



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

**Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos de
alginato e quitosana contendo natamicina como agente
antimicótico**

Autora: Mariana Altenhofen da Silva

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas - São Paulo

Junho/2009

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

Si38d Silva, Mariana Altenhofen da
Desenvolvimento e caracterização de filmes
compostos de alginato e quitosana contendo natamicina
como agente antimicótico / Mariana Altenhofen da Silva.
--Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Theo Guenter Kieckbusch.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

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

Título em Inglês: Development and characterization of alginate and
chitosan composite films containing natamycin as
antimicrobial agent

Palavras-chave em Inglês: Alginate, Chitosan, Antimicrobials, Biofilms,
Active packaging

Área de concentração: Engenharia de Processos

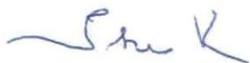
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares, Rosemary Aparecida
de Carvalho, Marta Hiromi Taniwaki, Ângela Maria
Moraes

Data da defesa: 22/06/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Mariana Altenhofen da Silva em 22 de junho de 2009 e aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:



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

(orientador)



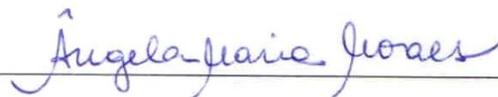
Profa. Dra. Nilda de Fátima Ferreira Soares (DTA/UFV)



Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho (FZEA/USP)



Dra. Marta Hiromi Taniwaki (ITAL)



Profa. Dra. Ângela Maria Moraes (FEQ/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado em Engenharia Química,
defendida por Mariana Altenhofen da Silva e aprovada pela comissão julgadora em 22 de
junho de 2009.



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch, agradeço pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos em todas as etapas deste trabalho e pela sua amizade, tranquilidade e franqueza.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial aos colegas, professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química.

Às pesquisadoras do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Dra. Marta Hiromi Taniwaki e Beatriz T. Iamanaka por toda a sua atenção, disponibilidade e ajuda indispensável na realização dos ensaios microbiológicos.

À colega e amiga Érica Morástica Zactiti pela ajuda e incentivo durante o trabalho, sobretudo nas etapas iniciais.

Ao Pablo Martinez pela ajuda e disponibilidade na realização das análises no infravermelho.

Aos colegas da FEQ: Élide, Júlia, Leda, Renata, Fernanda G., Fernanda C., Andréa, Juliana, Patrícia, Ângela e Roberto pelos bons momentos.

À Cibelem e ao Viktor, companheiros de todas as horas, obrigada por tudo!

À todos os meus amigos, de perto e de longe, que contribuíram das formas mais variadas.

À minha família pelo amor, apoio e incentivo constante em todos os passos da minha vida.

Ao Reinaldo, pelo amor, paciência, companheirismo em todos os momentos. Ao Murilo, meu maior presente neste período, por alegrar e tornar nossa vida mais leve todos os dias.

Ao meu anjo da guarda pela incansável proteção.

À DEUS, responsável por tudo, muito obrigado.

RESUMO

Filmes simples de alginato (FA) e filmes compostos de alginato e quitosana nas proporções 82,5:17,5 (FC1) e 65:35 (FC2), de baixo grau de reticulação com cálcio (0,04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato) contendo glicerol como plastificante, foram confeccionados pela técnica de *casting*. Esses filmes foram submetidos a uma reticulação complementar por imersão durante 30 minutos em uma solução contendo 5g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100 mL. Filmes FA, FC1 e FC2 com espessura média de 48, 54 e 62 μm , respectivamente, apresentaram massa solubilizada em água de 0,15, 0,19 e 0,23 g/g massa seca, coeficientes de permeabilidade ao vapor de água de 4,04, 4,91 e 7,41 $\text{g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$, intumescimento em água de 68, 102 e 195% (em massa), tensão na ruptura de 96, 75 e 59 MPa e alongamento na ruptura de 8,4, 12,5 e 17,1%. Esses valores assim como o conteúdo de cálcio e os espectros de FTIR indicaram que, nas condições experimentais utilizadas, a interação do alginato com os íons cálcio foi mais efetiva do que com a quitosana, não havendo indícios de formação de ligação amídica entre o alginato e a quitosana. A análise da Tg por DMA também indicou separação de fases entre os dois polímeros. Os filmes com 35% de quitosana apresentaram estrutura polimérica mais rugosa e heterogênea. As três formulações receberam sorbato de potássio (até 17 g/100g biopolímero) e natamicina (0, 0,5, 1, 2, 4 e 8 g/100g biopolímero) como agentes antimicrobianos, e o efeito antimicótico destes filmes frente às espécies *Penicillium roqueforti*, *Penicillium commune* e *Debaromyces hansenii* foi avaliado através do teste de difusão em ágar. O sorbato de potássio não apresentou efeito inibitório, e a natamicina foi eficiente a partir da concentração de 0,5 g/100g biopolímero para o filme de alginato puro e 1 g/100g biopolímero para os filmes compostos. Ensaios de liberação em água indicaram uma cinética muito lenta de liberação do antimicrobiano, sendo mais lenta para os filmes compostos, provavelmente devido à interações eletrostáticas entre a natamicina e a quitosana. Os coeficientes de difusão da natamicina encontrados foram da ordem de $10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ para FA e FC2 e de $10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ para FC1. A estrutura física menos compacta da matriz polimérica do FC2 acelerou a liberação da natamicina. Nas concentrações testadas, a adição da natamicina influenciou principalmente a cor, transparência, rugosidade e morfologia dos filmes. Os resultados obtidos permitem afirmar que os filmes desenvolvidos contendo natamicina apresentam excelente perspectiva de atuação como filmes ativos (antimicrobianos) para alimentos.

Palavras-chave: alginato, quitosana, reticulação, natamicina, filmes ativos.

ABSTRACT

Films composed solely by alginate (FA) and two composite films with different mass proportions of alginate and chitosan, 82.5:17.5 (FC1) and 65:35 (FC2), were obtained by casting. Using glycerol as plasticizer, the films were partially crosslinked by adding calcium chloride (0.04 g CaCl₂.2H₂O/g alginate) to the film forming solution. The resulting soluble films were further crosslinked by total immersion in a CaCl₂ solution (5g CaCl₂.2H₂O/100 mL) for 30 minutes. FA, FC1 and FC2 with an average thickness of 48, 54 and 62 μm, respectively, exhibited soluble mass in water of 0.15, 0.19 and 0.23 g/g dry matter, water vapor permeability coefficient of 4.04, 4.91 and 7.41 g.mm/m².day.kPa, swelling in water of 68, 102 and 195% (mass basis), tensile strength of 96, 75 and 59 MPa and elongation at break of 8.4, 12.5 and 17.1%. The tendencies found for the physical properties, complemented with values of calcium content in the films and results of FTIR analysis indicated that under the experimental conditions used, ionic binding of alginate chains with calcium ions was more effective than with chitosan, and no evidence of amidic bonding between alginate and chitosan was found. DMA thermograms also indicated phase separation between the two polymers, showing two Tg's for composite films. Films with higher content of chitosan showed rougher surfaces and less homogeneous polymeric structure. The film formulations received potassium sorbate (up to 17 g/100g biopolymer) and natamycin (0, 0.5, 1, 2, 4 and 8 g/100g biopolymer) as antimicrobial agents, and their antimycotic effect against *Penicillium roqueforti*, *Penicillium commune* and *Debaromyces hansenii* was evaluated by the agar diffusion test. Potassium sorbate did not show inhibitory effect. Natamycin was effective at concentrations as low as 0.5 g/100g biopolymer for alginate film and 1 g/100g biopolymer for composite films. Diffusion experiments in water indicated very slow release kinetics of the antimicrobial, being markedly hindered for the composite films, probably due to electrostatic interactions between chitosan and natamycin. Diffusion coefficients in films were in the order of 10⁻¹¹ cm²/s for FA and FC2, and 10⁻¹² cm²/s for FC1. The addition of natamycin affected mainly the color, transparency, roughness and morphology of the films, in the tested concentration range. The results showed that the films containing natamycin obtained in the present work show excellent perspectives for acting as active films intended for food applications.

Keywords: alginate, chitosan, crosslinking, natamycin, active films.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis para alimentos	3
2.1.1 Definições	3
2.1.2 Histórico	4
2.1.3 Processos de produção.....	4
2.1.4 Propriedades funcionais.....	5
2.1.5 Caracterização de filmes.....	6
2.1.6 Matérias-primas utilizadas na fabricação de filmes e coberturas	9
2.1.6.1 Alginato	9
2.1.6.2 Quitosana	13
2.1.7 Agentes plastificantes.....	16
2.2 Filmes compostos.....	17
2.3 Embalagens ativas	19
2.3.1 Filmes antimicrobianos	20
2.3.1.1 Substâncias antimicrobianas	24
2.3.1.1.1 Ácido sórbico ou sorbato de potássio	25
2.3.1.1.2 Natamicina	25
2.4 Transporte de substâncias ativas em filmes poliméricos.....	27
2.4.1 Liberação controlada de agentes antimicrobianos	28
2.4.2 Modelagem matemática.....	28
2.4.3 Determinação dos coeficientes de difusão.....	31
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento dos filmes	33
3.2 Processo de elaboração dos filmes de alginato puro	34
3.3 Processo de elaboração dos filmes compostos de alginato e quitosana	36
3.3.1 Preparo das soluções filmogênicas dos biopolímeros	36
3.3.1.1 Solução de alginato de sódio (1,5% m/m) - (Solução A1)	36
3.3.1.2 Solução de quitosana (1,5% m/m) - (Solução B1)	36
3.3.2 Mistura das soluções de biopolímeros.....	37
3.3.3 Tratamento dos filmes compostos de alginato e quitosana (2ºestágio).....	38

3.3.4 Filme de quitosana	38
3.4 Determinação das formulações otimizadas através de planejamentos fatoriais	38
3.4.1 Filmes de alginato	38
3.4.2 Filmes compostos de alginato e quitosana	41
3.5 Caracterização dos filmes	42
3.5.1 Aspecto visual	42
3.5.2 Determinação de espessura dos filmes (δ).....	42
3.5.3 Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água	43
3.5.4 Grau de intumescimento (GI)	43
3.5.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	43
3.5.6 Resistência mecânica.....	45
3.5.7 Cor e Transparência	46
3.5.8 Ângulo de contato	47
3.5.9 Isotermas de adsorção de vapor de água	47
3.5.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
3.5.11 Rugosidade.....	49
3.5.12 Determinação do conteúdo de cálcio.....	49
3.5.13 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	49
3.5.14 Análise dinâmica mecânica (DMA)	50
3.6 Filmes ativos (formulações otimizadas).....	50
3.6.1 Filmes ativos contendo sorbato de potássio.....	50
3.6.2 Filmes ativos contendo natamicina	51
3.6.3 Ensaio de liberação da natamicina.....	51
3.6.3.1 Estimativa da máxima absorção de natamicina pelo filme.....	52
3.6.4 Determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de difusão em ágar	53
3.6.4.1 Escolha dos microorganismos.....	53
3.6.4.2 Preparo do inóculo.....	54
3.6.4.3 Teste de difusão em ágar	54
3.7 Análises estatísticas.....	54
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO: FILMES DE ALGINATO E	
FILMES COMPOSTOS DE ALGINATO E QUITOSANA	55
4.1 Filmes de alginato	55
4.1.1 Ensaio preliminares.....	55

4.1.2 Planejamento fatorial completo 2^3 para os filmes de alginato.....	57
4.1.2.1 Massa solubilizada em água dos filmes de alginato.....	60
4.1.2.2 Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato.....	66
4.1.2.3 Grau de intumescimento dos filmes de alginato.....	71
4.1.2.4 Propriedades Mecânicas: Tensão e alongamento na ruptura dos filmes de alginato	76
4.1.3 Otimização da formulação do filme de alginato.....	84
4.2 Filmes compostos de alginato e quitosana.....	86
4.2.1 Ensaio preliminares.....	86
4.2.2 Planejamento fatorial completo 2^2 para os filmes compostos de alginato e quitosana	87
4.2.2.1 Massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana.....	89
4.2.2.2 Permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de alginato e quitosana	92
4.2.2.3 Grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana.....	94
4.2.2.4 Propriedades mecânicas: Tensão e alongamento na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana.....	97
4.2.3 Seleção dos filmes compostos de alginato e quitosana.....	102
4.3 Caracterização complementar dos filmes de alginato e filmes compostos.....	102
4.3.1 Concentração de cálcio.....	103
4.3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	105
4.3.3 Análise dinâmico-mecânica (DMA).....	108
CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO: FILMES ATIVOS.....	113
5.1 Filmes ativos (Formulações otimizadas).....	113
5.1.1 Ensaio de incorporação de sorbato de potássio em filmes de alginato puro.....	114
5.1.1.1 Efeito antimicrobiano em filmes de alginato puro contendo sorbato de potássio	115
5.1.2 Testes preliminares de incorporação de natamicina em filmes de alginato puro	119
5.1.3 Incorporação de natamicina nas formulações otimizadas.....	122
5.1.3.1 Efeito antimicrobiano das formulações otimizadas contendo natamicina.....	123
5.2 Ensaio de liberação da natamicina em água.....	132
5.3 Caracterização física e química das formulações otimizadas contendo natamicina.....	146
5.3.1 Espessura.....	147
5.3.2 Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água.....	148
5.3.3 Permeabilidade ao vapor de água.....	150
5.3.4 Grau de intumescimento.....	152
5.3.5 Resistência mecânica.....	155

5.3.6 Cor e transparência.....	158
5.3.7 Ângulo de contato	161
5.3.8 Rugosidade	163
5.3.9 Morfologia dos filmes – Microscopia eletrônica de varredura.....	165
5.3.10 Temperatura de transição vítrea.....	169
5.3.11 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	171
5.3.12 Isotermas de adsorção de umidade.....	173
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS....	177
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	181
APÊNDICE A: CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS.....	195
APÊNDICE B: CURVA PADRÃO DA NATAMICINA.....	201
APÊNDICE C: GRÁFICOS DE DMA DOS FILMES SEM E COM NATAMICINA ..	205
ANEXO 1.....	209
ANEXO 2.....	219

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A garantia da segurança microbiológica e a manutenção da qualidade nutricional dos produtos alimentícios processados, bem como a necessidade de redução da utilização de embalagens sintéticas são alguns dos principais desafios enfrentados pelo setor de comercialização de alimentos. Estas questões têm contribuído, nas últimas décadas, para o desenvolvimento de embalagens (filmes e coberturas) elaboradas a partir de matérias-primas renováveis tais como polissacarídeos, proteínas ou lipídios. Ainda que a intenção destes filmes e coberturas não seja a substituição total das embalagens plásticas tradicionais, eles apresentam um grande potencial para reduzir o seu uso, assim como atuar como sistemas de liberação controlada de substâncias ativas, e limitar a migração de umidade, aromas e lipídios entre as fases que compõe o alimento.

A tecnologia de biofilmes antimicrobianos vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, visando a compreensão e controle dos mecanismos da transferência de agentes ativos incorporados na matriz polimérica para a superfície do alimento. Com isso tem-se a possibilidade de utilização de menores quantidades de conservantes químicos, comparada às necessárias quando estes são incorporados diretamente no alimento, tendo como princípio que na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos o crescimento microbiano ocorre na superfície.

O Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos (LEPPbio) da FEQ/UNICAMP vem, desde 2000, desenvolvendo pesquisas com biofilmes de alginato, tendo desenvolvido uma técnica de obtenção de filmes de baixa massa solubilizada em água através da reticulação da matriz de alginato com íons cálcio. A possibilidade de obtenção de filmes compostos de alginato e quitosana despertou interesse devido ao potencial desses dois biopolímeros de formar complexos polieletrólíticos e com isto

melhorar as propriedades dos filmes em relação aos seus componentes puros. Além disso, a quitosana é conhecida por sua atividade antimicrobiana inerente, o que poderia contribuir para o caráter de filme ativo desejado.

Devido à complexidade observada nas etapas de obtenção dos filmes compostos com polímeros de cargas opostas, como o alginato e a quitosana, optou-se por focar o presente trabalho apenas no estudo da mistura destas duas macromoléculas como possíveis matrizes para liberação controlada de agentes antimicrobianos (neste caso, o sorbato de potássio e a natamicina). No entanto, a proposta inicial deste trabalho englobava, além da avaliação dos filmes de alginato e quitosana, a obtenção de filmes compostos de alginato e pectina, os quais foram obtidos e caracterizados quanto as suas propriedades físicas. Este estudo acabou dando origem ao artigo "*Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration*" (Carbohydrate Polymers, v.77, p.736-742, 2009) apresentado em anexo (ANEXO 1). Também foram feitos estudos exploratórios de filmes multi-camadas, isto é, filmes estruturados sequencialmente, com camadas individuais de alginato e quitosana, cujos resultados também se encontram em anexo (ANEXO 2).

O presente trabalho visou à otimização do processo de elaboração de filmes de alginato e de filmes compostos de alginato e quitosana. A eficiência de agentes antifúngicos (sorbato de potássio e natamicina), incorporados nestes filmes, contra três microorganismos de alta ocorrência em queijos (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium commune* e *Debaromyces hansenii*) foi avaliada visando uma possível aplicação como embalagem antimicrobiana em alimentos de umidade intermediária. Além disso, estudou-se a cinética de liberação da natamicina nas matrizes poliméricas formadas, bem como o efeito da adição desta nas propriedades físico-química dos filmes.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis para alimentos

2.1.1 Definições

Coberturas são aplicadas ou formadas diretamente no alimento enquanto que filmes são estruturas pré-formadas, independentes, que podem ser usadas para envolver o alimento após o seu processamento. Os filmes são aplicados sobre a superfície do alimento ou separando os diferentes componentes de um mesmo produto.

Quando um filme ou uma cobertura é parte integrante do alimento, sendo consumido juntamente com ele, a embalagem é definida como comestível. Como são considerados componentes do alimento, filmes e coberturas comestíveis devem apresentar o mínimo sabor possível para não alterem as características sensoriais originais do produto e estar em conformidade com a legislação vigente (Guilbert *et al.*, 1996).

O termo biodegradável é aplicado quando o material é completamente degradado por microrganismos em um processo de decomposição, levando a formação de biomassa e compostos naturais mais simples. O processo de biodegradação envolve etapas de despolimerização ou hidrólise (quebra da cadeia) e mineralização a CO₂, água e sais, na presença de microrganismos apropriados, meio ambiente favorável e substrato polimérico (Krochta e De Mulder-Johnston, 1997).

2.1.2 Histórico

A aplicação de filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis, apesar de ser o objeto de recentes pesquisas, já é utilizada em alimentos há muitos anos. Nos séculos 12 e 13, cera era utilizada na China para evitar a desidratação de frutos cítricos (Baldwin *et al.*, 1995; Tharanathan, 2003). O recobrimento de carnes com gorduras e posteriormente, com gelatina, para evitar o encolhimento, tem sido praticado desde o século 16 (Kester e Fennema, 1986). Um filme comestível obtido a partir da nata do leite de soja fervido, chamado *Yuba*, era tradicionalmente utilizado na Ásia, desde o século 16, visando melhorar a aparência e preservar alguns alimentos. No século 19, sacarose começou a ser aplicada em castanhas, amêndoas e avelãs para prevenir a oxidação e rancidez durante o armazenamento (Debeaufort *et al.*, 1998).

No entanto, a principal e mais conhecida aplicação de coberturas comestíveis desde os anos 30 até hoje é o uso de emulsões feitas de ceras e óleos em água aplicada em frutas e vegetais para melhorar a aparência (brilho, cor, textura) e aumentar a vida de prateleira, controlando o amadurecimento, a perda de água e a deterioração microbiológica (Baldwin *et al.*, 1995; Guilbert *et al.*, 1996; Nussinovitch e Hershko, 1996). Nos últimos 40 anos, um número elevado de trabalhos científicos e patentes referentes à formulação, aplicação e caracterização de filmes e coberturas foram desenvolvidos (Gennadios *et al.*, 1997; Debeaufort *et al.*, 1998). Na última década vem se constatando um crescente interesse por biofilmes comestíveis ou biodegradáveis, principalmente devido a preocupações ambientais, demanda por produtos minimamente processados e de alta qualidade e oportunidades para a criação de novos mercados para matérias-primas agrícolas sub-utilizadas que apresentam propriedades de formação de filmes.

2.1.3 Processos de produção

A formulação de filmes e coberturas requer o uso de pelo menos um componente capaz de formar uma matriz estrutural com adequada coesividade (Guilbert *et al.*, 1997; Mariniello *et al.*, 2003). As forças coesivas dependem da estrutura do polímero, do solvente utilizado, da temperatura e da presença de outras moléculas tais como plastificantes e agentes reticulantes (Tharanathan, 2003). As substâncias formadoras de filmes, normalmente polímeros de alta massa molar, são capazes de formar uma estrutura contínua pelo rearranjo e interação entre as moléculas sob ação de um tratamento químico ou físico.

