivos que se deseja atingir, da natureza do produto alimentício e do método de aplicação (DEBEAUFORT *et al.*, 1998).

Para que polímeros biodegradáveis sejam empregados como filmes alimentícios alguns requisitos específicos devem ser considerados, tais como propriedades mecânicas e de barreira adequadas, estabilidade físico-química e microbiológica, facilidade de processamento, custo e disponibilidade. Preferencialmente, os filmes produzidos por esses polímeros devem ser transparentes, apresentar consistência suficiente para proteger o alimento e não introduzir alterações em seu sabor. Esses requisitos estão diretamente ligados à natureza do biopolímero, à sua conformação estrutural, massa molar, distribuição de cargas, polaridade e às condições de fabricação e ambientais (CUQ *et al.*, 1996; DEBEAUFORT *et al.*, 1998; LACROIX; TIEN, 2005).

Biopolímeros originados de matéria-prima animal e vegetal como proteínas e polissacarídeos possuem cadeias longas e alta massa molar originando uma estrutura intermolecular contínua quando submetidos ao tratamento físico ou químico resultando num biofilme com matriz polimérica coesa (DEBEAUFORT *et al.*, 1998).

Quando descartados no ambiente, os polímeros biodegradáveis, inicialmente são degradados através da clivagem de suas cadeias poliméricas, devido aos processos de oxidação, hidrólise e fotólise e posteriormente sofrem o processo de biodegradação através da ação de microrganismos podendo originar como produto final água, metano, dióxido de carbono, gás hidrogênio e biomassa (GUILBERT *et al.*, 1996; JONES; McCLEMENTS, 2010).

Proteínas como o colágeno, a gelatina, a caseína e a zeína e polissacarídeos como o alginato, o amido, a quitosana, a pectina e a celulose, dentre outros, possuem características hidrofílicas limitando sua capacidade de barreira à umidade, contudo, apresentam boas propriedades de barreira a gases como o CO₂ e O₂, aromas, óleos e gorduras (KOELSCH, 1994; KROCHTA, 2002; LACROIX; TIEN, 2005).

Polissacarídeos apresentam ainda outras vantagens como grande disponibilidade e baixo custo, suas propriedades podem ser facilmente modificadas através da mistura com outros polímeros ou pela adição de aditivos melhorando suas características físicas e químicas. Devido a sua versatilidade, o uso dos polissacarídeos na produção de filmes e coberturas para a proteção de alimentos tem crescido nos últimos anos (CUTTER; SUMNER, 2002; LACROIX; TIEN, 2005).

2.3.1 Alginato

2.3.1.1 Origem, obtenção e comercialização

O alginato é um polissacarídeo coloidal hidrofílico encontrado na parede celular e nos espaços intercelulares das algas pardas (marrons) da classe *Phaeophyceae* dos gêneros *Macrocystis*, *Laminaria*, *Ecklonia*, *Durvillea* e *Ascophyllum*. Nestas algas, o alginato tem a função de sustentação e coesão do tecido celular chegando a compreender até 40% de sua massa seca (ONSØYEN, 1997). Na Figura 2.2 observa-se o aspecto das algas *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria hyperborica*.

Comercialmente, o alginato é encontrado principalmente na forma de sais de sódio, potássio ou amônio. Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade e suas propriedades coloidais como espessamento, estabilização, emulsificação e gelificação este biopolímero é largamente empregado em vários ramos industriais como médico-farmacêutico, biotecnológico e alimentício a qual

consome aproximadamente 30% de sua produção total anual (MANCINI *et al.*, 1996; ERTESVÅG; VALLA, 1998).

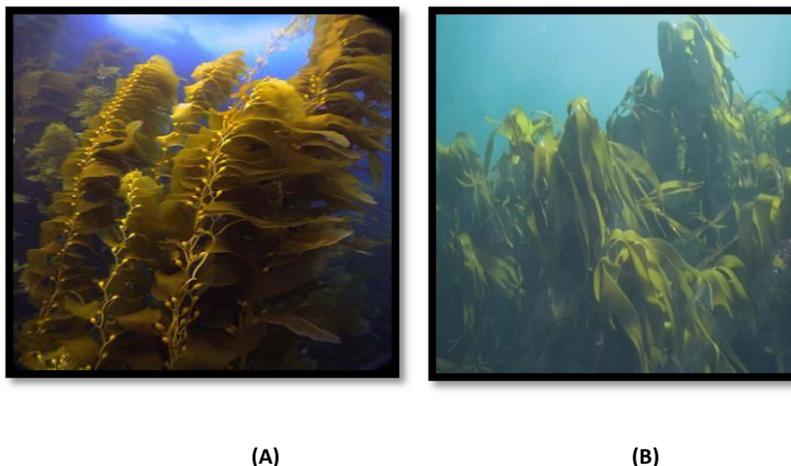


Figura 2.2 - Aspecto das algas marrons (A) *Macrocyctis pyrifera* e (B) *Laminaria hyperborica* (fonte: www.artbios.ru e www.lib.noaa.gov)

O processo industrial para obtenção do ácido algínico e de seus sais envolve uma prévia lavagem das algas em meio ácido para remover materiais solúveis. Em seguida é realizado o processo de extração, em meio alcalino, sendo empregado carbonato de sódio. O sal misto de sódio-potássio-amônio do ácido algínico originado na extração é solubilizado e separado dos resíduos das algas por filtração. Ao meio reacional é então adicionado cloreto de sódio ou cálcio originando fibras de alginato que se precipitam. Após várias etapas de purificação, o sal de alginato está pronto para ser comercializado (OAKENFULL, 1987; RINAUDO, 2008).

Embora as algas marrons sejam a fonte utilizada para a produção comercial do alginato, bactérias como a *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas spp.* também são capazes de sintetizá-lo na forma de uma mucilagem extracelular (polissacarídeo capsular). O alginato bacteriano diverge do ácido algínico presente nas algas marrons por apresentar maior grau de acetilação (CLEMENTI *et al.*, 1995; CLEMENTI *et al.*, 1999; GARCIA-CRUZ *et al.*, 2008).

2.3.1.2 Composição química e características físico-químicas do alginato

Estruturalmente, o alginato é um copolímero linear de alta massa molar composto por resíduos do ácido β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G) unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-4) (HAUG, 1967; DRAGET *et al.*, 1997).

As estruturas químicas dos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), monômeros formadores do alginato estão apresentados na Figura 2.3.

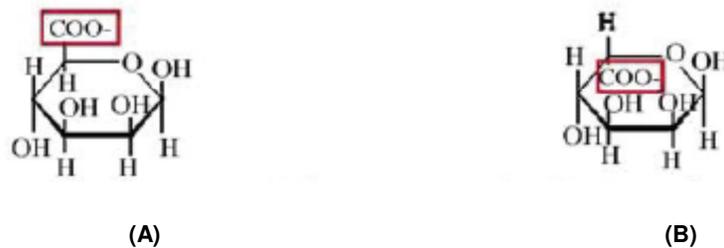


Figura 2.3 - Estrutura química dos ácidos β -D-manurônico (A) e α -L-gulurônico (B).

As unidades monoméricas M e G podem ser distribuídas em diferentes proporções ao longo da cadeia polimérica e organizadas em blocos que podem conter apenas resíduos G consecutivos (Blocos G) ou apenas resíduos M consecutivos (Blocos M), chamados de blocos homopoliméricos ou ainda blocos compostos por resíduos alternados de M e G (Blocos MG), chamados de blocos heteropoliméricos (SMIDSRØD, 1974; ERTESVÅG; VALLA, 1998).

Devido à orientação das ligações glicosídicas, as regiões da cadeia nas quais predominam Blocos M adquirem forma linear, enquanto que as regiões de Blocos G adquirem forma ondulada (GACESA, 1988).

Na Figura 2.4 é possível observar as possíveis configurações assumidas pelas cadeias de alginato.

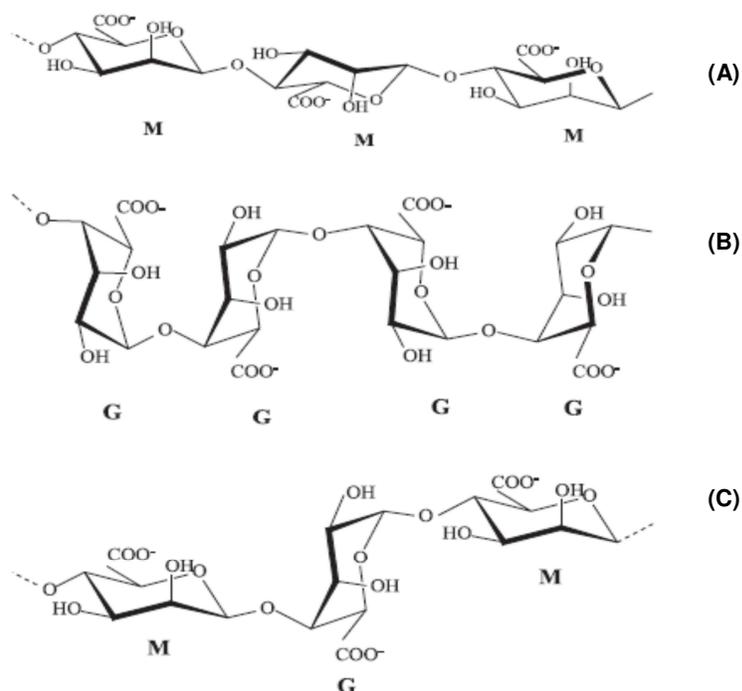


Figura 2.4 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteropoliméricos MG: (A) sequência M-M; (B) sequência G-G e (C) sequência M-G-M (GARCIA-CRUZ *et al.*, 2008).

De acordo com os métodos de extração, com a fonte originária e até mesmo com a época do ano e a localidade, os alginatos podem apresentar diferentes proporções e monômeros M e G e variados comprimentos de cadeia resultando em diversas faixas de massa molar e conseqüentemente diferentes viscosidades, características estas que influenciam diretamente o comportamento físico-químico e reológico do polímero e conseqüentemente de seus géis e seus filmes (GARCIA-CRUZ *et al.*, 2008; RINAUDO, 2008).

Na Tabela 2.1 estão apresentadas as quantidades proporcionais dos ácidos β-D-manurônico (M) e α-L-gulurônico (G) em alginatos produzidos pelas fontes mais comuns de algas pardas.

Tabela 2.1 - Proporção típica molar dos Blocos M e G presentes em várias espécies de algas pardas (adaptado de ZACTITI, 2004).

| Fonte | M/G | M | G | MM | GG |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|
| Algas | | | | | |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | 1,86 | 0,65 | 0,35 | 0,56 | 0,26 |
| <i>Durvillea antarctica</i> | 5,45 | 0,71 | 0,29 | 0,58 | 0,16 |
| <i>Durvillea potarum</i> | 3,33 | 0,71 | 0,23 | 0,69 | 0,13 |
| <i>Laminaria digitata</i> | 1,22 | 0,55 | 0,45 | 0,39 | 0,29 |
| <i>Laminaria hyperborea</i> | 0,43 | 0,30 | 0,70 | 0,18 | 0,58 |
| <i>Laminaria japonica</i> | 1,86 | 0,65 | 0,35 | 0,48 | 0,18 |
| <i>Macrocystis pyrifera</i> | 1,50 | 0,60 | 0,40 | 0,40 | 0,20 |

Alginatos originados da alga *Laminaria hyperborea* contêm maior proporção de ácido gulurônico (G) em sua estrutura, apresentando maior tendência à reticulação se comparado aos alginatos extraídos da alga *Macrocystis pyrifera*, ricos em ácido manurônico (M).

A quantidade e o tamanho de Blocos G presentes na molécula de alginato estão diretamente ligados à capacidade de formação do gel e sua estabilidade, seus grupos carboxílicos reagem com íons di e trivalentes, produzindo géis termoestáveis. Além dos géis iônicos, os alginatos também podem formar géis ácidos abaixo do pKa do ácido gulurônico (pKa = 3,4) (SMIDSRØD, 1974; DRAGET *et al.*, 1997).

Segundo Donati *et al.* (2005) a quantidade e a distribuição das sequências alternadas MG (configurações GG/MG e MG/MG) são muito importantes para o processo de gelificação, bem como para o comportamento mecânico dos géis de

alginato. A presença de junções GG/MG ocasionam um considerável aumento no módulo de Young do gel. Paralelamente, a presença de longas sequências alternadas MG/MG podem induzir a um colapso parcial das ligações do gel gerando um decréscimo no módulo de armazenamento devido ao aumento da força friccional entre as cadeias conectadas.

Estudos reológicos e de dispersão de luz comprovaram que diferenças na sequência e no conteúdo dos Blocos M e G influenciam na força e na estabilidade dos géis formados. Géis de alginato com maior quantidade de Blocos M são mais plásticos e menos porosos, géis com maior quantidade de Blocos MG apresentam rigidez intermediária e são mais solúveis em baixos pH, enquanto que géis com maior quantidade de Blocos G possuem maior estabilidade térmica, são mais volumosos exibindo alta porosidade e pequeno intumescimento, costumam apresentar alto valor de tensão de ruptura e sofrem pequeno encolhimento durante o processo de gelificação (SMIDSRØD, 1974; DRAGET *et al.*, 1997; ERTESVÅG; VALLA, 1998).

2.3.1.3 Mecanismo de reticulação (*crosslinking*)

O alginato possui a capacidade de formar géis fortes e insolúveis quando tratado com diversos cátions polivalentes, sendo que o cloreto de cálcio é considerado o agente reticulante mais efetivo (ALLEN *et al.*, 1963).

O processo de gelificação do alginato baseia-se na sua afinidade por certos íons e na habilidade de se ligar seletivamente e cooperativamente a estes íons conforme a representação na Figura 2.5 (DRAGET *et al.*, 1997). A estruturação alcançada entre Blocos G recebeu o nome de modelo “caixa de ovos”.

Esse processo é governado pela concentração e estrutura química do alginato como também pela cinética de reação, a qual depende da concentração dos cátions, da força iônica e do pH (DRAGET *et al.*, 1997).

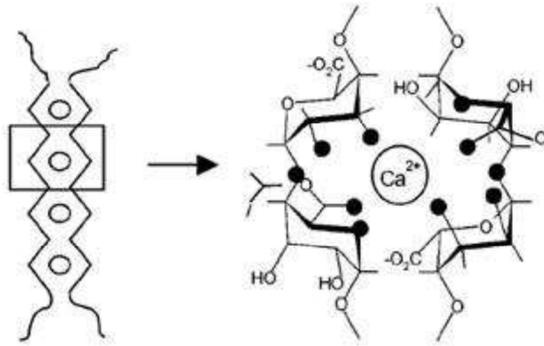


Figura 2.5 - Formação do gel de alginato de cálcio. Modelo “caixa de ovos” (BRYCE *et al.*, 1974).

Estudos atuais têm proposto um melhoramento da teoria “caixa de ovos” assumindo que junções do tipo GG/MG e MG/MG também participam do processo de reticulação não devendo ser desconsideradas, pois também originam cavidades capazes de acomodar os íons cálcio influenciando macroscopicamente no comportamento mecânico dos géis formados (DONATI *et al.*, 2005). As possíveis junções presentes nos géis de alginato estão representadas na Figura 2.6

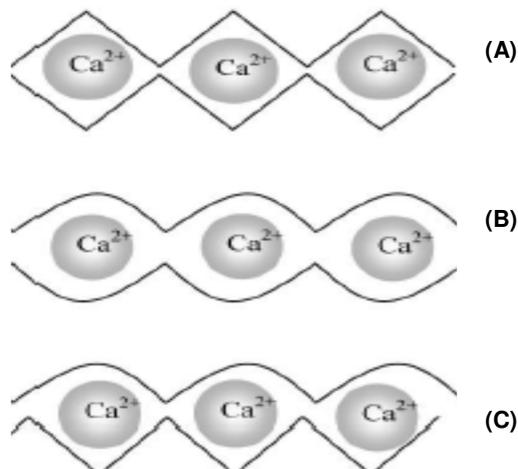


Figura 2.6 - Representação das possíveis junções possíveis nos géis de alginato: (A) ligações GG/GG; (B) ligações MG/MG e (C) ligações mistas GG/MG (DONATI *et al.*, 2005).

2.3.1.4 Filmes de alginato de cálcio

A qualidade dos filmes de alginato de cálcio depende da origem do alginato, do grau de conversão entre o sódio e o cálcio, da fonte de íons Ca^{2+} (cloreto, fosfato, lactato ou acetato de cálcio) e dos métodos de preparação (MANCINI *et al.*, 1996).

De maneira geral, o processo de reticulação do alginato com íons Ca^{2+} pode ocorrer de três maneiras: através do resfriamento da solução polimérica onde os íons já estão contidos, através da difusão dos íons Ca^{2+} para o interior do filme imerso em uma solução iônica ou através da adição controlada e homogênea de íons Ca^{2+} em uma solução de alginato (ZACTITI, 2004).

Em grande parte dos estudos relatados na literatura, filmes de alginato de sódio são reticulados através da difusão dos íons Ca^{2+} na matriz polimérica, sendo que o excesso de cálcio adicionado e a ausência de um agente plastificante propicia a formação de filmes quebradiços e ondulados (RHIM, 2004; ROGER *et al.*, 2006; OLIVAS; BARBOSA-CANOVAS, 2008; RUSSO *et al.*, 2007).

Aplicando sequencialmente dois contatos de reticulação, Zactiti e Kieckbusch (2005) desenvolveram uma metodologia de reticulação em dois estágios. No primeiro estágio os íons cálcio são adicionados diretamente na solução filmogênica, sendo obtido um filme com baixo grau de reticulação, com certa resistência mecânica e manuseabilidade, mas solúvel em água necessitando de uma reticulação complementar. Dessa maneira, os filmes retirados dos moldes são imersos em uma solução mais concentrada de cálcio (2º estágio de reticulação), onde os íons cálcio são agregados à estrutura polimérica através da difusão originando filmes menos hidrofílicos e pouco solúveis em água.

Carulo (2005) e Turbiani (2007) em seus trabalhos, verificaram que o grau de estruturação obtido no pré-filme (1º estágio de reticulação) é fundamental para otimizar os atributos dos filmes formados. Ocorre diminuição da massa de filme solubilizada em água e da permeabilidade ao vapor de água e a tensão de ruptura aumenta. O alongamento, no entanto, diminui drasticamente.

Dessa maneira, buscando minimizar a rigidez dos filmes de alginato Santana (2010) trabalhou com diversos agentes plastificantes enquanto que da Silva (2009) e Bierhalz (2010) trabalharam com filmes de alginato e quitosana e filmes de alginato e pectina, respectivamente, não se alcançando, entretanto, ganhos consideráveis de alongamento nas várias condições estudadas.

Em todos estes trabalhos os filmes são produzidos por alginato de sódio de média viscosidade e com maior proporção de Blocos M, proveniente das algas *Macrocystis pyrifera*. A literatura registra um número restrito de estudos sobre filmes, nos quais se compara o comportamento da estruturação com alginatos ricos em Bloco G e ricos em Blocos M. Olivas e Barbosa-Cánovas (2008) se limitam a comparar a permeabilidade ao vapor de água (menor em alginatos com M/G = 0,45) e Ashikin e colaboradores (2010) trabalharam com filmes de alginato sem que estes fossem reticulados com cálcio e verificaram que as propriedades mecânicas dos filmes e sua consequente cristalinidade são influenciadas pela temperatura de secagem e que soluções filmogênicas submetidas à secagem próximas da temperatura ambiente apresentam propriedades mecânicas e de coesividade mais adequadas.

Assim, a realização de um estudo comparativo das características dos filmes de alginato provenientes de diferentes fontes, reticulados em dois estágios com íons cálcio permite avaliar as possíveis melhorias nas propriedades mecânicas destes filmes.

2.3.2 Agentes plastificantes

Plastificantes são compostos orgânicos com baixa massa molar muito empregados no processamento de polímeros visando melhorias nas propriedades mecânicas como o aumento da flexibilidade e maior alongamento (GONTARD *et al.*, 1993).

Para que a estabilidade do material polimérico seja mantida durante o seu tempo de vida útil, o plastificante deve ser compatível com o polímero sendo capaz de se misturar e manter-se homogeneamente dissolvido. Sua volatilidade e sua taxa de difusão devem ser baixas, bem como sua concentração máxima admissível deve ser quantificada evitando o processo de exsudação e a separação de fases, características estas que influenciam negativamente nas propriedades do produto (DONHOWE; FENNEMA, 1993).

A plastificação de um polímero gera mudanças em suas propriedades físico-químicas as quais refletem em suas propriedades mecânicas. O agente plastificante modifica a organização molecular da matriz polimérica através da diminuição das forças de atração intermoleculares, as moléculas têm o seu volume livre aumentado e ganham maior mobilidade resultando no abaixamento da temperatura de transição vítrea e no aumento da flexibilidade e do alongamento do material (IRISSIN-MANGATA *et al.*, 2001; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005; LIMA *et al.*, 2007).

Dependendo da natureza hidrofóbica ou hidrofílica do plastificante as propriedades de barreira do filme também podem ser alteradas. Em filmes de polissacarídeos geralmente é necessário o uso de plastificantes hidrofílicos para alcançar o comportamento mecânico adequado devido à presença das hidroxilas. No entanto, a propriedade de barreira ao vapor de água e aos gases são reduzidas. Dessa maneira, o plastificante deve ser usado em quantidades que permitam a otimização das propriedades mecânicas e que gerem pequeno aumento na permeabilidade dos filmes (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005).

Dentre os plastificantes mais utilizados atualmente estão o glicerol, o sorbitol, o propileno glicol e o polietileno glicol. Entretanto, todos esses plastificantes apresentam caráter hidrofílico o que contribui para o aumento da susceptibilidade destes materiais a condições ambientais (SANTANA, 2010).

Empregando como plastificante o sorbitol, o glicerol e o lactato de sódio em filmes de alginato, Parris *et al.* (1995) verificaram que a menor permeabilidade foi

obtida para os filmes preparados com sorbitol como plastificante, seguido do glicerol e do lactato de sódio. Entretanto, os filmes utilizando sorbitol eram mais rígidos e quebradiços, enquanto que os de glicerol e lactato se mostraram mais elásticos.

Santana (2010) também estudou a influência do uso de vários plastificantes como o glicerol, o xilitol, o manitol e misturas de citrato de tributíla e glicerol nas propriedades dos filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio e verificou que o glicerol apresenta boa compatibilidade com a matriz deste polímero, originando filmes transparentes e com boas propriedades mecânicas.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ALGINATOS

O conhecimento das características físico-químicas do alginato é de fundamental importância para o entendimento da relação entre a estrutura apresentada pelo polímero e as propriedades de seus filmes, as quais consequentemente influenciam na definição de sua aplicação como embalagem.

Técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC), viscosimétricas e reométricas podem ser usadas neste sentido.

2.4.1 Determinação da composição

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de alta resolução é uma das técnicas mais versáteis e confiáveis para a determinação da estrutura molecular de materiais poliméricos bem como a sequência de copolímeros (CANEVAROLO, 2007).

Na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear a radiação eletromagnética é absorvida na região de frequência regida pelas características estruturais da amostra, a absorção é função de determinados núcleos da molécula como as dos isótopos ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O e ^{19}F sendo o espectro gerado um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades (SILVERSTEIN, 2007).

Por apresentar uma alta sensibilidade, a RMN ^1H é a principal técnica utilizada para a análise de biopolímeros (CANEVAROLO, 2007).

De acordo com Grasdalen (1983) nas cadeias de alginato os Blocos M e G podem assumir três configurações (MM, MG ou GM e GG) as quais emitem sinais na região de 5,20 a 4,00 ppm. Na região referente a 5,05 ppm (G), 4,67 ppm (M e GM) e 4,45 ppm (GG) são obtidas informações sobre a razão dos Blocos M e Blocos G e frações das configurações das cadeias intactas.

2.4.2 Determinação da massa molar

Polímeros diferenciam-se de outros materiais por possuírem cadeias longas, de alta massa molar, as quais conferem a estes materiais propriedades únicas. A massa molar média de um polímero é resultado do agrupamento de moléculas de vários tamanhos exibindo uma distribuição de massa molar (CANEVAROLO, 2007).

As propriedades mecânicas e o comportamento do polímero durante o processamento são altamente dependentes do tamanho médio e da distribuição de comprimentos das cadeias. Embora a estrutura química do polímero seja semelhante, massas molares diferentes podem mudar completamente as propriedades do polímero (propriedades físicas, mecânicas, térmicas, reológicas, de processamento e outras), e por esta razão, os polímeros são caracterizados principalmente por sua massa molar (LUCAS *et al.*, 2001).

A massa molar numérica média depende do número de moléculas de polímero presentes na solução, qualquer que seja sua estrutura ou tamanho (LUCAS *et al.*, 2001).

Para os alginatos, além da proporção e distribuição dos Blocos M e G, a determinação de sua massa molar também é muito importante para o entendimento de suas propriedades características (ZACTITI, 2004).

Métodos cromatográficos têm sido muito usados na determinação da massa molar de polímeros, sendo vários os trabalhos que relatam o emprego das técnicas cromatográficas na determinação da massa molar do alginato (LIU *et al.*, 2003; ZACTITI, 2004; da SILVA *et al.*, 2009).

Na Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) as moléculas do polímero são separadas de acordo com o seu tamanho efetivo, as moléculas menores penetram nos poros e possuem um tempo de retenção maior enquanto que as moléculas maiores eluem de forma mais rápida.

2.4.3 Determinação da viscosidade intrínseca (η_{int})

A viscosimetria é um segmento da mecânica dos fluidos que consiste na prática experimental de medir a resposta reológica dos fluidos, considerando-os puramente viscosos, desprezando a componente elástica. A determinação da medida de viscosidade em soluções poliméricas muito diluídas é convenientemente realizada em viscosímetro capilar dos tipos Ostwald Fenske ou Ubbelohde onde é medido do tempo de escoamento do fluido (MACHADO, 2002).

Segundo Kester e Fennema (1986) a viscosidade das soluções de alginato apresenta as seguintes características:

- Massa molar: quanto maior a massa molar, mais viscosa será a solução.
- Concentração da solução: quanto maior a concentração do polímero em solução, mais viscosa será a solução.

- Temperatura: soluções de alginato apresentam comportamento semelhante ao de outros fluidos em relação à influência da temperatura em sua viscosidade, sendo que a sua viscosidade decresce aproximadamente 2,5% por cada grau aumentado na temperatura. Este processo é reversível.

- pH: a viscosidade das soluções de alginato de sódio são quase independentes do pH na faixa entre 5,0 a 10,0, apresentando um valor ligeiramente maior perto da neutralidade (6,0-8,0) devido aos efeitos repulsivos dos grupos carboxílicos que mantêm estendidas as cadeias do polímero e aumentam a sua capacidade de união com as moléculas de água. Abaixo do pH 4,5 a viscosidade tende a aumentar pela diminuição da solubilidade do ácido algínico, o qual precipita na forma de gel (pH entre 3,0-3,5).

Os métodos viscosimétricos também permitem estimar os valores de massa molar de um determinado polímero pela aplicação da equação de Mark-Houwink (Equação 2.5). Smidsrød (1974) e Mancini *et al.* (1996) estudaram o comportamento do alginato em solução aquosa e verificaram que a viscosidade intrínseca está diretamente ligada ao volume ocupado pela molécula, à sua massa molar e à rigidez de suas cadeias poliméricas sendo que em condições nas quais as moléculas apresentam-se neutras (uso do solvente adequado) a Equação de Mark-Houwink (utilizando $K = 1,228 \cdot 10^{-4}$ e $a = 0,963$) pode ser usada para prever as massas molares viscosimétricas de alginatos de diferentes fontes.

Por ser uma técnica relativamente simples e barata ela é muito utilizada. Zactiti (2004), Carulo (2005), da Silva (2009) e Ashikin *et al.* (2010) utilizaram em seus estudos a técnica e determinação da viscosidade intrínseca para estimar a massa molar de suas amostras de alginato.

$$\eta_{int} = K (M_v)^a \quad \text{(Equação 2.5)}$$

onde: η_{int} é a viscosidade intrínseca; K e a são constantes dependentes do tipo de polímero, solvente e temperatura; M_v é a massa molar viscosimétrica do polímero.

2.4.4 Propriedades reológicas

A reologia estuda a deformação e o escoamento da matéria quando uma força externa é aplicada sobre ela (BIRD, 2005).

O sólido elástico é considerado um material com forma definida que, quando deformado por uma força externa, dentro de certos limites, retorna à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. Os fluidos viscosos não possuem forma geométrica definida e escoam irreversivelmente quando submetidos às tensões externas. Por outro lado, os polímeros são materiais que apresentam um comportamento intermediário entre o sólido elástico e o líquido viscoso sendo considerados materiais viscoelásticos (SCHRAMM, 2006).

A facilidade de um polissacarídeo se dissolver e o seu comportamento em solução dependem de sua estrutura química e de sua conformação. Em meio aquoso, grande parte dos polissacarídeos apresentam a capacidade de alterar as propriedades físicas da água elevando a viscosidade das soluções e, em algumas situações, criando através de interações físicas coesivas redes intermoleculares, que originam a formação de géis que podem ser entendidos como uma rede tridimensional a qual é obtida através de ligações das macromoléculas envoltas por um solvente (WHISTLER, 1973; MORRIS *et al.*, 1981).

As soluções polissacarídicas diluídas apresentam um comportamento semelhante ao de um fluido newtoniano; à medida que as soluções tornam-se mais concentradas o comportamento frequentemente observado é o pseudoplástico (WALTER, 1998).

A determinação das propriedades viscoelásticas de materiais pode ser realizada através de testes estáticos ou dinâmicos. Dentre as propriedades viscoelásticas determinadas nos testes dinâmicos estão o módulo de armazenamento ou de elasticidade (G') e o módulo de perda ou de viscosidade (G'') (MENDIETA-TABOATA *et al.*, 2008).

O módulo de elasticidade (G') e o módulo de perda (G'') representam, respectivamente, os graus relativos em que um material consegue se recuperar com uma resposta elástica ou com uma resposta viscosa, à medida que a taxa de deformação (frequência) muda. G' e também G'' aumentam linearmente com o aumento da frequência, mas um aumenta mais rapidamente que o outro. No ponto onde $G'=G''$, a frequência é denominada frequência cruzada.

A presença de ligações cruzadas não covalentes dificulta a descrição das propriedades físicas dessas redes, devido ao número e a posição destas ligações poderem variar com a temperatura e com o tempo. A reversibilidade dos géis físicos deve-se à natureza das interações envolvidas, todavia, esta reversibilidade está associada aos fenômenos de histerese (ROSS-MURPHY, 1995).