A formação do filme ou cobertura envolve um dos seguintes processos (Kester e Fennema, 1986; Guilbert *et al.*, 1996; Debeaufort *et al.*, 1998):

- Fusão e solidificação de gorduras, ceras ou resinas sólidas;
- Coacervação simples, onde um hidrocolóide disperso em solução aquosa é precipitado ou gelificado pela remoção do solvente, adição de um soluto não-eletrolítico no qual o polímero não é solúvel, adição de um soluto eletrolítico induzindo um efeito de *salting out*, ou pela modificação do pH da solução;
- Coacervação complexa, onde dois hidrocolóides em solução com cargas opostas são combinados, induzindo interações e a precipitação da mistura de polímeros;
- Gelificação ou coagulação térmica, através do aquecimento da solução da macromolécula envolvendo sua desnaturação, gelificação ou precipitação; ou através do resfriamento rápido da solução hidrocoloidal induzindo uma transição sol-gel.

Filmes, que são estruturas independentes, têm sido obtidos em escala laboratorial através do espalhamento da solução filmogênica em um suporte (*casting*), seguido por um processo de secagem e posterior desprendimento do filme (Guilbert *et al.*, 1997). Em processos industriais, as técnicas utilizadas na fabricação de filmes plásticos flexíveis podem ser adaptadas para a fabricação de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis. Estas técnicas podem ser extrusão ou coextrusão, laminação, e secagem em rolos para a evaporação do solvente (Tharanathan, 2003).

2.1.4 Propriedades funcionais

Embalagens biodegradáveis e/ou comestíveis devem apresentar algumas propriedades funcionais e específicas. A principal utilidade de biofilmes está relacionada à habilidade de melhorar a qualidade de alimentos, prolongando a sua vida de prateleira. Biofilmes podem também melhorar as propriedades mecânicas do produto, facilitando o seu manuseio e transporte; e sensoriais, tais como cor, brilho, transparência, rugosidade e pegajosidade (Martin-Polo *et al.*, 1992; Guilbert *et al.*, 1996; Miller e Krochta, 1997, Tharanathan, 2003).

As características exigidas para um biofilme dependem principalmente da aplicação para qual o mesmo está destinado. As principais propriedades funcionais são o controle da transferência de umidade, de gases (O_2 e CO_2), de óleos e gorduras, bem como melhoria das propriedades mecânicas, uso como carreador de compostos ativos e a retenção de compostos voláteis.

O controle do conteúdo de umidade de produtos alimentícios é um dos fatores mais importantes para a manutenção do frescor, textura e segurança microbiológica. Biofilmes podem controlar a atividade de água prevenindo seletivamente tanto a perda como o ganho de umidade. O controle das trocas gasosas, particularmente CO_2 e O_2 , permite um melhor acondicionamento de frutas (Kampf e Nussinovitch, 2000; Kittur *et al.*, 2001) e reduz significativamente a oxidação de alimentos e a rancidez de gorduras polinsaturadas (Debeaufort *et al.*, 1998).

A eficiência funcional do filme depende fortemente da natureza dos seus componentes e da sua composição e estrutura. Lipídios e substâncias hidrofóbicas tais como ceras e resinas são mais eficientes como barreira à transferência de água, porém tendem a ser opacos e pouco flexíveis (Baldwin *et al.*, 1995; Weller *et al.*, 1998; Gallo *et al.*, 2000; Tharanathan, 2003). Por outro lado, polissacarídeos e proteínas, devido a sua natureza hidrofílica, apresentam propriedades limitadas de barreira à água e ao vapor de água (Parris *et al.*, 1995; Kester e Fennema, 1986), sendo que em alimentos com alta atividade de água eles tendem a intumescer, dissolver e se desintegrar. No entanto, a permeabilidade a gases é normalmente mais baixa do que a de filmes plásticos, geralmente os filmes proteínas e polissacarídeos apresentam propriedades mecânicas melhores em relação a filmes de lipídios e outras substâncias hidrofóbicas.

Uma combinação das vantagens funcionais apresentadas por cada material pode ser obtida com filmes compostos feitos de hidrocolóides e lipídios em diversas proporções (Tharanathan, 2003).

2.1.5 Caracterização de filmes

O uso adequado de biofilmes depende fortemente das suas propriedades mecânicas e de barreira. Conseqüentemente, metodologias precisas para a determinação do desempenho dos filmes têm sido desenvolvidas, particularmente para a medida de

permeabilidade, necessária, por exemplo, em estimativas de vida de prateleira (Debeaufort *et al.*, 1998).

Além das propriedades mecânicas e de barreira contra umidade e gases, outras caracterizações podem ser realizadas, tais como medidas de espessura, isotermas de sorção de umidade, massa solubilizada em água e em outros solventes, intumescimento, propriedades térmicas, difusividade de substâncias ativas, cor, brilho e opacidade.

Um filme ou cobertura com ótimas propriedades de barreira pode ser ineficiente se as suas propriedades mecânicas não permitirem a manutenção da integridade do filme durante os processos de manuseio, envase e transporte. Assim, a resistência mecânica e a deformabilidade do filme ou cobertura devem ser avaliados. Métodos tradicionais usados para filmes plásticos são perfeitamente adaptáveis para filmes biodegradáveis.

As propriedades mecânicas dos filmes estão relacionadas com o tipo de macromolécula e principalmente com sua coesão estrutural. Coesão é o resultado de uma habilidade do polímero de formar fortes e/ou numerosas ligações moleculares entre as cadeias poliméricas, impedindo a sua separação. Esta habilidade depende da extensão da cadeia polimérica, da sua geometria, da dispersão das forças moleculares, da natureza e posição dos grupamentos laterais. Tecnicamente, as propriedades mecânicas estão associadas à formulação (macromolécula, solvente, plastificante), ao processo de obtenção e à maneira de aplicação (*casting*, pulverização no caso de recobrimentos, suspensão fundida) (Guilbert *et al.*, 1996).

A tensão e a deformação no ponto de ruptura de filmes comestíveis podem ser determinadas em testes de tração (Yang e Paulson, 2000). A tensão na ruptura é definida como a máxima força que um material pode suportar (Krochta e De Mulder-Johnston, 1997). A medida da tensão na ruptura fornece informações da magnitude das forças intermoleculares envolvidas na matriz polimérica. O alongamento é usualmente medido no ponto de ruptura do material e representa a capacidade do material em se estender, refletindo, portanto sua plasticidade.

Galiotta *et al.* (1998) definiram a propriedade massa solubilizada em água (MS) de filmes como a quantidade de matéria seca que é solubilizada após 24 horas de imersão. A avaliação dessa propriedade é essencial, sobretudo para que seja definido campo de aplicação do filme. Embalagens primárias requerem uma baixa massa solubilizada em água

devido ao manuseio, transporte e armazenamento das mesmas. Além disso, alimentos com alta atividade de água requerem filmes insolúveis para seu acondicionamento.

Coefficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA) é definido como a taxa da transmissão de vapor de água por unidade de área e espessura do material, e por unidade de diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições de umidade e temperatura específicas (Kester e Fennema, 1986; Debeaufort *et al.*, 1998). A permeabilidade não deve ser confundida com transporte através dos poros, uma vez que a mesma consiste em um processo de dissolução e difusão onde o soluto se dissolve em um lado do filme, se difunde através do mesmo até o outro lado e é desorvido. Desta forma, a transmissão de vapor de água através de filmes hidrofílicos depende da difusividade e solubilidade da molécula de água na matriz (Wijmans e Baker, 1995). Kester e Fennema (1986), relatam que a etapa referente à difusão depende do tamanho, forma e polaridade da molécula permeante, bem como da mobilidade da cadeia polimérica dentro da matriz do filme. Os fatores que afetam o movimento da cadeia do polímero incluem forças de atração entre as cadeias, como pontes de hidrogênio e interações do tipo Van der Waals, grau de reticulação e cristalinidade. O método padrão para determinação de PVA em filmes comestíveis e/ou biodegradáveis é o método do copo, baseado em técnica gravimétrica (Debeaufort *et al.*, 1998).

O intumescimento de filmes é o resultado da difusão de moléculas de solvente para o interior dos mesmos e sua acomodação na estrutura polimérica. Essa retenção de moléculas ocorre, inicialmente, nos espaços vazios. O intumescimento, entretanto, envolve inevitavelmente uma mudança no arranjo espacial das cadeias poliméricas resultando em um aumento de volume da amostra (Lucas *et al.*, 2001).

Para o desenvolvimento de filmes que serão utilizados como dispositivos para liberação controlada, testes de intumescimento devem ser realizados no filme sem o agente ativo (Remuñán-López e Bodmeier, 1997). Nestes casos é necessário conhecer as características de intumescimento e sua influência na permeabilidade para que se possa modelar a liberação do agente ativo para o meio.

2.1.6 Matérias-primas utilizadas na fabricação de filmes e coberturas

Quanto à natureza dos seus componentes, filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis podem ser formados por hidrocolóides (proteínas, polissacarídeos) e lipídios (ácidos graxos, ceras, resinas) (Mariniello *et al.*, 2003).

Os polissacarídeos mais frequentemente utilizados são celulose e amido (e seus derivados), quitosana, pectinas, extrato de algas (carragenas e alginatos), exudado de plantas (goma arábica), sementes (goma guar e goma locuste) ou obtidos por fermentação microbológica (goma xantana e gelana) (Baldwin *et al.*, 1995; Tharanathan, 2003). As proteínas com maior potencial para fabricação de biofilmes são tanto de origem vegetal (glúten, soja, caseína, zeína, etc.) quanto de origem animal (gelatina, albumina de ovo, colágeno, soro de leite, proteínas miofibrilares). As fontes lipídicas são constituídas de parafina, cera de abelha, cera de carnaúba, óleos vegetais, ácido esteárico, ácido caprílico, resinas entre outros.

As diferentes fontes de biopolímeros destinados à fabricação de filmes e coberturas bem como suas propriedades e aplicações como embalagens alimentícias têm sido revisadas e exploradas por diversos autores nestes últimos anos (Baldwin *et al.*, 1995; Guilbert *et al.*, 1996; Miller e Krochta, 1997; Krochta e De Mulder-Johnston, 1997; Gennadios *et al.*, 1997; Debeaufort *et al.*, 1998; Haugaard *et al.*, 2001; Tharanathan, 2003).

2.1.6.1 Alginato

O alginato é um carboidrato coloidal hidrofílico extraído de diversas espécies de algas pardas (*Phaeophyceae*) com soluções diluídas de álcalis. Ele também pode ser obtido por microrganismos (Coviello *et al.*, 2007). Em termos moleculares, o alginato é um copolímero linear composto de resíduos do ácido β -D-manurônico (G) e do ácido α -D-manurônico (M) ligados por ligações glicosídicas do tipo (1-4) (Figura 2.1). Esses monômeros podem ser organizados em blocos de resíduos G consecutivos (blocos GG), de resíduos M consecutivos (blocos MM) ou resíduos alternados de M e G (blocos MG) possibilitando a formação de quatro tipos de ligações e a nível molecular. A composição e estrutura seqüencial variam entre os diferentes tipos de alginato (Smidsrød, 1974; Ertesvåg e Valla, 1998).

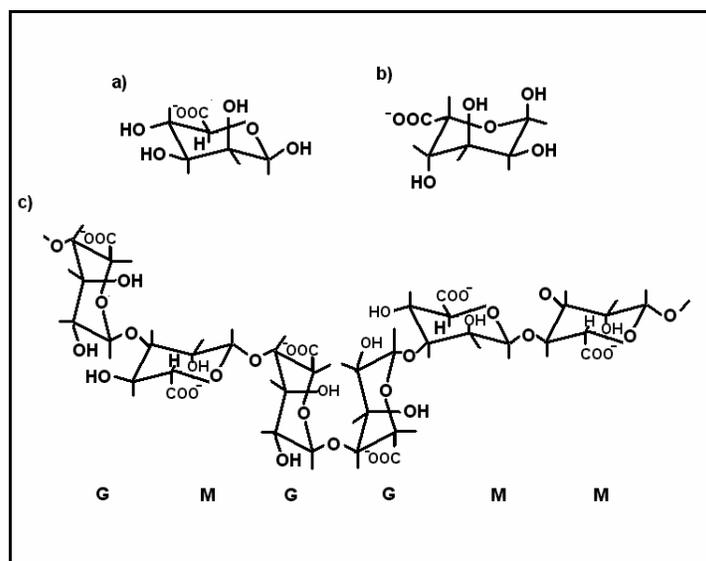


Figura 2.1. Estrutura do: (a) ácido β -D-manurônico, (b) α -L-gulurônico e (c) alginato (Ertesvåg e Valla, 1998)

Diversos trabalhos utilizando técnicas de fracionamento químico e ressonância magnética nuclear (NMR) aliadas a modelos estatísticos têm demonstrado que a ocorrência de resíduos G e M nas cadeias de alginato ocorre em blocos dispostos ordenadamente e não aleatoriamente (Draget *et al.*, 1997).

A principal aplicação comercial do alginato é na forma de sal, sendo os principais alginatos de sódio, potássio e amônio. Devido as suas propriedades coloidais tais como espessamento, estabilização, suspensão, formação de gel e emulsificação, este biopolímero é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e papelreira (Mancini *et al.*, 1996; Ertesvåg e Valla, 1998).

No processo de gelificação de polissacarídeos, o solvente é confinado nos interstícios de uma rede tridimensional unida por “pontos de amarração” que envolvem a associação cooperativa de longas regiões da cadeia do polímero. Essas regiões de associação são conhecidas como zonas de junção, apresentando-se na forma de ligações covalentes com conformação ordenada. Uma vez que a cadeia existe na forma sol, como uma hélice randômica, a interconversão sol-gel pode envolver a transição da conformação que pode ser detectada e caracterizada por métodos espectroscópicos (Bryce *et al.*, 1974).

Apesar de hidrocolóides como o alginato formarem filmes fortes, estes exibem pouca resistência à água devido a sua natureza hidrofílica (Rhim, 2004). No entanto a

habilidade do alginato de formar géis fortes e insolúveis com diversos cátions polivalentes pode ser utilizada para melhorar tais propriedades dos filmes de alginato. Allen *et al.* (1963) classificaram o cloreto de cálcio como o agente reticulante mais efetivo.

O alginato é o único polissacarídeo que naturalmente contém grupos carboxílicos em cada um dos resíduos, sendo que o processo de gelificação está baseado na afinidade dos alginatos por certos íons e na habilidade de ligar estes íons seletivamente e cooperativamente (Draget *et al.*, 1997). Os grupos carboxílicos de cadeias adjacentes de alginato reagem com íons cálcio para formar uma rede tridimensional do polímero (Bryce *et al.*, 1974). O mecanismo que melhor descreve a formação de géis de alginato na presença de íons cálcio é chamado modelo “caixa de ovos” (Figura 2.2) proposto por Grant *et al.* (1973).

A ligação iônica mais seletiva está estritamente ligada ao conteúdo de resíduos do ácido gulurônico (G), ou mais precisamente, a extensão dos blocos GG nas cadeias. As regiões de resíduos G alinhadas lado a lado, resultam na formação de uma cavidade onde os íons cálcio fazem uma junção entre as cadeias. Um maior grau de ligações iônicas é, portanto encontrado em alginatos ricos em resíduos G. A rede resultante é função da frequência e do tamanho dos blocos GG bem como da concentração e do tipo de cátion utilizado. Mudanças na concentração do cátion podem alterar o número de zonas de junção de cadeias de alginato unidas no modelo caixa de ovo alterando assim a força do gel. Acredita-se que a reticulação ocorra quando um bloco de vinte ou mais resíduos do ácido gulurônico ou manurônico em uma cadeia são ligados a um bloco similar em uma outra cadeia por um determinado número de íons cálcio (Simpson *et al.*, 2004).

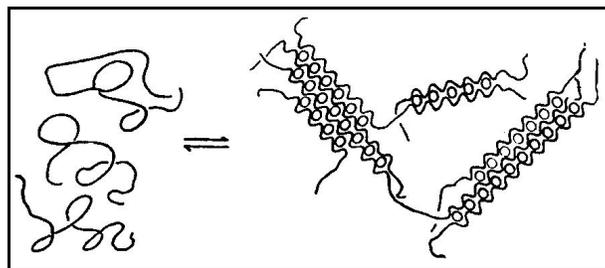


Figura 2.2. Representação esquemática da transição sol-gel para alginato, envolvendo zonas de junção tipo “caixa de ovos” (Bryce *et al.*, 1974)

Estudos reológicos e de dispersão de luz com alginatos sugerem que os blocos aumentam a rigidez do gel na seqüência $G > MG > M$. Um polímero volumoso e rígido é encontrado nas regiões de blocos G, tendo as regiões MG rigidez intermediária (Smidsrød, 1974). Segmentos da cadeia consistindo de resíduos G e M alternados não interagem com o cálcio, mas servem para formar as estruturas agregadas, produzindo uma rede tridimensional (Kester e Fennema, 1986).

Segundo Mancini *et al.* (1996), a obtenção de filmes de alginato de cálcio depende do tipo de alginato, do grau de conversão entre o sódio e cálcio, da fonte de íons cálcio (cloreto, fosfato, lactato ou acetato de cálcio) e dos métodos de preparação.

Existem dois métodos mais usados para a gelificação do alginato de sódio com cálcio. No primeiro método, íons de cálcio bivalentes são homoganeamente liberados dentro de uma solução de alginato para causar gelificação uniforme, que pode ser alcançada através da dispersão prévia de um sal de cálcio de baixa solubilidade. À medida que o cálcio ionizado na solução interage com polímeros de ácido algínico, mais sal será solubilizado, resultando eventualmente na formação de um gel homogêneo. Alterações no pH ou na temperatura também podem ser utilizadas para controlar a liberação de íons de cálcio por toda a solução de alginato (Kester e Fennema, 1986).

Um segundo método de formação de géis de alginato envolve a difusão de íons de cálcio para o interior da solução. Quando o cálcio ionizado entra em contato com a solução de alginato, um gel desenvolve-se instantaneamente na interface. A gelificação prossegue quando os íons cálcio difundem através da interface gel-membrana (Glicksman, 1983). Draget *et al.* (1991) propuseram uma técnica para uma liberação lenta do cálcio de maneira a formar um gel uniforme.

Remuñán-Lopes e Bodmeier (1997) obtiveram filmes insolúveis de alginato de cálcio por imersão de filmes de alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio. No entanto, esses autores observaram diferenças significativas na permeabilidade ao vapor de água e elasticidade com diferentes concentrações de agente reticulador, sendo que filmes tratados com altas concentrações do agente foram mais permeáveis e mais flexíveis. Altas concentrações de agente reticulador podem induzir uma reticulação muito rápida na superfície do polímero, diminuindo a velocidade de difusão dos demais íons cálcio para o interior dos filmes. Assim altas concentrações de íons cálcio irão requerer um maior tempo

de exposição para que o processo de reticulação dos polímeros seja completo.

Pavlati *et al.* (1999) observaram que a massa solubilizada em água de filmes de alginato em água foi significativamente diminuída pela imersão do filme em soluções de sais de íons multivalentes. Zactiti e Kieckbusch (2006) obtiveram filmes insolúveis de alginato através da pulverização da superfície dos filmes com solução de cloreto de cálcio. Estes autores observaram que a reticulação diminui a massa solubilizada em água e permeabilidade ao vapor de água, aumenta a tensão de ruptura, porém diminui drasticamente o alongamento dos mesmos. Rhim (2004), Roger *et al.* (2006) e Olivas *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes ao de Zactiti e Kieckbusch (2006) através da imersão de filmes de alginato em solução reticuladora de cloreto de cálcio.

Um método alternativo de gelificação de matrizes de alginato foi proposto por Sriamornsak e Kennedy (2006). Neste, a solução de polissacarídeo era depositada sobre uma membrana de diálise presa no interior de um molde cilíndrico contendo na base solução de cloreto de cálcio (5% p/v). A membrana de diálise foi selecionada como uma barreira de modo a reter a solução polimérica, porém permitir a difusão dos íons cálcio para o interior do gel. Após esta etapa, um determinado volume da mesma solução reticuladora era vertida sobre o gel “pré-formado” por um período de tempo. Os géis eram então lavados com água deionizada e secos.

Além dos géis iônicos, os alginatos podem formar géis ácidos abaixo do pK_a do ácido gulurônico ($pK_a = 3,4$). Géis com uma alta quantidade de blocos G exibem alta porosidade, pouco encolhimento durante a gelificação e pouco intumescimento. Com o aumento de blocos M os géis se tornam mais macios e tem uma porosidade menor (Ertesvåg e Valla, 1998).

2.1.6.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural derivado do processo de desacetilação da quitina, sendo o segundo biopolímero natural mais abundante, depois da celulose. A quitina é encontrada em exoesqueletos de crustáceos (principalmente carangueijo, camarão e lagosta), na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos (Krochta e De Mulder Johnston, 1997; Park *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004).

Em termos moleculares a quitosana (Figura 2.3 a) é formada pela repetição de unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicose (ou D-glicosamina) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose. Durante a desacetilação, parte das ligações N-acetil da quitina (Figura 2.3 b) são rompidas com formação de unidades que contém grupamentos amínicos livres, conferindo à quitosana uma natureza catiônica. Entretanto, a quitosana não é um composto uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 30% já podem ser considerados como quitosana (Lazaridou e Biliaderis, 2002; Garcia *et al.*, 2004; López-Caballero *et al.*, 2005). A quitosana é insolúvel em água, mas pode ser solubilizada em soluções ácidas.

As aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia do polímero. A quitosana é um polieletrólito linear em pH ácido com boa capacidade de formação de filmes dentre outras aplicações (Shu *et al.*, 2001).

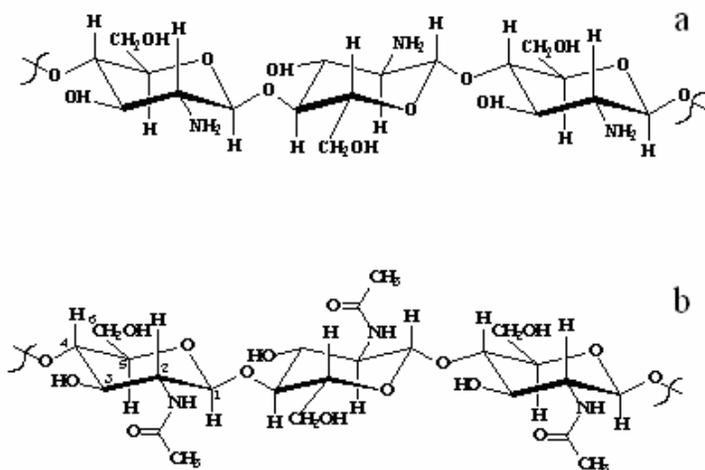


Figura 2.3. (a) Estrutura da quitosana, (b) estrutura da quitina (Einbu e Vårum, 2004)

Devido a sua não toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Coma *et al.*, 2002), a quitosana vem sendo considerada há décadas como um composto de grande interesse industrial (Shu *et al.*, 2001). Dentre as diversas aplicações destacam-se, biomateriais para medicina, membranas filtrantes para tratamento de efluentes, filmes e

coberturas comestíveis, fibra dietética e medicamento contra hipertensão devido a sua ação quelante com íons cloreto. Na indústria farmacêutica, a quitosana tem sido estudada ultimamente para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (Yao *et al.*, 1996; Shu *et al.* 2001).

A quitosana tem sido associada à inibição do crescimento de uma ampla variedade de fungos, leveduras e bactérias. Segundo Bégin e Van Calsteren (1999), as cargas positivas da quitosana reagem com as cargas negativas das macromoléculas na superfície do microrganismo, provavelmente competindo por íons cálcio nos sítios eletronegativos, impedindo assim uma estabilidade dimensional causando rompimento da membrana celular.

O potencial de uso da quitosana como um agente antimicrobiano tem sido demonstrado especialmente contra o crescimento de bactérias como a *Listeria monocytogenes*, a qual é inaceitável em alimentos devido a sua patogenicidade. Bégin e Van Calsteren (1999) demonstraram através de análises de epifluorescência que a quitosana apresentou atividade bactericida contra cepas de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*.

Coma *et al.* (2002) observaram uma diminuição da atividade antimicrobiana da quitosana em função do tempo em queijos recobertos por um filme de quitosana, provavelmente devido à ligação de todos os grupos amínicos da quitosana com os componentes da parede celular das bactérias. Segundo estes autores, seria interessante conciliar a liberação controlada de um outro agente ativo com a matriz de quitosana para que se obtenha uma maior eficiência antimicrobiana.

Filmes de quitosana preparados em soluções diluídas de ácido acético foram capazes de inibir o crescimento de *Rhodotorula rubra* e *Penicilium notatum* pela aplicação direta do filme em colônias dos microrganismos segundo constatado por Chen *et al.* (1996).

As condições de fabricação dos filmes incluindo pH do solvente, força iônica, tipo de solvente são parâmetros importante para o controle da porosidade e das propriedades mecânicas dos filmes. Força iônica e pH podem ser manipuladas de maneira a reduzir as repulsões eletrostáticas inter e intramoleculares entre as cadeias de quitosana, permitindo assim a aproximação das mesmas, promovendo ligações inter e intramoleculares por pontes de hidrogênio (Chen *et al.*, 1996; Arvanitoyannis *et al.*, 1998).

2.1.7 Agentes plastificantes

Na ciência dos polímeros sintéticos, um plastificante é definido como uma substância que incorporada a um polímero é capaz de aumentar a processabilidade, flexibilidade e extensibilidade do mesmo (Levine e Slade, 1992). O agente plastificante é um componente essencial na formulação de biofilmes. Com o aumento da concentração do plastificante, a temperatura de transição vítrea (T_g) do sistema diminui devido ao abaixamento da massa molar média da mistura polímero/plastificante. Galletta *et al.* (1998) observaram que o aumento da concentração de glicerol diminuiu a T_g em filmes de proteína de soro de leite. Da mesma forma, Zactiti (2004) observou um abaixamento da T_g de filmes de alginato de sódio de 29,7°C para 24,9°C sem e com a adição de glicerol (0,6 g/g de alginato).

O agente plastificante deve ser miscível com o biopolímero e é normalmente adicionado em concentrações que variam de 10 a 60 g/100g de massa seca dependendo da rigidez do polímero. Os principais agentes plastificantes são polióis, mono, di ou oligossacarídeos, lipídios e seus derivados. Os mais usados em pesquisas sobre biofilmes de polissacarídeos são o glicerol e o sorbitol. O glicerol é uma molécula hidrofílica de baixa massa molar que pode facilmente se encaixar entre as cadeias poliméricas e estabelecer pontes de hidrogênio como os grupos reativos do polímero, tendo sido adicionado na maioria das formulações de biofilmes de alginato (Irissin-Mangata *et al.*, 2001).

A adição de plastificantes em biofilmes normalmente evita que os filmes fiquem quebradiços. Sua adição, no entanto, promove modificações na estrutura das cadeias poliméricas (Irissin-Mangata *et al.*, 2001; Lazaridou *et al.*, 2003). Plastificantes tendem a aumentar a permeabilidade ao vapor de água, gases e solutos e diminuir a coesão de filmes. Parris *et al.* (1995) observaram que filmes de alginato e de caseinato de sódio plastificados com glicerol eram mais fortes e mais elásticos que filmes plastificados com sorbitol. Lazaridou *et al.* (2003) constataram que a adição de sorbitol afetou as propriedades mecânicas de biofilmes de pululana.

A presença de plastificante também aumenta a concentração de resíduos polares em hidrocolóides, aumentando assim a sua massa solubilizada em água. Zactiti (2004) e Galletta *et al.* (1998) constataram um aumento na massa solubilizada em água com o aumento da concentração de plastificante de filmes de alginato e de proteína de soro de leite, respectivamente.

2.2 Filmes compostos

Uma abordagem mais recente, na tecnologia de biofilmes, tem sido o desenvolvimento de filmes compostos através do uso combinado de diversos polissacarídeos, proteínas e lipídios compatíveis, com o intuito de melhorar sinergicamente suas propriedades (Kayserilioğlu *et al.*, 2003).

A blenda de polímeros sintéticos é um dos métodos mais efetivos para a obtenção de novos materiais poliméricos desejáveis para as mais diversas aplicações. Biofilmes compostos podem então ser desenvolvidos para que se aproveite as vantagens de cada um dos componentes puros. No entanto, assim com em polímeros sintéticos, as propriedades mecânicas e de barreira de biofilmes compostos dependem enormemente das características e compatibilidade dos biopolímeros envolvidos (García *et al.*, 2004).

Dependendo da origem dos biopolímeros e do controle dos parâmetros de processo, tais como pH, fração de cada componente na composição, temperatura e agitação, as propriedades funcionais de filmes compostos podem ser modificadas (Kayserilioğlu *et al.*, 2003).

Comparados aos biopolímeros puros, os complexos polieletrólíticos (PEC) formados a partir de polímeros de cargas opostas têm apresentado vantagens quando aplicados como coberturas e sistemas de liberação controlada (Yan *et al.*, 2001, Marudova *et al.*, 2004). Neste sentido, complexos polieletrólíticos compostos de quitosana e outros polímeros hidrofílicos tais como polivinilálcool, pectina e alginato resultam em matrizes mais insolúveis em água e com liberação mais lenta de agentes ativos quando comparados às matrizes de ambos os polímeros separadamente.

A mistura de pectina e quitosana, por exemplo, irá formar um PEC em valores de pH entre 3 e 6, de forma que esta combinação tende a formar filmes menos solúveis, mais resistentes a pH e com maior barreira a liberação de componentes ativos do que os dois polímeros separadamente (Hiorth *et al.*, 2003; Macleod *et al.*, 1999). Hiorth *et al.* (2003) estudando a produção de filmes de pectina e quitosana fabricados por atomização da solução do biopolímero, para sistemas de liberação controlada, observaram que os biofilmes mais promissores foram formulados com pectinas cítricas de baixo teor de metoxilação não-amidadas em combinação com quitosanas com alto grau de desacetilação. Ofori-Kwakye e Fell (2001) estudaram a permeabilidade de paracetamol em filmes

compostos de pectina/quitosana e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Os autores observaram uma menor permeabilidade da droga em pH próximo de 3, em que supostamente ocorreria a máxima interação entre os grupos carboxílicos ionizados da pectina ($pK_a = 3,6 - 4,1$) e os grupamentos amínicos da quitosana ($pK_a = 6,3$) resultando na formação de um PEC insolúvel. Macleod *et al.*, (1999) relatam que o menor grau de intumescimento da matriz de filmes de pectina e quitosana foi observado quando a razão entre pectina e quitosana era 2:1 em pH 5,0.

Yan *et al.* (2000) observaram que filmes de quitosana e alginato apresentaram boas propriedades mecânicas, entretanto com alta permeabilidade ao vapor de água. Os autores atribuem este fato a alta massa molar da quitosana em relação à do alginato. Para que a reação de coacervação seja efetuada, os grupos amínicos da quitosana devem estar próximos aos grupos carboxílicos do alginato. No entanto, a acessibilidade dos grupos reativos é determinada pelas mudanças na conformação das cadeias dos polímeros em solução. Se a cadeia de quitosana for muitas vezes maior que as cadeias de alginato, o processo de coacervação não ocorre por completo. Desta forma, um elevado número de grupos polares ficam vulneráveis para interagir com a água. Yan *et al.* (2001), em outro trabalho, estudaram o efeito de quitosanas de diferentes massas molares nas características de filmes de alginato e quitosana. Os filmes preparados com quitosana de baixa massa molar apresentaram baixa permeabilidade ao vapor de água e baixa massa solubilizada em água. Os autores constataram que existe um limiar de massa molar que resulta neste efeito, visto que os outros dois filmes (massa molar média e alta) apresentaram propriedades inferiores e muito semelhantes entre si.

Estudando a formação de membranas de alginato e quitosana, seguida de reticulação com glutaraldeído, para utilização na desidratação de misturas etanol/água, Kanti *et al.* (2004) observaram que a mistura dos polímeros resultou na formação espontânea de membranas poliônicas complexas insolúveis. Através de complexação com quitosana, a eficiente seletividade à permeação do alginato pode ser apropriadamente utilizada, sem que haja intumescimento excessivo da membrana, resultando em melhores características de fluxo e fatores de separação, e melhores propriedades mecânicas e térmicas.

Filmes compostos de quitosana e metilcelulose foram desenvolvidos e caracterizados por Garcia *et al.* (2004). Considerando que ambos os polímeros têm cadeia

linear, as interações intermoleculares devem ser facilitadas e reforçadas devido à diferença de cargas das duas moléculas. Os filmes obtidos apresentaram boas propriedades de barreira ao vapor de água e podem apresentar propriedades mecânicas e massa solubilizada em água específicas através da manipulação da razão entre os dois constituintes da matriz polimérica (quitosana/metilcelulose). Em outro trabalho com estes mesmos biopolímeros, Pinotti *et al.*, (2007) relatam que os filmes compostos apresentaram propriedades (massa solubilizada em água e propriedades mecânicas) com valores intermediários entre os valores obtidos para os filmes formados pelos componentes individuais.

Xu *et al.* (2005) observaram que os filmes compostos de amido e quitosana apresentaram melhores propriedades mecânicas e menores permeabilidades ao vapor de água, em relação ao filme de amido, com o aumento da concentração de quitosana na formulação do filme.

Mais recentemente, Chillo *et al.* (2008) utilizaram a ferramenta de planejamento experimental para definir uma formulação otimizada de filmes compostos de amido de mandioca e quitosana que apresentasse as melhores propriedades mecânicas e de barreira. Garcia *et al.* (2009) avaliaram filmes compostos de metilcelulose e quitosana tratados eletricamente e observaram que as misturas apresentaram propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água intermediárias em comparação aos dois componentes puros.

2.3 Embalagens ativas

O conceito tradicional de que a embalagem deve preservar a qualidade do produto por meio de uma mínima interação com o produto está sendo superado frente às várias tecnologias que vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, as quais têm por princípio justamente uma interação embalagem/produto/meio ambiente, como forma de prolongar a qualidade e a segurança do alimento (Álvarez, 2000; Quintavalla e Vicini, 2002; Suppakul *et al.*, 2003). Embalagens com estas características são conhecidas como “ativas”, pois além de atuarem como uma barreira a agentes externos, apresentam alguma outra função desejável.

O termo “embalagem ativa” foi definido pelo European FAIR-project CT 98-4170 como “Um tipo de embalagem que altera as condições de armazenamento para prolongar a

vida de prateleira, aumentar a segurança ou melhorar as características sensoriais do alimento mantendo a sua qualidade” (Quintavalla e Vicini, 2002).

As embalagens ativas desempenham funções que procuram corrigir deficiências presentes nas embalagens convencionais. As funções ativas podem incluir, por exemplo, absorção de oxigênio, umidade ou etileno; emissão de etanol e sabores; e atividade antimicrobiana (Han, 2000; Quintavalla e Vicini, 2002). Por outro lado, as embalagens “inteligentes” são sistemas que monitoram variações no ambiente, na embalagem ou no seu conteúdo, e comunicam estas alterações, incluindo indicadores de temperatura, indicadores de O₂/CO₂ e de qualidade microbiológica.

Os componentes ativos podem ser incorporados diretamente ao material de embalagem, em rótulos/etiquetas, ou estar contidos em sachês (Debeaufort *et al.*, 1998). A incorporação direta de agentes ativos na matriz da embalagem pode ser feita tanto em embalagens fabricadas com polímeros sintéticos como em filmes comestíveis e/ou biodegradáveis. Esta técnica tem a vantagem de que o alimento mantém contato com o composto ativo em toda a sua superfície e não somente em uma área restrita (Álvarez, 2000).

2.3.1 Filmes antimicrobianos

O crescimento microbiano na superfície de alimentos é a principal causa de contaminação e deterioração de diversos produtos refrigerados como carnes, frutas e hortaliças (Rico-Peña e Torres, 1991; Weng e Chen, 1997; Padgett *et al.*, 1998; Coma *et al.*, 2002), reduzindo a vida de prateleira e aumentando o risco de intoxicações alimentares.

Apesar dos diversos métodos de preservação de alimentos, há uma tendência atual dos consumidores pela busca de alimentos minimamente processados e com teores mínimos de aditivos. Neste sentido, a embalagem antimicrobiana é uma forma promissora de embalagem ativa, pois possibilita a utilização de menores quantidades de conservantes, comparada às quantidades necessárias quando são incorporados diretamente no interior do alimento (Bégin e Van Calsteren, 1999), tendo como princípio o fato de que na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos o crescimento microbiano se dá na superfície (Ouattara *et al.*, 2000a; Coma *et al.*, 2002; Choi *et al.* 2005).

Alternativas à aplicação direta de antimicrobianos nas formulações de alimentos, tais como borrifamento e imersão em soluções contendo agentes ativos, têm sido aplicadas como tentativas de aumentar a segurança ou retardar o crescimento de microrganismos (Coma *et al.*, 2002). Essas técnicas, no entanto, apresentam benefícios limitados, pois podem resultar em uma inativação parcial dos agentes ativos e na rápida difusão dos mesmos para o interior do alimento, reduzindo sua eficiência na superfície (Quintavalla e Vicini, 2002). Conseqüentemente, o uso de filmes antimicrobianos pode ser mais eficiente por manter altas concentrações do agente na superfície do produto com uma liberação controlada do mesmo para o alimento (Baldwin *et al.*, 1995; Cagri *et al.* 2002; Choi *et al.*, 2005).

Filmes e recobrimentos podem ser utilizados como veículos para incorporar aditivos alimentares, como antioxidantes e antimicrobianos, na superfície dos alimentos (Kester e Fennema, 1986; Gennadios *et al.*, 1997). Alguns biopolímeros também apresentam atividade antimicrobiana inerente, como por exemplo, a quitosana (Coma *et al.*, 2002). Ouattara *et al.* (2000a, 2000b) prepararam filmes antimicrobianos pela inclusão de vários ácidos orgânicos e óleos essenciais em uma matriz de quitosana e investigaram a inibição do crescimento de bactérias nativas (bactérias lácticas e enterobactérias) e inoculadas (*Lactobacillus sakei* e *Serratia liquefaciens*) na superfície de embutidos embalados a vácuo. A liberação de ácidos orgânicos (ácido acético e propiônico) foi inicialmente rápida, quando o gradiente de concentração do íon entre o lado interno da matriz polimérica e o ambiente externo era alto, diminuindo com a liberação progressiva do ácido. Embora os filmes em estudo não tenham apresentado efeito sobre as bactérias lácticas, o crescimento de enterobactérias e *Serratia liquefaciens* foi retardado ou completamente inibido por até 21 dias de armazenamento a 4°C. A maior inibição foi observada em superfícies com menor atividade de água (salame tipo Bologna), nas quais a liberação do ácido foi mais lenta, e com filmes contendo cinamaldeído, devido a sua maior atividade antimicrobiana sob estas condições. Em outro trabalho, Cagri *et al.* (2002) avaliaram a inibição de *Listeria monocytogenes*, *E. Coli* O157:H7 e *S. Typhimurium* DT104 em fatias de salames tipo Bologna e Summer por filmes de proteína de soro de leite contendo ácido sórbico e ácido p-aminobenzóico. Os filmes mantiveram sua atividade antimicrobiana por 21 dias a 4°C.

Amostras de queijo Emmental inoculadas com *Listeria monocytogenes* recobertas com quitosana apresentaram 10 vezes menos unidades formadoras de colônias do que as amostras sem recobrimento após 36h de incubação a 37°C. Além disso, após 132 h de incubação a 37°C não foram detectadas colônias nos filmes recobertos com quitosana (Coma *et al.*, 2002).

Diversos autores utilizam o “Teste de Difusão em Ágar”, também chamado de “Método do Halo” na determinação da efetividade antimicrobiana de filmes ativos. Este método avalia a atividade antimicrobiana de um dado componente ativo frente à difusão do mesmo através do filme para o meio de cultura solidificado inoculado com o microrganismo alvo (Cagri *et al.*, 2001). A difusão do agente antimicrobiano resulta na formação de uma zona de inibição do crescimento microbiano (Pranoto *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2008).

Chen *et al.* (1996), constataram que filmes de metilcelulose e quitosana contendo benzoato de sódio e/ou sorbato de potássio mostraram-se significativamente efetivos na inibição dos fungos *Penicillium notatum* e *Rhodotorula rubra*. Estudando a liberação destes agentes ativos em água, os autores observaram que nos primeiros 30 minutos, a 25°C, aproximadamente 40% do agente ativo tinha sido liberado do filme. A máxima quantidade de agente liberada nesta temperatura, em relação a quantidade incorporada inicialmente nos filmes, foi 60%. Os autores atribuem este comportamento à interação entre as cadeias de quitosana e dos agentes ativos.

Trabalhos recentes utilizam natamicina, nisina e pediocina como agentes antimicrobianos incorporados em filmes de celulose. Pires *et al.* (2008) estudaram o efeito da natamicina na preservação de queijo muzzarella. Em outro trabalho, Oliveira *et al.* (2007) avaliaram a inibição de fungos em queijo gorgonzola pela utilização de filmes contendo natamicina, nisina e a mistura desses dois agentes antimicrobianos, constatando que a natamicina foi eficiente na inibição de fungos, enquanto que a nisina agiu mais sobre as bactérias. Santiago-Silva *et al.* (2009) testaram a incorporação de pediocina em filmes de celulose e avaliaram a eficiência antimicrobiana dos mesmos na preservação de presunto fatiado, constatando que os filmes contendo 50% (m/m) de pediocina foram efetivos na inibição da *Listeria innocua*. Todos estes trabalhos utilizaram o teste de difusão em ágar para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra alguns microrganismos de interesse. No entanto, neste tipo de teste, a comparação entre os resultados tem caráter mais

qualitativo, uma vez que não existe uma metodologia padronizada em relação ao diâmetro de amostra, diâmetro da placa, método de medida da zona de inibição e carga inicial de microrganismos.

Bertan (2008) estudou a incorporação de sorbato de potássio em filmes compostos de glúten, gelatina e amido e avaliou o efeito inibitório dos mesmos frente a espécies fúngicas presentes em pão de forma. Em outro trabalho, Silveira (2005) avaliou a incorporação e eficiência de sorbato de potássio em filmes de celulose e sua aplicação em massa de pastel, obtendo redução da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em 2 ciclos logarítmicos após 40 dias de armazenamento.