Os géis geralmente apresentam propriedades viscosas e elásticas, porém observa-se uma preponderância do módulo elástico (G') sobre o viscoso (G''). Quanto maior for o valor de G' , maior é o caráter sólido do gel (WALTER, 1998) e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (RAO, 1986).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

A caracterização de filmes biodegradáveis é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de embalagens alimentícias, pois revela informações sobre as suas propriedades de barreira, sua resistência mecânica, flexibilidade, manuseabilidade, solubilidade e até mesmo de seu aspecto visual permitindo definir e otimizar sua aplicação. Os métodos utilizados para a determinação das propriedades características dos filmes comestíveis são derivados dos métodos clássicos aplicados aos materiais sintéticos e, foram adaptados às características dos biofilmes, devido especialmente à sua grande sensibilidade à umidade relativa e à temperatura (GUILBERT *et al.*, 1996).

2.5.1 Aspecto visual e táctil

As propriedades ópticas e táteis dos biofilmes são consequências da morfologia, da estrutura química e da massa molar do polímero bem como da formulação e do processo de fabricação empregados. A adição de lipídios, o uso de plastificantes e o grau de reticulação também influem drasticamente nestas propriedades (CHEN, 1995; GUILBERT *et al.*, 1996; SOBRAL; HABITANTE, 1999; BERTUZZI *et al.*, 2007).

Filmes biodegradáveis devem ser facilmente manuseados e apresentar um aspecto homogêneo não contendo rupturas, partículas insolúveis, poros abertos e zonas de opacidade ou com diferença de cor. Essas características podem influenciar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes comprometendo qualidade do alimento e até mesmo a aceitação do produto pelo consumidor (CARVALHO, 1997; MARCOS *et al.*, 2010).

2.5.2 Espessura (δ)

A aplicação de biofilmes como embalagens alimentícias depende de uma série de fatores, bem como de sua espessura a qual deve ser controlada e padronizada garantindo a uniformidade do material e a validação das análises comparativas entre as suas propriedades (GENNADIOS *et al.*, 1993; SOBRAL; HABITANTE, 2001).

No processo de produção de filmes por *casting* a uniformidade da espessura pode ser obtida pela fixação do volume ou da massa de solução vertida sobre as placas de secagem desde que sejam mantidas as características das formulações e as condições de confecção dos filmes (SOBRAL; HABITANTE, 2001).

Filmes de alginato quando reticulados por diferentes métodos apresentaram espessuras variadas. Os filmes imersos diretamente na solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram menor espessura se comparados aos filmes que tiveram este mesmo reticulante adicionado em sua solução filmogênica. O decréscimo da

espessura dos filmes mergulhados na solução reticuladora possivelmente ocorreu devido à solubilização parcial da matriz polimérica. O aumento da concentração de cálcio na solução de imersão gerou filmes com maior grau de reticulação minimizando a sua solubilização, resultando em estruturas com maior espessura (RHIM, 2004).

A massa molar dos biopolímeros também influi na espessura final dos filmes. Polímeros com alta massa molar possuem maior número de cadeias e de maior comprimento aumentando o número de interações intermoleculares e refletindo em ganhos de resistência mecânica (CUQ *et al.*, 1996).

Em filmes de polissacarídeos, a permeabilidade do oxigênio e do gás carbônico diminui com o aumento da espessura devido a sua menor solubilidade na matriz polimérica, enquanto que a permeabilidade do vapor de água aumenta linearmente com o aumento da espessura do filme devido às tensões internas provocadas pela alteração da estrutura dos filmes (PARK; CHINNAN, 1995; CUQ *et al.*, 1996; SOBRAL; HABITANTE, 2001).

2.5.3 Propriedades mecânicas

Filmes poliméricos aplicados como embalagens alimentícias devem apresentar propriedades mecânicas adequadas, como resistência à ruptura, alongamento e flexibilidade garantindo a proteção do produto durante o seu manuseio, empacotamento, transporte e comercialização (ROBERTSON, 1993; GUILBERT *et al.*, 1996).

A resistência à ruptura ou tensão na ruptura é definida como sendo o esforço máximo que um material pode suportar antes de se romper e está relacionada com a magnitude das forças intermoleculares presentes na matriz polimérica. O alongamento na ruptura permite quantificar a capacidade máxima de um material se estender indicando a quantidade de energia que é absorvida antes do seu

rompimento (ROBERTSON, 1993; CUQ *et al.*, 1996; RHIM, 2004; LIMA *et al.*, 2007).

As propriedades mecânicas dos filmes poliméricos são diretamente afetadas pela natureza do material filmogênico como extensão da cadeia polimérica, geometria, distribuição de massa molar e natureza e posição dos grupos laterais bem como, pela coesão da matriz polimérica, a qual depende da distribuição, da concentração e da força das ligações inter e intramoleculares na estrutura filmogênica. As condições de formação, o processo de elaboração e os aditivos utilizados como plastificantes e agentes reticulantes também influem no comportamento mecânico dos filmes (CUQ *et al.*, 1996).

Polissacarídeos apresentam elevada resistência à tração e pequeno alongamento, devido à sua estrutura molecular linear (CHEN, 1995).

O tratamento de filmes de alginato com íons Ca^{2+} eleva os valores de resistência à tração e diminuem o valor de alongamento. A adição de plastificantes tem sido uma alternativa para reduzir a fragilidade e melhorar o escoamento e a flexibilidade dos filmes (RHIM, 2004; LIMA *et al.*, 2007; OLIVAS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2008; ZACTITI; KIECKBUSCH, 2009; SANTANA, 2010; BIERHALZ, 2010).

2.5.4 Propriedades de barreira - permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Embalagens biodegradáveis com boas propriedades de barreira à umidade podem garantir a qualidade e a estabilidade do alimento evitando o seu ressecamento, a ação de microrganismos e alterações organolépticas (KESTER; FENNEMA, 1986; GONTARD *et al.*, 1996; CHEN *et al.* 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1996; SOBRAL; HABITANTE, 2001).

Geralmente, a transmissão de vapor de água através de filmes hidrofílicos depende da difusividade e solubilidade da molécula de água na matriz polimérica. O vapor de água é absorvido pela superfície do polímero e difunde através dos

poros presentes na cadeia polimérica sendo desorvido na superfície aposta do filme (KESTER; FENNEMA, 1986; McHUGH; KROCHTA, 1994).

Fatores como a natureza e estrutura do material permeante, o grau de interação entre as cadeias poliméricas e o uso de agentes plastificantes e reticulantes influem na taxa de permeabilidade do vapor de água (ROGERS, 1985; KESTER; FENNEMA, 1986; McHUGH; KROCHTA, 1994).

Filmes com maior densidade, mais cristalinos e com maior massa molar assim como, filmes que possuem uma matriz formada por cadeias poliméricas lineares são menos permeáveis ao vapor de água devido ao seu maior empacotamento. A presença de cadeias laterais na matriz conduz a um aumento nos espaços livres facilitando a difusão do permeante (GUILBERT *et al.*, 1996; McHUGH; KROCHTA, 1994).

O aumento no espaçamento entre as cadeias do polímero devido à inclusão de moléculas de plastificante pode facilitar a difusividade do vapor de água. O glicerol é altamente hidrofílico favorecendo a absorção de moléculas de água contribuindo desta maneira para o aumento da permeabilidade ao vapor de água (GONTARD *et al.*, 1993).

A permeabilidade ao vapor de água pode ser diminuída com o aumento da hidrofobicidade da matriz polimérica através da adição de lipídios ou através da tecnologia de laminação. A incorporação de certos lipídios, entretanto, resulta em efeito adverso nas propriedades mecânicas e óticas dos filmes (YANG; PAULSON, 2000b).

O efeito de possíveis variações das propriedades de barreira, como consequência da variação da espessura dos filmes, nem sempre é considerado, mas é fundamental. Segundo Chen (1995), a permeabilidade ao vapor de água de biofilmes aumenta com a espessura enquanto a permeabilidade aos gases diminui (maior interação com o CO₂). Para grande parte dos polissacarídeos observa-se uma relação inversa entre a permeabilidade ao vapor de água e aos gases carbônico e oxigênio. Polímeros que apresentam pobre barreira à umidade podem

conferir uma efetiva proteção contra oxidação de lipídios e outros componentes alimentícios (BANKER, 1966).

Para filmes de alginato a permeabilidade ao vapor de água é diminuída aumentando-se o grau de reticulação. O alginato possui cadeias lineares que após a reticulação com íons Ca^{2+} tem sua mobilidade diminuída, reduzindo desta maneira a difusividade da água através do filme, levando a uma diminuição na PVA. Rhim (2004) reticulou filmes de alginato com soluções de cloreto de cálcio com várias concentrações e comprovou que os filmes com maior grau de reticulação apresentaram melhores resultados de barreira ao vapor de água. Zactiti (2004) também comprovou que o tratamento com íons cálcio diminuiu em 15% a permeabilidade ao vapor de água de filmes de alginato.

A literatura descreve diversos métodos para a determinação da permeabilidade ao vapor de água, sendo o método gravimétrico o mais utilizado em estudos com biofilmes devido ao seu baixo custo e facilidade de realização. Este método é baseado no aumento de peso de um material higroscópico colocado no interior de uma cápsula impermeável e isolado do meio ambiente pelo biofilme, cuja taxa de permeabilidade se deseja conhecer. A cápsula é colocada em um ambiente com umidade relativa e temperatura constante e o ganho de peso da cápsula ao longo do tempo é usado para calcular a taxa de permeabilidade através do material (SOBRAL; HABITANTE, 2001).

2.5.5 Solubilidade

A solubilidade de filmes poliméricos pode ser quantificada através da determinação da matéria seca que é solubilizada após 24 horas de imersão em água.

Em sistemas em que se deseja uma barreira protetora evitando as perdas de umidade como as embalagens para alimentos com alta atividade de água é necessário que o filme seja insolúvel. Em sistemas onde os produtos exigem

hidratação prévia ao consumo faz-se interessante como em *sachets*, por exemplo, que esses filmes apresentem alta solubilidade (BATISTA, 2004).

De modo geral, a adição de plastificantes tende a aumentar a solubilidade dos filmes. Em filmes reticulados, entretanto, esse efeito pode ser menos pronunciado. As moléculas de plastificante podem permanecer fortemente ligadas à estrutura reticulada do polímero dificultando, dessa maneira, a sua liberação para a solução (IRISSIN-MANGATA *et al.*, 2001).

A solubilidade dos filmes pode ser minimizada através da adição de componentes hidrofóbicos como lipídios e ceras que, entretanto, podem induzir a perdas nas propriedades ópticas e mecânicas (MARTIN-POLO *et al.*, 1992; BATISTA, 2004; CARULO, 2005).

Uma vez que a energia de interação solvente-polímero depende da distância intramolecular, polímeros cujas cadeias apresentam melhor empacotamento são menos solúveis. Outra alternativa que pode ser aplicada para a redução da solubilidade dos filmes é o processo de reticulação com íons divalentes, pois há a formação de uma rede tridimensional que impede a separação das cadeias e a passagem do solvente através do filme (BIERHALZ, 2010).

2.5.6 Intumescimento (I)

O mecanismo de intumescimento dos filmes poliméricos inicia-se com o umedecimento de sua superfície seguida pela difusão das moléculas do solvente para o interior de sua matriz, alterando o seu arranjo espacial e aumentando o seu volume. No entanto, este processo é limitado pelas ligações inter e intramoleculares, pela rigidez intrínseca do polímero e pelo grau de reticulação (LUCAS *et al.*, 2001; SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008).

Em filmes de alginato a capacidade de absorção de água é facilitada pela presença de grupos carboxílicos que se associam às moléculas de água. O aumento no grau de reticulação dos filmes diminui a disponibilidade destes grupos

e, conseqüentemente, do processo de absorção (DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2010).

Para filmes ativos, a absorção de água pode influenciar no processo de liberação do agente antimicrobiano, sendo um fator importante a ser avaliado (ZACTITI, 2004).

2.5.7. Observações microscópicas

Observações microscópicas são técnicas complementares de caracterização estrutural muito úteis, pois permitem correlacionar a microestrutura dos filmes poliméricos com seus defeitos e prever o seu comportamento como embalagem (BIERHALZ, 2010).

A microscopia óptica de varredura (MEV) é uma técnica versátil que permite a análise da superfície e da secção transversal dos filmes. O seu resultado é uma imagem de fácil interpretação com profundidade de campo bastante alta, permitindo o estudo morfológico de amostras relativamente espessas com uma preparação mínima, usualmente um revestimento condutivo (MARCOS *et al.*, 2010).

Neste capítulo estão apresentados os materiais e as metodologias empregados nos procedimentos analíticos como: caracterização dos diferentes tipos de alginato, adequação da metodologia de preparo dos filmes, caracterização destes filmes e processo de liberação do agente antimicrobiano.

3.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

Para a realização deste estudo foram utilizados quatro tipos de alginato de sódio (FMC BioPolymer, EUA) com características distintas, extraídos das algas *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria hyperborica*. As informações cedidas pelo fornecedor quanto aos alginatos estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Denominação, relação M/G e nível de viscosidade de amostras de alginato de sódio usados na pesquisa.

| Alginato | Relação M/G | Viscosidade | Origem/Alga |
|----------|-------------|-------------|------------------------------|
| MM | Alto M | Média | <i>Macrocystis pyrifera</i> |
| MA | Alto M | Alta | <i>Macrocystis pyrifera</i> |
| GM | Alto G | Média | <i>Laminaria hyperborica</i> |
| GA | Alto G | Alta | <i>Laminaria hyperborica</i> |

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

Para o preparo dos filmes ativos, a natamicina Natamax® (Danisco, Dinamarca) foi empregada como agente antifúngico.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ALGINATOS

3.2.1 Determinação da composição

A proporção molar dos resíduos do ácido β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G) (M/G) e a fração molar de GG, MM e GM (MG) e as sequências F_{GG} , F_{MM} e $F_{GM,MG}$ foram determinadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H em D_2O a 37°C e 400 MHz, conforme Mendonça *et al.* (2011).

As análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, Portugal, utilizando um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III 400 MHz (Alemanha).

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do *software* MestReNova 6.0.2-5475 (Mestrelab Research S.L., Espanha) e calculados utilizando as Equações (3.1) a (3.5), conforme Grasdalen (1983).

$$F_G = (I_{5,05}) / (I_{4,67} + I_{4,45}) \quad (\text{Equação 3.1})$$

$$F_{GG} = (I_{4,45}) / (I_{4,67} + I_{4,45}) \quad (\text{Equação 3.2})$$

$$F_G + F_M = 1 \quad (\text{Equação 3.3})$$

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G \quad (\text{Equação 3.4})$$

$$F_{MM} + F_{MG} = F_M \quad (\text{Equação 3.5})$$

onde: $I_{5,05}$, $I_{4,67}$, $I_{4,45}$ é a intensidade dos picos; F_G é a fração molar dos Blocos G; F_M é a fração molar dos Blocos M e F_{GG} , F_{GM} , F_{MM} e F_{MG} são as frações molares das sequências GG; GM; MM e MG.

3.2.2 Determinação da massa molar média

As análises foram realizadas no Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais (LPRC) da FEQ/UNICAMP utilizando a técnica de Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) em sistema cromatográfico Shimadzu (Japão) (bombas Shimadzu LC-10 AS, injetor manual Shimadzu 2D, detector de índice de refração Shimadzu RID-6A e integrador Shimadzu) com uma coluna de filtração em gel Polysep-GFC (35 X 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, Califórnia, EUA).

A fase móvel isocrática usada foi o nitrato de sódio 0,1 mol/L a uma vazão de 1,0 mL/min. A calibração da coluna foi feita indiretamente usando padrões de dextrana com massa molar na faixa de 10^3 a 10^6 Da (5,2; 23,8; 148; 273; 1100; 2100; 4200; 5900; 7400 kDa) e as massas molares médias dos alginatos estudados foram determinadas com base no tempo de retenção das amostras injetadas.

3.2.3 Determinação da viscosidade intrínseca (η_{int})

Para a determinação da viscosidade intrínseca (η_{int}), amostras dos alginatos MM, MA, GM e GA foram diluídas em NaCl 0,1 mol/L, nas seguintes concentrações 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 e 0,30 g/dL.

Os ensaios utilizaram um viscosímetro capilar do tipo Ostwald-Cannon-Fenske (200) e foram realizados a 25°C, sendo a temperatura controlada através de um banho com recirculação ultratermostático (Nova Ética, Brasil), com controle de temperatura de $\pm 0,1$ °C. O volume da solução no viscosímetro foi mantido constante (8,0 mL) e o tempo de escoamento entre os pontos A e B foi registrado

(Figura 3.1). Para cada solução foram realizadas cinco medidas de tempo de escoamento.

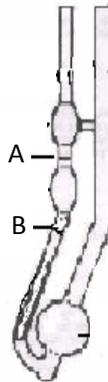


Figura 3.1 – Esquema de um viscosímetro modelo Ostwald-Cannon-Fenske.

Para a determinação das viscosidades específica (η_{esp}) e relativa (η_r) foram utilizadas as Equações 3.6 a 3.10 (LUCAS *et al.*, 2001). A viscosidade intrínseca (η_{int}) foi determinada pela extrapolação da curva (η_{esp})/C *versus* C até zero e ($\ln \eta_r$)/C *versus* C até zero, verificando o valor no qual o eixo foi interceptado.

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad \text{(Equação 3.6)}$$

$$\eta_{esp} = \eta_r - 1 = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{(Equação 3.7)}$$

$$\eta_{esp.red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad \text{(Equação 3.8)}$$

$$\eta_{ine} = \frac{\ln \eta_r}{C} \quad \text{(Equação 3.9)}$$

$$\eta_{int} = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{ine} = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{esp.red} \quad \text{(Equação 3.10)}$$

onde: η_r é a viscosidade relativa [adimensional]; η_{esp} é a viscosidade específica [adimensional]; $\eta_{esp.red}$ é a viscosidade específica reduzida [dL/g]; η_{ine} é a

viscosidade inerente [dL/g]; η_{int} é a viscosidade intrínseca [dL/g]; t é o tempo de escoamento da solução no viscosímetro [s]; t_0 é o tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro [s]; C é a concentração do polímero na solução [g/dL].

Através do método viscosimétrico também foi possível estimar os valores de massa molar viscosimétrica das diferentes amostras de alginato utilizando-se a equação de Mark-Houwink com $K = 1,228 \cdot 10^{-4}$ e $a = 0,963$ (Equação 2.5), conforme proposto por Smidsrød (1974) e Mancini *et al.* (1996).

3.2.4 Caracterização reológica

Os ensaios reológicos foram realizados no Departamento de Físico-química do Instituto de Química da UNICAMP utilizando um reômetro Haake, modelo RheoStress 1 (Haake Inc., Alemanha) com sistema cone-placa. O diâmetro e o ângulo do cone foram de 50 mm e 0,04 radianos, respectivamente, conforme a Figura 3.2.

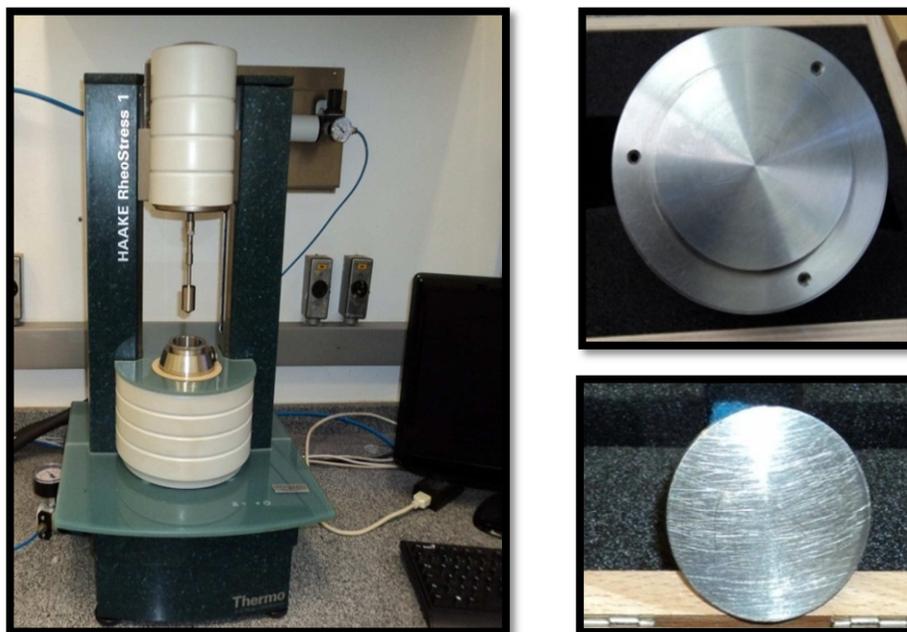


Figura 3.2 – Reômetro e sistema cone-placa utilizado nos ensaios reológicos.

A temperatura dos ensaios foi controlada através de um banho com recirculação modelo ThermoHaake DC-30 (Haake Inc., Alemanha), com controle de temperatura de $\pm 0,1$ °C. As medidas oscilatórias foram conduzidas na região viscoelástica linear em uma faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz. Os módulos de elástico (G') e viscoso (G'') foram obtidos em função da frequência na região viscoelástica.

As características reológicas de 13 diferentes soluções, especificadas na Tabela 3.2, foram determinadas para cada um dos quatro alginatos, a uma temperatura de 25°C.

Tabela 3.2 - Denominação e composição das soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA usadas nos ensaios reológicos.

| Formulação | g alginato/100 mL água | g glicerol/g alginato | mg Ca ⁺² /g alginato |
|------------|------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| AA.I | 0,50 | - | - |
| AA.II | 1,00 | - | - |
| AA.III | 1,50 | - | - |
| AA.IV | 2,00 | - | - |
| AAG.I | 1,50 | 0,30 | - |
| AAG.II | 1,50 | 0,60 | - |
| AAG.III | 1,50 | 1,20 | - |
| AAC.I | 1,50 | - | 6,80 |
| AAC.II | 1,50 | - | 8,16 |
| AAC.III | 1,50 | - | 19,04 |
| AAC.IV | 1,50 | - | 21,76 |
| AAGC.I | 1,50 | 0,60 | 6,80 |
| AAGC.II | 1,50 | 0,60 | 8,16 |

As quatro soluções alginato-água (AA) foram preparadas adicionando o alginato à água (temperatura ambiente), sob agitação mecânica de 900 rpm (Tecnal, modelo TE-139, Brasil) e mantendo-se a agitação por 1 hora.

As outras soluções estão baseadas na solução AA.III, isto é, soluções contendo 1,50 g de alginato em 100 mL de água. As soluções AAG foram preparadas solubilizando o glicerol em água (temperatura ambiente) e então adicionando-se 1,50 g de alginato por cada 100 mL de água.

No preparo das soluções AAC partiu-se de soluções AA.III já formadas que foram aquecidas a 70°C utilizando uma manta aquecedora (Fisaton, modelo 67, São Paulo, Brasil) e pré-reticuladas com quantidades crescentes de íons Ca^{2+} (Tabela 3.2). A adição do cálcio foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo 77120-70, EUA) a uma vazão de 1,0 mL/min.

As soluções AAGC foram preparadas com base na solução AAG.II sendo também aquecidas e reticuladas em condições semelhantes às empregadas para as soluções AAC.

3.3 PREPARO DOS FILMES DE ALGINATO DE CÁLCIO

Os filmes de alginato foram preparados por *casting*, tendo como base a metodologia desenvolvida por Zactiti e Kieckbusch (2005), a qual consiste em dois estágios de reticulação, conforme a Figura 3.3.

No primeiro estágio, o glicerol (0,6 g/g alginato) foi solubilizado em água destilada sob agitação mecânica de 900 rpm (Tecnal, modelo TE-139, Brasil) por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 1,5 g alginato/100 mL água destilada mantendo-se as mesmas condições de agitação por 1 hora, visando à perfeita dissolução do polímero.

A solução filmogênica foi aquecida a 70°C utilizando uma manta aquecedora (Fisaton, modelo 67, Brasil) e pré-reticulada com 30 mL de solução diluída de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ obedecendo a uma vazão de 1,0 mL/min com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo 77120-70, EUA).

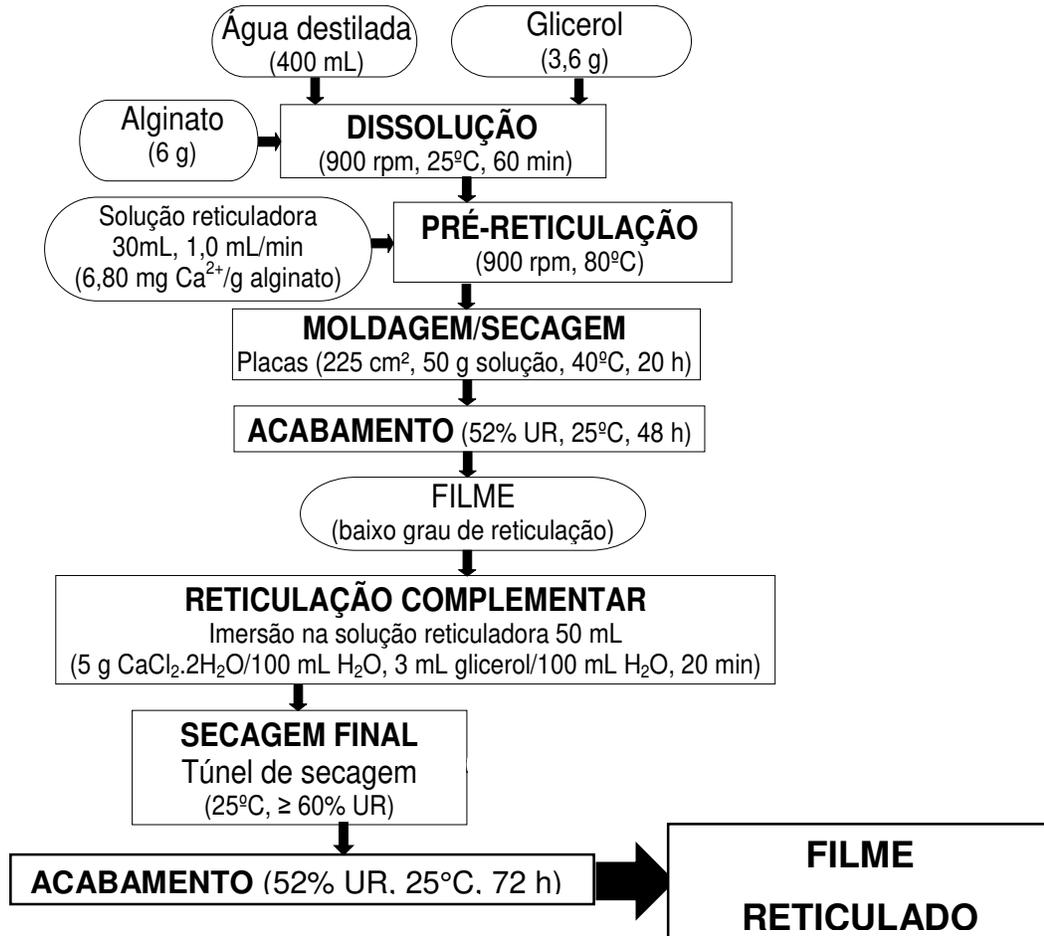


Figura 3.3 - Fluxograma do processo de preparo dos filmes de alginato.

Com a solução, ainda quente, alíquotas de 50 g foram vertidas em placas de acrílico de 225 cm² de área e mantidas por 20 horas em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 099EV, Brasil) a 40°C. Os filmes foram retirados das placas

e armazenados por 48 horas em ambiente climatizado a 25°C e 52% de umidade relativa. Estes filmes são denominados de pré-filmes ou filmes de 1º estágio.

No segundo estágio, os filmes obtidos na primeira etapa sofreram uma reticulação complementar por imersão total em 50 mL de solução de cloreto de cálcio e glicerol durante um período de tempo definido.

Os filmes foram secos em um túnel com circulação de ar a 25°C e umidade relativa superior a 60% (Figura 3.4) e permaneceram por 72 horas em ambiente a 52% UR e 25°C para equilíbrio e homogeneização antes de serem caracterizados.



Figura 3.4 - Túnel com circulação de ar usado na secagem dos filmes após a reticulação complementar.

3.3.1 Preparo dos filmes: definição do 1º estágio de reticulação

Ensaio preliminares foram realizados para determinar a concentração adequada de íons Ca^{2+} a ser adicionada no 1º estágio de reticulação dos filmes dos alginatos MM, MA, GM e GA. Soluções dos alginatos foram pré-reticuladas com quantidades crescentes de íons Ca^{2+} (contidos em 30 mL de solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) conforme a Tabela 3.3.

Filmes do 1º estágio de reticulação foram preparados com as formulações que não apresentaram pontos de gelificação e dificuldade de espalhamento da solução na placa.

As estruturas produzidas tiveram o seu aspecto visual avaliado e após 48 horas em ambiente climatizado a 25°C e 52% de umidade relativa, foram caracterizadas quanto à solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, umidade, propriedades mecânicas (tensão de ruptura e alongamento) e conteúdo de cálcio.

As quantidades de glicerol (0,6 g/g alginato) e alginato (1,5 g alginato/100 mL água destilada) presentes na solução filmogênica correspondem às usadas nos demais trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisas do LEPPbio possibilitando a comparação entre os resultados (ZACTITI, 2004; DA SILVA, 2009; BIERHALZ, 2010).

Tabela 3.3 - Quantidade de íons Ca^{2+} adicionada no 1º estágio de reticulação das soluções de alginato.

| Alginato | Concentração da solução reticuladora $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [%] | mg Ca^{+2} /g alginato |
|--------------------|--|---------------------------------|
| MM, MA, GM e GA | 0,2 | 2,72 |
| | 0,4 | 5,44 |
| | 0,5 | 6,80 |
| | 0,6 | 8,16 |
| | 0,8 | 10,88 |
| | 1,0 | 13,60 |
| | 1,2 | 16,32 |
| | 1,4 | 19,04 |
| | 1,6 | 21,76 |

3.3.2 Preparo dos filmes: definição do 2º estágio de reticulação

As formulações de filmes de 1º estágio confeccionados com alginatos MM, MA, GM e GA que se mostraram promissoras em termos de manuseio e aparência tiveram seu comportamento estudado perante a reticulação complementar (2º estágio) sendo avaliado:

- A influência do tempo de imersão dos filmes de alginato na solução reticuladora;
- A influência da concentração de glicerol na solução reticuladora;
- A influência da concentração de íons cálcio na solução reticuladora.

Na Tabela 3.4, estão apresentadas os parâmetros de tempo e concentrações de glicerol e íons cálcio usados nos ensaios para a definição das condições do 2º estágio de reticulação.

Tabela 3.4 - Tempo de imersão, quantidade de glicerol e íons Ca^{+2} adicionados no 2º estágio de reticulação.

| Alginato | Tempo de imersão [min] | glicerol mL/100 | $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ g /100 |
|--------------------|---------------------------|-----------------|---|
| | | mL água | mL água |
| MM, MA, GM e GA | 10, 20 e 30 | 3 | 3, 5 e 8 |
| | | 6 | 3, 5 e 8 |
| | | 9 | 3, 5 e 8 |
| | | 12 | 3, 5 e 8 |

Após 72 horas em ambiente a 52% UR e 25°C, os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual, à solubilidade em água, umidade, permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas (tensão de ruptura e alongamento) e conteúdo de cálcio.