De acordo com Han (2000), diversos fatores devem ser considerados para o desenvolvimento de um sistema de embalagem antimicrobiana, entre eles, a compatibilidade do agente antimicrobiano com o material do filme, características do agente antimicrobiano e do alimento, temperatura de armazenamento, coeficientes de transferência de massa e propriedades físicas do filme após a incorporação do agente.

Quando agentes antimicrobianos são incorporados à matriz do biopolímero, as propriedades físicas, mecânicas e a processabilidade dos filmes podem ser alteradas (Bégin e Van Calsteren, 1999). Cha *et al.* (2002) estudaram o efeito antimicrobiano de diferentes tipos de agentes ativos em filmes de alginato de sódio e κ -carragena e as propriedades desses filmes com e sem os agentes. Os autores constaram que as propriedades mecânicas dos filmes com agentes ativos foram inferiores as dos filmes sem os agentes. A mesma concentração de agentes antimicrobianos foi mais efetiva na matriz de alginato do que na de κ -carragena. Por outro lado, Chen *et al.* (1996) ressaltam que em filmes de metilcelulose e quitosana, a incorporação de benzoato de sódio ou sorbato de potássio não afetou as propriedades mecânicas dos filmes.

Bégin e Van Calsteren (1999) estudaram a influência de diferentes ácidos na dissolução de quitosana para a produção de filmes antimicrobianos e constataram que os ácidos láctico e cítrico resultaram em filmes mais espessos, porém mais fracos, enquanto que os ácidos fórmico, clorídrico e acético resultaram em filmes fortes e quebradiços. Os autores atribuem esse comportamento dos filmes ao volume do íon utilizado na interação com a macromolécula, sendo que o íon acetato representaria um limite máximo de volume molecular, acima do qual a resistência do filme decresce muito rapidamente.

2.3.1.1 Substâncias antimicrobianas

Os conservantes são definidos pela legislação brasileira em vigor como substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (Brasil, 1997).

A escolha de um conservante para uma aplicação específica é baseada em fatores como, mecanismo de inibição, natureza química (solubilidade, pH, reatividade, toxicidade), cinética de migração e difusão do agente no alimento, características físico-químicas do alimento, tipo e população de microrganismos, fisiologia do microrganismo alvo, processo de fabricação do material de embalagem e aspectos relacionados à legislação (Han, 2000).

As substâncias químicas antimicrobianas geralmente incorporadas a embalagens são ácidos orgânicos e seus sais, sulfitos, nitritos, antibióticos, álcoois e antimicóticos. Além disso, outras substâncias químicas têm sido testadas como conservantes e esterilizantes, destacando-se o ácido propiônico, peróxidos, ozônio, óxido clorídrico, eugenol, lizozima, nisina e EDTA (Padgett *et al.*, 1998; Han, 2000). O sorbato de potássio é um conservante amplamente utilizado pela indústria de alimentos (Tfouni e Toledo, 2001), enquanto que a natamicina é utilizada no tratamento de superfícies de queijos e embutidos (Stark e Tan, 2003). As características destes compostos serão descritas detalhadamente nos itens 2.3.1.1.1. e 2.3.1.1.2.

De modo geral, um filme antimicrobiano ideal deve ser efetivo em um amplo espectro e a baixas concentrações, não causar alterações nas características sensoriais do produto, ter um custo compatível e atender à legislação vigente. Os maiores desafios da tecnologia têm sido a estabilidade térmica, a eficácia a baixas temperaturas e o atendimento às exigências legais (Suppakul *et al.*, 2003).

Dentre as diversas propriedades de um produto, o pH é o que provavelmente mais influencia a atividade antimicrobiana do conservante (Han, 2000). Por exemplo, um abaixamento do pH aumenta a disponibilidade das formas mais ativas de ácidos minerais fracos (nitrito, sulfito) e de ácidos lipofílicos fracos (sorbico, benzóico, propiônico), potencializando a atividade antimicrobiana (Rico-Peña e Torres, 1991; Tfouni e Toledo, 2001).

2.3.1.1.1 Ácido sórbico ou sorbato de potássio

O ácido sórbico, encontrado naturalmente em alguns frutos, é um ácido graxo insaturado de cadeia linear, com massa molar de 112,13 g/gmol e pKa 4,8. Pode ser utilizado puro ou como sal de sódio, potássio ou cálcio. No entanto sua utilização na forma pura na indústria alimentícia é limitada devido a sua baixa solubilidade em água. O sorbato de potássio, cuja estrutura molecular está mostrada na Figura 2.4, é amplamente utilizado como conservante fungicida e bactericida, por não interferir no sabor e ser fisiologicamente inócuo (Tfouni e Toledo, 2001). O sorbato de potássio é utilizado em muitos alimentos, tais como queijos, vinho, iogurtes, carnes secas, massas e sucos, como forma de prolongar a vida de prateleira dos mesmos.

Uma vez que as moléculas não dissociadas são as responsáveis pela atividade antimicrobiana, esta será maior a baixos pH. Para o ácido sórbico, a maior eficiência é observada em pH menor que 6. O limite máximo de sorbato de potássio permitido pela legislação brasileira vigente para queijos é de 1000 mg/kg (Brasil, 1996).

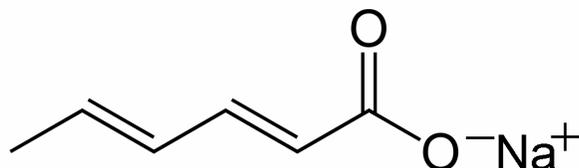


Figura 2.4: Estrutura química do sorbato de potássio

2.3.1.1.2 Natamicina

A natamicina, também conhecida como pimaricina, é um antifúngico macrolídeo poliênico com fórmula $C_{33}H_{47}NO_{13}$ e massa molar 665,75 g/gmol (Figura 2.5). Compostos poliênicos são assim chamados devido ao número de ligações duplas conjugadas que constituem sua estrutura cíclica, enquanto que macrolídeos são compostos que se caracterizam pela presença de um anel lactâmico. A natamicina é produzida em escala industrial pela espécie *Streptomyces natalensis* por meio de fermentação submersa (Stark e Tan, 2003).

A atividade antifúngica da natamicina depende da sua ligação com o esterol da membrana do fungo, principalmente o ergosterol, ocasionando o rompimento da mesma. As

bactérias não são afetadas pela natamicina, pois suas membranas são desprovidas de esteróis.

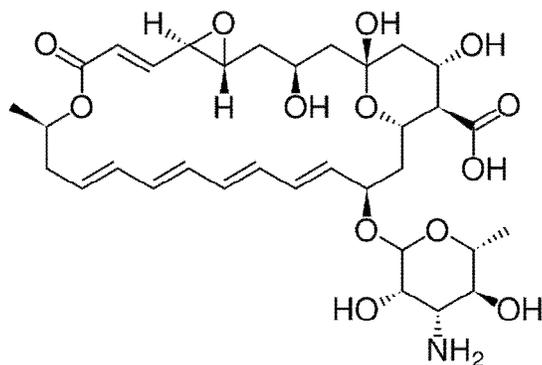


Figura 2.5: Estrutura química da natamicina

A natamicina apresenta baixa solubilidade (aproximadamente 50 µg/mL) em água devido a sua natureza anfifílica. No entanto este antifúngico é eficaz em concentrações muito baixas contra uma grande variedade de bolores e leveduras. A maioria dos fungos apresenta uma concentração mínima de inibição (MIC) menor que 10 ppm (Pedersen, 1992).

A natamicina foi descoberta há cerca de 50 anos e vem sendo utilizada por mais de 30 anos na prevenção de crescimento de fungos em alimentos como forma de prolongar a vida de prateleira. Devido a sua baixa solubilidade é apropriada para aplicação na superfície de alimentos, sendo utilizada no tratamento de superfícies de queijos e embutidos. Como a natamicina não tem ação contra bactérias, o processo de maturação natural destes alimentos não é afetado negativamente.

A natamicina é estável à temperatura ambiente. A estabilidade química da natamicina, no entanto, pode ser afetada por temperaturas elevadas, pH (pouco afetada na faixa de pH entre 5 e 7), exposição a luz solar e radiação UV, agentes oxidantes e metais pesados (Pedersen, 1992).

O uso da natamicina é permitido pela Legislação Brasileira e do MERCOSUL, sendo este composto considerado como um aditivo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nos EUA e reconhecido com um preservativo natural (E235) pela União Européia (Koonst e Marcy, 2003; Gallo *et al.*, 2006). O limite máximo de natamicina no produto acabado permitido pela Legislação Brasileira é de 1 mg/dm², devendo estar ausente a 2 mm de

profundidade em queijos (Brasil, 1996) e de 1 mg/dm² e ausente a 5mm de profundidade em produtos cárneos embutidos (Brasil, 2001).

2.4 Transporte de substâncias ativas em filmes poliméricos

Quando o filme entra em contato com o alimento, forma-se um sistema de duas fases. A taxa de fornecimento do princípio ativo do filme para o alimento passa a ser um processo de dissolução-difusão. Quando um soluto se move por difusão através de sistemas poliméricos, a força motriz para a transferência de massa é a diferença de potencial químico. Conseqüentemente, a difusividade e a solubilidade de equilíbrio do soluto no sistema filme/alimento são as duas principais interações que governam a taxa de transporte ou liberação e podem ser aplicadas para estimar o fluxo de uma substância ativa do filme para a superfície do alimento (Han, 2000).

Uma relação simples de solubilidades pode ser utilizada, caracterizada pelo coeficiente de partição (K), assumido como constante, isto é, independente da concentração do soluto. O coeficiente de partição estabelece a relação de afinidade da substância ativa pelo filme e pelo alimento (Equação 2.1), sendo introduzido em modelos difusionais de transferência de massa para expressar a distribuição de concentração do soluto na interface entre o filme e o alimento (Han, 2000).

$$C = Kc \quad (2.1)$$

onde C é a concentração do soluto ativo na fase filme, c é a concentração do soluto no alimento.

Alguns autores definiram o produto DK (permeabilidade) como sendo o coeficiente de difusão efetiva (D_e) (Axelsson e Persson, 1988; Zhang e Franco, 1999). Existem muitos trabalhos sobre determinação de D_e em géis e polímeros, focando principalmente a sua dependência com a concentração de polímero. Entretanto, a literatura é confusa, tornando difícil identificar se D_e ou D está sendo determinado.

2.4.1 Liberação controlada de agentes antimicrobianos

A tecnologia de liberação controlada tem suas raízes na indústria farmacêutica e vem sendo investigada e utilizada em outras áreas, tais como de fertilizantes e alimentos (Pothakamury e Barbosa-Canovas, 1995). Devido ao crescente interesse pelos filmes antimicrobianos nos últimos anos, os sistemas de liberação controlada vêm sendo abordados e aplicados por muitos pesquisadores na área de alimentos (Ouattara *et al.*, 2000b; Teerakarn *et al.*, 2002; Ozdemir e Floros, 2003; Buonocore *et al.*, 2003; Sebti *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Güçbilmez *et al.*, 2007; Mastromatteo *et al.*, 2009; Gemili *et al.*, 2009). O objetivo dos sistemas de liberação controlada para aplicações em embalagens alimentícias é a transferência do agente antimicrobiano da matriz polimérica para o alimento de maneira a manter uma concentração pré-determinada do composto ativo na superfície do alimento por um determinado tempo (Buonocore *et al.*, 2003).

A difusividade depende do tamanho, forma e polaridade da molécula permeante, bem como das interações entre as cadeias do polímero, tais como pontes-de-hidrogênio e interações de Van-der-Waals, grau de reticulação e grau de cristalinidade. Filmes fabricados com biopolímeros têm uma estrutura matricial suscetível a variações das condições ambientais e, portanto sua funcionalidade e caracterização como embalagem devem ser previamente estabelecidas (Han, 2000).

Uma alta taxa inicial de liberação do antimicrobiano poderia inibir o crescimento celular nos estágios iniciais de armazenamento do produto. No entanto, esta característica também acarretaria em uma alta concentração do conservante na superfície do produto e conseqüentemente aumentaria a taxa de difusão da superfície para o interior do alimento devido ao aumento do gradiente de concentração, podendo então reduzir a eficiência antimicrobiana do filme ativo em longos períodos de armazenamento (Chen *et al.*, 1996).

2.4.2 Modelagem matemática

O benefício prático de uma modelagem matemática dos sistemas de liberação controlada de agentes antimicrobianos consiste na possibilidade de se simular os efeitos dos parâmetros experimentais na performance do sistema filme/alimento (Buonocore *et al.*, 2003). Assim é possível explicar e estimar a cinética de liberação, a fim de se determinar os períodos de armazenamento capazes de manter a concentração do agente antimicrobiano

acima do valor crítico para inibição do desenvolvimento microbiano, de forma que a vida de prateleira do produto possa ser estimada (Han, 2000).

A liberação do agente antimicrobiano uniformemente dissolvido no interior de um filme, em sistemas difusivos, pode ser descrita pela 2ª Lei de Fick, segundo a Equação 2.2.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (2.2)$$

onde C é a concentração de agente antimicrobiano, D é a difusividade, z é a coordenada espacial na direção do transporte e t o tempo.

A metodologia para a integração dessa equação diferencial está bem estabelecida, caso se assuma que a difusividade e a espessura do filme permaneçam constantes (Crank, 1975).

A condição de concentração na face em contato com o alimento é função das características do alimento. Alimentos com alta atividade de água tendem a ter uma difusividade dos solutos da ordem de 10^{-5} cm²/s. Como a difusividade dos solutos no filme é cerca de duas ordens de grandeza menor, Han (2000) simplificou a situação assumindo que o alimento funciona como um sorvedouro, mantendo uma concentração muito baixa na superfície do filme ($z = \delta$; $C = 0$). Essa simplificação torna desnecessário o uso do coeficiente de partição.

A integração da Equação 2.2 conduz ao perfil de concentração dentro do filme, e a integração deste perfil fornece a concentração residual média no filme. Um balanço de massa permite calcular a massa total de soluto liberada (M_t), no intervalo de tempo de 0 a t através da Equação 2.3.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2} \exp\left[\frac{-(2n+1)^2 \pi^2 D t}{\delta^2}\right] \quad (2.3)$$

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

Uma maneira comum de investigar o mecanismo envolvido no processo de difusão em uma placa plana é o ajuste dos estágios iniciais da curva de liberação, ou seja, quando $M_t/M_\infty < 0,6$, pelo Modelo da Lei da Potência (Equação 2.4) (Crank, 1975).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad (2.4)$$

onde k é a constante que caracteriza a matriz da macromolécula e n é coeficiente difusional que caracteriza o mecanismo de liberação.

Um valor de n igual a 1 indica um mecanismo de transporte no qual a taxa de liberação é diretamente proporcional ao tempo (Caso II). Para valores de n entre 0,5 e 1,0, a difusão é conhecida como não-Fickiana ou difusão anômala. Um valor de n igual a 0,5, indica que a difusão segue o modelo Fickiano e que a taxa de liberação depende de $t^{0,5}$ (Caso I). Neste caso o coeficiente de difusão pode ser calculado pela Equação (2.5), ou seja, pelo ajuste linear da curva de M_t/M_∞ versus $t^{0,5}$, para $M_t/M_\infty < 0,6$ (Ozdemir e Floros, 2003). Esta solução é conhecida com solução de tempos curtos ou modelo de sólido semi-infinito.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \cdot \sqrt{\frac{D t}{\delta^2 \pi}} \quad (2.5)$$

Nas Equações 2.3 e 2.5, M_t/M_∞ relaciona a variação da concentração média do soluto no filme com o tempo, desconsiderando o efeito da fase do alimento. Um modelo mais completo, considerando a difusão transiente bicompartimentalizada (no alimento, A, e no filme, F) poderia fornecer a concentração na interface. O perfil de concentração no filme e no alimento são relacionados pela razão das difusividades $[(D_F/D_A)^{1/2}]$, bem como pelas difusividades em cada camada (D_F e D_A). Consequentemente a difusividade em uma camada afeta o perfil de difusão na outra camada, sendo que neste caso o coeficiente de partição (Equação 2.1) deve ser considerado (Han, 2000).

Buonocore *et al.* (2003) desenvolveram um modelo matemático capaz de descrever a cinética de liberação de compostos ativos em matriz com alto grau de intumescimento, levando em consideração os fenômenos envolvidos nessas matrizes, ou seja, difusão da água, relaxamento da matriz e difusão do agente antimicrobiano através da matriz polimérica. O modelo apresentou resultados satisfatórios para filmes de polivinilálcool reticulados com glioxal, contendo lisozima, nisina e benzoato de sódio como agentes antimicrobianos. Os coeficientes de difusão e partição dos agentes aumentaram com a diminuição do grau de *crosslinking* em todos os casos e também aumentaram com a diminuição da massa molar do agente antimicrobiano.

Um outro modelo matemático, utilizado para descrever a cinética de liberação de substâncias ativas incorporadas em matrizes de colágeno, foi desenvolvido e aplicado por Singh *et al.* (1995a). Neste caso, os autores consideram que o mecanismo de transporte é governado por difusão associada à interações eletrostáticas entre as cadeias do polímero e a substância ativa. A aplicação deste modelo torna necessário o levantamento de isotermas de adsorção do ativo na matriz polimérica.

2.4.3 Determinação dos coeficientes de difusão

Em filmes antimicrobianos, assim como em muitas aplicações farmacêuticas, a determinação do coeficiente de difusão das substâncias antimicrobianas ou drogas nas matrizes poliméricas é necessária para se estimar a liberação controlada dessas substâncias (Johansson e Löfroth, 1991).

A determinação experimental dos coeficientes de difusão de solutos em géis e matrizes poliméricas pode ser realizada com base em métodos de regime transiente e métodos de regime permanente (ex. célula de diafragma) (Axelson e Persson, 1988).

Os métodos de regime transiente, conhecidos como ensaios de liberação ou migração, medem o fluxo do soluto que difunde para dentro ou para fora da matriz, em contato com uma solução bem agitada. O filme é imerso em água (ou outro solvente) e a variação de concentração do agente antimicrobiano é monitorada periodicamente para se calcular a fração de massa liberada (M_t/M_∞) com o tempo (Han, 2000). Os pontos experimentais obtidos são ajustados pela Equação 2.3.

A maioria dos autores também utiliza a solução para tempos curtos (Equação 2.5) para o ajuste dos pontos experimentais (Teerakarn *et al.*, 2002). São determinações muito rápidas, mas a difusividade avaliada pode estar sendo afetada pela difusão da água para o interior do filme, que ocorre nos primeiros minutos de contato.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os materiais empregados bem como os métodos e procedimentos experimentais do trabalho. Primeiramente foram descritos os métodos utilizados no desenvolvimento dos filmes de alginato e dos filmes compostos de alginato e quitosana. Dois planejamentos experimentais foram delineados com o intuito de obter formulações otimizadas do filme simples de alginato e do filme composto de alginato e quitosana. Também foram descritos os métodos de caracterização dos filmes e os métodos de determinação dos coeficientes de difusão da natamicina e da atividade antimicrobiana dos filmes ativos.

3.1 Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento dos filmes

Para a elaboração dos filmes simples e compostos foram utilizados alginato de sódio de média viscosidade, obtido da alga *Macrocystis pyrifera* (Sigma-Aldrich Inc., EUA), com uma proporção de blocos M:G de aproximadamente 58:42 (Martinsen *et al.*, 1991) e massa molar de $1,3 \times 10^6$ g/gmol (Apêndice A); e quitosana (GD>90%) (Polymar Ind. e Comércio Ltda, Brasil) que apresentou grau de desacetilação de 96,7% e massa molar média de $3,7 \times 10^5$ g/gmol (Apêndice A). Cloreto de cálcio dihidratado (Merck, Alemanha) foi utilizado como agente reticulante e glicerol P.A. (Synth, Brasil) como agente plastificante. Como solventes foram utilizados água destilada e solução aquosa de ácido acético glacial (Synth, Brasil). Natamicina (Natamax[®]) ($\cong 54\%$) gentilmente cedida pela Danisco (Dinamarca) e sorbato de potássio adquirido da Sigma-Aldrich (EUA) foram utilizados como agentes antimicrobianos para a confecção dos filmes ativos. Natamicina padrão (min. 95%) (Sigma-Aldrich Inc., EUA) foi utilizada na construção da curva de calibração da natamicina (Apêndice A).

3.2 Processo de elaboração dos filmes de alginato puro

Os filmes obtidos na presente pesquisa foram obtidos segundo a técnica de *casting*, que consiste na preparação da solução filmogênica e aplicação da mesma em um suporte/molde com posterior evaporação do solvente. A metodologia de preparação proposta envolve dois estágios de reticulação. A espessura dos filmes foi controlada através do peso de solução filmogênica vertida no suporte.

Inicialmente, devido ao alto poder gelificante do Ca^{+2} , foi necessário produzir um filme de baixo grau de reticulação, sendo que a solução filmogênica contém alginato de sódio, plastificante e CaCl_2 . Essa etapa inicial foi denominada 1º estágio. Primeiramente, adicionou-se o glicerol (0,6 g glicerol/g alginato) em água destilada (400 mL) à temperatura ambiente sob agitação mecânica (hélice tipo pá dentada) constante (1000 rpm) (Fisatom, modelo 713, Brasil) durante 3 minutos antes de adicionar o alginato (1,5% m/m). A mistura era então mantida sob agitação mecânica durante 1 h, até a completa dissolução. Mantendo-se a agitação, a temperatura do sistema era elevada e mantida a 77°C através de uma manta aquecedora (Fisatom, modelo 67, Brasil). Em seguida, 30 mL de uma solução diluída de cloreto de cálcio dihidratado, cuja concentração foi definida através de planejamento experimental (Item 3.4.1), era adicionada pela parede do béquer (para evitar gelificação localizada) a uma vazão controlada (1 mL/min) através de bomba peristáltica (Masterflex C/L, modelo 77120-70, USA). Alíquotas da solução filmogênica (50g) eram então transferidas para placas de polipropileno ($d = 14\text{cm}$) e estas levadas à estufa com circulação forçada de ar (Nova Ética, 420D, Brasil) a 40°C por 20h. Após a secagem, os filmes eram removidos do suporte e armazenados por 24h a 25°C em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio (Ecibra, Brasil) para manter a umidade relativa em 52%.

Esse filme é solúvel em água e deve sofrer uma reticulação complementar (2º estágio). Essa metodologia consistiu na imersão total dos filmes em 50 mL de solução de cloreto de cálcio dihidratado contendo glicerol (5% v/v) por um determinado tempo. Após este tempo, os filmes eram retirados e rapidamente lavados através da imersão em 50 mL de água destilada contendo a mesma concentração de glicerol da solução reticuladora por 2 minutos. Os filmes eram então depositados sobre um suporte (uma placa de polipropileno invertida), com as bordas fixadas por argolas de teflon para evitar o enrugamento (Figura 3.1a), por 12h à temperatura ambiente em um túnel de madeira com o ar movimentado por um exaustor (Figura 3.1 b e c). Se a umidade relativa do ar da sala estivesse muito baixa

(abaixo de 50%), um vaporizador (Dexel, modelo 900D, Brasil) era ligado na entrada do túnel para manter a umidade relativa do ar em aproximadamente 60%. Os filmes foram retirados e armazenados em dessecador à temperatura ambiente e umidade relativa de 52% durante 3 dias, para uma equilibração antes da realização dos ensaios de caracterização.

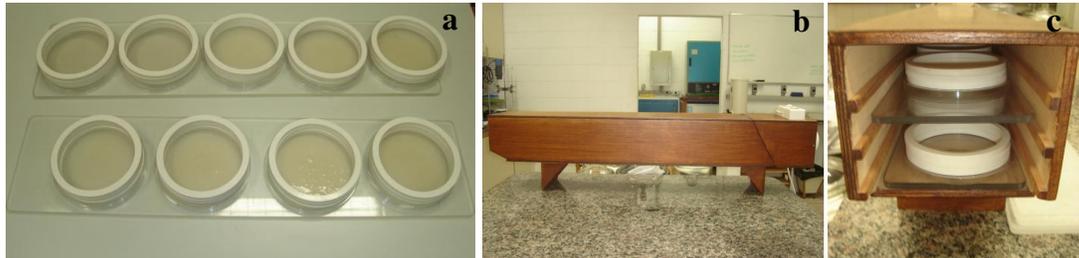


Figura 3.1: Sistema de secagem dos filmes durante o segundo estágio: (a) disposição dos filmes nas placas, (b) secador/umidificador com exaustor, (c) vista interna do secador

Um esquema geral da seqüência de etapas para a obtenção dos filmes de alginato puro pode ser visualizada no fluxograma da Figura 3.2.

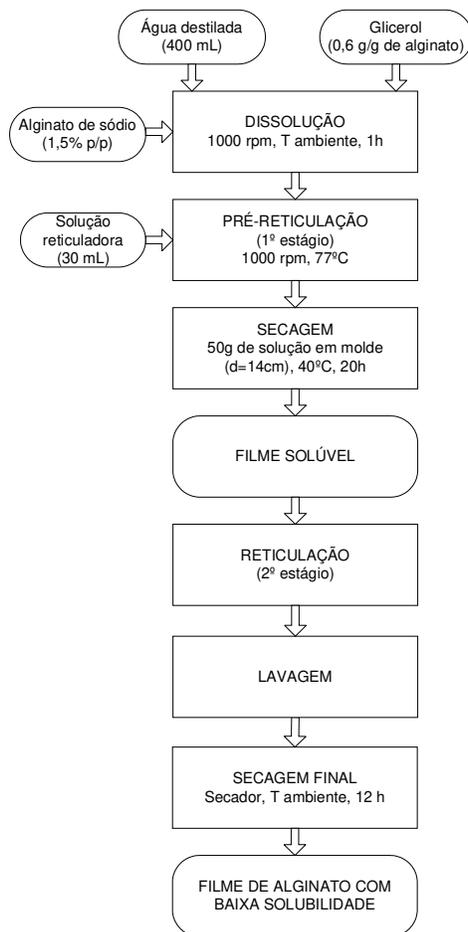


Figura 3.2: Fluxograma geral de obtenção dos filmes de alginato puro

As concentrações das soluções reticuladoras do primeiro e do segundo estágio, bem como o tempo de imersão dos filmes no segundo estágio foram definidas através de um planejamento experimental (Item 3.4.1).

3.3 Processo de elaboração dos filmes compostos de alginato e quitosana

Foram realizados diversos ensaios preliminares com o intuito de obter filmes homogêneos compostos de alginato e quitosana. A metodologia desenvolvida envolve as etapas descritas a seguir.

3.3.1 Preparo das soluções filmogênicas dos biopolímeros

3.3.1.1 Solução de alginato de sódio (1,5% m/m) - (Solução A1)

A solução foi preparada misturando-se o glicerol (0,6g glicerol/g alginato) em água destilada à temperatura ambiente sob agitação mecânica constante (1000 rpm) (Fisatom, modelo 713, Brasil) durante 3 minutos antes da adição do alginato (1,5% m/m). A mistura foi mantida sob agitação mecânica durante 1 h, até a completa dissolução. Mantendo-se a agitação, a temperatura do sistema foi então elevada e mantida a 77°C através de uma manta aquecedora (Fisatom, modelo 67, Brasil). Em seguida uma solução diluída de cloreto de cálcio foi adicionada, fazendo-a escorrer pela parede do béquer, a uma vazão controlada (1 mL/min) através de bomba peristáltica (Masterflex C/L, modelo 77120-70, EUA).

3.3.1.2 Solução de quitosana (1,5% m/m) - (Solução B1)

A solução foi preparada adicionando-se o glicerol (0,6g glicerol/g quitosana) em solução aquosa de ácido acético (1% v/v) a temperatura ambiente sob agitação mecânica constante (1000 rpm) (Fisatom, modelo 713, Brasil) durante 3 minutos antes da adição da quitosana (1,5% m/m). A solução foi mantida sob agitação mecânica constante durante 1 h, até completa dissolução do material e então filtrada a vácuo para a remoção de impurezas.

3.3.2 Mistura das soluções de biopolímeros

Proporções variadas das Soluções A1 e B1 foram adicionadas conforme o esquema ilustrado na Figura 3.3. Toda a Solução A1, na quantidade adequada, foi colocada em béquer de 400 mL e mantida na manta aquecedora (Fisatom, modelo 67, Brasil) sob agitação constante de aproximadamente 14.000 rpm (Ultra Turrax T18 basic, IKA, Alemanha) e temperatura de 77°C. A Solução B1 foi então adicionada a uma vazão controlada (1 mL/min) utilizando-se uma bomba peristáltica (Masterflex C/L, modelo 77120-70, USA) pelo fundo do béquer com a alimentação da solução bem próxima a haste do homogeneizador. Quando toda a Solução B1 foi adicionada, o sistema foi mantido sob o mesmo nível de agitação por mais 10 minutos para completar a homogeneização e então colocado em um banho de ultrassom (Thornton, modelo T14, Brasil) por outros 10 minutos para a retirada de bolhas de ar. Alíquotas da solução resultante foram então vertidas nos suportes (50g) e estes foram levados à estufa com circulação forçada de ar (Nova Ética, 420D, Brazil) a 40°C por 20h. Após a secagem, os filmes foram removidos do suporte e armazenados por 24h a 25°C em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio para manter a umidade relativa em 52%.

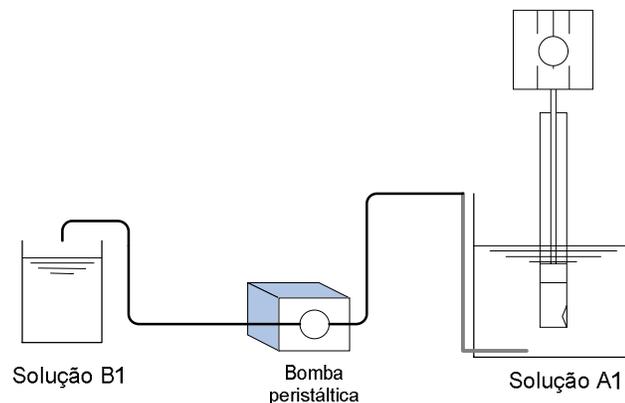


Figura 3.3: Sistema experimental para preparação da solução formadora de filmes de alginato e quitosana

Os efeitos da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na solução de alginato (A1) e da concentração de quitosana em relação a massa total de biopolímero na mistura foram avaliados por um planejamento experimental (Item 3.4.2).

3.3.3 Tratamento dos filmes compostos de alginato e quitosana (2º estágio)

Os filmes compostos de alginato e quitosana foram submetidos a tratamento posterior com solução aquosa de cloreto de cálcio diidratado (5% p/v) e glicerol (5%v/v) (solução reticuladora). Os mesmos foram totalmente imersos em 50 mL da solução de tratamento por 30 minutos. Após este tempo, os filmes foram retirados e imersos em 50 mL de água destilada contendo a mesma concentração de glicerol da solução reticuladora por 2 minutos. Os filmes foram então depositados sobre um suporte (uma placa de polipropileno invertida), com as bordas apoiadas por argolas de teflon para evitar o enrugamento, por 12h à temperatura ambiente em um túnel dotado de um exaustor. Se a umidade relativa do ar da sala estivesse muito baixa (abaixo de 50%) um vaporizador (Dexel, modelo 900D, Brasil) era ligado na entrada do túnel para manter a umidade relativa do ar em torno de 60%. Os filmes foram retirados e armazenados em dessecador à temperatura ambiente e umidade relativa de 52% durante 3 dias, para uma equilibração antes da realização dos ensaios de caracterização.

3.3.4 Filme de quitosana

Filmes simples de quitosana foram confeccionados com as mesmas concentrações de biopolímero e glicerol, e as mesmas condições de preparo e secagem utilizadas nos filmes simples de alginato, porém sem a realização das etapas de reticulação com íons cálcio (1º e 2º estágio). Estes filmes foram submetidos à espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e determinação da temperatura de transição vítrea por análise dinâmica-mecânica (DMA) e para a avaliação do seu efeito antimicrobiano.

3.4 Determinação das formulações otimizadas através de planejamentos fatoriais

3.4.1 Filmes de alginato

Esta etapa teve como objetivo otimizar as condições do processo de fabricação dos filmes de alginato puro buscando a obtenção de filmes com baixa massa solubilizada em água, baixa permeabilidade ao vapor de água (PVA), baixo grau de intumescimento e propriedades mecânicas adequadas. De acordo com resultados encontrados em ensaios preliminares, decidiu-se estudar as seguintes variáveis no processo de fabricação dos filmes

de alginato puro: concentração de CaCl_2 (1º estágio), concentração de CaCl_2 (2º estágio) e tempo de imersão (2º estágio). Os efeitos das variáveis sobre as propriedades do filmes foram estudados através da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), utilizando-se um Planejamento Fatorial Completo 2^3 com três repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios. O número de pontos axiais corresponde a $2 \times n$, onde “n” é o número de variáveis independentes. A distância dos pontos axiais, α , foi determinada através da Equação 3.1 (Khuri e Cornell, 1987).

$$\alpha = (2^n)^{1/4} \quad (3.1)$$

Os níveis codificados das variáveis foram determinados através da Equação 3.2.

$$x_i = \frac{(X_i - X_i^*)}{\Delta X_i} \quad (3.2)$$

onde: x_i é o valor codificado da variável independente i ; X_i é o valor real da variável independente i ; X_i^* é o valor real no ponto central e ΔX_i é a diferença entre o valor no ponto central e o valor a ser codificado.

Os níveis e as variáveis independentes utilizados no Planejamento Fatorial Completo 2^3 com pontos axiais estão apresentados na Tabela 3.1. A matriz de experimentos deste planejamento com os valores dos níveis reais e codificados das variáveis estudadas está apresentada na Tabela 3.2.

As respostas determinadas (variáveis dependentes) foram a massa solubilizada em água, a permeabilidade ao vapor de água, o grau de intumescimento e as propriedades mecânicas (tensão e alongamento na ruptura), cujos métodos de determinação estão descritos nos Itens 3.5.3 a 3.5.6.

Tabela 3.1: Variáveis e níveis utilizados no Planejamento Fatorial Completo 2^3 com pontos axiais para os filmes de alginato puro

	Variável	Nível				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
x_1	Concentração de CaCl_2 (1° estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato)	0,01	0,02	0,04	0,06	0,07
x_2	Concentração de CaCl_2 (2° estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100 mL solução)	2	3,0	4,5	6,0	7
x_3	Tempo de imersão (2° estágio) (minutos)	1	13	30,5	48	60

Tabela 3.2: Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2^3 com pontos axiais para os filmes de alginato puro

Ensaio	x_1	x_2	x_3
1	0,02 (-1)	3,0 (-1)	13 (-1)
2	0,06 (+1)	3,0 (-1)	13 (-1)
3	0,02 (-1)	6,0 (+1)	13 (-1)
4	0,06 (+1)	6,0 (+1)	13 (-1)
5	0,02 (-1)	3,0 (-1)	48 (+1)
6	0,06 (+1)	3,0 (-1)	48 (+1)
7	0,02 (-1)	6,0 (+1)	48 (+1)
8	0,06 (+1)	6,0 (+1)	48 (+1)
9	0,01 (-1,68)	4,5 (0)	30,5 (0)
10	0,07 (+1,68)	4,5 (0)	30,5 (0)
11	0,04 (0)	2,0 (-1,68)	30,5 (0)
12	0,04 (0)	7,0 (+1,68)	30,5 (0)
13	0,04 (0)	4,5 (0)	1,0 (-1,68)
14	0,04 (0)	4,5 (0)	60 (+1,68)
15	0,04 (0)	4,5 (0)	30,5 (0)
16	0,04 (0)	4,5 (0)	30,5 (0)
17	0,04 (0)	4,5 (0)	30,5 (0)

x_1 = concentração de CaCl_2 (1° estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato), x_2 = concentração de CaCl_2 (2° estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100 mL solução), x_3 = tempo de imersão (2° estágio) (minutos)

Valores entre parênteses são os níveis codificados das variáveis

3.4.2 Filmes compostos de alginato e quitosana

Após a otimização da formulação do filme de alginato puro, fez-se um segundo planejamento experimental para avaliar o efeito das variáveis fração mássica de quitosana e concentração de CaCl_2 (1º estágio) nas propriedades dos filmes compostos de alginato e quitosana. Realizou-se um Planejamento Fatorial Completo 2^2 com três repetições no ponto central e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios.

Os níveis e as variáveis independentes utilizados no Planejamento Fatorial Completo 2^2 com pontos axiais estão apresentados na Tabela 3.3. A matriz de experimentos deste planejamento com os valores dos níveis reais e codificados das variáveis estudadas está apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.3: Variáveis e níveis utilizados no Planejamento Fatorial Completo 2^2 com pontos axiais para os filmes de alginato e quitosana

	Variável	Nível				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
x_1	Concentração de CaCl_2 (1º estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato)	0,01	0,02	0,04	0,06	0,07
x_2	Fração mássica de quitosana (g quitosana/g biopolímero)	0	0,051	0,175	0,299	0,350

As respostas determinadas (variáveis dependentes) foram a massa solubilizada em água, a permeabilidade ao vapor de água, o grau de intumescimento e as propriedades mecânicas (tensão e alongamento na ruptura), cujos métodos de determinação estão descritos nos Itens 3.5.3 a 3.5.6.

Nos dois planejamentos experimentais realizados, a análise estatística foi realizada utilizando-se o *Software Statistica 7.0* (Statsoft Inc., EUA). Este programa possibilitou a avaliação do ajuste dos dados experimentais aos modelos matemáticos obtidos, bem como a obtenção das superfícies de resposta em função das variáveis estudadas.

Tabela 3.4: Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2^2 com pontos axiais para os filmes de alginato e quitosana

Ensaio	x_1	x_2
1	0,02 (-1)	0,051 (-1)
2	0,02 (-1)	0,299 (+1)
3	0,06 (+1)	0,051 (-1)
4	0,06 (+1)	0,299 (+1)
5	0,01 (-1,41)	0,175 (0)
6	0,07 (+1,41)	0,175(0)
7	0,04 (0)	0 (-1,41)
8	0,04 (0)	0,350 (+1,41)
9	0,04 (0)	0,175 (0)
10	0,04 (0)	0,175 (0)
11	0,04 (0)	0,175 (0)

x_1 = Concentração de CaCl_2 (1º estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / g alginato), x_2 = fração mássica de quitosana (g quitosana/g biopolímero)

Valores entre parênteses são os níveis codificados das variáveis

3.5 Caracterização dos filmes

Os filmes de alginato puro, bem como os filmes compostos de alginato e quitosana foram caracterizados segundo os métodos descritos nos Itens 3.5.1 a 3.5.14.

3.5.1 Aspecto visual

Os filmes produzidos foram submetidos a uma avaliação subjetiva considerando homogeneidade, continuidade, flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e manuseio.

3.5.2 Determinação de espessura dos filmes (δ)

A espessura foi determinada através de um micrômetro digital (Mitutoyo, modelo MDC-25S, Japão). A espessura foi calculada pela média aritmética de dez medidas aleatórias sobre uma área de 31,5, 15,2 e 16 cm^2 para os ensaios mecânicos, ensaios de permeabilidade ao vapor de água e ensaios de liberação em água, respectivamente.

3.5.3 Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água

O conteúdo de umidade e a massa solubilizada em água foram determinados segundo metodologia proposta por Irissin-Mangata *et al.* (2001). Inicialmente, o conteúdo de umidade, ω , de uma amostra de filme ($d = 3$ cm) foi determinado em estufa a vácuo (Lab-Line, Squaroid, EUA) a 105°C por 24 h. Amostras cortadas do mesmo filme ($d = 3$ cm), com massa total (m_o) foram imersas em 50 mL de água destilada e o sistema foi mantido sob agitação constante (175 rpm) à 25°C por 24 h (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, EUA). A massa seca final (m_f) foi determinada na mesma estufa a vácuo ($105^{\circ}\text{C}/24$ h). A matéria solúvel (MS) foi expressa como massa solubilizada em função da matéria seca total inicial através da Equação 3.3.

$$MS = \frac{m_o(1 - \omega) - m_f}{m_o(1 - \omega)} \quad (3.3)$$

3.5.4 Grau de intumescimento (GI)

O grau de intumescimento foi determinado segundo a metodologia proposta por Xu *et al.* (2003). A massa inicial (m_i) de uma amostra de 2,5 cm de diâmetro, cortada do filme, foi quantificada e imersa em água destilada e mantida sob agitação constante (175 rpm) à 25°C (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, EUA) durante 40 minutos. O excesso de umidade na superfície das amostras era retirado, utilizando-se filtro de papel, antes de cada pesagem. O grau de intumescimento (GI), expresso em g $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ amostra, foi calculado segundo a Equação 3.4.

$$GI = \frac{(m_u - m_i)}{m_i} \quad (3.4)$$

onde: m_u é a massa total do filme úmido (g).

3.5.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água foi determinado gravimetricamente de acordo como o método E96-95 (ASTM, 1995a). O instrumental utilizado nas primeiras pesquisas no LEPPbio para a determinação de PVA era constituído

de células de alumínio, colocadas dentro de dessecadores. As células eram de difícil manuseio, exigiam grande quantidade de CaCl_2 , além de serem suscetíveis a vazamentos. Os dessecadores eram muito volumosos e não se conseguia uniformizar rapidamente a UR em seu interior.

Foram construídas células em acrílico, menores, e que podem ser colocadas individualmente em potes de acrílico (500 mL) com fechamento hermético, conforme a Figura 3.4. Os potes continham em seu fundo uma solução supersaturada de NaCl , para manter o ambiente interno em 75% de UR a 25°C. Essa solução era agitada intermitentemente por meio de uma barra magnética, para uniformizar o ambiente interno, tanto na fase líquida como no ar.