Os filmes dos alginatos MM, MA, GM e GA que apresentaram as melhores propriedades foram caracterizados complementarmente quanto à sua morfologia, cor e opacidade.

3.3.3 Confeção dos filmes ativos de alginato

Os filmes dos alginatos MM, MA, GM e GA que apresentaram as melhores propriedades serviram como base para o preparo dos respectivos filmes ativos que foram confeccionados de acordo com da Silva (2009). A natamicina foi adicionada à solução filmogênica durante o 1º estágio, após sua pré-reticulação, na concentração de 4% em relação à quantidade total de alginato, mantendo-se o aquecimento e a agitação por 10 minutos.

Após 72 horas em ambiente a 52% UR e 25°C, os filmes ativos MM, MA, GM e GA e suas respectivas estruturas contendo natamicina em sua formulação foram caracterizados quanto ao aspecto visual, à solubilidade em água, umidade, permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas (tensão de ruptura e alongamento) e complementarmente quanto à sua morfologia e grau de intumescimento.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES

As amostras de filmes foram caracterizadas quanto ao seu aspecto visual, espessura, conteúdo de umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, grau de intumescimento e resistência mecânica.

Além das características citadas, esses filmes foram submetidos a observações microscópicas de sua microestrutura, quantificação do teor de cálcio e da cor e opacidade.

3.4.1 Aspecto visual

Análises visuais e táteis foram realizadas de forma subjetiva visando selecionar as formulações que originaram filmes homogêneos (com coloração uniforme e ausência de partículas insolúveis), contínuos (sem a presença de rupturas e regiões quebradiças) flexíveis, não apresentando dificuldades para se desprender do suporte e serem facilmente manuseados.

3.4.2 Espessura (δ)

A espessura dos filmes foi controlada através da adição de uma massa constante de solução filmogênica na placa.

Foram realizadas 10 medições, de maneira distribuída, na superfície do filme utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo, MDC-25S, resolução 0,001 mm, Japão).

3.4.3 Conteúdo de umidade (ω)

O conteúdo de umidade dos filmes foi determinado através de análises gravimétricas realizadas em estufa a vácuo (Lab-Line, Squaroid, EUA), a 105°C durante 24 h. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.4 Massa solubilizada em água (MS)

A solubilidade dos filmes de alginato em água (MS), foi determinada segundo metodologia proposta por Irissin-Mangata *et al.* (2001).

A umidade (ω) do filme foi pré-determinada conforme o Item 3.4.3. Outra amostra do mesmo filme (m_o) foi imersa em 50 mL de água destilada e o sistema

mantido sob agitação lenta e periódica (150 rpm) à 25 °C por 24 h, utilizando um banho de agitação (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, EUA).

A amostra foi seca em estufa para determinação da massa não solúvel (m_f). A matéria solubilizada é expressa em função da massa seca inicial conforme a Equação 3.11.

$$MS = \frac{m_0(1-\omega) - m_f}{m_0(1-\omega)} \quad (\text{Equação 3.11})$$

3.4.5 Intumescimento (I)

O intumescimento dos filmes foi determinado segundo a metodologia proposta por Xu *et al.* (2003).

A massa inicial (m_0) de uma amostra circular de filme de 2,5 cm de diâmetro foi quantificada e imersa em água destilada por diferentes períodos de tempo a fim de conhecer o tempo de estabilização. A superfície do filme era enxugada entre papéis de filtro antes de cada pesagem, tendo-se o cuidado para não pressionar o filme, determinando-se a massa do filme úmido (m_u).

O intumescimento dos filmes foi calculado em função da massa total inicial da amostra (Equação 3.12). A análise foi realizada com três repetições.

$$I = \frac{m_u - m_0}{m_0} \quad (\text{Equação 3.12})$$

3.4.6 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água foi determinado de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995a).

Amostras dos filmes foram seladas sob a abertura circular da tampa de uma célula de permeação com abertura central de 46,24 cm², feita de acrílico preenchida com cloreto de cálcio granulado (Ecibra, Brasil).

Estas células foram colocadas em recipientes hermeticamente fechados (500 mL) contendo em seu fundo uma solução super-saturada de cloreto de sódio (Synth, Brasil) a 25°C para manter a umidade relativa em 75%. O volume interior da célula era de 30 mL enquanto que o volume livre do recipiente era de 400 mL (Figura 3.5).



Figura 3.5 – Sistema utilizado na determinação da permeabilidade ao vapor de água.

Após 2 horas, a massa das células foi determinada a cada 12 horas por 3 dias utilizando uma balança analítica AY 220 (Shimadzu, Japão).

A variação de massa da célula com o tempo corresponde à taxa de água que permeou pelo filme e que foi usada na Equação 3.13 para calcular a PVA.

$$PVA = F \cdot \frac{G \cdot \delta}{A_e \cdot \Delta P_{H_2O}} \quad (\text{Equação 3.13})$$

onde: PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água [(g.mm/m².dia.kPa)]; δ é a espessura média do filme no final do experimento [mm]; G é a taxa de massa do sistema [g/dia]; A_e é a área de permeação do filme [m²]; ΔP_{H_2O} é diferença de pressão parcial de vapor de 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. Nas condições de uso, essa correção era maior que 0,99 sendo adotado o valor de 1,0 (McHUGH; KROCHTA, 1994).

3.4.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes como tensão na ruptura (TR) e o alongamento na ruptura (A) foram determinadas à temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 50% ($\pm 5\%$) utilizando um texturômetro TA.XT2 (Stable Micro Systems SMD, Inglaterra), de acordo com as normas ASTM D882 (ASTM, 1995b).

Dez amostras de filmes com dimensões de 10 X 2,54 cm tiveram a espessura pré-determinada pela média aritmética de dez medidas em pontos aleatórios nos filmes. As amostras foram fixadas por duas garras corrugadas distantes 5 cm entre si e que se afastavam a uma velocidade de 0,1 cm/s.

A tensão de ruptura foi expressa como a força máxima no rompimento dividida pela área da secção transversal inicial da amostra (Equação 3.14) e o alongamento como o percentual da distância original (Equação 3.15).

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (\text{Equação 3.14})$$

$$A = \frac{d}{d_0} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3.15})$$

onde: TR é a tensão na ruptura [MPa]; F_m é a força máxima no rompimento [N]; A_s é a área de secção transversal da amostra do filme [mm^2]; 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].

3.4.8 Determinação do conteúdo de cálcio

A determinação da concentração de cálcio foi realizada nos filmes que apresentaram propriedades otimizadas, com 1° e 2° estágios de reticulação.

Amostras dos filmes com aproximadamente 8 mg foram dissolvidas em 10 mL de uma solução de citrato de sódio 2% e diluídas em água destilada na proporção de 1:25, conforme Sriamornsak e Kennedy (2008).

As leituras foram efetuadas em um espectrofotômetro de absorção atômica com chama (Perkin-Elmer, modelo 373, EUA) utilizando uma lâmpada de cátodo oco de cálcio como fonte de radiação primária, no modo de absorção com sistema de combustão ar-acetileno. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Filmes reticulados com e sem natamicina em sua formulação tiveram a morfologia de sua superfície e da seção transversal analisadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando-se um microscópio (LEO, modelo DMLM, EUA) acoplado ao computador LEO Q500IW. As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da FEQ/UNICAMP.

As amostras foram mantidas em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro por sete dias antes da realização das análises.

3.4.10 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi determinada por meio de um colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Faifax, EUA), segundo Sobral e Habitante (2001). As análises foram realizadas simulando a luz do dia (modo D₆₅) e com área de medida de 30 mm².

Três leituras em cada lado dos filmes com três repetições foram realizadas utilizando-se os padrões CIELab: 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^*) foi calculada de acordo com a Equação 3.16.

$$\Delta E^* = [(L^* - L_p^*)^2 + (a^* - a_p^*)^2 + (b^* - b_p^*)^2]^{0,5} \quad (\text{Equação 3.16})$$

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

O ângulo Hue (H) foi determinado permitindo avaliar a tonalidade e a intensidade da cor dos filmes, os cálculos utilizaram as Equações 3.17 e 3.18.

$$H = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Equação 3.17})$$

$$C_R = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (\text{Equação 3.18})$$

onde: H é o ângulo Hue; C_R é o croma; a^* e b^* são parâmetros de luminosidade.

A opacidade dos filmes foi obtida de acordo com o método Hunterlab (Sobral, 1999), utilizando-se o colorímetro no modo transmitância. O equipamento foi calibrado com um fundo padrão branco e um fundo padrão preto. As análises foram realizadas em triplicada e os cálculos utilizaram a Equação 3.19.

$$Y = \left(\frac{Y_p}{Y_b} \right) .100 \quad (\text{Equação 3.19})$$

onde: Y é a opacidade do filme [%]; Y_p é a opacidade do filme sobreposto a um fundo preto; Y_b é a opacidade do filme sobreposto a um fundo branco.

3.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA NATAMICINA EM ÁGUA

Para o ensaio de liberação da natamicina em água, amostras de filmes ativos com dimensões 4 X 4 cm foram colocadas em recipientes contendo 25 mL de água destilada. Os recipientes foram dispostos em um banho (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, EUA) e mantidos sob agitação e temperatura de 25°C, com a finalidade de minimizar possível resistência por convecção de massa.

No tempo zero as amostras dos filmes foram mergulhadas no primeiro recipiente e, após um intervalo de tempo pré-determinado foram transferidas para o segundo recipiente, e assim sucessivamente (ZACTITI, 2004).

A concentração do agente antimicrobiano na solução foi determinada por espectrofotometria UV/Vis utilizando um espectrofotômetro (HP, modelo 8453, EUA), equipado com controlador de temperatura HP 89090A e *software* UV-Visible Chem Station. Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 290 a 350 nm e a concentração de natamicina foi determinada como a terceira derivada pela amplitude do pico em 317 nm e calculada a partir da Equação 3.20, resultante da curva padrão da natamicina (da SILVA, 2009).

$$C_N = -0,0022 \left(\frac{d^3 abs}{d\lambda^3} \right) \quad \text{(Equação 3.20)}$$

onde: C_N é a concentração de natamicina em ppm; $\frac{d^3 abs}{d\lambda^3}$ é a leitura da absorbância em terceira derivada no pico da natamicina.

A massa do agente antimicrobiano liberada no tempo t (M_t) e as frações de massa liberadas (M_t/M_∞) foram calculadas e plotadas em função do tempo.

A quantidade de agente antimicrobiano que poderia ser liberada em um tempo infinito (M_{∞}) foi considerada como a massa a partir da qual não houve mais variação considerável.

A massa total de natamicina transferida dos filmes para o sorvedouro foi determinada através da Equação (2.2).

Para soluções em tempos curtos a difusividade efetiva do agente antimicrobiano foi calculada a partir do ajuste linear da reta obtida ao plotar-se (M_t/M_{∞}) em função da raiz do tempo, conforme Equação (2.4).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada através do método de análise de variância (ANOVA).

O Teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas entre as médias, a um nível de probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

Estas análises foram realizadas com auxílio do *software* Statistica 7.0 (Stasoft, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo contém os resultados obtidos neste estudo bem como as discussões pertinentes. Os alginatos MM, MA, GM e GA foram caracterizados quanto à sua composição, massa molar, viscosidade intrínseca e comportamento reológico. Essas caracterizações permitiram relacionar a estrutura do biopolímero com suas propriedades físico-químicas e até mesmo otimizar suas aplicações. Ensaio preliminares foram realizados visando determinar as condições ótimas de preparo bem como compreender o comportamento dos alginatos de diferentes composições frente ao mecanismo de reticulação com íons cálcio, influência da concentração do agente plastificante e do tempo de imersão na solução reticuladora o que permitiu definir os filmes com melhores propriedades, os quais passaram por uma caracterização complementar. Filmes ativos, contendo antifúngico, também foram caracterizados, sendo o mecanismo de liberação avaliado para os alginatos de características distintas.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ALGINATOS

4.1.1 Determinação da composição

Em alginatos a relação de proporcionalidade existente entre os Blocos M e Blocos G (M/G) e a distribuição sequencial destes monômeros na cadeia polimérica definem as características físico-químicas e reológicas deste polímero.

A proporção entre os Blocos M e G e a fração molar dos Blocos M, Blocos G, Blocos GG, Blocos MM e Blocos MG ou GM dos alginatos provenientes das algas *Macrocystis pyrifera* (MM e MA) e *Laminaria hyperboria* (GM e GA) foram

determinadas através da Ressonância Nuclear Magnética. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.1 e os seus respectivos espectros podem ser observados no Apêndice A.

Tabela 4.1 – Proporção entre Blocos (M/G), fração molar dos Blocos M (F_M), Blocos G (F_G), Blocos GG (F_{GG}), Blocos MM (F_{MM}) e Blocos MG ou GM ($F_{MG, GM}$) dos alginatos.

| Alginato | M/G | F_M | F_G | F_{GG} | F_{MM} | $F_{MG, GM}$ |
|----------|------|-------|-------|----------|----------|--------------|
| MM | 1,94 | 0,66 | 0,34 | 0,17 | 0,49 | 0,17 |
| MA | 1,43 | 0,59 | 0,41 | 0,27 | 0,45 | 0,14 |
| GM | 0,61 | 0,38 | 0,62 | 0,42 | 0,18 | 0,20 |
| GA | 0,54 | 0,35 | 0,65 | 0,45 | 0,15 | 0,20 |

Conforme os valores apresentados na Tabela 4.1, os alginatos utilizados neste estudo estão ordenados de forma crescente em relação à quantidade de Blocos G presentes em sua cadeia, na sequência:

$$MM < MA < GM < GA$$

Os resultados obtidos através da espectroscopia de ressonância nuclear magnética permitiram confirmar que os alginatos GM e GA são provenientes das algas *Laminaria hyperboria*, apresentando maior quantidade de Blocos G enquanto que os alginatos MM e MA são originados da *Macrocystis pyrifera* apresentando maior quantidade de Blocos M.

Resultados semelhantes estão relatados na literatura em diversos trabalhos onde a razão entre Blocos M e G para os alginatos extraídos das algas marrons apresenta-se na faixa de 0,40 a 1,85 (SARTORI *et al.*, 1996; DRAGET *et al.*, 1997; CLEMENTI *et al.*, 1999; DONATI *et al.*, 2005; MØRCH *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2007; OLIVAS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2008).

Carulo (2005) determinou a composição do alginato convencionalmente empregado no preparo de filmes no LEPPbio e obteve a relação M/G no valor de 1,38 (muito próximo de 1,43, conforme a Tabela 4.1) confirmando que o alginato usado nos estudos realizados pelo grupo de pesquisa possui maior quantidade de Blocos M, sendo proveniente das algas *Macrocystis pyrifera*.

A quantidade de Blocos M e Blocos G presentes na cadeia polimérica do alginato está diretamente relacionada com o limite de íons cálcio a ser usado no processo de reticulação dos seus filmes. Os alginatos GM e GA, ou seja, alginatos com maior proporção de Blocos G necessitam de menores quantidades de cálcio em seu processo de reticulação, pois possuem maior afinidade por estes íons, originando um maior número de ligações de conteúdo energético superior às formadas pelos alginatos MM e MA que apresentam ligações mais brandas com estes íons (SMIDSRØD, 1974; DONATI, *et al.*, 2005; RUSSO *et al.*, 2007; GARCIA-CRUZ *et al.*, 2008).

4.1.2 Determinação da massa molar

A massa molar do alginato e o comprimento de suas cadeias são características que estão relacionadas diretamente com a sua fonte de origem e o seu processo de beneficiamento.

A caracterização da massa molar das amostras de alginato foi realizada através da avaliação do tempo médio de retenção do polímero na coluna cromatográfica de exclusão por tamanho. Os resultados foram expressos sob a forma de massa molar média dos alginatos estudados e estão apresentadas na Tabela 4.2. A curva padrão de calibração da coluna e os cromatogramas obtidos encontram-se no Apêndice B.

Os valores na Tabela 4.2 indicam que os alginatos GA (maior proporção de Blocos G e alta viscosidade) e MA (maior proporção de Blocos M e alta viscosidade) apresentaram maiores valores de massa molar média numérica não

havendo diferenças significativas entre os valores obtidos, confirmando que estes polímeros possuem cadeias longas.

Tabela 4.2 – Valores de massa molar média numérica (\bar{M}_n) dos alginatos obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho.

| Alginato | MM | MA | GM | GA |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| \bar{M}_n [Da] | $1,94 \cdot 10^6$ ^a | $5,62 \cdot 10^6$ ^b | $1,02 \cdot 10^6$ ^c | $6,17 \cdot 10^6$ ^b |

Obs. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as medias obtidas pelo Teste de Tukey.

O alginato GM (maior proporção de Blocos G e média viscosidade) apresentou o menor valor de massa molar média numérica dentre as amostras estudadas, indicativo de que suas cadeias são menores que as dos demais alginatos. O alginato MM (maior proporção de Blocos M e média viscosidade) apresentou valor intermediário de massa molar média numérica.

Conforme o esquema apresentado os alginatos utilizados neste estudo estão ordenados de forma crescente em relação à massa molar, na sequência:

$$GM < MM < MA < GA$$

Liu *et al.* (2003) trabalharam com alginatos com diferentes proporções de Blocos M e G e variadas massas molares para verificar a fase de transição sol-gel induzida pela adição de íons cálcio à solução aquosa destes polímeros, enquanto que Russo *et al.* (2007) empregaram alginatos com diferentes proporções M/G, mas com massas molares médias numéricas semelhantes, na faixa de 10^5 Da para estudar o mecanismo de gelificação e a influência dos Blocos G na produção de filmes. Os resultados destes estudos demonstraram que o processo de gelificação do alginato depende da proporção entre Blocos M e G e de sua massa molar.

Draget *et al.* (1994) estudando também os efeitos da composição química e da massa molar nas propriedades do alginato observaram que a capacidade de

formação de geis está relacionada com a proporção M/G e com massa molar deste polímero. Alginatos com maior massa molar possuem maior tendência à gelificação, pois possibilitam a formação de um maior número de possíveis junções e maiores entrelaçamentos entre as suas cadeias fato que acaba refletindo nas propriedades dos filmes obtidos.

Estudos realizados no LEPPbio revelaram que filmes produzidos com alginato com maior proporção de Blocos M e massa molar média numérica na faixa de 10^5 a 10^6 Da apresentam boas propriedades físico-químicas e de barreira. O uso de alginatos com massa molar média numérica acima desta faixa originou filmes heterogêneos, devido à formação de soluções poliméricas de alta viscosidade e conseqüentemente com baixa capacidade de espalhamento nos moldes (ZACTITI, 2004; da SILVA 2009; BIERHALZ, 2010).

4.1.3 Determinação da viscosidade intrínseca (η_{int})

Os resultados de viscosidade intrínseca dos alginatos foram obtidos experimentalmente de acordo com a metodologia descrita no Item 3.2.3.

Na Tabela 4.3 estão apresentados os resultados obtidos para a viscosidade intrínseca e os correspondentes valores de massa molar viscosimétrica, a qual foi calculada através da Equação de Mark-Houwink.

Tabela 4.3 – Valores de viscosidade intrínseca (η_{int}) e massa molar média viscosimétrica (\bar{M}_V), obtidos experimentalmente dos alginatos.

| Alginato | MM | MA | GM | GA |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| η_{int} [dL/g] | 208,14 ^a | 277,26 ^b | 177,58 ^c | 296,32 ^b |
| \bar{M}_V [Da] | 2,94.10 ^{6a} | 3,96.10 ^{6b} | 2,49.10 ^{6c} | 4,24.10 ^{6b} |

Obs. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as médias obtidas pelo Teste de Tukey.

Os alginatos MM e GM apresentaram menores valores de viscosidade intrínseca se comparados aos valores dos alginatos MA e GA, seguindo a mesma tendência apresentada pelas massas molares correspondentes. O alginato GM apresentou o menor valor de viscosidade intrínseca se comparado às demais amostras estudadas enquanto que o alginato GA apresentou o maior valor de viscosidade.

Os valores obtidos para a massa molar média viscosimétrica são próximos aos da massa molar numérica, obtidos por cromatografia de exclusão de tamanho. Os alginatos utilizados neste estudo, quando ordenados de forma crescente em relação à massa molar média viscosimétrica assim como à viscosidade intrínseca apresentam a mesma sequência já obtida e apresentada na Tabela 4.2.

Os resultados de viscosidade intrínseca obtidos neste estudo demonstraram que é possível estimar satisfatoriamente os valores de massa molar tanto para os alginatos com maior quantidade de Blocos M quanto para alginatos com maior quantidade de Blocos G através da Equação 2.5 utilizando as constantes ($K = 1,228 \cdot 10^{-4}$ e $a = 0,963$) propostas por Smidsrød (1974) e Mancini *et al.* (1996).

Empregando a equação de Mark-Houwink para alginatos com maior quantidade de Blocos M e massa molar na faixa de 10^5 a 10^6 Da Zactiti (2004) e da Silva *et al.* (2009) também obtiveram resultados equivalentes aos aqui obtidos.

4.1.4 Teste reológico dinâmico-oscilatório

Na reologia, os testes dinâmico-oscilatórios fornecem informações importantes sobre o comportamento viscoelástico do material polimérico em diferentes frequências. Dessa maneira, neste estudo buscou-se conhecer o comportamento reológico dos alginatos MM, MA, GM e GA possibilitando avaliar a influência da concentração destes polímeros em solução, de suas massas molares bem como da proporção dos Blocos M e Blocos G quando submetidos ao

processo de reticulação com variadas quantidades de íons cálcio, fornecendo assim dados indicativos para o processo de produção dos biofilmes.

4.1.4.1 Caracterização viscoelástica dos alginatos em água (AA)

Foram preparadas soluções aquosas dos alginatos estudados, em diversas concentrações (0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0%), conforme a Tabela 3.2, visando avaliar o comportamento dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4.4 a 4.7.

É possível verificar através dos reogramas que as soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA apresentaram um comportamento predominantemente viscoso ($G'' > G'$) dentro da faixa de concentração estudada.

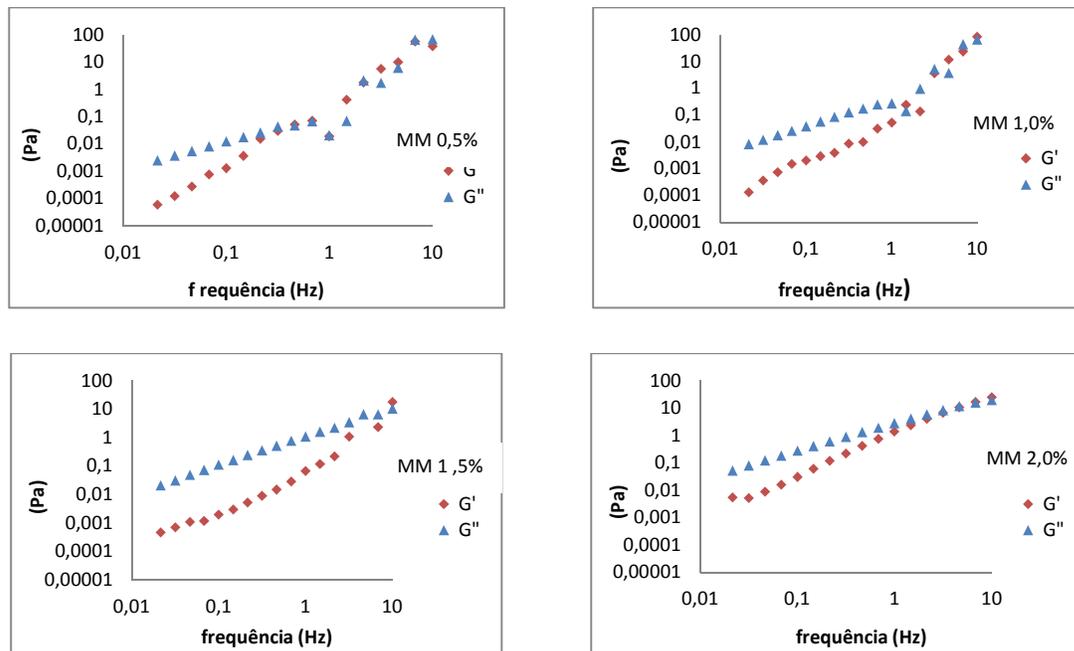


Figura 4.4 – Reogramas das soluções de alginato MM em água nas concentrações de 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% a 25°C.

Comparando-se o comportamento das soluções dos alginatos MA e GA nas mesmas concentrações, observa-se semelhança entre os valores de seus módulos elástico (G') e viscoso (G'') sendo estes maiores que os apresentados pelas soluções dos alginatos MM e GM. O alginato MM apresentou módulos elástico (G') e viscoso (G'') com valores intermediários para as concentrações estudadas, enquanto que o alginato GM desenvolveu os menores módulos dentre os alginatos estudados.

A distribuição da massa molar do polímero pode afetar as suas propriedades dinâmicas. Moléculas de baixa massa molar na matriz funcionam como lubrificantes internos que promovem o escoamento ou deslizamento intermolecular, diminuindo o módulo elástico do material. Por outro lado, moléculas de alta massa molar ocasionam um aumento do módulo elástico, pois apresentam um maior envelhecimento bem como permitem um maior entrelaçamento entre si remetendo à necessidade de maior esforço para o seu estiramento e orientação.

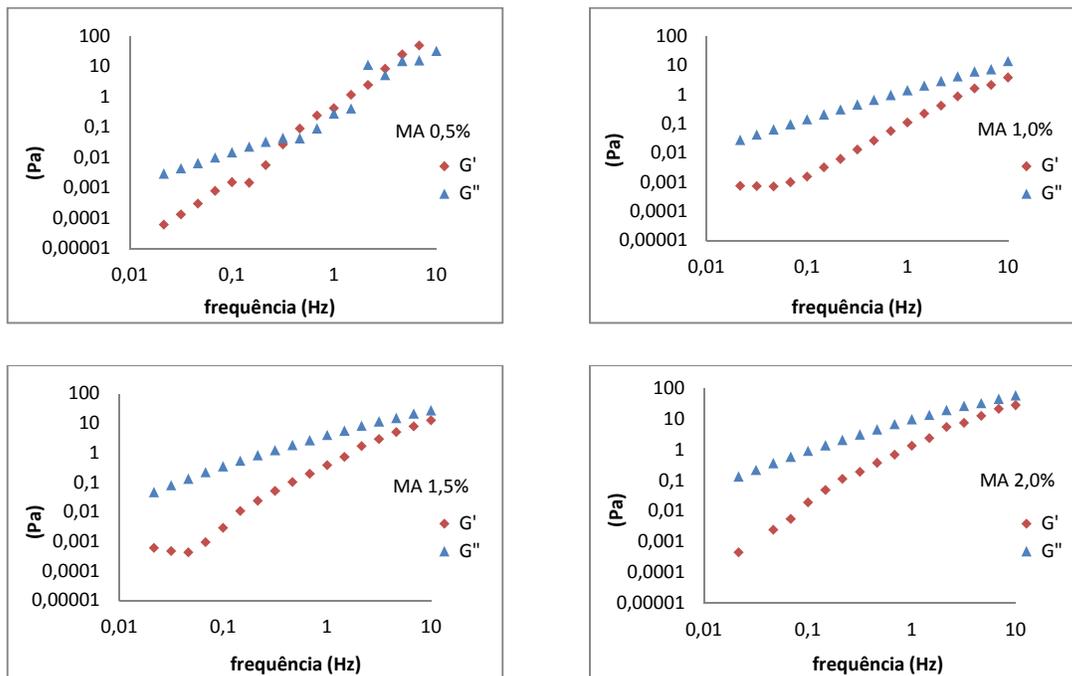


Figura 4.5 – Reogramas das soluções de alginato MA em água nas concentrações de 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% a 25°C.

Segundo Cruz *et al.* (2008), a elevada massa molar permite um grande número de conformações estruturais, bem como a possibilidade de emaranhamentos temporários das cadeias poliméricas, as quais são responsáveis pelas diferenças nas propriedades dos materiais.

Os reogramas também demonstram tendência crescente dos valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') e maior estabilidade na tomada dos dados com o aumento da concentração de alginato em solução.

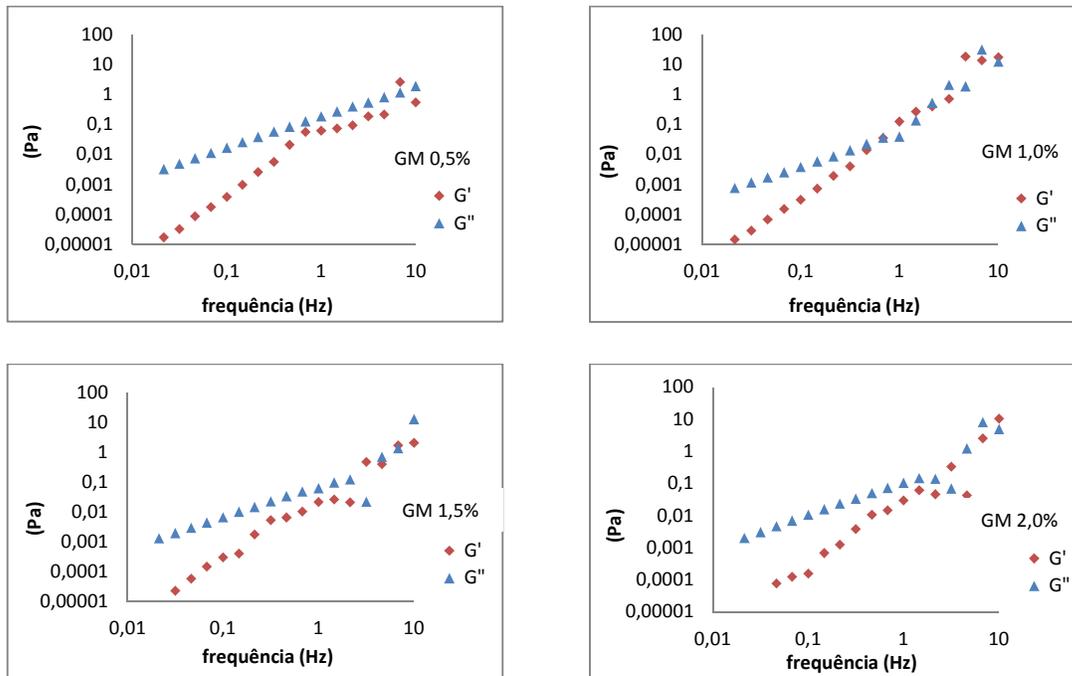


Figura 4.6 – Reogramas das soluções de alginato GM em água nas concentrações 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% a 25°C.

O maior número de cadeias poliméricas na solução propicia a aproximação das mesmas e o aumento das interações intermoleculares momentâneas, refletindo conseqüentemente em maiores módulos elásticos (G') e viscosos (G'') e na necessidade de maior esforço para a deformação do material (XU *et al.*, 2006).

Estudando o comportamento reológico do alginato de sódio em água, Gómez-Díaz e Navaza (2002) também verificaram que a concentração, a massa molar e a temperatura influenciam diretamente a viscosidade e consequentemente nos módulos elástico e viscoso das soluções.

De maneira geral, não foi possível nestas condições relacionar diretamente a influência da proporção M/G no comportamento reológico das soluções aquosas dos alginatos estudados bem como de suas massas molares corroborando com os resultados anteriormente apresentados.

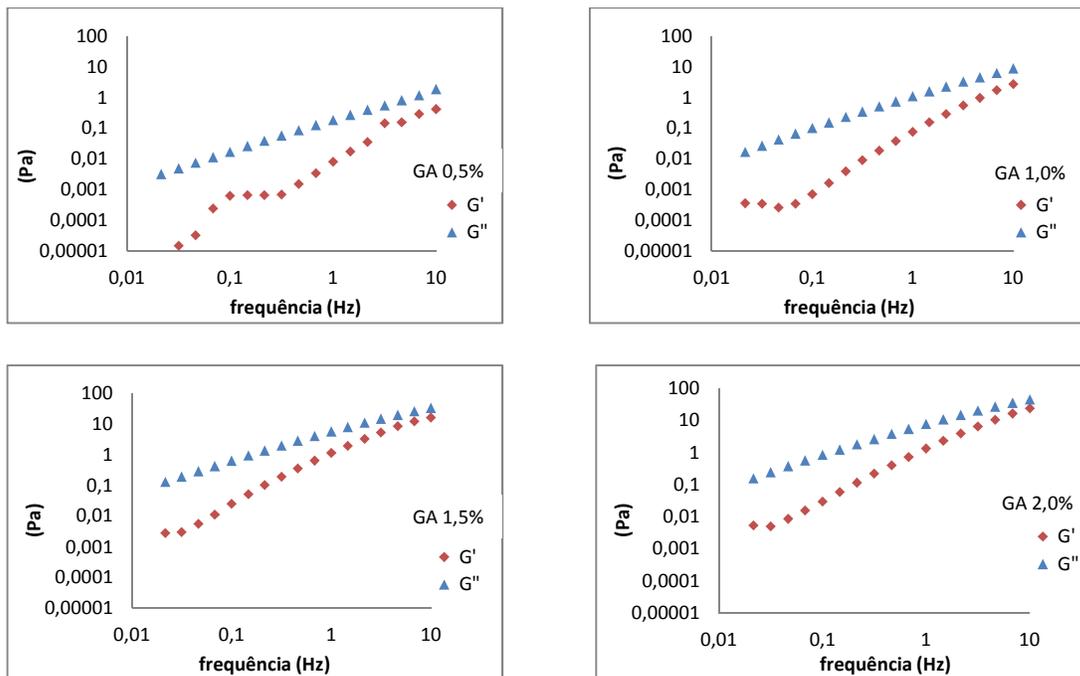


Figura 4.7 – Reogramas das soluções de alginato GA em água nas concentrações 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% a 25°C.

4.1.4.2 Caracterização reológica das soluções de alginato e glicerol (AG)

As soluções aquosas contendo 1,5% dos alginatos MM, MA, GM e GA e glicerol (0,3; 0,6 e 1,2 g glicerol/g alginato) foram preparadas de acordo com a Tabela 3.2. Os reogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.8.

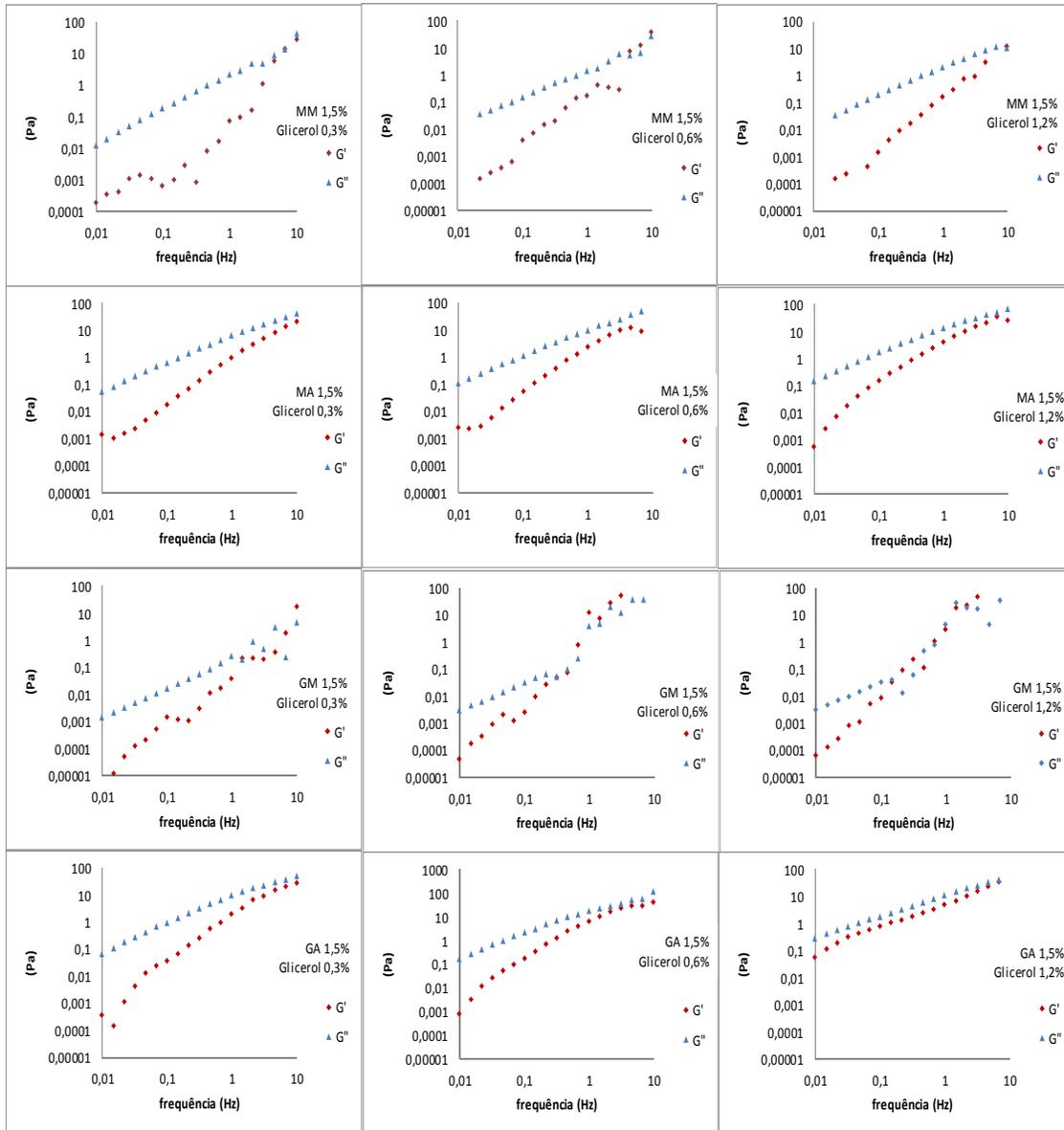


Figura 4.8 – Reogramas das soluções (1,5%) de alginatos MM, MA, GM e GA com glicerol AAG.I (0,3%), AAG.II (0,6%) e AAG.III (1,2%) a 25°C.

Para as condições estudadas, nota-se que a adição do glicerol não ocasionou mudanças significativas nos módulos elástico (G') e viscoso (G'') das soluções de alginato, não alterando o seu comportamento predominantemente viscoso ($G'' > G'$).

Esperava-se que a adição do glicerol provocasse diminuição nos valores dos módulos elásticos (G'), visto que o plastificante permite um maior espaçamento entre as cadeias poliméricas e a diminuição de suas interações. Considerando, entretanto, que as soluções já se encontravam num alto grau de fluidez, é provável que o glicerol não conseguiu exercer a sua ação de plastificante.

É possível observar também que as soluções dos alginatos aditivados com o glicerol apresentam comportamento influenciado por suas massas molares, de uma forma semelhante ao que foi verificado anteriormente para as soluções sem a presença do plastificante onde não foi observada influência direta das diferentes proporções entre os Blocos M e Blocos G.

As soluções dos alginatos MA e GA apresentaram módulos elásticos (G') e viscosos (G'') semelhantes entre si e de maior valor dentro o grupo dos alginatos estudados. As soluções do alginato MM apresentaram módulos de valor intermediário enquanto que as soluções do alginato GM apresentaram os menores valores confirmando mais uma vez os resultados anteriormente apresentados.

4.1.4.3 Caracterização reológica das soluções de alginato reticuladas com íons cálcio (AAC)

Soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA foram preparadas e reticuladas com quantidades crescentes de cloreto de cálcio de acordo com a Tabela 3.2.

Na Figura 4.9 observa-se o comportamento reológico de soluções (1,5%) de alginatos MM, MA, GM e GA reticulados com 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato (AAC.I) sendo que estas soluções apresentaram um comportamento predominante viscoso, não sendo observadas alterações significativas nos valores do módulo viscoso (G'') e elástico (G') quando comparados aos valores obtidos por estes polímeros puros solubilizados na mesma concentração em água.

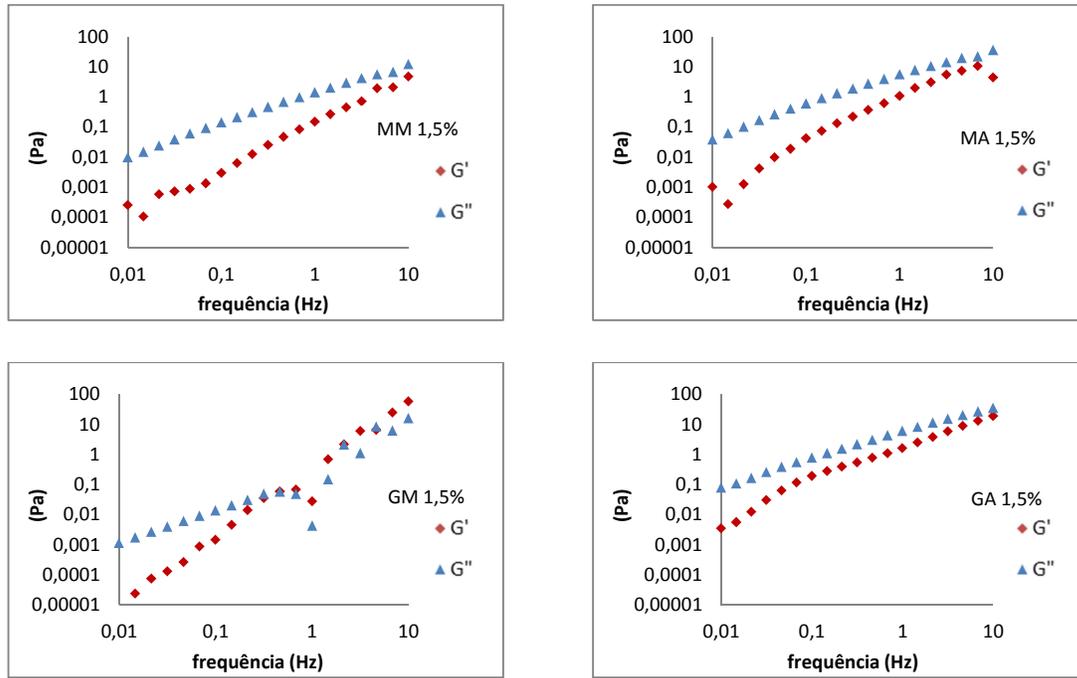


Figura 4.9 – Reogramas das soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato sem glicerol (AAC.I) a 25°C.

Para as soluções (1,5%) dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 8,16 mg Ca^{2+} /g alginato (AAC.II) (Figura 4.10) não foram observadas alterações no comportamento reológico dos alginatos MM e MA (maior quantidade de Blocos M), sendo $G'' > G'$.

No entanto, uma comparação entre as curvas correspondentes da Figura 4.10 com as Figuras 4.6 e 4.7 deixa evidente o efeito da adição de 8,16 mg de íons cálcio nas soluções dos alginatos GM e GA (maior quantidade de Blocos G).

Nesta concentração de íons cálcio, observa-se para o alginato GM (Figura 4.10) o cruzamento (*crossover* $G''=G'$) e a inversão dos módulos G' e G'' , evidenciando a presença de ligações químicas fracas. Para o alginato GA (Figura 4.9) observa-se a predominância do módulo elástico, no intervalo de frequência analisado, demonstrando que as ligações formadas são fortes e ratificando a sua maior afinidade com estes íons.

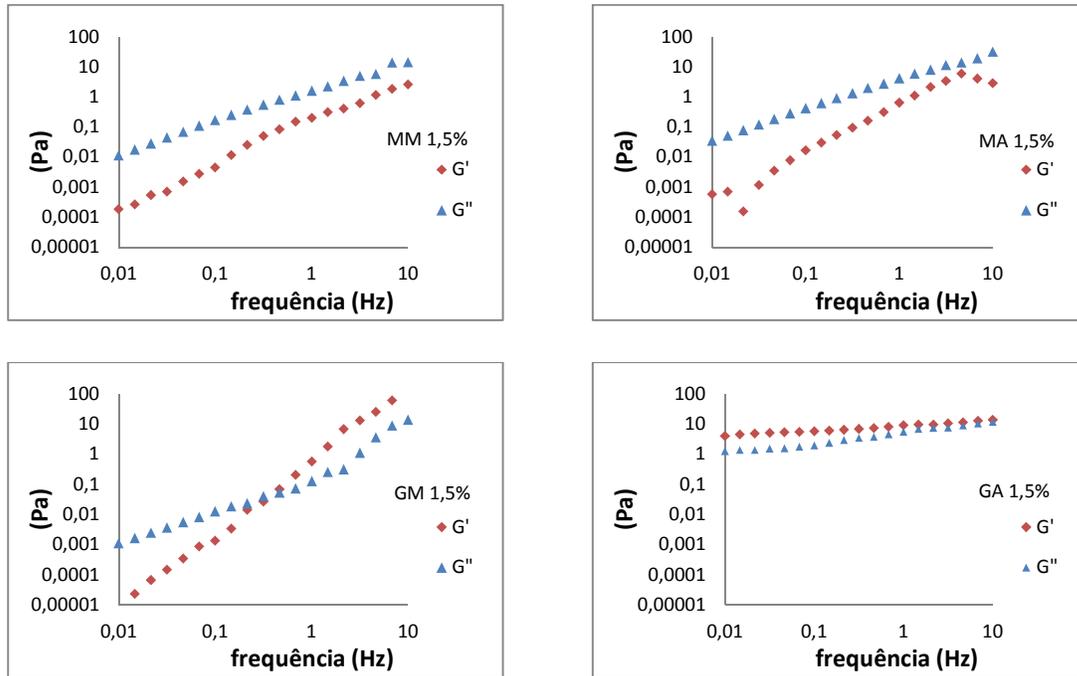


Figura 4.10 – Reogramas das soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 8,16 mg Ca^{2+} /g alginato sem glicerol (AAC.II) a 25°C.

Segundo Xu *et al.* (2006), as soluções poliméricas quando submetidas a esforços sob baixa frequência apresentam tendência ao equilíbrio de seus módulos ($G'=G''$), sendo que este ponto não é observado para materiais perfeitamente elásticos, tão pouco para materiais totalmente viscosos e para géis formados por ligações químicas e/ou físicas fortes.

O processo de gelificação do alginato depende do emparelhamento das cadeias poliméricas, na região dos Blocos G, onde são formadas cavidades que acomodam perfeitamente os íons cálcio, conforme o modelo “caixa de ovos”. Para os alginatos com maior quantidade de Blocos G este mecanismo está relacionado com um maior número de junções entre as cadeias poliméricas e maior energia intermolecular aumentando a rigidez do gel e conseqüentemente seus valores de módulo elástico (G') (SMIDSRØD, 1974).

Um aumento na concentração de íons cálcio tende a reforçar esta tendência, como pode ser observado nas Figuras 4.11 a 4.13. Na Figura 4.11, observa-se que as soluções dos alginatos GM e GA reticuladas com 16,32 mg Ca^{2+} /g alginato apresentaram um comportamento predominantemente elástico ($G' > G''$).

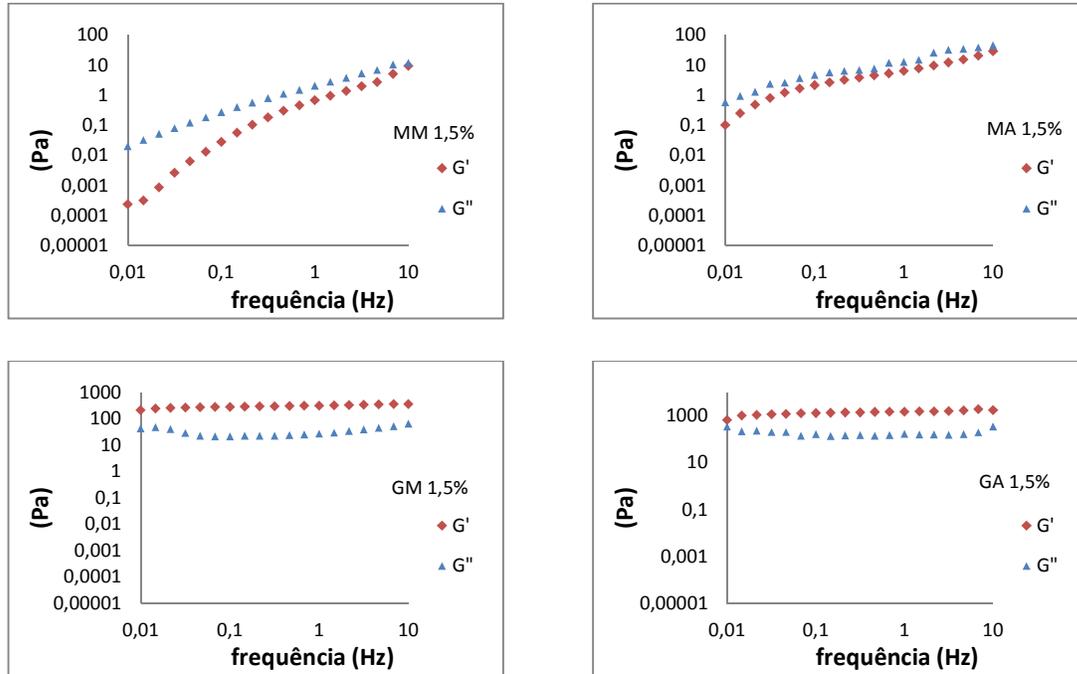


Figura 4.11 – Reogramas das soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 16,32 mg Ca^{2+} /g alginato sem glicerol (AAC.III) a 25°C.

Para todas as soluções é possível observar o aumento dos valores de seus módulos devido à maior da concentração dos íons cálcio na solução polimérica o que possibilitou a formação de um maior número de interações intermoleculares.

No entanto, para as soluções dos alginatos MM e MA, mesmo com o aumento do número de interações, observa-se a permanência do comportamento viscoso. Este comportamento é devido à quantidade insuficiente de íons cálcio presentes no meio, incapazes de gerar o número de ligações necessárias para iniciar o processo de gelificação e provocar a inversão dos módulos.

A reticulação das soluções dos alginatos estudados com 19,04 mg Ca^{2+}/g alginato (Figura 4.12) fez com que apenas o alginato MM apresentasse um comportamento viscoso. Os demais alginatos (MA, GM e GA), por possuírem uma maior quantidade de Blocos G em suas cadeias (Tabela 4.1), assumiram um comportamento elástico ($G' > G''$), demonstrando mais uma vez que a afinidade dos íons cálcio com os Blocos G presentes na estrutura dos referidos alginatos, gerou maior interação entre as suas cadeias e módulos de maior valor.

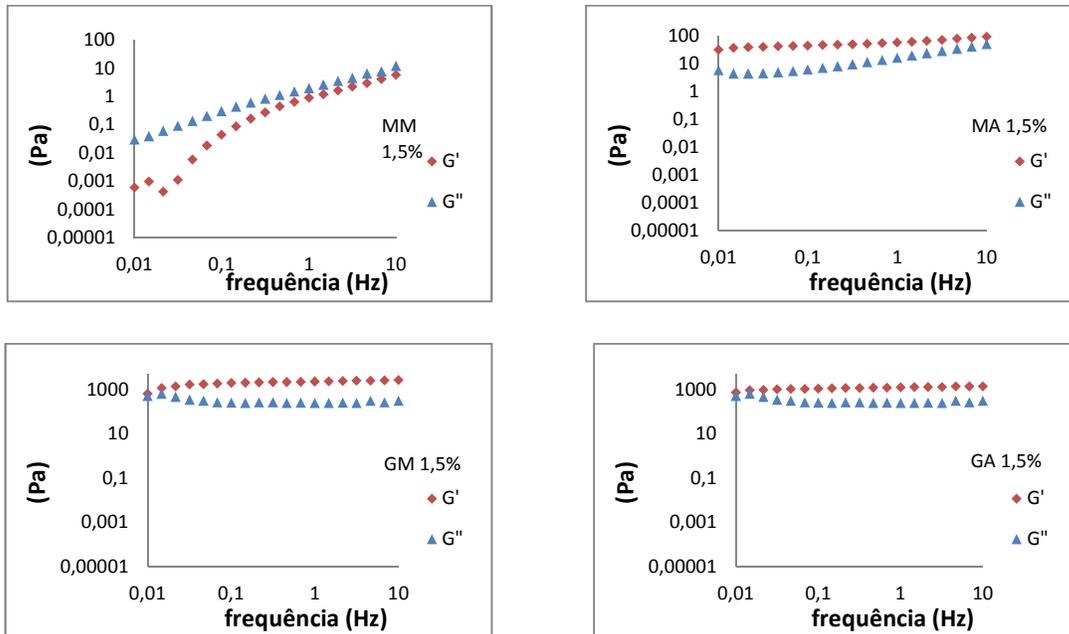


Figura 4.12 – Reogramas das soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 19,04 mg Ca^{2+}/g alginato sem glicerol (AAC.IV) a 25°C.

Na Figura 4.13, é possível observar que todos os alginatos avaliados quando reticulados com 21,76 mg Ca^{2+}/g alginato apresentam módulo elástico (G') maior que o módulo viscoso (G''), exibindo um comportamento típico de um gel em toda a faixa de frequência estudada. As curvas são paralelas ao eixo de frequência pois os módulos dos géis podem ser considerados independentes da frequência.

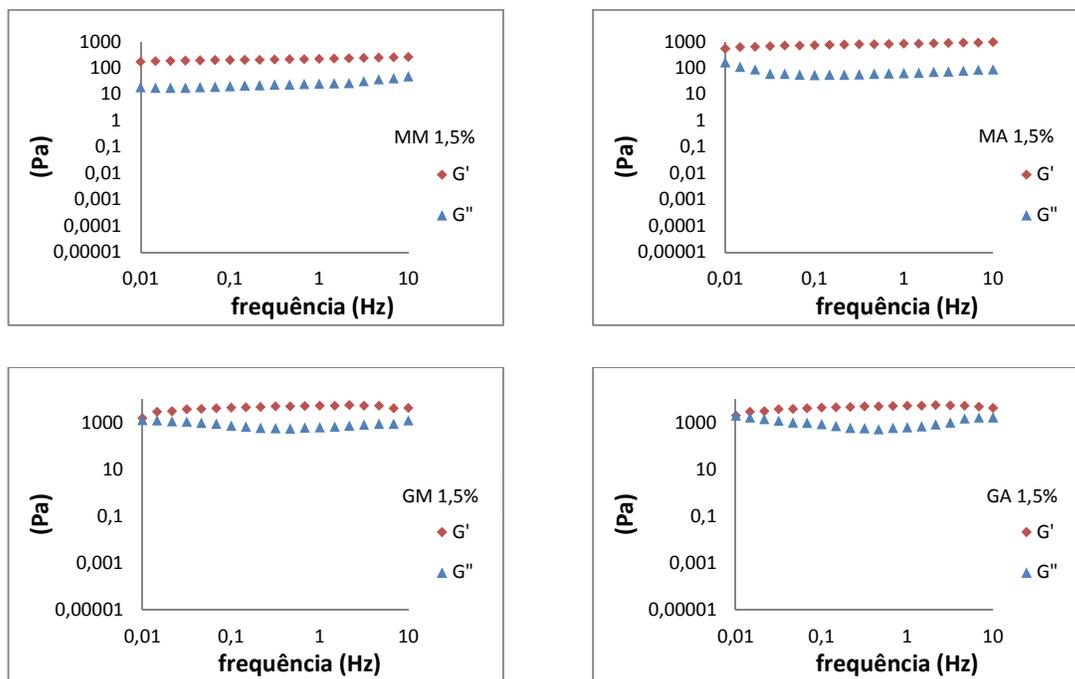


Figura 4.13 – Reogramas das soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 21,76 mg Ca^{2+} /g alginato sem glicerol (AAC.V) a 25°C.

Estudando o comportamento reológico do alginato e o efeito da adição de íons cálcio à solução deste polímero, Draget *et al.* (1994) observaram que a concentração e a adição destes íons gera soluções de maior viscosidade e com módulos crescentes. Donati *et al.* (2005) demonstraram que os Blocos MG e GM também permitem, de maneira secundária, a acomodação dos íons cálcio em suas cavidades, influenciando também no comportamento reológico dos alginatos e em suas propriedades mecânicas.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 4.1 é possível observar que os alginatos GM e GA além de apresentarem maior quantidade de Blocos G, também apresentam maior quantidade de Blocos MG e GM, confirmando efetivamente a influência da composição no comportamento dos alginatos estudados a qual é refletida em módulos de maior valor.

Liu *et al.* (2003) estudando o processo de transição sol-gel induzida pela adição de íons cálcio verificaram que o grau de reticulação desempenha um importante papel na definição dos módulos do gel. Um gel com um menor número de ligações covalentes requer menor força para se deformar. Com o aumento do grau de reticulação a rede torna-se mais emaranhada necessitando de mais força para ser deformada.

4.1.4.4 Caracterização reológica dos alginatos em água contendo o glicerol como plastificante e íons cálcio como agente reticulante (AAGC)

Nas Figuras 4.14 e 4.15 está apresentando o comportamento reológico das soluções filmogênicas dos alginatos estudados contendo 0,6 g glicerol/ g alginato e íons cálcio nas concentrações de 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato e 8,16 mg Ca^{2+} /g alginato respectivamente.

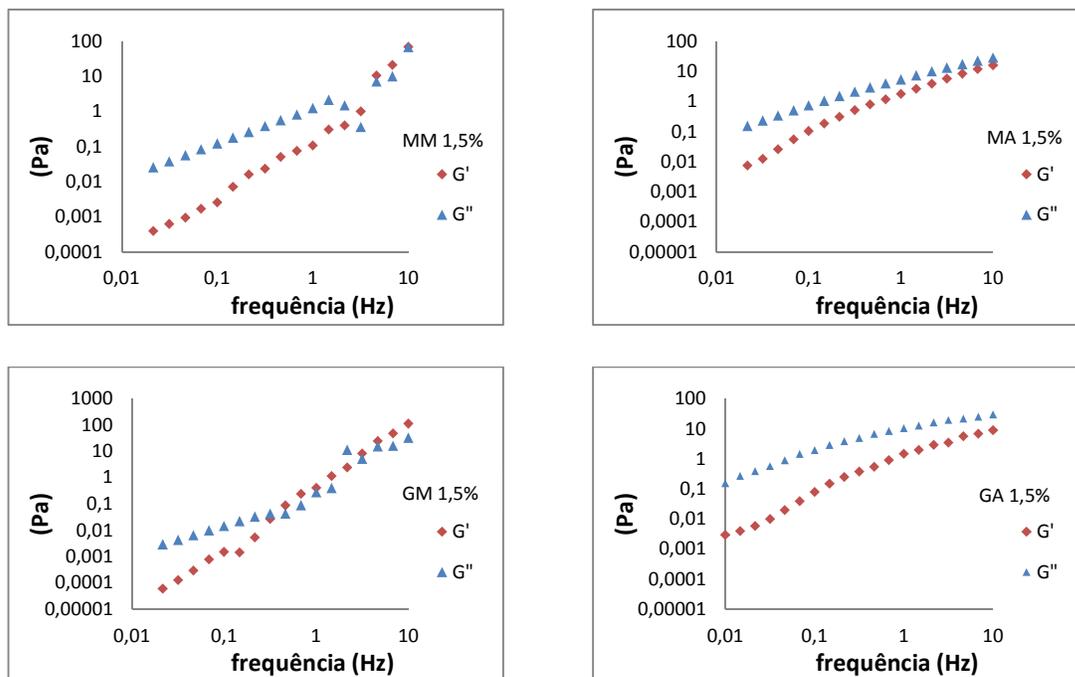


Figura 4.14 – Reogramas da solução dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato e plastificadas com 0,6 g glicerol/g alginato (AAGC.I) a 25°C.

O comportamento reológico apresentado pelos alginatos MM, MA, GM e GA quando reticulados com soluções de variadas concentrações de íons cálcio permitiu determinar e estabelecer que $6,80 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{g}$ alginato é a quantidade limitante para que não seja iniciado o processo de gelificação para os alginatos GM e GA, antes da moldagem do filme. Estes resultados serviram como base para o preparo das soluções filmogênicas pré-reticuladas.

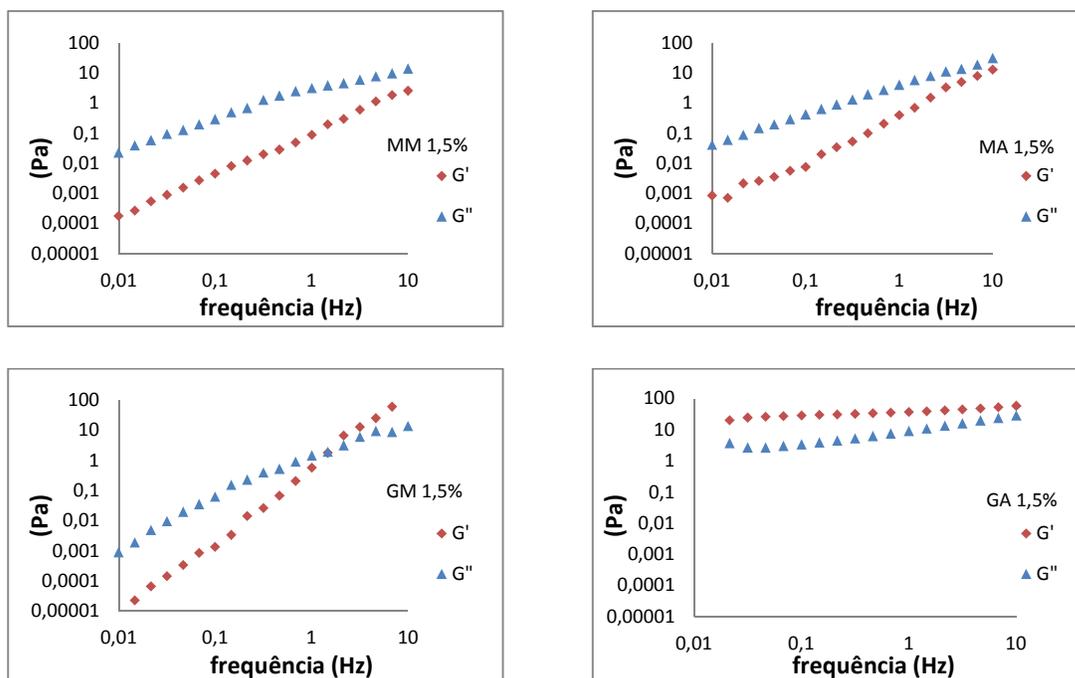


Figura 4.15 – Reogramas da solução dos alginatos MM, MA, GM e GA reticuladas com $8,16 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{g}$ alginato e plastificadas com $0,6 \text{ g glicerol/g}$ alginato (AAGC.II) 25°C .