Figura 3.4: Células de PVA em acrílico

A base das células consiste em cortes de 6,9 x 6,9 cm de chapas de acrílico de 1,9 cm de espessura, nos quais foi torneado um rebaixo cilíndrico de 1,0 cm de profundidade e 4,50 cm de diâmetro e que recebe CaCl_2 anidro granulado. Uma placa 6,9 x 6,9 cm e de 0,6 cm de espessura serve de tampa. Ela contém um orifício circular central de 4,40 cm de diâmetro. Uma amostra do filme, de cerca de 5,0 x 5,0 cm, é prensada entre a base e a tampa por meio de um *O-ring*, preso em um rebaixo na tampa. Quatro parafusos de aço inoxidável fixam a tampa à base, garantindo a hermeticidade (Figura 3.4) e criando um micro-ambiente com UR próxima a 0% no interior da célula. A área livre para a permeação é de 15,21 cm² e, como o CaCl_2 anidro granulado preenche a célula até próximo à face interna do filme, não há necessidade de considerar a influência da resistência à difusão devido ao efeito da camada estagnada de ar, entre o filme e a superfície do CaCl_2 no cálculo do valor de PVA. A célula era colocada dentro do pote de acrílico e após aproximadamente

duas horas sua massa era quantificada, sendo esta monitorada a cada 12h horas durante três dias. O PVA é calculado pela Equação 3.5.

$$PVA = \frac{G.\delta}{A.\Delta P_w} \quad (3.5)$$

onde δ é a espessura média do filme (mm), medida no fim do ensaio conforme descrito no Item 3.6.2, G é a taxa de permeação (g/dia) obtida pelo coeficiente angular da reta de ajuste massa *versus* tempo, A é a área da abertura contendo o filme (m²) e ΔP_w a diferença de pressão de vapor de água através do filme.

Com as medidas da célula, a 25°C, a Equação 3.5 é simplificada para a Equação 3.6.

$$PVA = 6,644 G.\delta \quad (3.6)$$

sendo PVA calculado em g.mm/m².dia.kPa.

3.5.6 Resistência mecânica

A tensão na ruptura (TR) e o alongamento na ruptura dos filmes foram determinadas segundo o método D882 (ASTM, 1995b), utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD, Inglaterra). Amostras de filmes com dimensões de 10 x 2,54 cm foram acondicionadas a 52% (UR) e 25 °C por 72h antes das análises. A espessura dos filmes foi determinada conforme descrito no Item 3.5.2. Os filmes eram fixados por duas garras corrugadas distantes 5,0 cm entre si e uma delas se movimentava a uma velocidade de 0,1 cm/s. A tensão de ruptura do filme foi calculada dividindo a força máxima no rompimento pela área da seção transversal (Equação 3.7).

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (3.7)$$

onde TR é a tensão na ruptura (MPa), F_m a força máxima no rompimento (N) e A_s a área da secção transversal inicial da amostra (m^2).

O alongamento na ruptura foi determinado pela Equação 3.8.

$$\text{Alongamento} = \frac{d_r}{d_i} \cdot 100 \quad (3.8)$$

sendo o alongamento na ruptura expresso em porcentagem em relação à situação em repouso; d_i o afastamento inicial das garras (5 cm) e d_r o afastamento das garras no momento da ruptura.

3.5.7 Cor e Transparência

A cor e a transparência dos filmes foram determinadas no Laboratório de Apoio de Instrumentação, do DTA/FEA/UNICAMP utilizando-se um colorímetro (Hunterlab, Colorquest II, EUA).

A análise de cor foi realizada simulando-se a luz do dia (modo D_{65}) e ângulo de visão de 10° , sendo a área de medida igual a 30 mm^2 . O sistema CIELCh foi utilizado para calcular os parâmetros: luminosidade (L^*), de preto (0) até branco (100); Chroma (C^*) e ângulo *hue* (h^*). Os filmes foram dispostos sobre uma superfície padrão branca e os parâmetros de cor foram determinados através do *software* do equipamento. Em cada amostra de filme cinco leituras foram realizadas.

A transparência dos filmes foi determinada de acordo com o método D1003-95 (ASTM, 1995c) utilizando o mesmo equipamento da determinação da cor (operando no modo de transmitância), após a calibração do mesmo com um fundo padrão branco e um fundo padrão negro (Equação 3.9).

$$\% \text{ transparência} = \left[1 - \left(\frac{T_{negro}}{T_{branco}} \right) \right] \cdot 100 \quad (3.9)$$

onde: T_{negro} = transmitância do filme sobreposto a um fundo negro; T_{branco} = transmitância do filme sobreposto a um fundo branco.

3.5.8 Ângulo de contato

A determinação do ângulo de contato entre uma gota e o filme foi realizada por método ótico, através de um goniômetro manual (Tantec, Camplus micro, EUA). Amostras de filme de 30 mm de comprimento e 5 mm de largura foram fixadas em uma lâmina de vidro por meio de fita adesiva dupla face (Silva *et al.*, 2007). As lâminas eram então colocadas na base do aparelho. Uma micro gota (0,1 mL) de água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, EUA) era colocada sobre a superfície do filme com o auxílio de uma seringa e a imagem da gota era projetada sobre um anteparo graduado, sendo que o valor do ângulo era registrado após 30s de deposição da gota sobre a superfície do filme. A Figura 3.5 apresenta uma ilustração do ângulo de contato formado entre a gota e a superfície do filme. Os valores do ângulo de contato representam a média dos ângulos das três repetições experimentais.

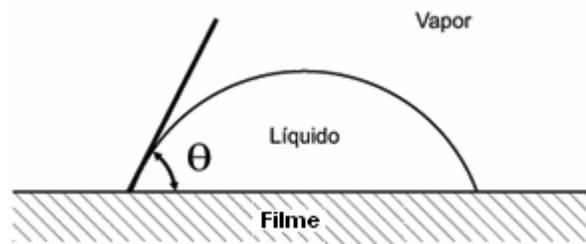


Figura 3.5: Ilustração do ângulo de contato formado entre uma gota e a superfície do filme

3.5.9 Isotermas de adsorção de vapor de água

Amostras do filme ($d = 2,5$ cm), em triplicata, foram dispostas em pesa-filtros e equilibradas a 25°C ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) utilizando soluções saturadas de sais (Tabela 3.5) de maneira a manter a atividade de água entre 0,11 e 0,90, de acordo com metodologia descrita por Spiess e Wolf (1983). Essas soluções preenchem o fundo de uma pequena célula de plástico ($\cong 100$ mL), hermeticamente fechada e que continha uma base de PVC que recebia o pesa-filtro aberto.

Os pesa filtros eram submetidos a pesagens em intervalos de 7 dias até o equilíbrio (aproximadamente 3 semanas).

O conteúdo de umidade de equilíbrio foi determinado em estufa a vácuo (Lab-Line, Squaroid, USA) a 105°C por 24 horas. Os pontos experimentais obtidos foram ajustados pelo modelo de Gugenheim-Anderson-DeBoer (GAB) (Equação 3.10), obtendo-

se assim o valor de umidade da monocamada e das constantes C_{GAB} e k_{GAB} , bem como os parâmetros estatísticos da precisão do ajuste.

Tabela 3.5: Atividades de água das soluções saturadas de sais a 25°C

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

Fonte: Spiess e Wolf (1983)

$$X_w = \frac{C_{GAB} k_{GAB} X_m a_w}{(1 - k_{GAB} a_w)(1 - k_{GAB} a_w + C_{GAB} k_{GAB} a_w)} \quad (3.10)$$

onde: X_w é o conteúdo de umidade do material em base seca (g H₂O/g sólido seco), a_w é a atividade de água, X_m é o conteúdo de umidade (base seca) da monocamada, C_{GAB} e k_{GAB} são constantes relacionadas ao calor de sorção da monocamada e multicamada, respectivamente.

3.5.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microestrutura dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura utilizando-se um microscópio (LEICA, modelo DMLM, EUA) acoplado ao computador LEICA Q500IW, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da FEQ/UNICAMP.

As amostras dos filmes foram equilibradas em dessecadores contendo cloreto de cálcio anidro (25°C), por um período de 7 dias. Após este período, as amostras foram fixadas em suportes (*stubs*) de alumínio, com fita condutiva de cobre e recobertas com ouro a 25°C por 180 s. Foram realizadas observações na superfície do filme e também no seu interior (após fratura).

3.5.11 Rugosidade

A análise da rugosidade superficial dos filmes foi determinada em um rugosímetro digital (Mitotoyo, SJ-210, Japão), executando 10 leituras em cada filme. A rugosidade superficial foi expressa em milímetros (mm), de acordo com a norma de análise de rugosidade da ABTN (PNB-13) (ABNT, 1980) utilizando um comprimento total (L_n) de 5 mm e valor do *cut-off* de 0,8 mm para filtrar as ondulações de superfície. Denomina-se de *cut-off* cada seção do perfil dada pelas divisões do comprimento de avaliação (L_n) da amostra, através do qual são realizados cálculos dos parâmetros para identificar as irregularidades da superfície. Para descrever a textura da superfície da amostra utilizou-se o parâmetro “Ra” cuja medida reflete a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas do perfil efetivo em relação à linha média num comprimento de amostragem, ou seja, a média aritmética dos valores de todas as distâncias absolutas do perfil da rugosidade da área percorrida.

3.5.12 Determinação do conteúdo de cálcio

A concentração de cálcio presente nas amostras dos filmes, antes e após o tratamento (segundo estágio) foi determinada por espectrometria de absorção atômica no Laboratório de Engenharia Ambiental do Departamento de Termofluidodinâmica da FEQ/UNICAMP, por meio de um espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo AAnalyst 100 (Perkin-Elmer, EUA), utilizando uma lâmpada de cátodo oco de cálcio como fonte de radiação primária, no modo de absorção com sistema de combustão ar-acetileno.

Para a realização das análises, amostras dos filmes (aproximadamente 8mg) foram dissolvidas em 10 mL de uma solução de citrato de sódio 2% (Sriamornsak e Kennedy, 2008). As determinações foram realizadas em triplicata.

3.5.13 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) dos filmes foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Thermo Nicolet IR200 (Thermo Nicolet Corporation, EUA) no modo de absorção em uma faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução e 4 cm^{-1} .

3.5.14 Análise dinâmica mecânica (DMA)

As temperaturas de transição vítrea dos filmes foram determinadas no Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Tecnologia de Polímeros da FEQ/UNICAMP, utilizando-se um DMA (TA instruments, modelo 2980, EUA). As amostras (retângulos de 4 x 1 cm) foram cortadas e acondicionadas em dessecador a 25°C e umidade relativa de 52% durante 3 dias antes das determinações. O equipamento foi utilizado em modo de tensão e com frequência de 1Hz, sendo as amostras fixadas por uma garra tipo filme. A taxa de aquecimento foi de 2°C/min em uma faixa de -100 a 100°C, a força inicial utilizada foi de 0,5N e a amplitude de 10 µm. As medidas de módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e ângulo de perda ($\tan \delta$) foram determinadas em função da temperatura. A temperatura de transição vítrea foi determinada no ponto de inflexão da curva do parâmetro $\tan \delta$ em função da temperatura (Cherian *et al.*, 1995).

3.6 Filmes ativos (formulações otimizadas)

De acordo com os resultados obtidos nos planejamentos experimentais, foram selecionadas as melhores formulações e condições de processamento para filmes de alginato puro e filmes compostos de alginato e quitosana, conforme as características desejadas. Os filmes compostos selecionados foram denominados *Filme Composto 1* (filme com fração mássica de quitosana igual a 0,175) e *Filme Composto 2* (filme com fração mássica de quitosana igual a 0,35).

Estas formulações otimizadas foram utilizadas para a incorporação de agentes antimicrobianos, a fim de se estudar os coeficientes de difusão do agente antimicrobiano no filme e a efetividade destes na inibição do crescimento de algumas espécies fúngicas selecionadas (Item 3.6.4.1). Além disso, estes filmes foram caracterizados a fim de se validar os planejamentos experimentais e determinar a influência da adição do agente antimicrobiano nas características dos mesmos.

3.6.1 Filmes ativos contendo sorbato de potássio

Inicialmente foram obtidos filmes de alginato puro (conforme formulação otimizada) ativos contendo sorbato de potássio como agente antimicrobiano. Foram

avaliadas diferentes concentrações (0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2 g/100g solução filmogênica) que eram adicionadas no solvente, antes da adição do biopolímero.

3.6.2 Filmes ativos contendo natamicina

De acordo com os resultados obtidos para os testes com sorbato de potássio decidiu-se substituir o agente ativo para natamicina. Foram produzidos filmes ativos de acordo com as formulações selecionadas através dos resultados dos planejamentos experimentais.

Foram avaliadas as seguintes concentrações de natamicina: 0, 0,5, 1, 2, 4 e 8% m/m em relação a massa de biopolímero, sendo que o antimicrobiano era adicionado no final do processo de elaboração dos filmes. Após a adição da natamicina o sistema era agitado por mais 10 minutos para homogeneização. Como meio de comparação, para a concentração de 4% (m/m), avaliou-se também a adição da natamicina no início do processo de elaboração dos filmes, ou seja, no solvente antes da adição do biopolímero. Os filmes contendo natamicina foram armazenados em dessecadores protegidos da luz a 25°C e UR = 52% por três dias antes das análises.

3.6.3 Ensaio de liberação da natamicina

Os ensaios de liberação foram realizados utilizando-se amostras dos filmes contendo natamicina com dimensões 4 × 4 cm (massa média 0,14 g). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Como sorvedouro para a liberação foi utilizada água destilada a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em volumes de 25 mL colocados em copos plásticos com tampa. Os recipientes contendo a água foram dispostos em um *shaker* (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, EUA) protegidos da luz e mantidos sob agitação constante (150 rpm) durante o ensaio, a fim de diminuir uma possível resistência por convecção de massa.

No início do ensaio (tempo zero) a amostra de filme era mergulhada no primeiro copo e, após um intervalo de tempo pré-determinado era rapidamente transferida para o segundo copo, e assim por diante, de maneira que cada copo corresponde a um ponto da curva de liberação. Com a renovação da água garantiu-se que a concentração de agente antimicrobiano nas interfaces do filme mantinha-se próxima à zero.

A concentração da natamicina na água foi determinada segundo Oliveira *et al.* (2007) utilizando-se um espectrofotômetro (HP, modelo 8453, EUA), equipado com controlador de temperatura HP 89090A e software UV-Visible ChemStation. Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 290 a 350 nm e a terceira derivada destas curvas foi então calculada. A concentração de natamicina foi determinada pela amplitude do pico mínimo em 317nm em relação à linha de base, comparada com uma curva padrão (Apêndice B).

A massa de natamicina 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 natamicina que poderia ser liberada em um tempo infinito (M_∞) foi considerada como a massa acumulada a partir da qual não se observou mais variação considerável. A espessura média do filme foi determinada antes e no final de cada ensaio, sendo a espessura final considerada no cálculo da difusividade.

Para a estimativa da difusividade da natamicina nos filmes, os dados experimentais foram ajustados à Equação 2.3, através de regressão não-linear por mínimos quadrados, com o uso do *Software Statistica 7.0* (Statsoft Inc., EUA) utilizando o método de Levenberg-Marquardt. Comparativamente, estimou-se os coeficientes de difusão através da solução dos tempos curtos (ou sólidos semi-infinitos) (Equação 2.5). Assim, para $M_t/M_\infty < 0,6$, a difusividade pode ser calculada através do ajuste linear da curva M_t/M_∞ versus $t^{1/2}$ através da Equação 3.11.

$$D = \left(\frac{\tan \alpha \cdot \delta_f}{4} \right)^2 \cdot \pi \quad (3.11)$$

Onde $\tan \alpha$ é a inclinação da reta M_t/M_∞ versus $t^{1/2}$ e δ_f é a espessura do filme após os ensaios de liberação.

3.6.3.1 Estimativa da máxima absorção de natamicina pelo filme

A afinidade da natamicina pela matriz polimérica foi estimada através da determinação da massa de natamicina que foi absorvida pelo filme (inicialmente sem

natamicina) após a imersão deste em uma solução contendo uma concentração conhecida do antimicrobiano.

Amostras dos filmes de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2* com dimensões de 4 x 4 cm (massa média 0,14 g) foram colocados em recipientes fechados contendo 25 mL uma solução aquosa de natamicina (\cong 1 mg/mL). Estes recipientes foram protegidos da luz e mantidos sob agitação constante (150 rpm) em um *shaker* (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, EUA) por 85 dias. A concentração de natamicina da solução inicial ($t = 0$) e da solução final ($t = 85$ dias) foi determinada por espectrofotometria de UV-visível, de acordo com metodologia descrita no Item 3.6.3. A massa de natamicina absorvida por área de filme foi calculada através do balanço de massa do sistema.

3.6.4 Determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de difusão em ágar (Teste do Halo)

As determinações microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Micologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo.

3.6.4.1 Escolha dos microorganismos

Para a avaliação do efeito antimicrobiano dos filmes ativos optou-se por trabalhar com três espécies de fungos que teriam alta incidência em queijos, visando uma possível aplicação dos filmes neste tipo de produto alimentício.

As cepas escolhidas eram provenientes da coleção de espécies fúngicas do Laboratório de Micologia do ITAL. As espécies escolhidas foram: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium commune* e *Debaromyces hansenii*.

As cepas eram mantidas secas em sílica. Desta forma, fez-se a reativação das mesmas através do plaqueamento de uma pequena quantidade de cada cepa liofilizada em placas de Petri contendo meio de cultura MEA (*Malt Extract Agar*) seguido de incubação destas placas a 25°C por 5 dias. Após este período, as espécies de *Penicillium* foram isoladas em meio MEA (25°C), em Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) (5, 25 e 37°C) e em meio Ágar Creatina Sacarose Neutro (CSN) (25°C) por 7 dias para confirmação da identidade das cepas. As colônias resultantes foram comparadas com a chave de identificação de Pitt (1988).

3.6.4.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo consistiu na inoculação das espécies fúngicas escolhidas (*Penicillium Roqueforti*, *Penicillium commune* e *Debaromyces hansenii*) em meio MEA seguida de incubação a 25°C por 5 dias. Após o tempo de incubação, fez-se uma raspagem das colônias presentes na placa com o auxílio de uma alça, e o material foi transferido para um frasco estéril contendo 50 mL de água peptonada (0,1%) com 0,01% de *tween* 80 e esferas de vidro para auxiliar na suspensão dos esporos. A suspensão foi agitada e filtrada através de um funil contendo gaze estéril. A partir desse inóculo inicial, foram realizadas diluições decimais e então escolheu-se a diluição adequada para o teste de difusão de acordo com as características de crescimento de cada fungo.

3.6.4.3 Teste de difusão em ágar

Amostras circulares ($d = 2,5$ cm) dos filmes ativos foram cortadas e submetidas a uma etapa de assepsia através da exposição de cada lado do filme à luz UV (110V, 254nm) em câmara de fluxo laminar por 30 minutos. Após esta etapa, os filmes eram depositados assepticamente, sobre a superfície do meio solidificado (Placas de Petri contendo meio de cultura MEA) previamente inoculado com 0,1 mL da suspensão de esporos preparada conforme Item 3.6.4.2 do microrganismo teste. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. A eficiência do antimicrobiano foi avaliada pela formação do halo ao redor dos filmes (Pereira *et al.*, 2005) e pela quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Em todos os ensaios foram incubadas placas controles contendo o filme sem a inoculação do antimicrobiano e placas sem o filme contendo o microorganismo.

3.7 Análises estatísticas

Análise de variância e o Teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias, utilizando o *Software Statistica* V.1.1.5.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO: FILMES DE ALGINATO E FILMES COMPOSTOS DE ALGINATO E QUITOSANA

Este capítulo foi dividido em três seções, nas quais estão apresentados e discutidos os resultados experimentais referentes à obtenção e caracterização dos filmes de alginato e dos filmes compostos de alginato e quitosana. Nos Itens 4.1 e 4.2, estão apresentados os resultados dos planejamentos experimentais realizados para a obtenção de formulações otimizadas para os filmes simples, formados apenas por alginato, e para os filmes compostos de alginato e quitosana. Por fim, no Item 4.3 apresenta-se uma caracterização complementar dos filmes obtidos na tentativa de se elucidar alguns aspectos da interação entre os dois polímeros.

4.1 Filmes de alginato

4.1.1 Ensaios preliminares

Inicialmente trabalhou-se exaustivamente nas técnicas de preparo de filmes de alginato, com o objetivo de definir condições e metodologias de tratamento ou reticulação (1º e 2º estágio) a serem utilizados ao longo do trabalho, tendo em vista que o tipo de tratamento influencia na quantidade de ligações iônicas formadas, promovendo modificações consideráveis nas propriedades do filme.

Os testes preliminares basearam-se principalmente em dados da literatura e nas pesquisas de Zactiti (2004) que trabalhou com filmes de alginato, sendo a pioneira no trabalho com filmes de alginato no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPbio) da FEQ/UNICAMP. Muitos destes dados dos ensaios preliminares estão publicados no trabalho de Turbiani (2007) também integrante do mesmo laboratório.