Os reogramas também demonstraram que o glicerol não ocasionou alterações significativas às soluções as quais apresentaram um comportamento semelhante ao observado nas Figuras 4.10 e 4.11 sendo perceptível o efeito da concentração dos íons cálcio combinado com a massa molar destes polímeros.

4.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE ALGINATO DE CÁLCIO

O preparo dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA teve como base a metodologia desenvolvida pelo LEPPbio/FEQ/UNICAMP tendo sido realizados ensaios preliminares visando conhecer e avaliar o comportamento destes biopolímeros nos dois estágios de reticulação. Para tanto, foram utilizadas soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com diferentes concentrações.

4.2.1 Preparo dos filmes: definição do 1º estágio de reticulação

Diversos trabalhos realizados no LEPPbio reafirmaram a importância do processo de pré-reticulação (1º estágio de reticulação) na estruturação final dos filmes de alginato. Todavia, a quantidade de cálcio a ser adicionada deve ser limitada para que a solução filmogênica possua fluidez suficiente, tenha um fácil espalhamento sobre o molde permitindo a obtenção de filmes com espessura uniforme e para que também não haja pontos de gelificação localizados, responsáveis por efeitos negativos nas propriedades mecânicas, de barreira e ópticas dos filmes (PAVLATH; ROBERTSON, 1999; CARULO, 2005; TURBIANI, 2007, da SILVA, 2009; BIERHALZ, 2010).

Neste estudo, as soluções dos alginatos MM, MA, GM e GA foram tratadas com diferentes concentrações de íons cálcio e tiveram o seu comportamento avaliado quanto à ocorrência de zonas de gelificação e a sua capacidade de espalhamento sobre os moldes de secagem. Uma avaliação subjetiva das características das soluções filmogênicas (como homogeneidade e viscosidade) e de seus filmes (como transparência, facilidade de manipulação, presença de heterogeneidades, etc) frente às diferentes concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ usadas no 1º estágio de reticulação estão anotadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Avaliação subjetiva das características das soluções filmogênicas e dos filmes de diferentes alginatos em relação à concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ usada no 1º estágio de reticulação.

| Alginato | Solução $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (%)* | mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/$ g alginato | g glicerol/ g alginato | Funcionalidade | |
|---------------|--|--|---------------------------|--|------------|
| | | | | Solução filmogênica | Filmes |
| MM e MA | 0,2 | 2,72 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 0,4 | 5,44 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 0,5 | 6,80 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 0,6 | 8,16 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 0,8 | 10,88 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 1,0 | 13,60 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 1,2 | 16,32 | 0,6 | Aumento da viscosidade | Adequada |
| | 1,4 | 19,04 | 0,6 | Aumento da viscosidade | Adequada |
| | Acima de 1,4 | Acima de 19,04 | 0,6 | Alta viscosidade, dificuldade no espalhamento, retenção de bolhas e heterogeneidades | Inadequada |
| GM e GA | 0,2 | 2,72 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 0,4 | 5,44 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | 0,5 | 6,80 | 0,6 | Adequada | Adequada |
| | Acima de 0,5 | Acima de 6,80 | 0,6 | Alta viscosidade, dificuldade no espalhamento, retenção de bolhas e heterogeneidades | Inadequada |

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

Experimentalmente, observou-se que para a obtenção de filmes homogêneos era necessário definir a máxima concentração de íons cálcio a ser adicionado no 1º estágio de reticulação, a qual possibilitasse a formação adequada de um filme com a resistência mecânica para permitir sua manipulação.

Alginatos com maior proporção de Grupos M (alginatos MM e MA) admitiram até 19,04 mg Ca^{+2}/g alginato, resultado semelhante ao alcançado por da Silva *et al.* (2009).

Em seus estudos Rhim (2004) também verificou a limitação existente na quantidade de cálcio a ser incorporada na solução de filmes de alginato, conseguindo adicionar à solução filmogênica a quantidade máxima de 10,83 mg Ca^{2+}/g alginato. Acima desta concentração ocorria forte gelificação.

Os filmes com maior proporção de Grupos G (GM e GA) admitiram até 6,80 mg de Ca^{+2}/g alginato comprovando a existência de uma reação de maior afinidade dos Blocos G em relação aos íons cálcio. Acima destas concentrações as soluções apresentaram gelificação localizada confirmando os resultados das análises reológicas anteriormente apresentados.

O processo de gelificação do alginato é baseado na afinidade dos Blocos M e Blocos G em relação a certos íons di e trivalentes e na habilidade de estabelecer ligações seletivas com estes íons (ONSØYEN, 1997).

Segundo Smidsrød (1974), alginatos com maior proporção de Blocos M necessitam da adição de uma maior quantidade de cálcio no processo de reticulação se comparados a alginatos com maior proporção de Grupos G, pois, sua reticulação ocorre de forma mais lenta em consequência da energia de ligação mais branda entre as cadeias do ácido manurônico do alginato e os íons cálcio.

Os filmes contendo 6,80 mg Ca^{+2}/g alginato apresentaram-se transparentes, homogêneos, sem presença de zonas de opacidade e com fácil desprendimento dos moldes. Fotografias de amostras destes filmes estão na Figura 4.17.

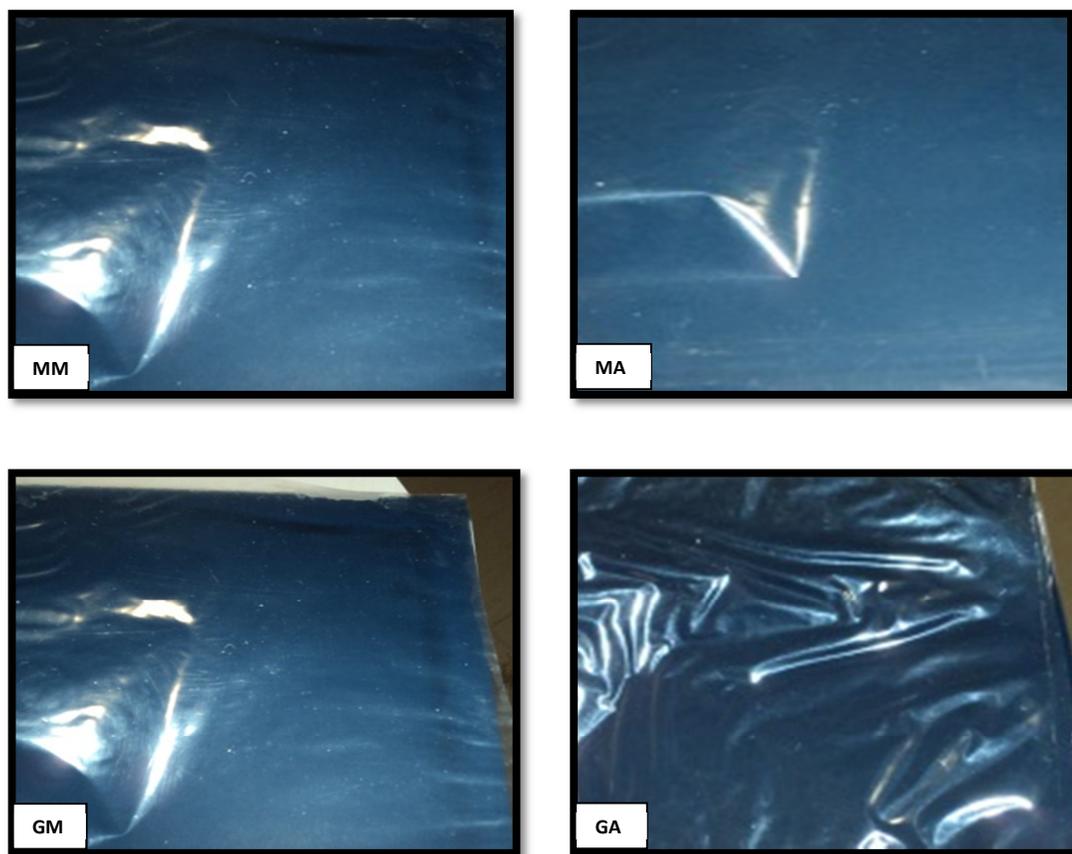


Figura 4.17 - Aspecto dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA pré-reticulados com 6,80 mg Ca^{+2} /g alginato.

Levando-se em consideração os resultados obtidos nos trabalhos anteriores realizados no LEPPbio, os quais relatam que o processo de reticulação diminuiu consideravelmente o alongamento dos filmes de alginato, nesta pesquisa optou-se por limitar a concentração máxima de íons cálcio no processo de reticulação em 6,80 mg Ca^{+2} /g alginato (1º estágio).

Sendo, dessa maneira, possível avaliar também os efeitos da quantidade de Blocos M e Blocos G e da massa molar de cada um dos tipos de alginato nas propriedades dos filmes produzidos sob mesmas condições. Os resultados da caracterização dos filmes originados estão apresentados e discutidos a seguir.

4.2.1.1 Caracterização dos filmes de alginato de cálcio pré-reticulados (um estágio)

Os filmes de alginato MM e MA GM e GA foram pré-reticulados com soluções de cálcio nas concentrações de 2,72; 5,44 e 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato e caracterizados (Tabela 4.6) permitindo definir a formulação otimizada, a qual serviu como base para o estudo do processo de reticulação complementar.

Tabela 4.6 – Caracterização dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA obtidos com um só contato de reticulação quanto à espessura (δ), permeabilidade ao vapor de água (PVA), umidade (ω), massa solúvel (MS), tensão de ruptura (TR) e alongamento (A) quando pré-reticulados com diferentes concentrações de Ca^{2+} .

| Alginatos | δ [μm] | PVA [(g.mm/m ² .dia.kPa)] | ω [%] | MS [%] | TR [MPa] | A [%] |
|---|-------------------------------|---|-------------------------|-------------|------------------------|------------------------|
| 2,72 mg $\text{Cl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato | | | | | | |
| MM | 31±2,4 ^a | 13,58±0,17 ^c | 34,53±0,55 ^a | 100 | 17,7±2,77 ^c | 37,2±3,53 ^c |
| MA | 34±2,2 ^a | 13,09±0,23 ^c | 35,93±0,87 ^a | 100 | 19,5±3,67 ^c | 35,4±1,69 ^c |
| GM | 25±1,6 ^b | 13,53±0,32 ^c | 33,67±0,99 ^a | 100 | 15,4±3,11 ^c | 37,0±1,87 ^c |
| GA | 33±3,1 ^a | 13,32±0,16 ^c | 34,45±0,29 ^a | 100 | 19,0±3,19 ^c | 37,4±3,05 ^c |
| 5,44 mg $\text{Cl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato | | | | | | |
| MM | 33±2,5 ^a | 11,93±0,17 ^b | 33,53±0,54 ^a | 100 | 20,7±1,98 ^b | 25,3±1,42 ^b |
| MA | 33±1,9 ^a | 11,24±0,24 ^b | 34,84±0,23 ^a | 100 | 21,3±3,25 ^b | 25,7±2,57 ^b |
| GM | 22±4,2 ^b | 12,08±0,14 ^b | 35,03±0,35 ^a | 100 | 21,8±2,60 ^b | 24,2±2,99 ^b |
| GA | 33±1,3 ^a | 10,90±0,19 ^b | 33,71±0,65 ^a | 100 | 23,0±1,43 ^b | 25,6±3,32 ^b |
| 6,80 mg $\text{Cl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato | | | | | | |
| MM | 31±4,1 ^a | 9,21±0,91 ^{a,b} | 35,23±0,15 ^a | 100 | 27,0±1,99 ^a | 19,4±1,45 ^a |
| MA | 32±2,9 ^a | 8,26±0,16 ^a | 34,15±0,99 ^a | 100 | 26,1±1,91 ^a | 19,7±3,01 ^a |
| GM | 24±1,0 ^b | 7,29±0,85 ^{a,d} | 33,27±0,68 ^a | 100 | 22,4±1,54 ^b | 17,4±1,48 ^a |
| GA | 32±1,9 ^a | 6,68±0,98 ^{a,d} | 34,51±0,45 ^a | 100 | 30,0±3,66 ^a | 18,1±1,34 ^a |

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

As condições de pré-reticulação empregadas, bem como as diferenças estruturais (proporção de Blocos M/G e os valores de massa molar) dos alginatos estudados não geraram diferenças significativas na espessura dos filmes obtidos a partir dos alginatos MM, MA e GA sendo exceção os resultados obtidos para os filmes do alginato GM que apresentaram valores de espessura 33% menores que a dos demais filmes de alginato. Este comportamento possivelmente está relacionado ao menor comprimento de suas cadeias e ao menor volume ocupado por elas.

Os filmes pré-reticulados com 2,72 mg Ca^{2+}/g alginato apresentaram-se completamente solúveis. Observou-se que a partir da concentração de 5,44 mg Ca^{2+}/g alginato os filmes tiveram sua taxa inicial de solubilização reduzida. Após 24 horas, no entanto, os filmes apresentaram-se totalmente solubilizados indicando que as ligações formadas no processo de pré-reticulação não foram suficientes para manter a integridade dos filmes, mesmo para as estruturas formadas por alginatos com maior quantidades de Blocos G.

Comportamento semelhante foi observado através dos estudos já realizados no LEPPbio e também relatados por Pavlath e Robertson (1999) e Rhim (2004) nos quais a adição de pequenas quantidades de íons cálcio não reduziu a solubilidade dos filmes de alginato em água.

Analisando o teor de umidade contido nos filmes MM, MA, GM e GA verificou-se que esta propriedade não foi influenciada pelos diferentes processos de pré-reticulação empregados, bem como pela estrutura dos diferentes tipos de alginato, não sendo observada uma tendência definida para os valores encontrados.

O aumento da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na solução pré-reticuladora de 2,44 para 6,80 mg Ca^{2+}/g alginato provocou alterações significativas nos valores da tensão de ruptura, alongamento e permeabilidade ao vapor de água para os filmes, sendo estas alterações mais expressivas para o alginato GA (maior quantidade de Blocos G). Observa-se aumento de aproximadamente 60% nos

valores de tensão de ruptura associado à diminuição média de 49% do alongamento dos filmes, enquanto que a permeabilidade ao vapor de água teve os seus valores reduzidos em aproximadamente 50% com um tratamento com maior quantidade de íons cálcio.

Allen *et al.* (1963) classificaram o cálcio como o agente reticulante mais efetivo para o alginato o que permite justificar que mesmo trabalhando-se à baixas faixas de concentração é possível aumentar o grau de coesão da estrutura polimérica, refletindo em alterações nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

Zactiti (2004) desenvolveu suas pesquisas utilizando um alginato com maior quantidade de Blocos M, com massa molar na faixa de 10^5 Da realizando o processo de pré-reticulação de seus filmes com soluções contendo 5,44 mg Ca^{2+}/g alginato. Demais trabalhos no LEPPbio utilizaram quantidades iguais ou maiores que 10,88 mg Ca^{2+}/g alginato.

No entanto, neste estudo os alginatos provenientes de diferentes algas e tratados com 6,80 mg Ca^{2+}/g alginato apresentaram um melhor compromisso entre os valores das propriedades mecânicas e de barreira, principalmente quando comparados os resultados obtidos para os filmes dos alginatos com maior quantidade de Blocos G (GM e GA) em relação aos filmes dos alginatos MM e MA na mesma concentração. Estes resultados confirmam os da análise reológica, anteriormente apresentados.

4.2.2 Preparo dos filmes: definição do 2º estágio de reticulação

O estudo para avaliar a influência do 2º estágio de reticulação dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA teve como base a condição atual utilizada para os trabalhos desenvolvidos no LEPPbio, ou seja, tempo de imersão de 20 minutos em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol.

Dessa forma, com a finalidade de definir a condição ótima para o processo de reticulação complementar dos filmes de alginato foram avaliados os efeitos da concentração dos íons cálcio (3%, 5% e 8%), da adição do glicerol (3%, 6%) e do tempo de imersão dos filmes na solução reticuladora (10 e 20 minutos).

Visando maiores ganhos no alongamento e a redução da fragilidade dos filmes de alginato, buscou-se trabalhar também com as concentrações de 9 e 12% de glicerol na solução reticuladora (2º estágio). As estruturas originadas deste processo, no entanto, apresentaram considerável exsudação deste plastificante, inviabilizando o estudo nestas condições.

Outro fato observado foi que os filmes de alginato GM quando imersos na solução reticuladora contendo 5% e 8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 30 minutos apresentaram alta opacidade o que acabou por inviabilizar o estudo com este tempo de imersão. Este comportamento possivelmente está relacionado com as ligações de maior intensidade com os íons cálcio, visto que este alginato possui uma maior quantidade de Blocos G, mas também apresenta cadeias de menor comprimento, as quais não comportaram a quantidade excedente de íons cálcio difundida neste tempo permitindo até mesmo a solubilização parcial de sua estrutura.

4.2.2.1 Caracterização dos filmes de alginato de cálcio com dois estágios de reticulação

As etapas de reticulação são determinantes no processo de produção e na qualidade dos filmes de alginato. Através do estudo da influência da pré-reticulação no comportamento dos filmes, observou-se que há uma limitação na quantidade máxima de íons cálcio a ser adicionada à solução filmogênica, principalmente para os alginatos que possuem em sua estrutura uma maior quantidade de Blocos G. No entanto, independente da composição do alginato, o processo de pré-reticulação não é capaz de criar um número suficiente de junções efetivas entre as suas cadeias poliméricas e minimizar assim a alta

higroscopicidade inerente de seus filmes, a qual é refletida em altos valores de umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água.

O estágio complementar de reticulação consiste na imersão dos pré-filmes em uma solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de maior concentração permitindo, através do processo difusional dos íons cálcio, uma reticulação efetiva e uniforme.

Na Tabela 4.7 estão apresentados os resultados obtidos com filmes dos alginatos MM, MA, GM e GA pré-reticulados com 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato e posteriormente submetidos ao processo de reticulação complementar (2º estágio) com tempo de imersão de 20 minutos em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol.

Tabela 4.7 - Espessura (δ), permeabilidade ao vapor de água (*PVA*), massa solúvel (*MS*), umidade (ω), tensão de ruptura (*TR*) e alongamento (*A*) dos filmes de alginato pré-reticulados com 6,80 mg Ca^{2+} /g alginato e reticulação complementar (2º estágio) com tempo de imersão de 20 minutos em solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol.

| Alginatos | δ [μm] | <i>PVA</i> [(g.mm/m ² .dia.kPa)] | <i>MS</i> [%] | ω [%] | <i>TR</i> [MPa] | <i>A</i> [%] |
|-------------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Filmes do 1º estágio de reticulação | | | | | | |
| MM | 31±4,1 ^a | 9,21±0,91 ^a | 35,23±0,15 ^a | 100 | 27,0±1,99 ^a | 19,4±1,45 ^a |
| MA | 32±2,9 ^a | 8,26±0,16 ^{a,b} | 34,15±0,99 ^a | 100 | 26,1±1,91 ^a | 19,7±3,01 ^a |
| GM | 24±1,0 ^b | 7,29±0,85 ^{b,c} | 33,27±0,68 ^a | 100 | 22,4±1,54 ^b | 17,4±1,48 ^a |
| GA | 32±1,9 ^a | 6,68±0,98 ^c | 34,51±0,45 ^a | 100 | 30,0±3,66 ^a | 18,1±1,34 ^a |
| Filmes do 2º estágio de reticulação | | | | | | |
| MM | 27±4,8 ^b | 3,59±0,13 ^d | 17,68±0,89 ^c | 18,57±0,25 ^a | 79,7±2,42 ^c | 3,6±0,22 ^b |
| MA | 26±3,4 ^b | 3,39±0,16 ^d | 18,50±0,31 ^c | 21,85±0,35 ^b | 81,4±2,28 ^c | 3,8±0,49 ^b |
| GM | 19±2,1 ^c | 4,69±0,37 ^e | 20,72±0,32 ^b | 19,30±0,27 ^c | 62,8±2,23 ^d | 2,8±0,99 ^b |
| GA | 27±2,2 ^b | 3,26±0,28 ^d | 15,81±0,39 ^d | 20,54±0,17 ^d | 87,3±3,29 ^e | 3,0±0,35 ^b |

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

Observa-se que os filmes de alginato MM, MA, GM e GA, independentemente da quantidade de Blocos M e Blocos G, quando submetidos à reticulação complementar (2º estágio) apresentaram redução de sua espessura de aproximadamente 15%, quando comparados aos seus respectivos filmes pré-reticulados.

O alginato GM, no entanto, originou filmes com menor espessura se comparados aos demais filmes (MM, MA e GA) nas mesmas condições de reticulação. Este comportamento pode estar relacionado com sua massa molar que apresenta cadeias de menor comprimento e que possivelmente ocupam menor volume dando origem a filmes menos espessos, com menor densidade.

A redução na espessura dos filmes de alginato de aproximadamente 18% pode ser consequência da imersão dos filmes na solução reticuladora, o que pode ter ocasionado a solubilização parcial do biopolímero, visto que estes filmes apresentavam-se pré-reticulados com uma concentração relativamente baixa de íons cálcio. Outro fator que pode ter ocasionado este comportamento é a melhor acomodação das cadeias poliméricas, resultando numa estrutura mais compacta e coesa (PAVLATH; ROBERTSON, 1999; SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008).

Rhim (2004) observou que filmes de alginato imersos em solução de 2% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram menor espessura que os filmes reticulados pela adição direta dos íons à solução filme-formadora. Este autor atribuiu este comportamento à solubilização parcial dos filmes quando imersos em solução de cálcio de baixa concentração. Utilizando uma solução reticuladora de maior concentração esta redução mostrou-se menos pronunciada. Comportamento semelhante foi verificado nos vários trabalhos realizados no LEPPbio.

Analisando o teor de umidade dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA verifica-se que a reticulação complementar dos filmes gerou estruturas com menor umidade, mas sem uma tendência definida na redução. Este comportamento está associado ao aumento do grau de reticulação obtido no 2º estágio de reticulação levando à alterações na hidrofiliabilidade dos filmes e afetando a absorção de

umidade. Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisas realizadas no LEPPbio e também por Rhim (2004).

A solubilidade dos filmes submetidos ao 2º estágio de reticulação apresentou uma redução de aproximadamente 80% em seu valor em relação a dos filmes apenas pré-reticulados. Os filmes permaneceram íntegros após as 24 horas de imersão em água, confirmando assim que o processo de reticulação por difusão dos íons cálcio é mais eficiente para promover o aumento das ligações intermoleculares e pode ter dificultado a passagem do solvente através das cadeias poliméricas não permitindo a desestruturação dos filmes.

Dentre os filmes estudados, verificou-se que os filmes GA apresentaram menor solubilidade, comportamento devido à maior interação de seus Blocos G com os íons cálcio o qual origina uma estrutura mais coesa. Todavia, os filmes do alginato GM apesar de também possuírem em sua composição maior quantidade de Blocos G, apresentaram-se com maior grau de solubilidade dentre os filmes estudados, fato este que pode estar relacionado o comprimento de suas cadeias que são menores que as dos demais alginatos e originam uma menor interação intermolecular. Os filmes MM e MA apresentaram solubilidade intermediária, devido às suas ligações intermoleculares mais brandas.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA após o 2º estágio de reticulação sofreu apreciável redução dos seus valores, sendo este comportamento mais pronunciado para os alginato MA e GA, provavelmente devido à sua maior massa molar. Para os filmes de alginato GA este comportamento também é influenciado diretamente pela maior quantidade de Blocos G presentes em sua estrutura.

Os filmes do alginato GM também sofreram redução no valor de sua permeabilidade ao vapor de água se comparado aos resultados obtidos quando pré-reticulados. No entanto, levando-se em conta o tratamento complementar de reticulação, estes filmes apresentaram maior permeabilidade se comparados às

demais estruturas, no entanto, os seus valores foram influenciados por sua menor espessura.

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

Efeito pronunciado da etapa de reticulação complementar também foi observado nas propriedades mecânicas dos filmes. Enquanto os filmes pré-reticulados apresentavam baixa tensão de ruptura, os filmes com 2º estágio de reticulação apresentaram expressivo aumento (acima de 70%) desta característica. Houve considerável redução nos valores de alongamento destes filmes (aproximadamente 84%) se comparado aos valores obtidos pelos filmes pré-reticulados, sendo este comportamento característico de filmes que sofrem processo de reticulação.

Segundo Pavlath e Robertson (1999), devido ao aumento das associações das cadeias de grupos carboxílicos com os íons cálcio, os filmes tornam-se mais fortes, porém mais rígidos. Como o grau de reticulação dos filmes do 1º estágio é pequeno, há uma maior mobilidade das moléculas que faz com que estes sejam mais elásticos.

Os resultados de resistência mecânica dos filmes submetidos ao 2º estágio também indicam que os alginatos com maior quantidade de Blocos G apresentaram maior tensão na ruptura porém, não se observa diferenças significativas dos valores de alongamento para os diferentes tipos de alginato estudados.

Em filmes obtidos com polímeros sintéticos geralmente são observados altos valores para o alongamento e valores mais baixos para a tensão na ruptura. McHugh e Krochta (1994) relatam que filmes de polietileno de baixa densidade

apresentaram tensão de ruptura de apenas 13 MPa enquanto que o seu alongamento pode atingir até 500%.

4.2.2.1.1 Influência do tempo de imersão

Buscou-se avaliar o efeito do tempo de imersão dos filmes de alginato na solução reticuladora (2º estágio) e, para isso o tempo de contato foi variado de 10 e 20 minutos para os filmes de alginato MM, MA, GM e GA nas diferentes soluções. Na Tabela 4.8 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 4.8 - Espessura (δ), permeabilidade ao vapor de água (*PVA*), massa solúvel (*MS*), umidade (ω), tensão de ruptura (*TR*) e alongamento (*A*) dos filmes de alginato após a reticulação complementar com tempos diferentes de imersão (10 e 20 minutos) em solução de 3% de glicerol e 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

| Alginato | Tempo de imersão | δ [μm] | <i>PVA</i> [(g.mm/m ² .dia.kPa)] | <i>MS</i> [%] | ω [%] | <i>TR</i> [MPa] | <i>A</i> [%] |
|----------|------------------|-------------------------------|--|-------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| MM | 10 min | 27±2,3 ^a | 5,00±0,32 ^c | 23,42±0,17 ^d | 20,38±0,37 ^{b,d} | 59,7±3,71 ^c | 4,8±0,75 ^a |
| MM | 20 min | 27±4,8 ^a | 3,59±0,13 ^a | 17,68±0,89 ^a | 18,57±0,25 ^a | 79,7±2,42 ^b | 3,6±0,22 ^b |
| MA | 10 min | 27±1,9 ^a | 5,97±0,49 ^d | 22,55±0,33 ^e | 21,05±1,03 ^{b,c,d} | 69,5±2,25 ^a | 4,2±0,12 ^a |
| MA | 20 min | 26±3,4 ^a | 3,39±0,16 ^a | 18,50±0,91 ^a | 21,85±0,35 ^{c,d} | 81,4±2,28 ^b | 3,8±0,49 ^b |
| GM | 10 min | 19±4,5 ^b | 5,47±0,18 ^e | 25,62±0,41 ^f | 20,22±0,47 ^{b,d} | 49,4±4,18 ^e | 4,9±0,43 ^a |
| GM | 20 min | 19±2,1 ^b | 4,69±0,37 ^b | 20,72±0,32 ^b | 19,30±0,27 ^f | 62,8±2,23 ^c | 2,8±0,99 ^b |
| GA | 10 min | 27±1,6 ^a | 4,95±0,34 ^{b,c,e} | 21,18±0,21 ^b | 21,03±0,21 ^d | 76,9±3,41 ^b | 4,4±0,59 ^a |
| GA | 20 min | 27±2,2 ^a | 3,26±0,28 ^a | 15,81±0,39 ^c | 20,54±0,87 ^{b,d} | 87,3±3,29 ^d | 3,0±0,35 ^b |

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.

Segundo Bierhalz (2010), o tempo de contato dos filmes com a solução reticuladora deve ser suficiente para que todas as zonas de junção disponíveis

sejam reticuladas, promovendo ligações efetivas as quais resultam em filmes fortes e resistentes.

Avaliando-se a espessura dos filmes dos diferentes tipos de alginato estudados, verificou-se que a redução no tempo de imersão de 20 para 10 minutos não provocou alterações significativas nos valores de espessura quando comparados os filmes originados com alginatos de mesma quantidade de Blocos M e Blocos G, indicando que não houve solubilização do polímero na solução reticuladora ou mesmo alteração no volume de sua cadeia estrutural. Comportamento semelhante foi observado nos demais trabalhos realizados no LEPPbio com filmes de alginato (ZACTITI, 2004; DA SILVA *et al.*, 2009; BIERHALZ, 2010; TURBIANI *et al.*, 2011).

O conteúdo de umidade não apresentou uma tendência definida quando são comparados filmes de alginato com mesma razão entre Blocos M e de Blocos G. Os resultados obtidos para umidade são semelhantes aos relatados na literatura para os filmes de alginato 13 a 25% (RHIM, 2004; da SILVA *et al.*, 2009).

A quantidade de massa solubilizada em filmes de alginato apresentou-se inversamente proporcional ao tempo de imersão, ou seja, a solubilidade aumentou com a diminuição do tempo de imersão dos filmes na solução reticuladora. Os resultados indicam que no tempo de imersão de 20 minutos houve a diminuição da permeação de moléculas de água para o interior dos filmes sendo este efeito mais pronunciado para os filmes GA que possui alta massa molar e maior quantidade de Blocos G, apresentado assim uma estrutura mais compacta. Os alginatos MM e MA produziram filmes que apresentaram valores de solubilidade intermediários e semelhantes entre si.

Filmes produzidos com o alginato GM apesar de possuírem maior proporção de Blocos G em sua estrutura apresentaram valores de solubilidade superior aos dos demais alginatos possivelmente devido à sua menor massa molar. Possivelmente este tipo de alginato possui uma influência em suas propriedades muito mais relacionada com sua massa molar do que com o seu conteúdo de

Blocos G apresentando comportamento contrário ao descrito por Liu *et al.* (2003) e Draget *et al.* (1994) que classificam a massa molar como um fator secundário na definição das características do alginato se comparado ao conteúdo M/G.

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes confeccionados com a mesma quantidade M/G também apresentou diferenças significativas entre os dois tempos de imersão e observou-se que valores mais baixos foram obtidos para os filmes do alginato GA (3,26 g.mm/m².dia.kPa em 20 minutos de imersão), provavelmente devido à sua maior massa molar e conteúdo de Blocos G. O alginato GM apresentou permeabilidade ao vapor de água 31% (4,69 g.mm/m².dia.kPa em 20 minutos de imersão) maior que as dos demais filmes estudados devido a sua estrutura menos densa.

Em seus estudos, Zactiti (2004) obteve filmes de alginato reticulados com 5% de CaCl₂.2H₂O no 2º estágio com PVA de 4,69 g.mm/m².dia.kPa, porém a espessura dos mesmos era de 95 µm.

Olivas e Barbosa-Cánovas (2008) trabalharam com alginatos com diferentes quantidades M/G e verificaram que filmes com maior quantidades de Blocos G fornecem maior barreira à umidade, isto é, menores valores de PVA. Resultado semelhante foi obtido para filmes do alginato GA, neste estudo. Na pesquisa daqueles autores foram avaliados ainda diferentes tempos de imersão (0, 1, 3, 5, 10 e 20 minutos) em solução aquosa de cálcio sendo que os melhores valores foram obtidos para o tempo de 3 minutos de imersão. Acima deste tempo, houve aumento considerável do valor da PVA que foi atribuído ao prevailecimento do processo de solubilização sobre a reticulação.

Da Silva (2009), ao estudar os efeitos do tempo de imersão em conjunto com outras variáveis determinou que 30 minutos era o tempo de imersão necessário para que os filmes de alginato e quitosana apresentem boas propriedades mecânicas e de barreira.

Os valores de tensão na ruptura encontrados indicam que o tempo de imersão influenciou no comportamento mecânico dos filmes, pois houve um

aumento significativo nos valores de tensão na ruptura (aproximadamente 20%) e redução de 30%, em média, nos valores de alongamento ao se aumentar o tempo de imersão de 10 para 20 minutos.

Sartori *et al.* (1997) verificaram, para filmes com diferentes tipos de alginato imersos em solução de 0,8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que o processo de troca iônica é muito rápido, e que mais da metade da conversão entre o sódio e o cálcio ocorrem nos primeiros 30 segundos, sendo que após 30 minutos praticamente não há mais variação no conteúdo de íons cálcio.

Resultado equivalente foi informado por Roger *et al.* (2006). Estes autores 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 à difusão devido às ligações já existentes, fazendo com que o processo seja mais lento nos instantes finais.

A partir da avaliação dos resultados, o tempo de imersão na solução reticuladora de 20 minutos foi definido como ideal, para os filmes de alginato MM, MA, GM e GA.

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

De maneira geral, os filmes de alginato MM, MA, GM e GA não apresentaram perda da transparência, regiões heterogêneas ou quebradiças quando a concentração de glicerol na solução reticuladora variou de 3 a 6%. Os resultados de espessura, permeabilidade ao vapor de água, umidade, solubilidade e propriedades mecânicas estão apresentados na Tabela 4.9.

O processo de reticulação empregando 6% de glicerol, independente da composição dos alginatos utilizados no preparo dos filmes, gerou estruturas com

maior maleabilidade não sendo observadas alterações significativas em suas espessuras.

Tabela 4.9 - Espessura (δ), permeabilidade ao vapor de água (*PVA*), massa solúvel (*MS*), umidade (ω), tensão de ruptura (*TR*) e alongamento (*A*) dos filmes de alginato após a reticulação complementar com 3 e 6% de glicerol e 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

| Alginatos | Glicerol | δ [μm] | <i>PVA</i> [(g.mm/m ² .dia.kPa)] | <i>MS</i> [%] | ω [%] | <i>TR</i> [MPa] | <i>A</i> [%] |
|-----------|----------|-------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| MM | 3% | 27±4,8 ^a | 3,59±0,13 ^a | 17,68±0,89 ^a | 18,57±0,25 ^a | 79,7±2,42 ^a | 3,6±0,22 ^a |
| MM | 6% | 28±2,3 ^a | 7,17±0,37 ^d | 29,77±0,13 ^d | 28,82±0,42 ^e | 50,6±3,33 ^e | 7,0±0,51 ^c |
| MA | 3% | 26±3,4 ^a | 3,39±0,16 ^a | 18,50±0,91 ^a | 21,85±0,35 ^b | 81,4±2,28 ^b | 3,8±0,49 ^a |
| MA | 6% | 25±4,8 ^a | 7,49±0,21 ^d | 28,51±0,44 ^e | 30,27±0,12 ^f | 53,6±3,19 ^e | 7,3±0,22 ^c |
| GM | 3% | 19±2,1 ^b | 4,69±0,37 ^b | 20,72±0,32 ^b | 19,30±0,27 ^c | 62,8±2,23 ^c | 2,8±0,99 ^a |
| GM | 6% | 20±1,1 ^b | 8,56±0,41 ^e | 30,39±0,19 ^f | 34,02±0,54 ^f | 47,8±3,47 ^f | 7,8±0,35 ^c |
| GA | 3% | 27±2,2 ^a | 3,26±0,28 ^a | 15,81±0,39 ^c | 20,54±0,17 ^d | 87,3±3,29 ^d | 3,0±0,35 ^a |
| GA | 6% | 28±1,0 ^a | 6,32±0,13 ^c | 22,30±0,31 ^d | 28,30±0,31 ^e | 51,4±2,67 ^e | 6,2±0,28 ^b |

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.

O conteúdo de umidade aumentou em média 35% para os filmes dos alginatos MM e GM. Os filmes dos alginatos MA apresentaram acréscimo de umidade de 30% enquanto que os filmes GA apresentaram o menor ganho (22%) possivelmente devido à sua maior interação com o cálcio e a menor disponibilidade de grupos carboxílicos livres.

A massa solubilizada dos filmes sofreram alterações significativas, variando de 30 a 46%, sendo o menor valor obtido para os filmes GA. O aumento da concentração do glicerol diminui as forças coesivas, afastando as cadeias poliméricas. Além disso, este plastificante possui alta solubilidade em água, sendo facilmente lixiviado da matriz polimérica.

Zactiti (2004) observou aumento na massa solubilizada em água em filmes de alginato ao aumentar a concentração de glicerol de 0,7 para 5%. Bierhalz (2010), trabalhando com filmes de alginato e pectina aditivados com 1, 3, 5 e 7% de glicerol também relatou alterações significativas em seus valores de massa solubilizada e umidade.

Da Silva *et al.* (2009) verificaram que a presença de 15% de plastificante na solução reticuladora resultou em filmes de alginato com 37% de massa solubilizada e admitiu que a exsudação do próprio glicerol pode ser responsável por estes altos valores.

O efeito do plastificante nas propriedades de barreira dos filmes também ficou evidente através dos resultados da permeabilidade ao vapor de água os quais sofreram em média um aumento acima de 40% com o aumento da concentração de glicerol. Resultados semelhantes foram observados por Zactiti (2004), da Silva (2009), Bierhalz (2010), Santana (2010) e Turbiani *et al.* (2011).

Filmes de natureza hidrofílica, como os de alginato de sódio, costumam apresentar pobre barreira à transferência de água, o que é amenizado pela formação de fortes redes tridimensionais com os íons cálcio. O plastificante utilizado para melhorar a flexibilidade dos filmes, exerce grande influência negativa sobre as propriedades de barreira, pois há uma redução das forças intermoleculares com o consequente aumento do volume livre e dos movimentos das cadeias, facilitando a permeação do vapor de água (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005; SANTANA, 2010).

A elasticidade melhorou significativamente com o aumento dos níveis de glicerol e foi observada uma relação inversa entre a tensão na ruptura e o alongamento, pois os filmes contendo 6% de glicerol apresentaram a maior elasticidade e, também, a menor tensão na ruptura. Este comportamento é comum, pois a função do plastificante é justamente modificar a organização tridimensional das cadeias com o intuito de melhorar a mobilidade das moléculas.

Entretanto, há a redução das forças coesivas fazendo com que os filmes mais elásticos sejam menos resistentes.

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

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

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

As características desenvolvidas pelos filmes dos alginatos estudados quando imersos na solução reticuladora (2º estágio) por 20 minutos contendo 3% de glicerol e 3, 5 ou 8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ estão apresentados na Tabela 4.10.

Analisando o comportamento dos filmes de alginato reticulados com solução contendo 3% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não são observadas diferenças significativas nos valores de espessura em relação as dos filmes reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. No entanto, são evidentes as alterações ocorridas nas propriedades de barreira e mecânicas destes filmes devido a menor concentração de cálcio e consequentemente a formação de um menor número de junções entre as cadeias poliméricas.

O processo de reticulação complementar utilizando 3% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ originou filmes mais solúveis, com menor barreira ao vapor de água e mais úmidos. Os valores de tensão de ruptura sofreram redução de seus valores, no entanto, não foram observadas alterações significativas do alongamento destes filmes, condição esta que era esperada principalmente para os filmes dos

alginatos MM e MA, os quais possuem menor quantidade de Blocos G em sua composição.

Tabela 4.10 - Espessura (δ), permeabilidade ao vapor de água (*PVA*), massa solúvel (*MS*), umidade (ω), tensão de ruptura (*TR*) e alongamento (*A*) dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA após a reticulação complementar com soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 3, 5 e 8%, contendo 3% de glicerol e 20 minutos de contato.

| Glicerol 3% | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | δ [μm] | <i>PVA</i> [(g.mm/m ² .dia.kPa)] | <i>MS</i> [%] | ω [%] | <i>TR</i> [MPa] | <i>A</i> [%] |
|----------------|---|-------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| MM | 3% | 26±2,3 ^a | 7,00±0,32 ^c | 18,12±0,12 ^a | 22,38±0,28 ^c | 62,7±3,71 ^b | 4,0±0,44 ^a |
| MM | 5% | 27±4,8 ^a | 3,59±0,13 ^a | 17,68±0,89 ^a | 18,57±0,25 ^b | 79,7±2,42 ^a | 3,6±0,22 ^a |
| MM | 8% | 31±1,5 ^b | 9,32±0,56 ^f | 22,53±0,43 ^c | 26,35±0,34 ^a | 67,9±4,29 ^b | 3,9±0,15 ^a |
| MA | 3% | 27±2,1 ^a | 7,07±0,18 ^c | 19,32±0,33 ^e | 23,02±1,23 ^d | 65,5±2,25 ^b | 4,1±0,12 ^a |
| MA | 5% | 26±3,4 ^a | 3,39±0,16 ^a | 18,50±0,91 ^a | 21,85±0,35 ^a | 81,4±2,28 ^a | 3,8±0,49 ^a |
| MA | 8% | 32±3,8 ^b | 9,29±0,31 ^f | 24,58±0,73 ^d | 21,43±0,56 ^a | 62,3±2,19 ^c | 3,8±0,21 ^a |
| GM | 3% | 19±1,9 ^a | 7,97±0,18 ^d | 22,62±0,44 ^c | 25,03±0,26 ^e | 59,4±4,18 ^a | 3,5±0,26 ^a |
| GM | 5% | 19±2,1 ^a | 4,69±0,37 ^b | 20,72±0,32 ^e | 19,30±0,27 ^c | 62,8±2,23 ^a | 2,8±0,99 ^a |
| GM | 8% | 21±2,5 ^a | 8,99±1,31 ^g | 33,40±0,18 ^f | 21,18±0,29 ^a | 43,9±4,41 ^a | 2,0±0,34 ^b |
| GA | 3% | 27±2,9 ^a | 6,09±0,11 ^e | 17,92±0,34 ^a | 21,12±0,21 ^a | 78,9±5,31 ^a | 3,9±0,43 ^a |
| GA | 5% | 27±2,2 ^a | 3,26±0,28 ^a | 15,81±0,39 ^b | 20,54±0,17 ^c | 87,3±3,29 ^e | 3,0±0,35 ^a |
| GA | 8% | 30±2,5 ^b | 8,01±0,38 ^g | 22,80±0,27 ^c | 21,28±0,27 ^a | 69,8±4,22 ^a | 4,1±0,20 ^a |

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

Os filmes de alginato quando tratados por 20 minutos com solução reticuladora contendo 3% de glicerol e 8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentaram também considerável perda em qualidade de suas características se comparados aos filmes reticulados com 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol.

Possivelmente o aumento dos valores de espessura, solubilidade em água e a redução das propriedades de barreira e mecânicas estão relacionados com a ocorrência de uma reticulação imediata na superfície dos filmes bloqueando a entrada dos íons para as regiões mais internas e impedindo o desenvolvimento de ligações efetivas e em maior número entre as cadeias. Segundo Draget *et al.* (1997), o filme apresentaria uma estrutura polimérica densamente reticulada na superfície mas, aberta ou parcialmente reticulada em seu interior.

Remuñan-Lopez e Bodmeier (1997) confeccionaram filmes de alginato reticulados por imersão em diversas concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ durante uma hora e verificaram que altas concentrações de cálcio provocaram o aumento da permeabilidade ao vapor de água e diminuição da resistência mecânica dos filmes. Os autores atribuíram este comportamento à rápida reticulação da superfície que dificulta a difusão dos íons para dentro do filme e ressaltam que o tempo de imersão em soluções reticuladoras contendo altas concentrações de cálcio deveria ser maior.

Em relação à permeabilidade ao vapor de água, também constatou-se um aumento deste coeficiente nos níveis mais altos de cálcio o qual possivelmente está relacionado com os maiores valores de espessura. No entanto, Rhim (2004) e Zactiti (2004) estudaram diversas concentrações de cálcio na solução reticuladora e não observaram diferenças significativas na PVA dos filmes de alginato.

Zactiti (2004) ao avaliar as concentrações de 2, 3, 4, 5 e 7% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em filmes de alginato, verificou que a tensão na ruptura foi beneficiada com o aumento da concentração de 5% para 7%, mas as demais propriedades como alongamento e massa solubilizada não sofreram alteração com os diferentes tratamentos.

Bierhalz (2010) trabalhou com filmes de alginato e alginato/pectina e relatou comportamento semelhante ao observado neste trabalho quando avaliou a influência do estágio complementar de reticulação. Empregando um tempo de

imersão de 20 minutos e uma solução reticuladora contendo 6, 7 e 8% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol verificou-se diminuição nas propriedades dos filmes.

A partir da avaliação dos resultados, definiu-se que a solução contendo 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como padrão para o processo de reticulação dos filmes avaliados neste estudo.

4.2.3 Determinação do conteúdo de cálcio

A quantidade de íons cálcio efetivamente incorporada aos filmes de alginato MM, MA, GM e GA através dos processos de reticulação (1º e 2º estágio) foi determinada através da espectroscopia de absorção atômica seguindo a metodologia descrita na Seção 3.4.8.

Os resultados da Tabela 4.11 indicam que o conteúdo de cálcio presente nos filmes pré-reticulados com 6,80 mg Ca^{2+}/g alginato não apresentou diferenças significativas, independente da relação M/G presentes na sua estrutura dos diferentes tipos de alginato. Resultados estes que estão em acordo com os demais até então apresentados nesta pesquisa.

Bierhalz (2010), trabalhando com filmes de alginato e alginato/pectina pré-reticulados também obteve valores uniformes de teor de cálcio e atribuiu esta tendência à incorporação direta destes íons à solução filmogênica.

Para os filmes tratados com o 2º estágio de reticulação (3% de glicerol, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, com 20 minutos de imersão), o conteúdo de cálcio apresentou considerável variação entre os tipos de filmes de alginato estudados.

Os valores na Tabela 4.11 deixam evidente que os filmes produzidos pelos alginatos GM e GA, admitiram uma menor quantidade de íons cálcio em sua estrutura. Este comportamento era esperado visto que o processo de pré-reticulação se aplica de forma mais eficiente às cadeias do alginato com maior quantidade de Blocos G sendo necessária uma menor quantidade destes íons no

2º estágio de reticulação. Todavia, para os filmes GM é possível que haja também uma limitação ocasionada pelo menor comprimento de suas cadeias permitindo a formação de um menor número de junções e refletindo em suas propriedades mecânicas e de barreira como pôde ser observado anteriormente.

Tabela 4.11 – Conteúdo efetivo de cálcio presente nos filmes com 1º e 2º estágios de reticulação.

| Filme | Conteúdo de cálcio ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ filme seco) | |
|-------|--|-------------------------------|
| | 1º estágio* | 2º estágio** |
| MM | 0,43 \pm 0,005 ^a | 4,49 \pm 0,032 ^a |
| MA | 0,45 \pm 0,003 ^a | 4,33 \pm 0,057 ^a |
| GM | 0,47 \pm 0,004 ^a | 2,12 \pm 0,024 ^b |
| GA | 0,43 \pm 0,002 ^a | 3,07 \pm 0,045 ^c |

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

* 6,80 mg Ca^{2+}/g alginato; ** 3% de glicerol, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, com 20 minutos de imersão

Os filmes dos alginato MM e MA apresentaram resultados semelhantes entre si, admitindo uma maior quantidade de íons cálcio em sua estrutura devido as suas ligações mais brandas com estes íons. Valores de conteúdo de cálcio de 2,25, 3,29 e 4,35 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ filme seco foram encontrados por da Silva (2009) e Bierhlaz (2010).

4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO NATAMICINA COMO AGENTE ANTIFÚNGICO

Os filmes dos alginato MM, MA, GM e GA contendo 4% de natamicina (4 g natamicina/100 g alginato) foram preparados de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.3.3 e utilizando as condições consideradas padrão (reticulados com 3% de glicerol, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e tempo de imersão de 20 minutos). Estes filmes foram caracterizados quanto à espessura, permeabilidade ao vapor de água, umidade, massa solúvel e propriedades mecânicas (tensão de ruptura e alongamento), grau de intumescimento, microscopia eletrônica de varredura e propriedades ópticas, sendo comparados com suas respectivas estruturas sem a presença deste antimicrobiano em sua formulação.

Na Tabela 4.12 estão apresentados os resultados de espessura, permeabilidade ao vapor de água, umidade, massa solúvel, tensão de ruptura e alongamento dos filmes de alginato comparados aos filmes produzidos sob estas mesmas condições contendo 4% de natamicina.

De maneira geral, os filmes ativos produzidos com os alginatos MM, MA, GM e GA apresentaram-se manuseáveis, mas com maior grau perceptível de opacidade e rugosidade.

Observa-se através dos resultados, que a presença da natamicina alterou a espessura dos filmes, possivelmente devido à presença de cristais presentes na superfície não incorporados internamente à matriz polimérica. Este comportamento é mais acentuado para os filmes produzidos com o alginato GM (aumento de espessura de 24%), enquanto que para os demais filmes houve um aumento médio de 14%.

Os valores de umidade dos filmes contendo natamicina seguiram a mesma tendência apresentada pelos filmes que não contêm o antimicrobiano em sua formulação. Observa-se, no entanto, crescente aumento da solubilidade, principalmente para o filme GM (aumento de 37,5% no valor de sua solubilidade). Para os filmes MM, MA e GA os valores de solubilidade aumentaram em média 32%.

Tabela 4.12 – Espessura (δ), permeabilidade ao vapor de água (*PVA*), umidade (ω), massa solúvel (*MS*), tensão de ruptura (*TR*) e alongamento (*A*) dos filmes de alginato reticulados com 3% de glicerol, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e tempo de imersão de 20 minutos comparados aos filmes produzidos sob estas mesmas condições contendo 4% de natamicina.

| Alginatos | δ [μm] | <i>PVA</i> [(g.mm/m ² .dia.kPa)] | ω [%] | <i>MS</i> [%] | <i>TR</i> [MPa] | <i>A</i> [%] |
|---|-------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Filmes sem natamicina | | | | | | |
| MM | 27±4,8 ^a | 3,59±0,13 ^a | 18,57±0,25 ^a | 17,68±0,89 ^a | 79,6±2,42 ^a | 3,6±0,22 ^a |
| MA | 26±3,4 ^a | 3,39±0,16 ^a | 21,85±0,35 ^b | 18,50±0,91 ^a | 81,4±2,28 ^a | 3,8±0,49 ^a |
| GM | 19±2,1 ^b | 4,69±0,37 ^b | 19,30±0,27 ^d | 20,72±0,32 ^b | 62,8±2,23 ^b | 2,8±0,99 ^a |
| GA | 27±2,2 ^a | 3,26±0,28 ^a | 20,54±0,17 ^c | 15,81±0,39 ^c | 87,3±3,29 ^c | 3,0±0,35 ^a |
| Filmes formados com uma solução contendo 4 g natamicina/ 100 g alginato | | | | | | |
| MM | 30±2,3 ^c | 6,20±0,23 ^c | 16,88±0,94 ^e | 27,87±0,42 ^d | 68,1±4,02 ^d | 2,8±0,87 ^a |
| MA | 31±2,9 ^c | 6,22±0,73 ^c | 17,35±0,42 ^e | 27,85±0,35 ^d | 65,9±4,43 ^d | 3,0±0,25 ^a |
| GM | 25±3,5 ^a | 9,56±1,28 ^e | 18,17±0,54 ^a | 32,52±0,57 ^e | 48,9±5,45 ^e | 3,1±0,19 ^a |
| GA | 32±3,2 ^c | 5,44±0,71 ^d | 17,44±0,73 ^e | 22,54±0,29 ^f | 79,4±4,51 ^a | 2,9±0,85 ^a |

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

A permeabilidade ao vapor de água sofreu considerável aumento para todos os filmes contendo natamicina se comparados aos seus respectivos filmes sem o antimicrobiano em sua formulação. Este comportamento foi mais acentuado para os filmes de alginato GM o qual apesar de possuir maior quantidade de Blocos G apresenta menor massa molar. Os alginato MM e MA apresentaram aumento intermediário desta propriedade, enquanto que o alginato GA demonstrou sofrer menor alteração, comportamento este que também pode ser atribuído à sua maior massa molar mas, também à sua maior afinidade com os íons cálcio.

A tensão de ruptura dos filmes sofreu redução. Os valores de alongamento, no entanto, mantiveram a mesma tendência dos filmes confeccionados sem o antimicrobiano.

De maneira geral, a difícil incorporação e compatibilização da natamicina na matriz polimérica dos filmes de alginato causou alterações em sua estrutura prejudicando o processo de reticulação e o desenvolvimento das zonas de junção o que refletiu em menor coesividade das cadeias poliméricas e maior volume livre das moléculas facilitando a permeação da água aumentando os valores de solubilidade e permeabilidade dos filmes, além de torna-los menos resistentes mecanicamente.

Zactiti *et al.* (2009), trabalhando com filmes de alginato contendo sorbato de potássio como agente antimicrobiano não observaram diferenças na espessura dos filmes de alginato bem como em suas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. Todavia, houve considerável aumento dos valores de massa solubilizada devido ao alto grau de lixiviação do sorbato de potássio em água.

Da Silva (2009) verificou que a adição de natamicina em quantidades superiores a 4% geram perdas em propriedades mecânicas e de barreira nos filmes de alginato. 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.

Bierhalz (2010) verificou que filmes de alginato e alginato com pectina contendo 4% de natamicina não só apresentaram maior solubilidade, mas também perdas em suas propriedades mecânicas e de barreira devido possivelmente a menor compatibilidade do agente ativo com a pectina, o que dificultou a reticulação desses filmes com os íons cálcio.

Benevides *et al.* (2011) incorporaram óleo essencial de orégano em filmes de alginato de cálcio e observaram maior alongamento dos filmes, menor permeabilidade do vapor de água e boa ação antibacteriana sendo que os valores de tensão de ruptura para estes filmes sofreram considerável redução com o

aumento da concentração deste agente. Por outro lado, Pranoto *et al.* (2005a), trabalhando também com filmes de alginato, mas incorporando óleo de alho, verificaram considerável aumento da permeabilidade ao vapor de água.

4.3.1 Intumescimento (I)

Foram determinados os tempos de estabilização do processo de absorção de água dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA reticulados com 3% de glicerol, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 20 minutos e para filmes com estas mesma condições de reticulação contendo 4% de natamicina em sua formulação.

Na Figura 4.18 estão traçadas as curvas de absorção de água dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA assim como de seus respectivos filmes ativos.

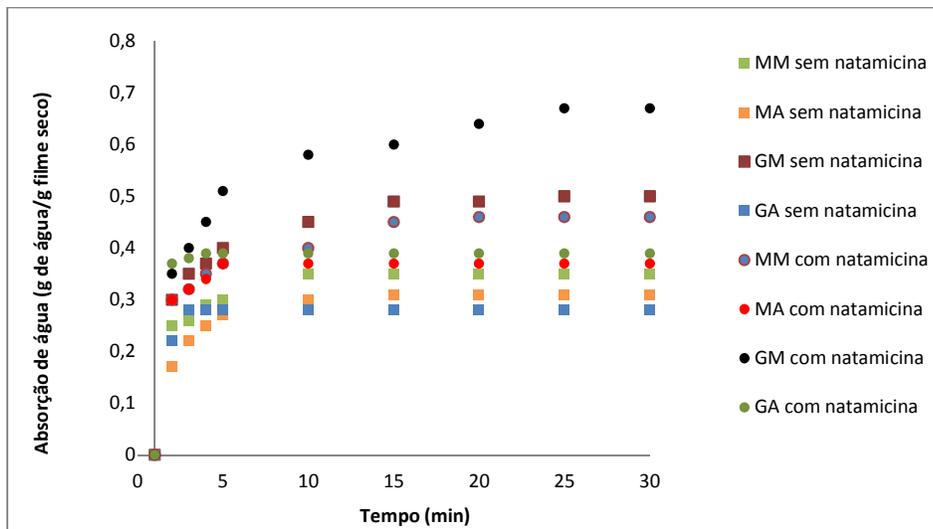


Figura 4.18 – Curvas de absorção de água dos filmes MM, MA, GM e GA reticulados com 3% de glicerol, 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 20 minutos com e sem natamicina.

Verifica-se que os filmes GA sem natamicina absorvem uma menor quantidade de água e atingem o equilíbrio mais rapidamente, se comparado aos

demais filmes avaliados. Este comportamento era esperado, visto que este tipo de alginato possui uma maior quantidade de Blocos G em sua estrutura. Quando reticulados com íons cálcio, ocorre um maior número de junções efetivas entre as suas cadeias minimizando a movimentação e o inchamento de sua estrutura e a consequente permeação de água na matriz do polímero.

A capacidade de absorção de água pelos filmes de alginato é facilitada pelos grupos carboxílicos, que se associam fortemente às moléculas de água. Um aumento no grau de reticulação diminui a disponibilidade destes grupos e, conseqüentemente, a hidrofiliabilidade do sistema (BRACCINI; PEREZ, 2001; FANG *et al.*, 2008).

Devido à relação entre o intumescimento e a extensão da reticulação, esperava-se que os filmes produzidos com o alginato GM sem o agente antimicótico apresentassem comportamento semelhante ao dos filmes GA. No entanto, os filmes GM apresentaram maior capacidade de absorção de água quando comparados aos filmes GA e até mesmo em relação aos filmes MM e MA demonstrando que a massa molar apresentou maior influência no comportamento deste filme que a distribuição dos Blocos M e Blocos G em sua estrutura.

Os filmes dos alginatos MM e MA apresentaram maior capacidade de absorção de água se comparados aos filmes GA. Comportamento semelhante ao obtido para os filmes MM e MA foram relatados por da Silva (2009) e Bierhlaz (2010).

Para os filmes contendo a natamicina a avaliação do grau de intumescimento permitiu prever as modificações na matriz polimérica causadas pelo aumento de volume entre as cadeias, o qual está relacionado com a difusividade do agente antimicótico.

Tendência semelhante à dos filmes de alginato sem natamicina foi apresentada, porém os valores de absorção de água apresentaram considerável aumento. A natamicina possivelmente provocou o desenvolvimento de uma estrutura não compacta a qual permitiu a difusão de moléculas de água para o

interior dos filmes. As moléculas de água acomodaram-se na fase polimérica provocando uma mudança no arranjo espacial das cadeias e o consequente aumento do volume da matriz permitindo uma maior lixiviação do agente ativo (LUCAS *et al.*, 2001, ZACTITI, 2004, DA SILVA, 2009).

Observa-se que o filme GM apesar de apresentar maior quantidade de Blocos G em sua cadeia, se comparada aos demais filmes estudados, apresentou o maior valor de absorção de água, possivelmente devido à desestruturação causada pela natamicina em sua cadeia polimérica.

Zactiti (2004) e da Silva (2009) verificaram que a absorção de água pelos filmes de alginato aumentava proporcionalmente à quantidade de agente antimicótico, no entanto, Bierhalz (2010) não observou alterações significativas.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura permitiu correlacionar as propriedades físico-químicas dos filmes dos alginatos MM, MA, GM e GA e sua estrutura morfológica sendo possível visualizar imperfeições, a presença de poros e cristais, separação de fases e o grau de compatibilidade entre o agente antimicótico e os diferentes tipos de alginatos.

As micrografias da superfície e da seção transversal (fratura) dos filmes com 2º estágio de reticulação não possuindo natamicina em sua formulação e das estruturas correspondentes formuladas com 4% de natamicina estão apresentadas nas Figuras 4.22 a 4.25.

De maneira geral, os filmes com 2º estágio de reticulação (sem natamicina) apresentaram superfícies lisas e homogêneas, mas pequenos pontos brancos, indicando que parte do cálcio usado na reticulação complementar não foi incorporada à matriz dos filmes corroborando com os resultados obtidos através da análise do conteúdo efetivo de cálcio presente nos filmes.