Avaliou-se diferentes concentrações e maneiras de adição da solução reticuladora no 1º estágio. Pequenas quantidades de cálcio adicionadas à solução filmogênica de alginato de sódio (reticulação parcial) resultaram em uma diminuição da taxa inicial de solubilização, verificada visualmente, mas os filmes encontravam-se totalmente solubilizados após 24 h. Resultados semelhantes foram encontrados por Galiotta *et al.* (1998), que adicionaram pequenas quantidades de cloreto de cálcio (0,05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100g de matéria seca) à solução filmogênica de proteína de soja, reduzindo a massa solubilizada em água em menos de 1%. A concentração máxima de solução de cálcio que poderia ser utilizada para reticulação no 1º estágio foi definida realizando-se experimentos preliminares em que se avaliou a ocorrência de gelificação localizada. A concentração máxima de solução de cloreto de cálcio alcançada foi de 0,07 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato no 1º estágio. Este seria o limite, a partir do qual já se observava a ocorrência de gelificação.

Também foram avaliadas diferentes formas de se realizar a reticulação final (2º estágio) como, por exemplo, tratamento dos filmes sobre uma espuma ou tecido encharcados com solução de CaCl_2 , aplicação da solução de reticulação com pincel e rolo de pintura e imersão parcial e total dos filmes. Testou-se também diferentes concentrações de plastificante na solução de tratamento do 2º estágio, verificando-se que a utilização de uma certa concentração de glicerol nesta etapa era de fundamental importância para conferir aos filmes condições adequadas de manuseabilidade.

Com os resultados encontrados e com o intuito de simplificar e uniformizar o processo de tratamento (2º estágio) dos filmes de alginato, visto que os outros tratamentos avaliados, ou seja, com tecido e espuma e pincel e rolo acarretavam erros experimentais devido as diferentes pressões aplicadas sobre os filmes na realização do tratamento, comprometendo a reprodutibilidade dos resultados, optou-se por utilizar o tratamento por imersão total do filme em 50 mL de solução de CaCl_2 variando-se a concentração e o tempo de imersão do filme nesta solução.

Com base nestes dados preliminares desenvolveu-se o protocolo padrão de elaboração de filmes de alginato puro conforme descrito no Item 3.2 e apresentado na Figura 3.2. Seguindo este procedimento, realizou-se um planejamento experimental para definir uma formulação otimizada de filmes de alginato.

4.1.2 Planejamento fatorial completo 2³ para os filmes de alginato

Os limites dos níveis inferior e superior das variáveis estudadas foram definidos com base em ensaios preliminares e resultados de trabalhos anteriores. Em ensaios preliminares verificou-se que a máxima concentração de CaCl₂ adicionada, na etapa de pré-reticulação da solução de alginato (1º estágio), nas condições operacionais utilizadas, foi de 0,07 g CaCl₂.2H₂O/g alginato. Acima deste valor surgiram zonas de gelificação localizada e precipitação do cálcio na superfície dos filmes de alginato. Rhim (2004) reporta que em concentrações acima de 0,03 g CaCl₂.2H₂O/g alginato a solução filmogênica formada era muito espessa, o que dificultava o processo de deposição da solução no suporte. Este autor, no entanto, não menciona a temperatura utilizada na incorporação da solução de CaCl₂. Abaixo de 0,01 g CaCl₂.2H₂O/g alginato, os filmes exibiam certa dificuldade em serem retirados do suporte após a evaporação do solvente e os mesmos encolhiam e ficavam opacos no tratamento do 2º estágio. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre filmes de alginato não utiliza seqüencialmente dois estágios de reticulação com íons Ca⁺². Esses autores utilizam tratamento dos filmes por imersão em solução de CaCl₂ (Rhim, 2004; Pavlath *et al.*, 1999) ou a incorporação direta do reticulante na solução filmogênica (Rhim, 2004; Draget *et al.*, 1991), sendo que esta última técnica isoladamente não é capaz de produzir filmes insolúveis, pois a viscosidade da solução filmogênica aumenta rapidamente formando um gel tão firme que acaba limitando a máxima concentração de solução reticulante capaz de ser adicionada. Pavlath *et al.* (1999) supõem que dois processos competitivos ocorrem na reticulação por imersão: a rápida dissolução do alginato de sódio e a difusão lenta dos cátions multivalentes que reticulam a superfície do filme, reduzindo a taxa de dissolução. Assim conclui-se que a ausência de íons cálcio na estrutura formada no primeiro estágio faz com o que o processo de dissolução do filme seja muito rápido e intenso independente da concentração da solução reticuladora, causando alterações irreversíveis na matriz polimérica.

Com relação à concentração da solução reticuladora no segundo estágio, esta deve ser suficiente para se sobrepor à dissolução. Observou-se que uma concentração abaixo de 2,0 g CaCl₂.2H₂O/100 mL, no segundo estágio, não era suficiente para produzir filmes insolúveis. Acima de 7,0 g CaCl₂.2H₂O/100 mL os filmes se apresentavam excessivamente rígidos. Zactiti (2004) também testou concentrações entre 2 e 7 g CaCl₂.2H₂O/100 mL no processo de reticulação final de filmes de alginato, porém o método de tratamento utilizado

era diferente. Os filmes de Zactiti (2004) eram tratados por aspersão desta solução e não por imersão dos mesmos. Alguns autores relatam que a reação de reticulação de filmes de alginato com íons cálcio é rápida e que acima de 30 minutos o tempo de imersão não teria nenhum efeito adicional (Al-Musa *et al.*, 1999, Sartori *et al.*, 1997, Pavlath *et al.*, 1999). Desta forma, decidiu-se utilizar um intervalo de tempo de até 60 minutos para avaliar este efeito sobre as propriedades dos filmes de alginato.

A concentração de glicerol na solução reticuladora do segundo estágio foi fixada em 5 mL/100 mL. Em testes preliminares observou-se que em concentrações acima de 10% (v/v) o plastificante excede o limite de compatibilidade com o polímero e ocorre separação de fases e exclusão do plastificante. Em concentrações de glicerol abaixo de 3% o filme se apresentava muito quebradiço e de difícil manuseio. Fixou-se esse valor em 5% pois os resultados anteriores mostraram que com esta concentração obtinha-se uma combinação interessante entre propriedades mecânicas e massa solubilizada em água, além de apresentar aspecto visual mais atraente.

Os valores encontrados nas determinações da massa solubilizada em água (MS), do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA), grau de intumescimento (GI) e propriedades mecânicas (TR e alongamento na ruptura) dos filmes de alginato puro estão apresentados na Tabela 4.1. O conteúdo de umidade de equilíbrio a 52% de umidade relativa (ω) bem como a espessura do filme de alginato (δ) não foram considerados no planejamento experimental, porém foram determinados e podem ser observados na Tabela 4.2.

Observa-se que as espessuras dos filmes de alginato puro não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) dentre as formulações testadas (Tabela 4.2) indicando que a espessura dos filmes de alginato pode ser controlada através da massa de solução adicionada ao suporte. Para o planejamento foram utilizadas alíquotas de 50g de solução filmogênica por placa, que correspondiam a uma gramatura final de aproximadamente 0,08 g/cm². O conteúdo de umidade dos filmes variou de 0,18 a 0,20 g/g massa seca, valores típicos para biofilmes encontrados na literatura (Rhim, 2004; Garcia *et al.* 2006; Turbiani, 2007). Rhim (2004) relata que a umidade de filmes de alginato é dependente do método de preparação dos mesmos. A reticulação afeta a hidrofiliabilidade da estrutura polimérica e, conseqüentemente, a sorção de moléculas de água e as propriedades de permeação dos filmes.

Tabela 4.1: Resultados do planejamento fatorial completo 2^3 para os filmes de alginato

<i>Ensaio</i>	<i>MS*</i> (g/g massa seca)	<i>PVA*</i> (g.mm/m ² . dia.kPa)	<i>GI*</i> (g H ₂ O/g amostra)	<i>TR**</i> (MPa)	<i>Alongamento na ruptura**</i> (%)
1	0,217 (0,009) ^e	5,95 (0,42) ^{fg}	0,71 (0,03) ^d	81,96 (4,27) ^{ab}	9,88 (2,85) ^{de}
2	0,180 (0,010) ^{c,d}	5,34 (0,30) ^{def}	0,68 (0,002) ^{bc}	93,37 (10,92) ^e	3,83 (0,69) ^{ab}
3	0,176 (0,006) ^c	5,99 (0,40) ^g	0,68 (0,003) ^{bc}	95,42 (10,95) ^{cde}	8,30 (2,13) ^{de}
4	0,160 (0,010) ^b	5,12 (0,17) ^{bcde}	0,63 (0,02) ^a	98,26 (7,99) ^{de}	1,82 (0,36) ^a
5	0,208 (0,005) ^{d,e}	5,14 (0,58) ^{bcde}	0,67 (0,05) ^{bc}	88,63 (9,27) ^{abcd}	9,88 (1,71) ^{de}
6	0,161 (0,006) ^b	4,95 (0,03) ^{abcde}	0,69 (0,005) ^{cd}	93,23 (11,81) ^{bcde}	5,41 (1,00) ^{bc}
7	0,198 (0,013) ^{d,e}	4,73 (0,13) ^{abc}	0,68 (0,01) ^{cd}	87,95 (17,37) ^{abcd}	5,12 (1,13) ^{bc}
8	0,154 (0,007) ^{a,b}	4,64 (0,30) ^{ab}	0,65 (0,01) ^{ab}	94,81 (10,97) ^{abcde}	2,33 (0,51) ^a
9	0,237 (0,001) ^f	5,53 (0,15) ^{efg}	0,68 (0,005) ^{cd}	90,26 (13,04) ^{abcd}	8,64 (2,24) ^{de}
10	0,190 (0,009) ^c	4,51 (0,44) ^{abcde}	0,63 (0,007) ^a	99,36 (8,19) ^{cde}	1,96 (0,20) ^a
11	0,196 (0,009) ^d	4,55 (0,29) ^a	0,76 (0,01) ^e	86,62 (8,61) ^a	7,40 (0,82) ^{cd}
12	0,159 (0,011) ^b	4,71 (0,47) ^{abc}	0,62 (0,003) ^a	95,49 (6,74) ^{cde}	3,50 (1,00) ^{ab}
13	0,162 (0,008) ^b	5,26 (0,29) ^{cde}	0,71 (0,003) ^d	94,58 (9,84) ^{abc}	5,53 (1,20) ^{bc}
14	0,160 (0,010) ^b	5,15 (0,05) ^{bcde}	0,69 (0,001) ^{cd}	94,11 (10,11) ^{de}	9,71 (2,15) ^{de}
15	0,142 (0,013) ^a	4,68 (0,32) ^{abcd}	0,62 (0,004) ^a	97,27 (10,05) ^{cde}	9,26 (2,50) ^{de}
16	0,139 (0,007) ^a	4,78 (0,25) ^{abcd}	0,63 (0,008) ^a	97,60 (3,71) ^{cde}	8,85 (2,43) ^{de}
17	0,142 (0,005) ^a	4,50 (0,03) ^a	0,63 (0,010) ^a	96,63 (6,03) ^{cde}	10,05 (2,39) ^e

MS = massa solubilizada em água, PVA = coeficiente de permeabilidade ao vapor de água, GI = grau de intumescimento, TR = tensão na ruptura

Média (desvio padrão) de: * três determinações experimentais; ** dez determinações experimentais.

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias (teste de Tukey)

Tabela 4.2: Resultados de conteúdo de umidade de equilíbrio (UR=52%) e espessuras dos filmes produzidos segundo o planejamento fatorial completo 2^3 para os filmes de alginato

Ensaio	x_1	x_2	x_3	ω^*	δ^{**}
				(g H ₂ O/g amostra)	(mm)
1	0,02	3,0	13	0,198 (0,003) ^{defg}	0,057 (0,006) ^a
2	0,06	3,0	13	0,196 (0,001) ^{cdefg}	0,048 (0,002) ^a
3	0,02	6,0	13	0,190 (0,002) ^{bcde}	0,054 (0,003) ^a
4	0,06	6,0	13	0,195 (0,002) ^{cdef}	0,049 (0,001) ^a
5	0,02	3,0	48	0,194 (0,006) ^{cdef}	0,053 (0,011) ^a
6	0,06	3,0	48	0,199 (0,005) ^{efg}	0,052 (0,001) ^a
7	0,02	6,0	48	0,186 (0,005) ^{abc}	0,051 (0,007) ^a
8	0,06	6,0	48	0,190 (0,004) ^{bcde}	0,051 (0,002) ^a
9	0,01	4,5	30,5	0,186 (0,001) ^{abc}	0,053 (0,001) ^a
10	0,07	4,5	30,5	0,182 (0,003) ^{ab}	0,050 (0,002) ^a
11	0,04	2,0	30,5	0,179 (0,002) ^a	0,047 (0,003) ^a
12	0,04	7,0	30,5	0,189 (0,001) ^{abcd}	0,050 (0,003) ^a
13	0,04	4,5	1,0	0,204 (0,001) ^{fg}	0,047 (0,003) ^a
14	0,04	4,5	60	0,204 (0,004) ^{fg}	0,052 (0,003) ^a
15	0,04	4,5	30,5	0,202 (0,001) ^{fg}	0,049 (0,006) ^a
16	0,04	4,5	30,5	0,205 (0,003) ^g	0,049 (0,004) ^a
17	0,04	4,5	30,5	0,204 (0,003) ^{fg}	0,046 (0,003) ^a

x_1 = concentração de CaCl₂ (1º estágio) (g CaCl₂.2H₂O/g alginato), x_2 = concentração de CaCl₂ (2º estágio) (g CaCl₂.2H₂O/100 mL solução), x_3 = tempo de imersão (2º estágio) (minutos)

Média (desvio padrão) de: * três determinações experimentais; ** dez determinações experimentais.

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias (teste de Tukey)

4.1.2.1 Massa solubilizada em água dos filmes de alginato

O maior valor de massa solubilizada encontrado para os filmes de alginato estudados foi de 0,23 g/g massa seca inicial (Tabela 4.1), obtido no ensaio que utilizou a menor concentração de CaCl₂ no primeiro estágio. Os resultados para o efeito das variáveis estudadas sobre a resposta massa solubilizada em água dos filmes de alginato estão apresentados na Tabela 4.3. Observa-se que, para um intervalo de confiança de 95%, as variáveis concentração de CaCl₂ no primeiro e no segundo estágio apresentaram efeito

significativo sobre a resposta na faixa de trabalho estudada. A concentração de CaCl_2 tanto no primeiro como no segundo estágio apresentaram efeito negativo sobre a massa solubilizada em água dos filmes de alginato puro, de modo que um aumento do nível (-1) para (+1) dessas variáveis causou uma diminuição, em média, na massa solubilizada dos filmes de 0,0331 e 0,0206 g/g massa seca, respectivamente. Esta tendência é consistente visto que os íons cálcio agem como agentes reticulantes na matriz de alginato, tendendo a formar uma matriz mais compacta e, portanto menos sujeita à interação com a água. Uma baixa massa solubilizada é característica desejável para biofilmes, tornando-os mais resistentes na presença de alta atividade de água. O glicerol por sua vez, devido a sua característica hidrofílica e plastificante, proporciona o aumento da capacidade de ligação com a água pela diminuição das forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas, alongando e “afrouxando” a estrutura dos filmes. A adição de plastificante se faz necessária, porém, para melhorar a flexibilidade e facilitar o desprendimento do filme do suporte.

Tabela 4.3: Efeito das variáveis estudadas sobre a massa solubilizada em água dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Efeito</i> (g/g massa seca)	<i>Desvio</i> <i>padrão</i>	<i>p (95% de</i> <i>confiança)</i>
	média	0,1415	0,0009	<0,0001*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,0331	0,0008	0,0006*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio) [x_2]	-0,0206	0,0008	0,0016*
	Tempo de imersão [x_3]	-0,0023	0,0008	0,1127
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	0,0491	0,0009	0,0003*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio)	0,0236	0,0009	0,0015*
	Tempo de imersão	0,0119	0,0009	0,0060*
Interações	x_1x_2	0,0060	0,0011	0,0317*
	x_1x_3	-0,0098	0,0011	0,0124*
	x_2x_3	0,0111	0,0011	0,0097*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

O termo linear do tempo de imersão também apresentou efeito negativo sobre a massa solubilizada dos filmes. Este efeito, no entanto, não foi significativo na faixa estudada, mas os seus termos quadráticos e de interação com as outras variáveis foram importantes a um nível de significância de 5%. Pode-se observar, porém, que o efeito do tempo de imersão na massa solubilizada dos filmes foi menos do que a metade dos efeitos provocados pelas concentrações de CaCl₂ em ambos os estágios. A sua interação com a concentração de CaCl₂ no 1º estágio provocou um efeito negativo, gerando uma diminuição, em média, na massa solubilizada dos filmes de 0,011 g/g massa seca.

Apesar do termo linear do tempo de imersão não ter sido estatisticamente significativo ($p < 0,05$), este foi incluído no modelo quadrático, pois os seus termos quadrático e de interação apresentaram significância. Os coeficientes de regressão obtidos estão apresentados na Tabela 4.4. O modelo codificado da massa solubilizada em água em função das variáveis estudadas está apresentado na Equação 4.1.

Tabela 4.4: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para a massa solubilizada em água dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>p (95% de confiança)</i>
	média	0,1415	<0,0001*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio) [x ₁]	-0,0165	0,0006*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio) [x ₂]	-0,0103	0,0016*
	Tempo de imersão [x ₃]	-0,0011	0,1127
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio)	0,0245	0,0003*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio)	0,0118	0,0015*
	Tempo de imersão	0,0059	0,0060*
Interações	x ₁ x ₂	0,0030	0,0317*
	x ₁ x ₃	-0,0049	0,0124*
	x ₂ x ₃	0,0055	0,0097*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

$$\begin{aligned}
 MS = & 0,1415 - 0,0165x_1 + 0,0245x_1^2 - 0,0103x_2 + 0,0118x_2^2 - 0,0011x_3 \\
 & + 0,0059x_3^2 + 0,0030x_1x_2 - 0,0049x_1x_3 + 0,0055x_2x_3
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto pela Equação 4.1 estão apresentados na Tabela 4.5. Pode-se considerar que o modelo estatístico é válido uma vez que o valor de $F_{\text{calculado}}$ da regressão em relação aos resíduos foi 15,5 vezes maior que o F_{tabelado} . O coeficiente de determinação (R^2) representa a proporção da variação na resposta que pode ser explicada pelo modelo. Ou seja, para os filmes de alginato, 98,66% da variação na massa solubilizada pode ser explicada através do modelo da Equação 4.1, sendo a máxima variação explicável de 99,96%. O erro puro calculado foi baixo, indicando boa reprodutibilidade dos dados. Lembrando que, como foram feitas apenas repetições no ponto central e não réplica dos experimentos, assume-se que os dados são homocedásticos, ou seja, que todos os pontos apresentam variâncias iguais.

Tabela 4.5: Análise de variância para a massa solubilizada em água dos filmes de alginato

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	0,01284	9	0,0014	57,08	3,68
Resíduos	0,00017	7	0,000025		
Falta de ajuste	0,00017	5	0,000034	13,60	19,30
Erro puro	0,000005	2	0,0000025		
Total	0,013018	16			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,987$, $R^2_{\text{ajustado}} = 0,969$

Uma vez validado o modelo estatístico, foi possível obter as superfícies de resposta para a massa solubilizada em água em função das variáveis estudadas (Figura 4.1 a-c). Pode-se observar que as condições que levam à obtenção de filmes com menor massa solubilizada em água são: concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio na faixa de 0,04 e 0,06 g/g alginato, concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio entre 4 e 6 g/100 mL e tempo de imersão de 20 a 40 minutos.