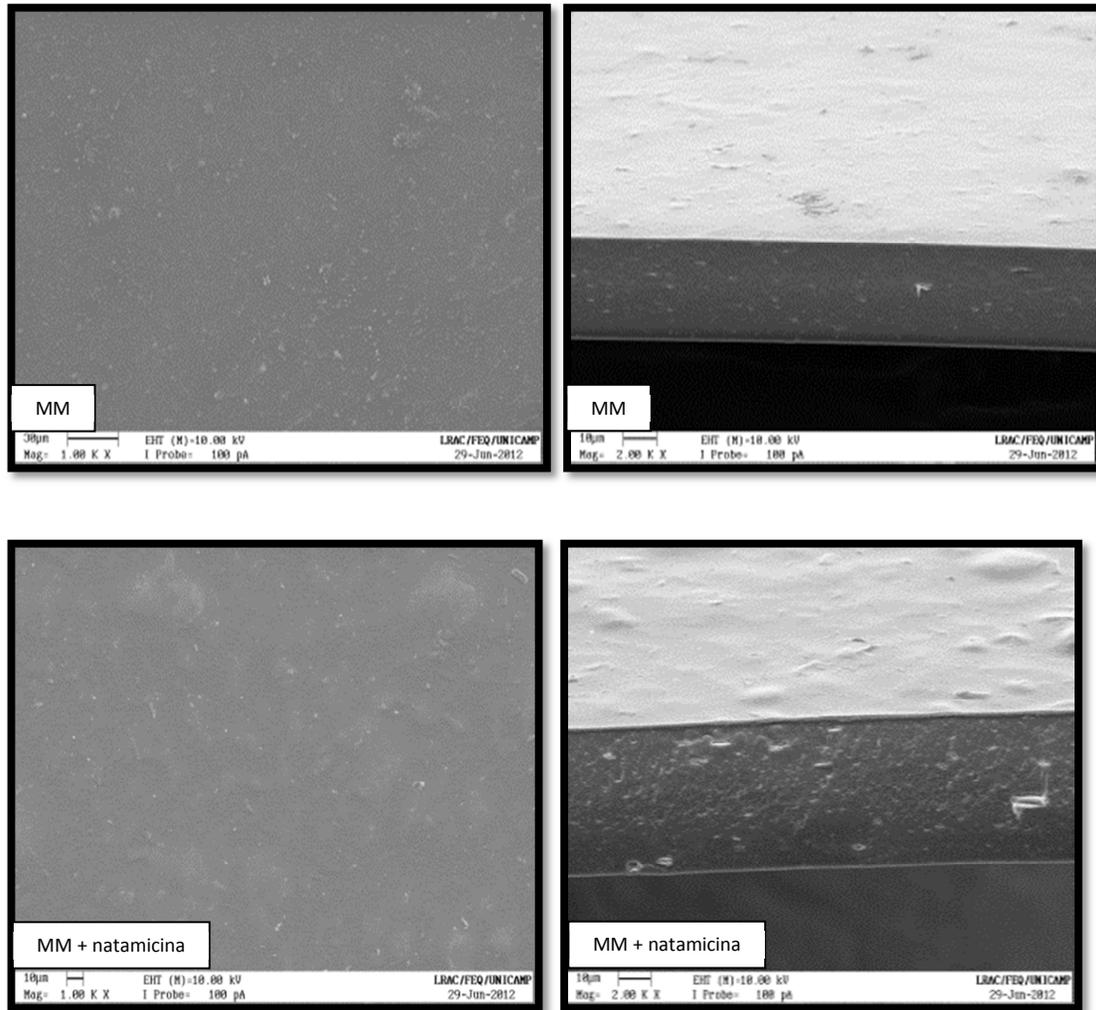


Figura 4.22 – Micrografias da superfície (aumento de 1000 vezes) e fratura (aumento de 2000 vezes) dos filmes de alginato MM sem e com natamicina.

A seção transversal dos filmes dos diferentes tipos de alginato (sem natamicina) demonstram estruturas bem compactadas, sem indícios de separação de fases ou presença de trincas. Exceção pode ser observada na micrografia da secção transversal do filme GA (Figura 4.25) onde houve o desenvolvimento de pequenas trincas possivelmente geradas por uma maior rigidez localizada, ocasionada por sua reação mais intensa com os íons cálcio.

A incorporação da natamicina à formulação dos filmes dos alginatos estudados provocou grande alteração morfológica havendo a presença de grânulos e cristais insolúveis depositados na superfície e na seção transversal dos filmes, sendo este comportamento intensificado para os filmes GM (Figura 4.24).

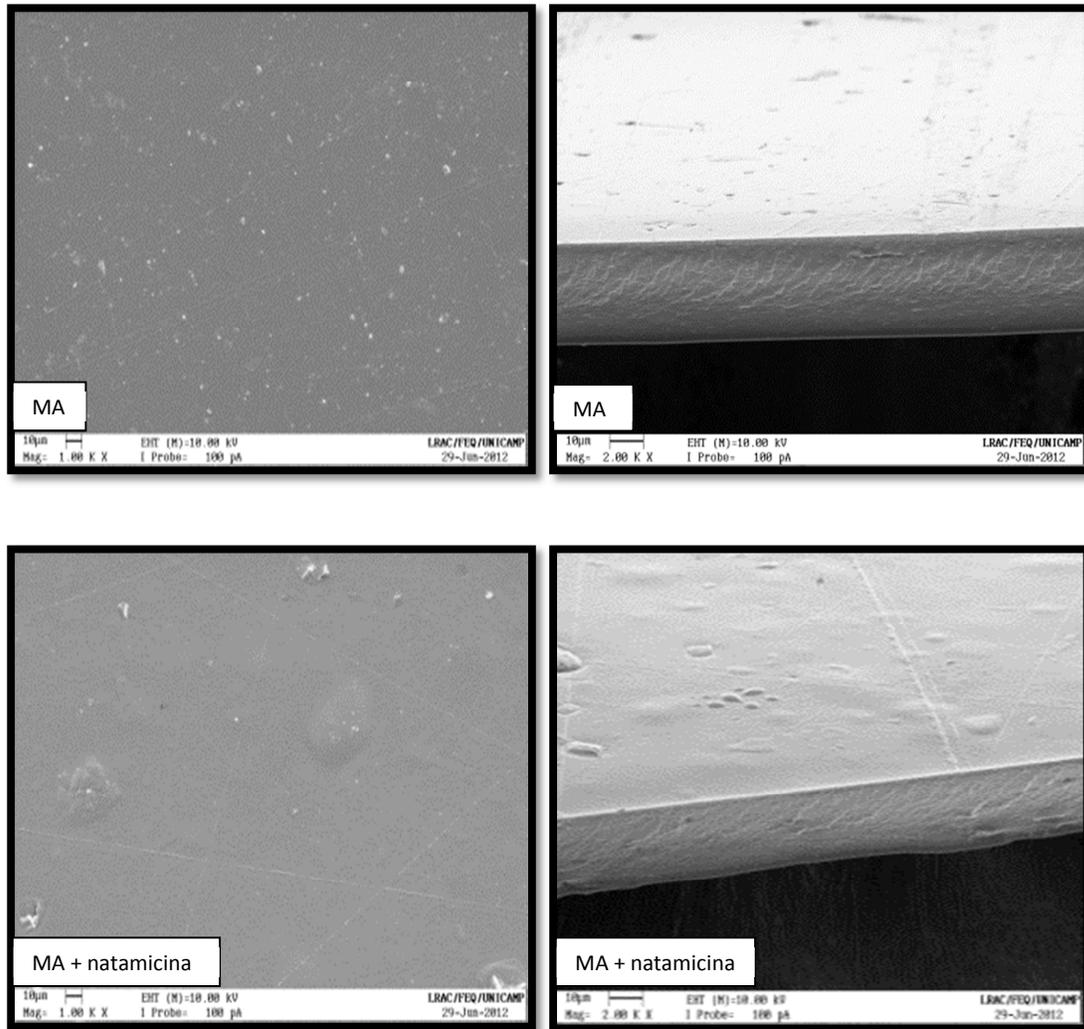


Figura 4.23 – Micrografias da superfície (aumento de 1000 vezes) e fratura (aumento de 2000 vezes) dos filmes de alginato MA sem e com natamicina.

Nas micrografias das fraturas dos filmes também são verificadas estruturas irregulares e descontínuas, resultados estes que reforçam as observações visuais

de que os filmes ativos apresentaram menor transparência e com relativa aspereza. Estas características estão relacionadas com a baixa solubilidade da natamicina na solução filme-formadora e no filme posteriormente formado. A imiscibilidade entre o agente antimicótico e os polímeros estudados possivelmente ocasionou também a redução das propriedades de barreira e mecânicas dos filmes ativos e no seu grau de intumescimento.

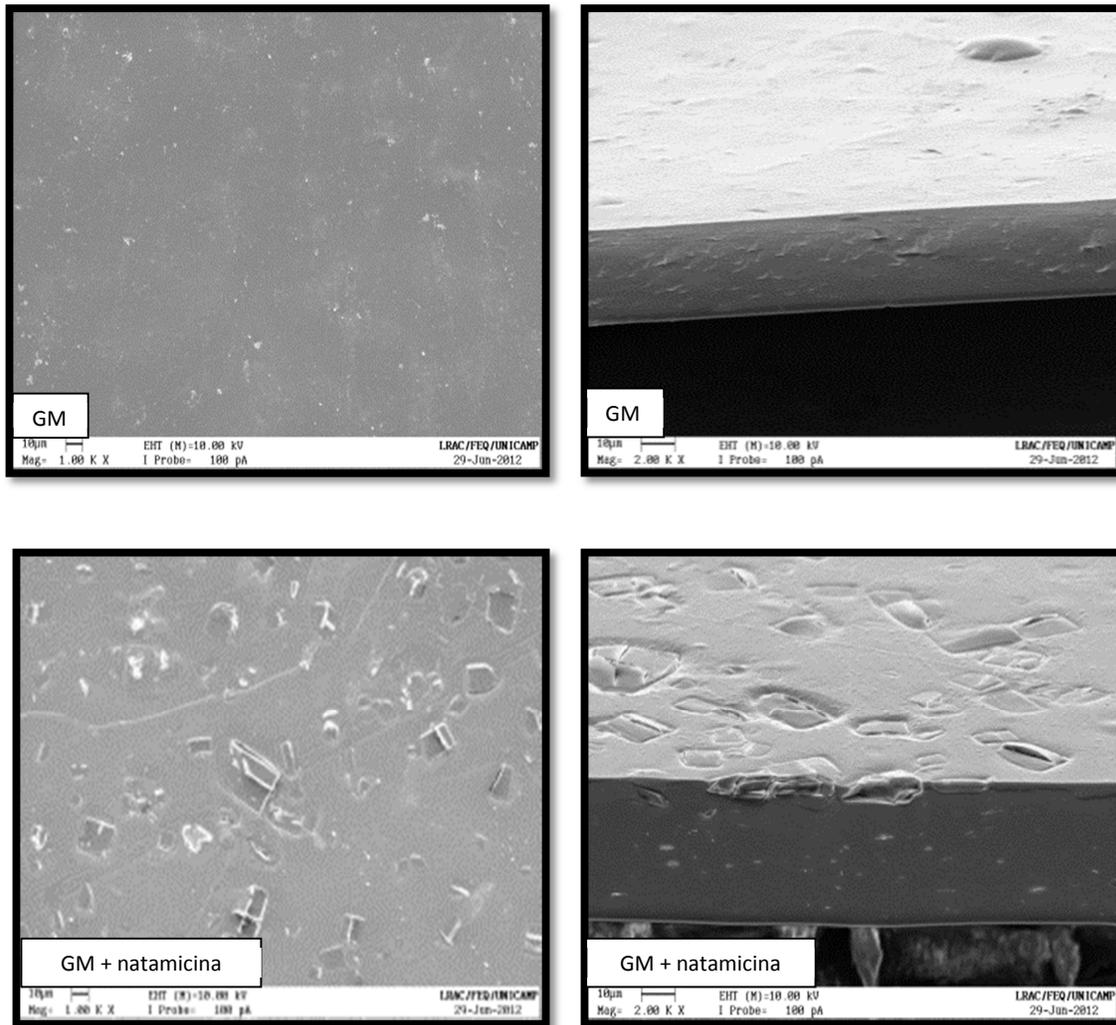


Figura 4.24 – Micrografias da superfície (aumento de 1000 vezes) e fratura (aumento de 2000 vezes) dos filmes de alginato GM sem e com natamicina.

Na literatura, grande parte dos trabalhos com filmes de alginato relata superfícies e fraturas regulares sendo esta característica também observada por da Silva (2009) e Bierhalz (2010) em seus trabalhos.

Geralmente a separação de fases é observada quando há a incorporação de grande quantidade de plastificante ou de compostos hidrofóbicos como ácidos graxos ou a adição de um agente antimicrobiano incompatível (CARULO, 2005; BATISTA, 2004; SANTANA, 2010; DA SILVA, 2009; BIERHALZ, 2010).

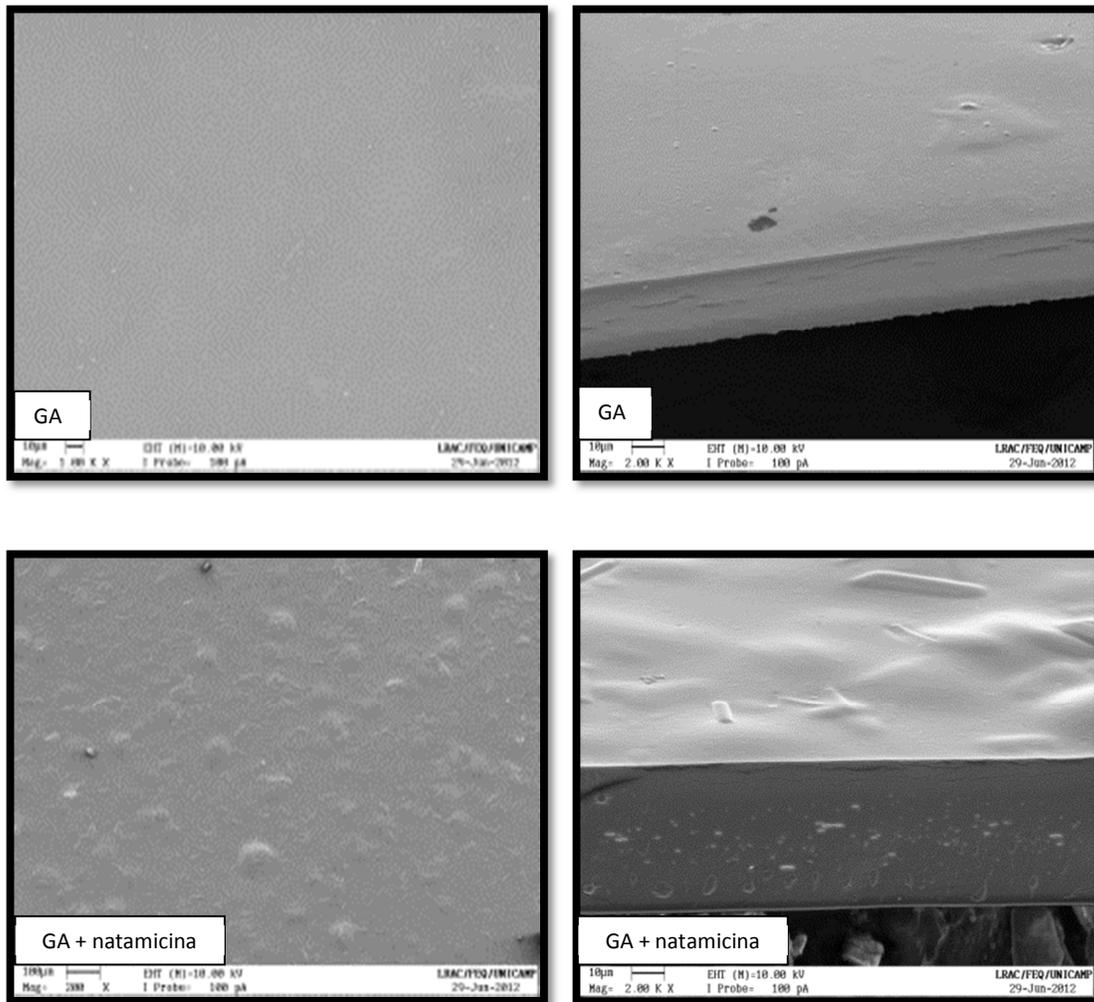


Figura 4.25 – Micrografias da superfície (aumento de 1000 vezes) e fratura (aumento de 2000 vezes) dos filmes de alginato GA sem e com natamicina.

4.3.3 Cor e opacidade

Na Figura 4.26 observa-se os valores de opacidade calculadas para os filmes de alginato de cálcio MM, MA, GM e GA contendo natamicina e para os filmes confeccionados sem este agente antimicrobiano.

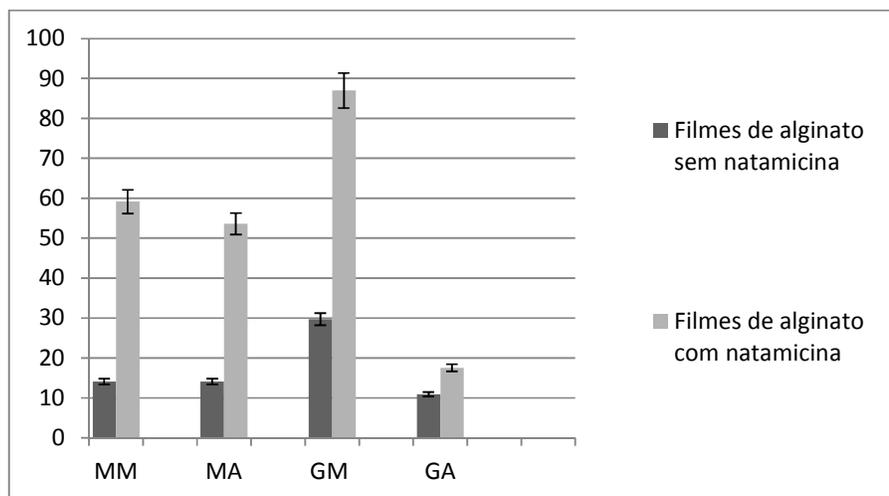


Figura 4.26 – Valores de opacidade obtidos para os filmes de alginato MM, MA, GM e GA com e sem natamicina.

Filmes puros dos alginatos MM, MA, GM e GA apresentaram valores de opacidade entre 10 a 30% não sendo possível relacionar esta característica com a proporção de Blocos M e Blocos G presentes na estrutura dos polímeros.

Verifica-se que a incorporação da natamicina aos filmes de alginato provocou considerável aumento na opacidade. Os filmes produzidos com os alginatos MM e MA apresentaram acréscimo de aproximadamente 45 %, sendo que o filme produzido com o alginato GM apresentou o maior valor de opacidade (57,25%), fato este possivelmente ocasionado pela natamicina pouco incorporada, conforme foi observada através da microscopia eletrônica de varredura. Os filmes de alginato GA com natamicina apresentaram o menor valor de opacidade (17,53%).

A Figura 4.27 mostra uma fotografia comparando os dois tipos de filmes, onde é possível verificar visualmente a maior transparência dos filmes sem antimicrobiano.

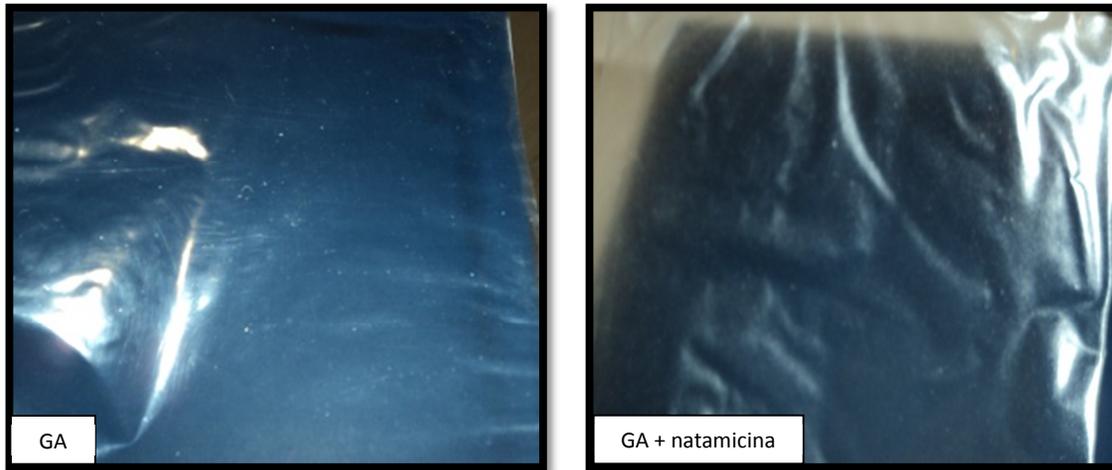


Figura 4.27 – Aspecto de um filme de alginato GA sem natamicina em sua formulação e contendo natamicina.

Os resultados de opacidade deste trabalho seguem a tendência observada por da Silva (2009), cujos filmes de alginato puro apresentaram 7% de opacidade e a adição de natamicina elevou a opacidade para 52%. Bierhalz (2010) também observou esta tendência para os filmes de alginato sendo a opacidade sete vezes maior para os filmes que continham natamicina.

Os parâmetros de cor, L^* , a^* e b^* dos filmes estão dispostos na Tabela 4.13, bem como os resultados obtidos no cálculo da diferença total de cor ΔE^* , a qual foi calculada para as formulações dos filmes ativos, utilizando-se como padrão os respectivos filmes puros de alginato.

Tabela 4.13 - Parâmetros de cor L^* , a^* e b^* dos filmes MM, MA, GM e GA com e sem tratamento antimicrobiano e diferença total de cor (ΔE^*) usando como padrão os filmes de alginato sem antimicótico.

| Filme | % natamicina | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
|-------|--------------|-------------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| MM | 0 | 91,39±0,17 ^a | 0,09±0,01 ^b | 1,81±0,02 ^a | 2,66 |
| | 4 | 97,37±0,18 ^e | 0,53±0,01 ^c | 4,25±0,12 ^e | |
| MA | 0 | 96,44±0,09 ^c | 0,02±0,01 ^a | 2,25±0,03 ^c | 2,86 |
| | 4 | 97,59±0,15 ^f | 0,52±0,01 ^c | 4,83±0,18 ^h | |
| GM | 0 | 95,43±0,32 ^b | 0,20±0,03 ^d | 1,99±0,09 ^b | 2,96 |
| | 4 | 97,40±0,29 ^e | 0,56±0,01 ^e | 4,76±0,16 ^g | |
| GA | 0 | 96,76±0,13 ^d | 0,01±0,02 ^a | 2,33±0,05 ^d | 2,41 |
| | 4 | 97,78±0,17 ^g | 0,58±0,01 ^f | 4,44±0,13 ^f | |

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.

Verificou-se que a luminosidade (L^*), parâmetro relacionado com a distinção da cor clara em relação à cor escura, apresentou maiores valores para os filmes contendo natamicina em sua formulação.

Em relação ao parâmetro a^* , os filmes apresentaram tendência à tonalidade vermelha, sendo esta aumentada com a adição da natamicina enquanto que o parâmetro b^* indicou que a natamicina provoca um aumento significativo na tonalidade amarela dos filmes. Não foram observadas alterações significativas para o parâmetro diferença total de cor (ΔE^*).

Na Tabela 4.14 estão apresentados os resultados para o ângulo Hue e o Cromo dos filmes.

Tabela 4.14 – Ângulo Hue e Croma dos filmes de alginato MM, MA, GM e GA com e sem natamicina.

| Filme | % natamicina | ° Hue | Croma |
|-------|--------------|-------------------------|------------------------|
| MM | 0 | 87,20±0,18 ^f | 1,99±0,26 ^a |
| | 4 | 82,93±0,17 ^b | 3,99±0,09 ^e |
| MA | 0 | 89,53±0,10 ^g | 2,36±0,07 ^c |
| | 4 | 83,89±0,09 ^d | 4,35±0,01 ^g |
| GM | 0 | 84,30±0,29 ^e | 2,23±0,05 ^b |
| | 4 | 83,33±0,22 ^c | 4,32±0,01 ^f |
| GA | 0 | 89,80±0,18 ^h | 2,91±0,03 ^d |
| | 4 | 82,60±0,12 ^a | 4,47±0,02 ^h |

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.

O ângulo Hue dos filmes variou entre 82,60 a 89,80° estando orientados no 1° quadrante, entre a (+) e o b (+) de acordo com o diagrama CIELab. Os valores indicam que os filmes apresentam coloração entre o amarelo-laranja e o amarelo. O croma indica a intensidade da cor representada pelo valor do Hue cujo valor máximo é 16, assim os filmes de alginato sem natamicina apresentaram fraca intensidade de cor, representada pelos menores valores do croma. Já os filmes ativos apresentaram maior intensidade devido ao maior valor do croma.

Da Silva (2009) obteve características gerais de cor semelhantes aos amostrados aqui. Nos filmes de alginato com natamicina, o ângulo Hue situou-se entre 85,70 a 92,55° e houve um aumento no parâmetro b^* com a incorporação do agente ativo. Bierhalz (2010) também constatou um aumento da intensidade da coloração dos filmes após a adição da natamicina, obtendo valores de ângulo Hue entre 89,33 e 93,52°.

4.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA NATAMICINA EM ÁGUA

Os filmes ativos produzidos através dos diferentes tipos de alginatos (MM, MA, GM e GA) foram submetidos aos ensaios de liberação da natamicina em água, à temperatura de 25°C, conforme descrito na Seção 3.5.

4.4.1 Ensaios de liberação da natamicina – tempos curtos

Com o objetivo de avaliar o mecanismo envolvido no processo de difusão, utilizou-se o Modelo da Lei da Potência (Equação 2.3) que relaciona a perda de soluto no período inicial de liberação com o tempo.

Para os alginatos MM, MA, GM e GA, os gráficos de $\ln (Mt/M_\infty)$ versus $\ln (t)$ permitiram determinar o expoente difusional (n), calculado a partir do coeficiente angular e a constante difusional (k) calculada a partir do coeficiente linear das retas. O parâmetro n indica o mecanismo de liberação do agente antimicrobiano e k os tempos de liberação.

Na Tabela 4.15 estão apresentados os valores obtidos para o expoente difusional n e a constante difusional k e na Figura 4.28 são apresentadas as linearizações para os diferentes tipos de alginatos avaliados neste estudo.

Tabela 4.15 – Expoente difusional (n) e constante difusional (k) da liberação de natamicina nos filmes de alginato MM, MA, GM e GA.

| Alginatos | n | $k (s^{-1})$ | R^2 |
|-----------|--------|------------------------|--------|
| MM | 0,8842 | $2,26 \cdot 10^{-4}^a$ | 0,9805 |
| MA | 0,8754 | $1,97 \cdot 10^{-4}^b$ | 0,9826 |
| GM | 0,8515 | $5,16 \cdot 10^{-4}^c$ | 0,9726 |
| GA | 0,8250 | $1,04 \cdot 10^{-4}^d$ | 0,9703 |

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

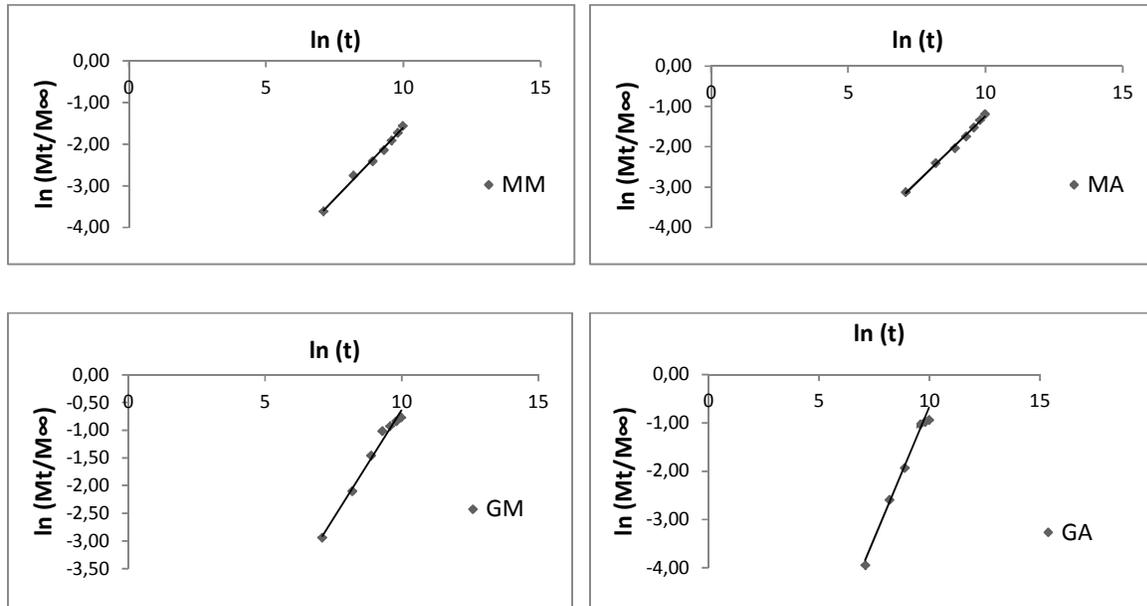


Figura 4.28 - Curva $\ln (Mt/M_{\infty})$ por $\ln (t)$ para filmes MM, MA, GM e GA contendo 4g natamicina/100g alginato.

Verifica-se que para os filmes dos alginatos MM, MA, GM e GA o parâmetro n encontra-se entre 0,5 e 1, indicando que o processo de transporte é uma difusão não-Fickiana e sim anômala na qual a taxa de difusão do soluto e a taxa de relaxação da estrutura do polímero pela absorção de água são da mesma ordem de magnitude.

Os resultados obtidos, neste estudo, para o expoente difusional estão em acordo com os valores obtidos através das pesquisas realizadas no LEEPbio. Resultados similares foram encontrados por Zactiti (2004) para filmes ativos de alginato contendo sorbato de potássio e reticulados com solução de cloreto de cálcio. Carulo (2005) trabalhando com filmes de alginato contendo sorbato de potássio e ácidos graxos encontrou valores de n entre 0,6822 e 0,9081. Turbiani (2009) trabalhando com filmes de alginato contendo benzoato de cálcio obteve n valores entre 0,8148 e 0,9504. Bierhalz (2010) trabalhando com filmes de alginato e pectina verificou que os filmes de alginato e pectina com composição entre 90 a

100% de pectina apresentaram um mecanismo de liberação que associa a difusão parcial através de uma matriz intumescida e através de poros hidrofílicos ($n = 0,3371$). Os filmes de alginato e pectina com quantidades maior ou igual a 70% de alginato em sua composição apresentaram um mecanismo de liberação anômalo ($n = 0,8466$). Da Silva (2009) trabalhando com filmes de alginato obteve expoente difusional igual a 0,608.

Em relação à constante difusional (k), quanto maior seus valores, menor é o tempo para liberação do agente ativo. Dessa forma, os resultados obtidos para k estão de acordo com os tempos de liberação, pois o maior valor foi verificado para o filme GM. Os filmes MM e MA apresentaram valores intermediários de k , enquanto que o filme GA apresentou o menor valor para este parâmetro.

Com a finalidade de comparar os valores de difusividade obtidos nos ensaios de liberação até o equilíbrio, com a difusividade efetiva da natamicina nos instantes iniciais da liberação, adequou-se os dados obtidos nos ensaios ao modelo de difusão em sólidos semi-infinitos (tempos curtos). A Figura 4.29 apresenta os gráficos para os filmes de alginato MM, MA, GM e GA.

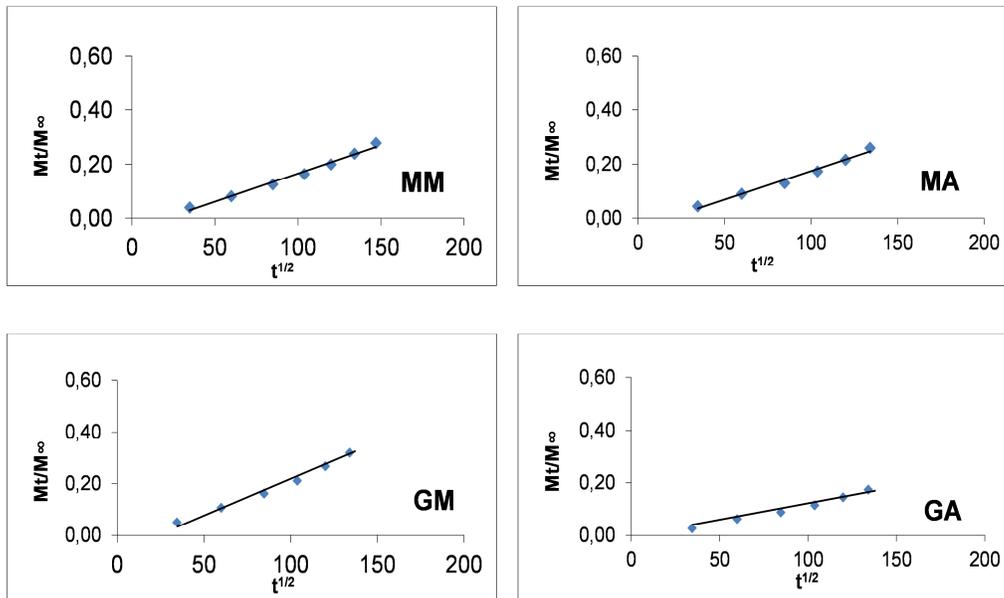


Figura 4.29 – Ajuste dos dados ao modelo dos sólidos semi-infinitos para os filmes ativos dos alginatos MM, MA, GM e GA.

Para este caso, a liberação segue a cinética de ordem $1/2$ e os valores para a fração de massa liberada deve exibir ajuste linear em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$). Na Tabela 4.16 estão apresentados os valores dos coeficientes de difusão (D) obtidos através do modelo de tempos curtos para os quatro tipos de filmes ativos.

Tabela 4.16 – Coeficientes de difusão (D) obtidos através do modelo de tempos curtos para os filmes ativos dos alginatos MM, MA, GM e GA.

| Alginatos | D (cm ² /s) | R^2 |
|-----------|--------------------------|--------|
| MM | $2,97.10^{-11}$ | 0,9838 |
| MA | $2,41.10^{-11}$ | 0,9787 |
| GM | $1,01.10^{-10}$ | 0,9707 |
| GA | $1,95.10^{-11}$ | 0,9699 |

Observa-se que os valores de difusividade obtidos para os filmes de alginato MM e MA são bem próximos entre si. A natamicina apresentou maior difusividade nos filmes produzidos com o alginato GM, apesar deste alginato apresentar uma maior quantidade de Blocos G do que os alginatos MM e MA, o que lhe confere uma maior interação com os íons cálcio, a influência de suas cadeias menores demonstrou-se mais pronunciada, facilitando a liberação da natamicina.

Este comportamento dos filmes GM é evidenciado pelos valores de grau de intumescimento e solubilidade e é confirmado pelas micrografias que revelaram grande quantidade de cristais na superfície destes filmes demonstrando sua menor interação com o antimicótico. Nos filmes GA, a natamicina apresentou o menor valor de difusividade já que o processo de reticulação nestes filmes é mais intenso e minimiza a liberação da natamicina.

De maneira geral, estes resultados apresentam-se ordem de grandeza semelhante aos obtidos por da Silva (2009) e Bierhalz (2010), salvo o valor obtido para os filmes do alginato GM.

4.4.2 Ensaios de liberação da natamicina – liberação completa

Os dados experimentais de liberação total da natamicina para os filmes de alginato MM, MA, GM e GA foram avaliados através da Equação 2.2 sendo apresentados na Figura 4.30. A Tabela 4.17 contém os resultados dos cálculos da difusividade.

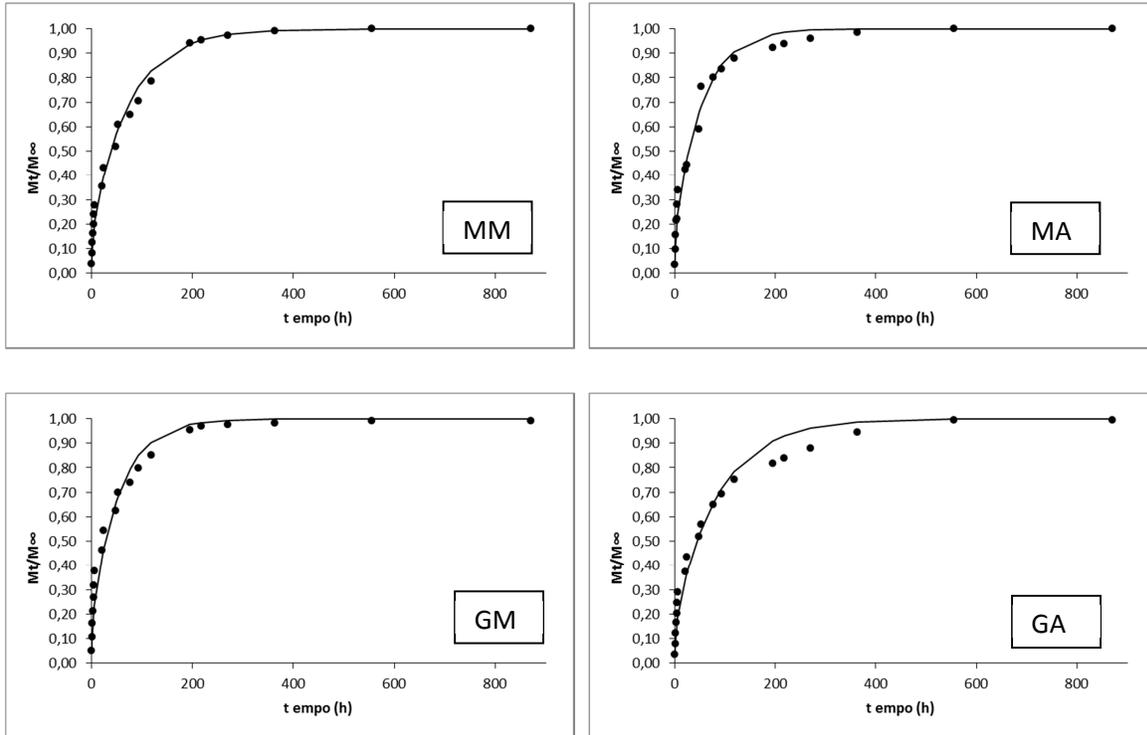


Figura 4.30 – Fração de natamicina liberada com o tempo para os filmes de alginato MM, MA, GM e GA.

Observa-se que para o filme GA foram necessárias aproximadamente 400 horas para que 90% da massa total de natamicina fosse transferida para o solvedouro. Para os filmes MM e MA este tempo foi reduzido para aproximadamente 180 e 200 horas enquanto que para o filme de GM foi necessário pouco mais de 100 horas. Estes resultados corroboram com os valores de grau de intumescimento e massa solubilizada que conjuntamente com as micrografias demonstram que entre os alginatos MM, MA e GA a relação M/G e o

grau de reticulação influencia primariamente no processo de liberação da natamicina. Já para o filme GM, a liberação do antimicótico mostrou maior dependência de sua massa molar, que por apresentar menores valores acabou por se sobrepor à sua maior quantidade de Blocos G, fazendo com que estes filmes liberassem mais rapidamente a natamicina.

Tabela 4.17 – Coeficientes de difusão efetiva (D) obtidos através da liberação completa para os filmes ativos dos alginatos MM, MA, GM e GA.

| Alginatos | D (cm ² /s) | R^2 |
|-----------|--------------------------|--------|
| MM | $2,38.10^{-11}$ | 0,9767 |
| MA | $2,08.10^{-11}$ | 0,9842 |
| GM | $1,67.10^{-09}$ | 0,9638 |
| GA | $1,52.10^{-11}$ | 0,9679 |

Considerando-se o modelo de tempos curtos e o completo, observa-se que os valores são diferentes, mas os comportamentos são semelhantes. A difusividade é menor nos filmes GA, pois, estes possuem maior massa molar e maior quantidade Blocos G, apresentando uma reticulação mais intensa. Os filmes MM e MA (maior quantidade de Blocos M com média e alta massa molar respectivamente) apresentaram valores maiores que os obtidos para os filmes GA, no entanto, menores que os dos filmes GM (maior quantidade de Blocos G, mas com menor massa molar).

Zactiti (2004) e Carulo (2005) observaram que a difusividade do sorbato de potássio em água diminuía com o aumento da concentração de cálcio utilizada na reticulação e com a adição de ácidos graxos. Seus valores foram da ordem de 10^{-7} cm²/s. Da Silva (2009) e Bierhalz (2010) obtiveram valores de difusividade da natamicina em água para filmes de alginato na ordem de 10^{-11} cm²/s.

Este capítulo traz as principais conclusões deste estudo, envolvendo o processo de produção de filmes de alginato com diferentes proporções de Blocos M e Blocos G e suas características físico-químicas. Ao final do capítulo também são apresentadas recomendações para futuros trabalhos.

Os resultados experimentais desta pesquisa, que focou a elaboração e caracterização de filmes de alginato de quatro composições diferentes (média viscosidade e maior quantidade de Blocos M – MM; alta viscosidade e maior quantidade de Blocos M – MA; provenientes das algas *Macrocystis pyrifera* e média viscosidade e maior quantidade de Blocos G – GM; alta viscosidade e maior quantidade de Blocos G – GA originados da *Laminaria hyperboria*) permitiram definir dois importantes avanços em relação aos resultados e procedimentos de pesquisas com filmes de alginato:

A) Os alginatos MM e MA possuem características semelhantes entre si, bem como os seus filmes. O alginato GA, mesmo exigindo uma menor quantidade de íons cálcio para reticular, apresentou as melhores propriedades dentre os alginatos estudados enquanto que o alginato GM originou filmes com propriedades inferiores aos dos demais alginatos avaliados neste estudo, comportamento este influenciado diretamente por sua massa molar.

B) A massa molar é fator determinante nas propriedades funcionais do alginato e de seus filmes, influenciando de forma mais drástica as propriedades de barreira e mecânicas que a proporção de Blocos M e Blocos G.

C) Os ensaios reológicos dinâmicos demonstraram ser uma ferramenta importante permitindo determinar a quantidade limite de íons cálcio a ser adicionada à solução filmogênica dos alginatos MM, MA, GM e GA.

Outras conclusões com relação aos filmes com diferentes tipos de alginato:

1) Através dos ensaios preliminares, foi possível confirmar os resultados obtidos da reologia que revelaram que alginatos MM e MA, provenientes das algas *Macrocystis pyrifera* (alto teor de Blocos M) e alginatos GM e GA, originados da *Laminaria hyperborea* (alto teor de Blocos G) apresentam comportamentos diferentes em relação à reação de reticulação com íons cálcio. O limite de adição de íons cálcio para a obtenção de estruturas homogêneas foi de 6,80 e 19,04 mg Ca^{2+}/g alginato para alginatos com maior teor de Blocos G e Blocos M, respectivamente.

2) A reticulação parcial com íons cálcio interfere nas características visuais, de manuseio, e na tensão na ruptura dos filmes sendo que 6,80 mg Ca^{2+}/g alginato mostrou-se como a concentração mais adequada para a produção dos diferentes tipos de alginato, não havendo tendência para uma gelificação localizada e originando estruturas com propriedades mecânicas e de barreira adequadas.

3) A reticulação complementar através da imersão dos filmes por 20 minutos em solução de 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3% de glicerol originou estruturas com melhores propriedades de barreira e resistência mecânica.

4) 6,80 mg Ca^{2+}/g alginato empregado no processo de reticulação não gerou ganhos significativos de alongamento e maleabilidade para os filmes avaliados neste estudo.

5) A incorporação da natamicina para a confecção dos filmes ativos gerou perdas nas propriedades funcionais dos filmes. A natamicina é incompatível com os diferentes tipos de alginato.

6) A difusividade dos filmes de alginato foi influenciada pela relação M/G bem como pela massa molar dos diferentes alginatos avaliados. A liberação da natamicina foi mais rápida nos filmes com menor massa molar (GM). Filmes com maior quantidade de Blocos G e alta massa molar (GA) liberam a natamicina de forma mais lenta que se comparados aos filmes de MM e MA (média e alta massa molar e maior quantidade de Blocos M).

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- As pesquisas desta dissertação apontaram para a necessidade de estudos mais abrangentes em relação a filmes de alginato com maior massa molar.

- Avaliar as propriedades térmicas dos diferentes tipos de alginato, assim como de seus filmes.

- Obter as curvas de relaxação para alginatos de diferentes fontes e avaliar a adequação do modelo de Maxwell-Voigt para a representação do comportamento viscoelástico destes polímeros.

- Desenvolver um processo produtivo para os filmes com maior eficácia e menor custo.

- Avaliar o comportamento dos alginatos através da produção de blendas com amido e nanocompósitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Este capítulo traz as referências bibliográficas usadas no texto listadas em ordem alfabética em relação ao primeiro autor.

ALLEN, L.; NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; MCGILL, J. N. Edible corn-carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch-alginate coating. **Food Technology**, v. 17, p. 1442-1446, 1963.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.

ASHIKIN, W. H. N. S.; WONG, T. W.; LAW, C. L. Plasticity of hot air-dried mannuronate-rich and gulurone-rich alginate films. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p.104-113, 2010.

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials - E96-95. American Society for Testing and Materials. **Annual Book of ASTM Standards**, Philadelphia, 1995a.

ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting - D882. American Society for Testing and Materials. **Annual Book of ASTM Standards**, Philadelphia, 1995b.

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

BANKER, G. S. Film coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 55, n. 1, p. 81-89, 1966.

BASTIOLI, C. Global status of the production of biobased packaging materials. **Starch/Starke**, v. 53, p. 351-355, 2001.

BATISTA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de pectina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolis**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado, 2004.

BENEVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.

BERTUZZI, M. A.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J.C. Physicochemical characterization of starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 17-25, 2007.

BIERHALZ, A. C. K. **Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina BTM e de pectina BTM/alginate reticulados com cálcio**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado, 2010.

BIERHALZ, A. C. K.; DA SILVA, M. A.; KIECKBUSCH, T. G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v.110, p.18-25, 2012.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOD, E. N. **Fenômenos do Transporte**. Universidade de Wisconsin, ed. internacional, Editora Wiley, 2005.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis de Ca^{2+} - Induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1089-1096, 2001.

BRYCE, T. A.; MCKINNON, A. A.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; THOM, D. Chain conformations in the sol-gel transitions for polysaccharide systems, and their characterization by spectroscopic methods. **Faraday Discussions Chemical Society**, v. 57, p. 221-229, 1974.

BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A.; PANIZZA, A.; CORBO, M. R. A general approach to describe the antimicrobial release from highly swellable films intended for food packaging applications. **Journal of Controlled Release**, v. 90, p. 97-107, 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial edible films and coating. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 833-848, 2004.

CANEVAROLO, JR. S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo, Editora Artliber, 2007.

CARULO, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos de alginatos contendo sorbato de potássio, feitos de alginato de cálcio e ácidos graxos**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de Mestrado, 2005.

CARVALHO, R. A. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de Mestrado, 1997.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n.11, p. 2563-2583, 1995.

CLEMENTI, F.; FANTOZZI, P.; MANCINI, F.; MORESI, M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 983-988, 1995.

CLEMENTI, F.; CRUDELE, M. A.; PARENTE, E.; MANCINI, M.; MORESI, M. Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 4, p. 602-610, 1999.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**, 2 ed. Editora Oxford University Press, 1975.

CRUZ, S. A.; FARAH, M.; ZANIN, M.; BRETAS, R. E. S. Avaliação das propriedades reológicas de blendas de PEAD virgem/PEAD reciclado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 144-151, 2008.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.

CUSSLER, E. L. **Diffusion mass transfer in fluid systems**, 2 ed. Editora Cambridge University Press, 1997.

CUTTER, C. N.; SUMNER, S. S. Application of edible coatings on muscle foods. In: **Protein-based Films and Coatings**. Ed. GENNADIOS, A. Florida: CRC Press, p. 467-484, 2002.

DA SILVA, M. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos de alginato de cálcio e quitosana contendo natamicina como agente antimicótico**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Tese de doutorado, 2009.

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.

DANISCO. Natamax antimicrobials. Disponível em: <<http://www.danisco.com>> Acesso em: 01 de novembro de 2012.

DAVIDOVICH-PINHAS, M.; BIANCO-PELED, H. A quantitative analysis of alginate swelling. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 1020-1027, 2010.

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. 299-313, 1998.

DONATI, I.; HOLTAN, S.; MØRCH, Y.; MASSIMILIANO, B.; DENTINI, M; SKJÅK-BRÆK, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginates gels. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1031-1040, 2005.

DONHOWE, G; FENNEMA, O. The effects of plasticizers on cristallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 17, p. 247-257, 1993.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 31-38, 1994.

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

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

FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; NISHINARI, K.; FUNAMI, T.; WILLIAMS, P. A.; LI, L. Multiple steps and critical behaviors of calcium to alginate. **Journal of Food Protection**, v. 5, p. 2456-2462, 2007.

FIGURA *Macrocystis pyrifera* disponível em: <<http://www.artbios.ru>> Acesso em: 01 de novembro de 2012.

FIGURA *Laminaria hyperborica* disponível em: <<http://www.lib.noaa.gov>> Acesso em: 01 de novembro de 2012.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, p. 161-182, 1988.

GARCIA, E. E. C. Desenvolvimento de embalagens e meio ambiente. Brasil Pack Trends 2005 - Embalagem, distribuição e consumo. Campinas - SP: **CETEA/ITAL**, 2005.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. da. Ácido algínico bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, Campinas - SP, v. 31, p. 1006-1080, 2008.

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

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

GÓMEZ-DÍAZ, D.; NAVAZA, J. M. Caracterización reológica de dispersiones agua-alginato sódico con aplicación en la industria alimentaria. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 1(2), p. 98-102, 2002.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of and edible wheat gluten film. **Journal Food Science**, v. 58 (1), p. 206-221, 1993.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim do SBCTA**, v.1.30, n.1, p. 3-15, 1996.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 29, p. 10-17, 1996.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 14 (6-7), p. 741-751, 1997.

GRASDALEN, H. High-field, ^1H -n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, v. 118, p. 255-260, 1983.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, n. 3, p. 56-65, 2000.

HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. Ed. HAN, J. H. In: **Innovations in Food Packaging**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 80-101, 2005.

HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Correlation between chemical structure and physical properties of alginate. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 21, p. 691-704, 1967.

IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1533-1541, 2001.

JONES, O.; McCLEMENTS, D. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 374- 397, 2010.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coating a review. **Food Technology**, v. 40, n.12, p. 47-59, 1986.

KOELSCH, C. Edible water vapor barriers: properties and promise. **Trends Food Science Technology**, v. 5, p. 76-81, 1994.

KROCHTA, J. M.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 60-74, 1997.

KROCHTA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. In: **Protein-based Films and Coatings**. Ed. GENNADIOS, A. Florida: CRC Press, p.1-41, 2002.

LACROIX, M.; TIEN, L. C. Edible films and coatings from non-starch polysaccharides. Ed. HAN, J. H. In: **Innovations and Food Packaging**. Elsevier, 2005.

LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 13, p. 1-69, 1989.

LIMA, A. M.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v. 30, p. 832-837, 2007.

LIU, X.; QIAN, L.; SHU, T.; TONG, Z. Rheology characterization of sol-gel transition in aqueous alginate induced by calcium cations through in situ release. **Polymer**, v. 44, p. 407-412, 2003.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação do Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro, Editora E-papers, 2001.

MACHADO, J. C. V. **Reologia e escoamento de Fluidos**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2002.

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.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v. 28, p. 283-295, 1996.

MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A.; BLOND, G.; COLAS, B.; MESNIER, M.; FLOQUET, N. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of the physical state. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 413-418, 1992.

MENDIETA-TABOADA, O.; DE CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 384-393, 2008.

MENDONÇA, P. V.; SERRA, A. C.; COELHO, J. F. J.; POPOV, A. V. GULIASSHVILI, T. Ambient temperature rapid ATRP of methyl acrylate, methyl methacrylate and styrene in polar solvents with mixed transition metal catalyst system. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 1460-1466, 2011.

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.

MORRIS, E. R.; CULLER, A. N.; ROSS-MURPHY, S. B.; REES, D. A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random oil polysaccharide solution. **Carbohydrate Polymer**, Barking, v. 1; p. 5-21, 1981.

MØRCH, Y. A.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; 2006; SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1471-1480, 2006.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA F.; LAURINDO J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 82–87, 2008.

OAKENFULL, D. **Gelling agents Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v. 26, n. 1, p. 1-21, 1987.

OLABARRIETA, I. **Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films**. Stockholm: Royal Institute of Technology, Department of Fibre and Polymer Technology, 2005.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate-calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 41, p. 359-366, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V.; SARANTÓPOULUS, C. I. G. L.; PADULA, M.; GARCIA, E. C. E.; CONTROL, L. Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Campinas: **CETEA/ITAL**, 202p, 1996.

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.

OLIVEIRA, V. F.; SOLDI V. Preparação, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1845-1849, 2009.

ONSØYEN, E. Alginates. In:**Thickening and gelling agents for food**. Ed. IMENSON, A.London: Blackie Academic & Professional 2 ed., p. 230-260, 1997.

PARRIS, N.; COFFIN, D. R.; REMON, F. J.; PESSEN, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1432-1435, 1995.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**, v. 25, n 4, p. 497-507, 1995.

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.

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.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 397-406, 1995.

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.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373-380, 2002.

RAO, M. A. Rheological properties of fluid foods. In: **Engineering Properties of Foods**. Ed. RAO, M. A.; RIZIVI, S. S. H. New York: Marcel Dekker, p.1-47, 1986.

REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. **Journal of Controlled Release**, v. 44, p. 215-225, 1997.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 323-330, 2004.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p.1-24, 2007.

RINAUDO, M., Review: Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

ROBERTSON, G. L. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. **Food Packaging: Principles and Practice**, p. 63-107, 1993.

ROGER, S.; 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.

ROGERS, C. E. Permeation of gases and vapors in polymer. In: **Polymer Permeability**. Ed. COMYN, J. London: Elsevier Applied Science, p.11-73, 1985.

ROSS-MURPHY, S. B. Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. **Journal of Rheology**, v. 39, p. 1451–1463, 1995.

RUSSO, R.; MALINCONICO, M.; SANTAGATA, G. Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginates films. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3193-3197, 2007.

SANTANA, A. A. **Influência de características físicas e químicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscópico de filmes de alginato de cálcio**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado, 2010.

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.

SCRHAMM, G. **Reologia e Reometria. Fundamentos Teóricos e Práticos**, São Paulo, Editora Artliber, 2006.

SEBTI, I.; HAM-PICHAVANT, F.; COMA, V. Edible bioactive fatty acid-cellulosic derivative composites used in food-packaging applications. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 4290-4294, 2002.

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.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro, 7 ed., Editora LTC - Livros Técnicos e Científicos S.A., 2007.

SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. **Faraday Discussions Chemical Society**, v. 57, p. 263-274, 1974.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, v.8, n.1, p.60-67, 1999.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 377-382, 2001.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. In: **Innovations in Food Packaging**. Ed. HAN, J. H. Canada: Elsevier Academic Press, p. 403-433, 2005.

STRANDBURG, G.; De LASSUS, P. T.; HOWELL, B. A. Barrier polymers and packaging. Ed. KOROS, W. J. **ACS Symposium Series, 423**. Washington DC, p. 333, 1990.

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.

TAPIA, M.; ROJAS-GRAU, M.; CARMONA, A.; RODRIGUEZ, F.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O.; Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1493-1503, 2008.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, p. 71-78, 2003.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginatos de sódio reticulados com benzoato de cálcio**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de Mestrado, 2007.

TURBIANI, F. R. B.; GIMENES, M. L.; KIECKBUSCH, T. G. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 175-181, 2011.

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.

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. 218, p. 131-146, 2003.

XU, X.; LIU, W.; ZHANG, L. Rheological behavior of Aeromonas gum in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 723–729, 2006.

WALTER, R.H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**, San Diego, Editora Academic Press, 1998.

WHISTLER, R. L. Solubility of polysaccharides and their behaviour in solution. **Carbohydrates in Solution. ACS Advances in Chemistry Series**, n. 117, p. 242, 1973.

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

ZACTITI, E. M. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de alginato de cálcio sem e com sorbato de potássio**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado, 2004.

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. 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

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN

Na Figura A.1 estão apresentadas os espectros de ^1H RMN dos alginatos MM, MA, GM e GA empregados neste estudo.

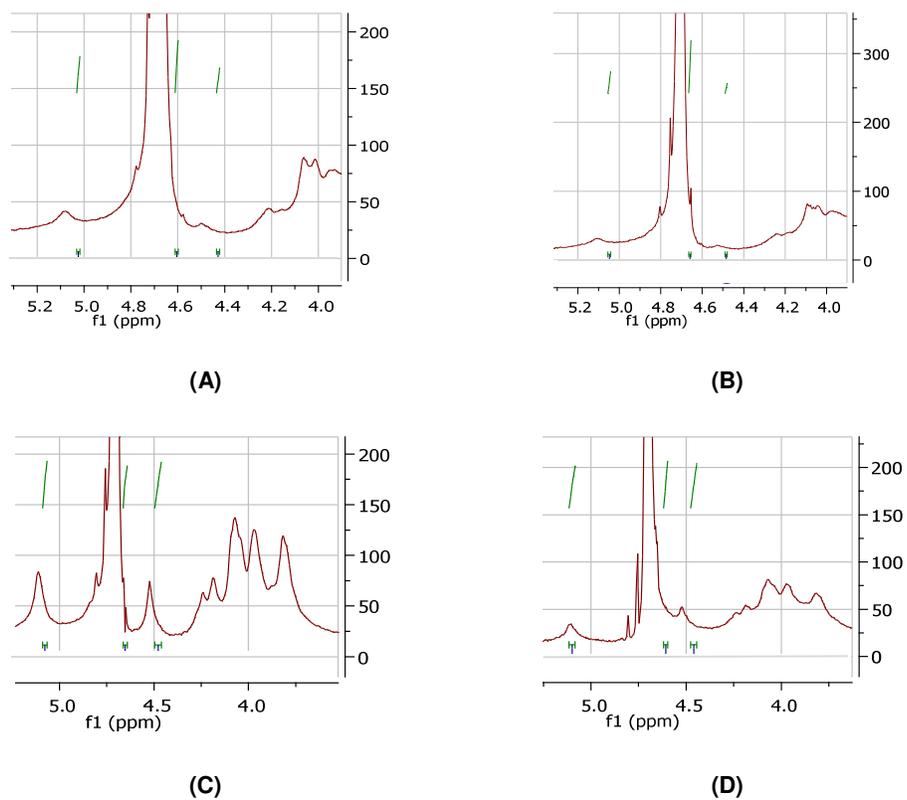


Figura A.1 – Espectros de ^1H RMN para os alginatos MM (A), MA (B), GM (C) e GA (D).

Cromatografia de exclusão por tamanho - SEC

Na Figura B.1 está apresentada a curva de calibração da coluna cromatográfica utilizando padrões de dextrana com massa molar na faixa de 10^3 a 10^6 Da.

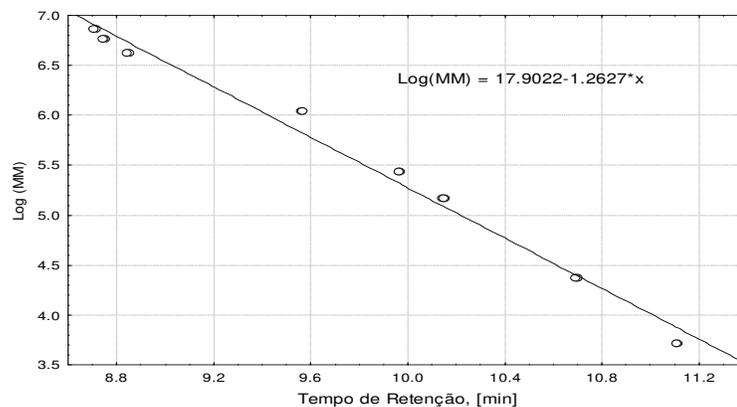


Figura B.1 - Curva linearizada da calibração da coluna cromatográfica.

Na Figura B.2 estão apresentados, em triplicata, os cromatogramas obtidos a partir dos alginatos MM, MA, GM e GA.

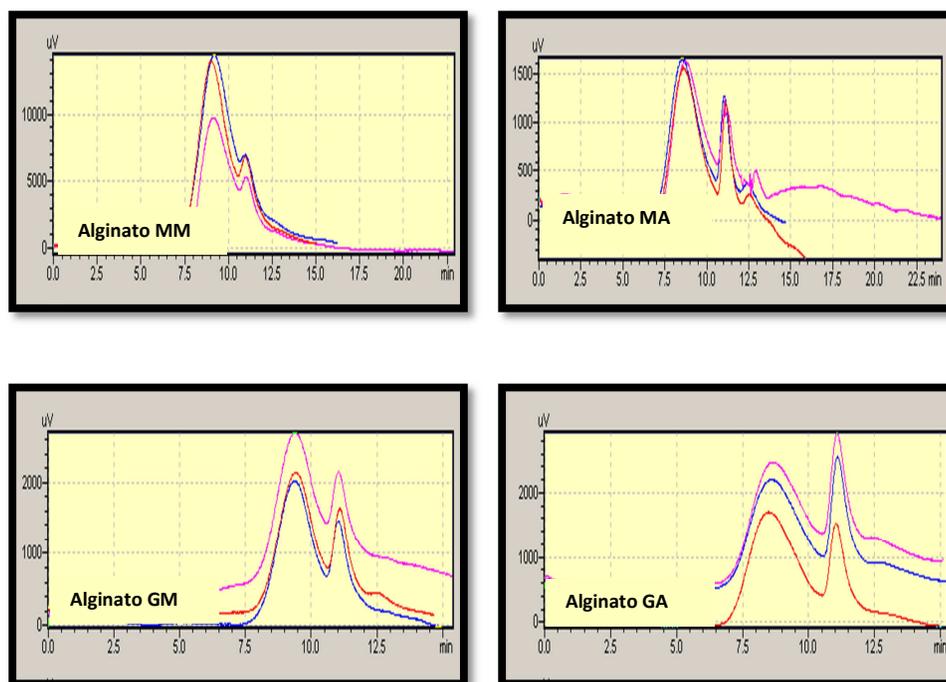


Figura B.2 – Cromatogramas obtido por SEC para os alginatos MM, MA, GM e GA.