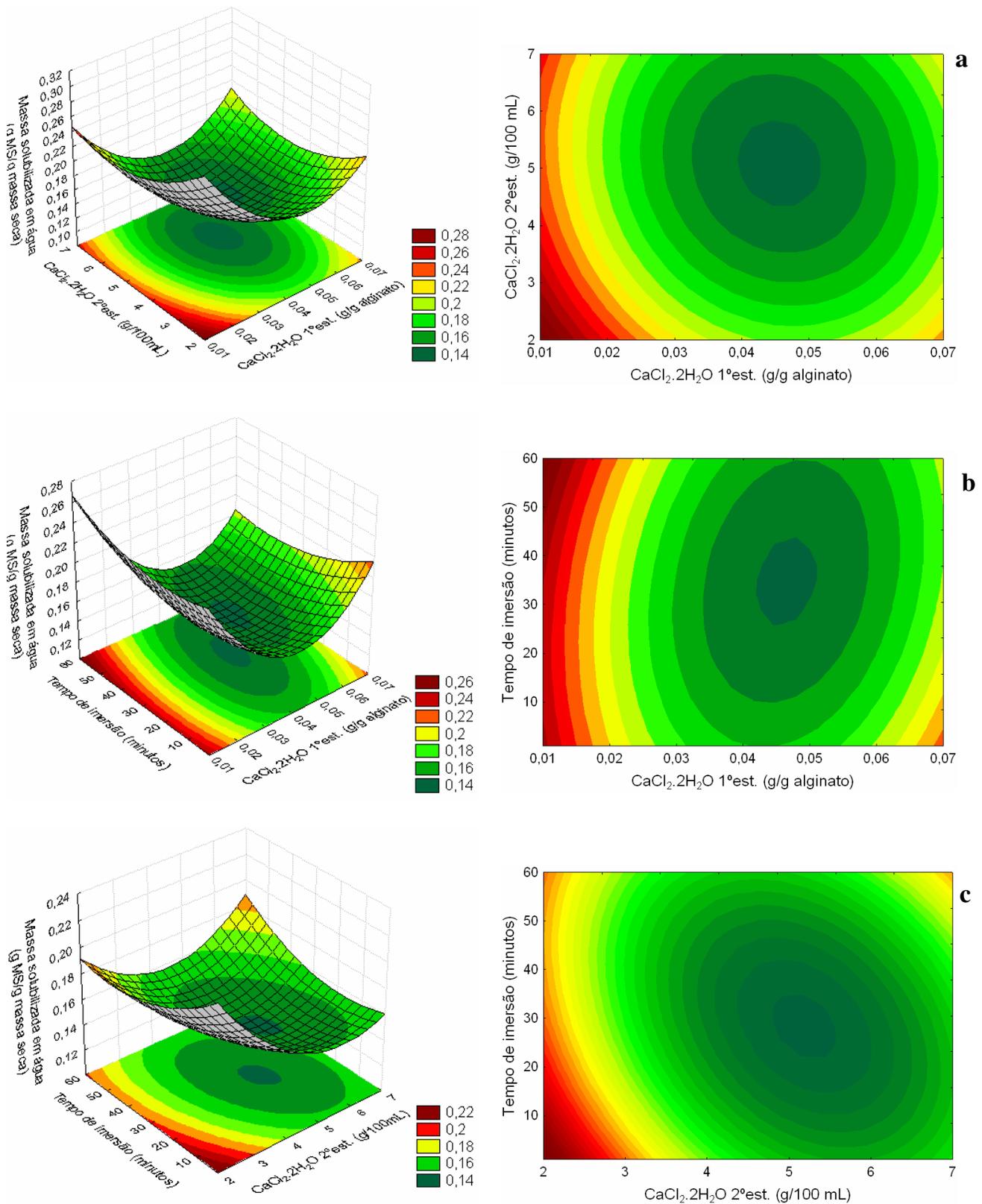


Figura 4.1: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a massa solubilizada em água dos filmes de alginato em função das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1^o e no 2^o estágio (a), da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1^o estágio e do tempo de imersão (b) e da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2^o estágio e do tempo de imersão (c)

Biofilmes preparados a partir de hidrocolóides, tais como alginatos, tendem a formar filmes fortes, mas que exibem baixa resistência à água devido a sua natureza hidrofílica (Guilbert *et al.*, 1996). Por outro lado, os grupos carboxílicos do alginato conferem a este polímero a capacidade de formar géis fortes e insolúveis na presença de cátions multivalentes, mais especificamente íons Ca^{+2} , a qual pode ser utilizada para melhorar tais propriedades dos filmes de alginato. O agente reticulante promove a formação de uma rede polimérica através da ligação entre as cadeias. Rhim (2004) reticularam filmes de alginato pela imersão dos mesmos durante 5 minutos em solução de CaCl_2 (3%) e obtiveram aproximadamente 15% de massa solubilizada em água. Estes filmes, no entanto, não eram pré-reticulados com íons cálcio na etapa de preparo da solução filmogênica nem continham glicerol na solução reticuladora. No presente trabalho observou-se que a adição de íons cálcio já no primeiro estágio foi necessária para que os filmes pudessem ser adequadamente retirados dos suportes e para que não houvesse enrugamento e solubilização dos mesmos na etapa de reticulação final (2º estágio). No entanto, em concentrações acima de 0,06 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato no 1º estágio provavelmente ocorreu um fechamento excessivo da matriz dificultando a entrada de mais íons Ca^{+2} no 2º estágio (Figura 4.1 a). Com relação a concentração de cálcio no 2º estágio, os grupos carboxílicos do alginato de sódio reagem com os íons Ca^{+2} para formar uma rede entre as cadeias do polímero. Roger *et al.* (2006) sugerem que ocorra uma reticulação instantânea das moléculas interfaciais de alginato pelos íons Ca^{+2} , fazendo com que uma barreira protetora se forme nas superfícies do filme prevenindo a dissolução do alginato. Porém observou-se que se a concentração for muito alta (acima de 6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100 mL, para as condições utilizadas neste estudo) poderia estar havendo um bloqueio muito rápido da superfície de forma que o interior do filme não consiga ser reticulado adequadamente.

Al-Musa *et al.* (1999) relatam que a reação de reticulação de filmes de alginato com íons cálcio é rápida e que acima de 30 minutos o tempo de imersão não tem mais nenhum efeito. Em outro trabalho, Sartori *et al.* (1997) monitoraram a concentração de cátions Na^+ e Ca^{+2} em filmes de alginato. Estes autores observaram que filmes tratados por imersão em solução de CaCl_2 (0,8% p/v) apresentaram uma substituição de mais da metade dos sítios ativos por íons cálcio nos primeiros 30 segundos de imersão e que após 30 min de imersão não houve diferença significativa no conteúdo de íons cálcio. Pavlath *et al.* (1999) compararam as características de filmes de alginato reticulados com diferentes cátions

multivalentes (Ca^{+2} , Al^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} e Zn^{+2}) variando a concentração da solução reticulante e o tempo de imersão. Os autores constataram que a reticulação e conseqüentemente, a massa solubilizada em água dos filmes era função tanto do tempo como da concentração da solução. Os autores supõem que dois processos competitivos ocorrem na reticulação por imersão: a rápida dissolução do alginato de sódio e a difusão lenta dos cátions multivalentes que reticulam a superfície do filme reduzindo a taxa de dissolução. Desta forma a concentração da solução deve ser suficiente para se sobrepor à dissolução. Assim como observado no presente estudo, concentrações abaixo de 2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/100$ mL não foram suficientes para produzir filmes insolúveis.

4.1.2.2 Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato

Os valores dos coeficientes de permeabilidade ao vapor de água (Tabela 4.1) dos filmes de alginato variaram de 4,50 a 5,99 $\text{g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$ na região experimental estudada. Quando comparados aos resultados de outros pesquisadores para filmes de vários biopolímeros, os valores obtidos neste trabalho são relativamente baixos, indicando que a reticulação das cadeias de alginato com íons cálcio foi eficiente para formar uma matriz coesa dificultando a passagem das moléculas de água. Park e Chinnan (1995) obtiveram aproximadamente 10,0; 53,2 e 7,9 $\text{g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$ para filmes de zeína de milho, glúten de trigo e metilcelulose, respectivamente. Zactiti (2004) obteve filmes de alginato reticulados com 0,02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ alginato no primeiro estágio e aspersão de solução 5% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (m/v) na superfície do filme que apresentaram PVA de aproximadamente 6,5 $\text{g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$.

Alguns autores observaram um aumento linear da PVA em função da espessura do filme (Park e Chinnan, 1995; Sobral, 2000). No caso dos filmes de alginato puro, obtidos no presente trabalho, é possível comparar os valores de PVA, pois todos os experimentos realizados produziram filmes com espessuras semelhantes ($p < 0,05$), conforme mostra a Tabela 4.2.

De acordo com a definição estabelecida por Krochta e De Mulder Johnston (1997), os filmes de alginato obtidos encontram-se na faixa considerada como moderada, que compreende valores de PVA entre 0,1-10 $\text{g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$. No entanto os valores de PVA obtidos estão bem acima dos valores estabelecidos para filmes sintéticos de polietileno,

como por exemplo, o polietileno de baixa densidade que apresenta um valor de PVA de aproximadamente 0,08 g.mm/m².dia.kPa.

Os efeitos estatísticos dos parâmetros estudados (concentração de CaCl₂.2H₂O no 1º estágio, concentração de CaCl₂.2H₂O no 2º estágio e tempo de imersão) sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes estão apresentados na Tabela 4.6. Verifica-se que, as variáveis concentração de CaCl₂.2H₂O no 1º estágio e tempo de imersão influenciaram significativamente a permeabilidade dos filmes de alginato puro a um nível significância de 5%. Tanto a concentração de CaCl₂.2H₂O no 1º estágio como o tempo de imersão apresentaram efeito negativo sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Desta forma pode-se dizer que um aumento na concentração de CaCl₂.2H₂O no 1º estágio de 0,02 (-1) para 0,06 (+1), provocou, em média, uma diminuição no PVA dos filmes de alginato de 0,51 g.mm/m².dia.kPa. Já com relação ao tempo de imersão um aumento de 13 (-1) para 48 (-1) minutos acarretou em um diminuição em média de 0,46 g.mm/m².dia.kPa no PVA destes filmes. A variável concentração de CaCl₂.2H₂O no 2º estágio não foi estatisticamente significativa dentro da faixa de estudo utilizada. Da mesma forma, os termos de interação das variáveis estudadas não apresentaram significância estatística (p<0,05), ou seja, o efeito entre os níveis de uma variável não é influenciado pela mudança no nível de outra variável.

Tabela 4.6: Efeito das variáveis estudadas sobre o PVA dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Efeito</i> (g.mm/m ² .dia.kPa)	<i>Desvio</i> <i>padrão</i>	<i>p (95% de</i> <i>confiança)</i>
	Média	4,6373	0,0811	0,0003*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio) [x ₁]	-0,5099	0,0762	0,0216*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio) [x ₂]	-0,0906	0,0762	0,3564
	Tempo de imersão [x ₃]	-0,4560	0,0762	0,0268*
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio)	0,3770	0,0839	0,0461*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio)	0,1004	0,0839	0,3540
	Tempo de imersão	0,5094	0,0839	0,0261*
Interações	x ₁ x ₂	-0,0410	0,0996	0,7202
	x ₁ x ₃	0,2992	0,0996	0,0952
	x ₂ x ₃	-0,1339	0,0996	0,3109

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, p < 0,05)

Desconsiderando os fatores não significativos, foram obtidos os coeficientes de regressão para o modelo quadrático que relaciona a permeabilidade ao vapor de água em função das variáveis estudadas (Tabela 4.7). Apesar do termo de interação entre a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e o tempo de imersão (x_1x_3) não ter apresentado importância estatística a sua retirada do modelo afetava negativamente o ajuste dos dados experimentais. Desta forma, este termo foi mantido no modelo quadrático proposto representado pela Equação 4.2. A escolha dos termos que devem ser incluídos ou excluídos do modelo é muito importante. Muitas considerações, estatísticas ou não, influenciam na decisão. Normalmente, o primeiro passo para se excluir um termo do modelo é observar o seu valor p, ou seja, nesse caso, se $p < 0,05$, o termo deve ser mantido no modelo. No entanto, algumas vezes, mesmo que o valor p seja maior que α , pode-se querer incluir o termo no modelo. Primeiramente observa-se como o R^2 ajustado muda quando o termo é excluído. Quanto mais alto for o R^2 ajustado, melhor é o modelo, consequentemente se o valor R^2 ajustado diminuir pela exclusão do termo, o mesmo deve permanecer no modelo. Os demais termos foram descartados do modelo e adicionados aos resíduos.

Tabela 4.7: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para o PVA dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
	Média	4,7015	0,0002*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	- 0,2520	0,0216*
	Tempo de imersão [x_3]	- 0,2280	0,0268*
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	0,1737	0,0493*
	Tempo de imersão	0,2399	0,0268*
Interações	x_1x_3	0,1496	0,0952

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

$$\text{PVA} = 4,7015 - 0,2520x_1 + 0,1737x_1^2 - 0,2280x_3 + 0,2399x_3^2 + 0,1496x_1x_3 \quad (4.2)$$

A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo de segunda ordem da Equação 4.2 está apresentada na Tabela 4.8. O modelo proposto é válido, uma vez que o

valor de $F_{\text{calculado}}$ da regressão em relação aos resíduos foi maior que o F_{tabelado} . O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,76, indicando que para os filmes de alginato puro, 76% da variação na permeabilidade ao vapor de água ser explicada através do modelo da Equação 4.2, a máxima variação explicável foi de 98,87%. Apesar do R^2 ter sido baixo o modelo não apresentou falta de ajuste. O erro puro calculado foi baixo, indicando reprodutibilidade dos dados. O modelo da Equação 4.2 foi então utilizado para gerar as superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.2 a-c.

Tabela 4.8: Análise de variância para o PVA dos filmes de alginato

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	2,6719	5	0,5344	6,90	2,45
Resíduos	0,8519	11	0,0770		
Falta de ajuste	0,8122	9	0,0902	4,56	9,38
Erro puro	0,0397	2	0,0198		
Total	3,5238	16			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,758$, R^2 ajustado = 0,648

Pode-se observar através da Figura 4.2a, que quando o tempo de imersão é fixado em 30,5 minutos, os menores valores de PVA são obtidos utilizando-se concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio entre 0,04 e 0,06 g/g alginato, independente da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio. Baseando-se nestas informações foi possível estabelecer as faixas das variáveis estudadas que resultam nos menores valores de PVA, ou seja, propiciam a obtenção de filmes com melhor propriedade de barreira ao vapor de água. Quando a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio é fixada em 4,5 g/100 mL, observa-se uma região bem definida de mínimo de PVA (Figura 4.2b), utilizando-se em torno de 0,05 e 0,06 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato no primeiro estágio e um tempo de imersão entre 35 e 40 minutos. Se a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio é fixada em 0,04 g/g alginato, observa-se que o intervalo de tempo de imersão que promoveu os menores valores de PVA foi entre 30 e 45 minutos, independente da concentração de CaCl_2 no 2º estágio, na faixa estudada.

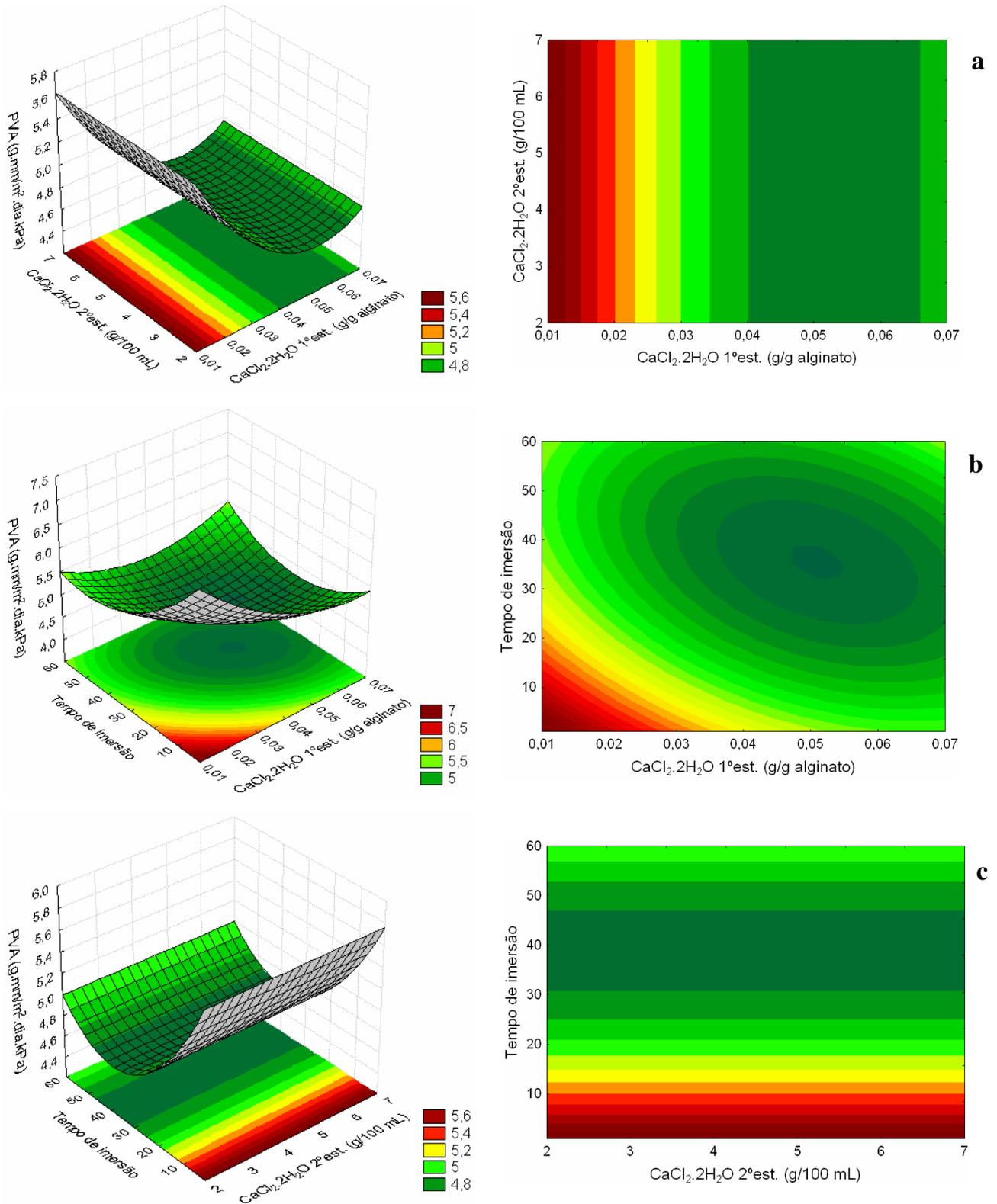


Figura 4.2: Superfícies de resposta e curvas de contorno para o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato em função das concentrações de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1^o e no 2^o estágio (a), da concentração de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1^o estágio e do tempo de imersão (b) e da concentração de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2^o estágio e do tempo de imersão (c)

4.1.2.3 Grau de intumescimento dos filmes de alginato

Os efeitos dos fatores estudados e de suas interações, sobre o grau de intumescimento dos filmes de alginato puro, estão apresentados na Tabela 4.9. O termo linear da variável tempo de imersão e os termos de interação entre as variáveis estudadas não apresentaram efeito significativo sobre o grau de intumescimento dos filmes. A concentração de CaCl_2 nos dois estágios da confecção dos filmes apresentou efeito negativo, a um nível de confiança de 95%, indicando que, conforme o esperado, o aumento da concentração do agente reticulante na matriz polimérica, provoca uma diminuição no grau de intumescimento dos filmes. É interessante notar que, para o grau de intumescimento, o efeito da concentração de CaCl_2 no 2º estágio foi aproximadamente o dobro do efeito da concentração do mesmo no 1º estágio. Isto indica que na reticulação final provavelmente ocorre um fechamento da superfície do filme impedindo que as moléculas de água penetrem na matriz.

Tabela 4.9: Efeito das variáveis estudadas sobre o grau de intumescimento dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Efeito (gH₂O/g amostra)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>p (95% de confiança)</i>
	Média	0,6274	0,0033	0,0000*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,0255	0,0031	0,0147*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio) [x_2]	-0,0506	0,0031	0,0038*
	Tempo de imersão [x_3]	-0,0064	0,0031	0,1775
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	0,0150	0,0034	0,0485*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio)	0,0398	0,0034	0,0074*
	Tempo de imersão	0,0468	0,0034	0,0053*
Interações	x_1x_2	-0,0175	0,0041	0,0503
	x_1x_3	0,0175	0,0041	0,0503
	x_2x_3	0,0125	0,0041	0,0921

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Apesar do termo linear do tempo de imersão e dos termos de interação não terem sido estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na faixa estudada, optou-se por mantê-los na construção do modelo quadrático, pois, o ajuste dos dados se mostrou superior. Os coeficientes de regressão obtidos estão apresentados na Tabela 4.10. O modelo codificado do grau de intumescimento (GI) em função das variáveis estudadas está apresentado na Equação 4.3.

Tabela 4.10: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para o grau de intumescimento dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
Linear	Média	0,6274	0,0000*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio) [x ₁]	-0,0127	0,0147*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio) [x ₂]	-0,0253	0,0038*
	Tempo de imersão [x ₃]	-0,0032	0,1775
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio)	0,0075	0,0485*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio)	0,0199	0,0074*
	Tempo de imersão	0,0234	0,0053*
Interações	x ₁ x ₂	-0,0087	0,0503
	x ₁ x ₃	0,0087	0,0503
	x ₂ x ₃	0,0062	0,0921

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

$$\begin{aligned}
 \text{GI} = & 0,6274 - 0,0127x_1 + 0,0075x_1^2 - 0,0253x_2 + 0,0199x_2^2 - 0,0032x_3 \\
 & + 0,0234x_3^2 - 0,0087x_1x_2 + 0,0087x_1x_3 + 0,0062x_2x_3
 \end{aligned}
 \tag{4.3}$$

A análise de variância (Tabela 4.11) mostrou que o modelo proposto é válido, pois $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O modelo não apresentou falta de ajuste significativa a um nível de 5% de probabilidade e o coeficiente de determinação foi bom ($R^2=0,86$).

As superfícies de respostas e seus respectivos gráficos de contorno gerados a partir do modelo quadrático da Equação 4.3 estão mostrados na Figura 4.3a-c.

Tabela 4.11: Análise de variância para o grau de intumescimento dos filmes de alginato

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	0,020973	9	0,002330	4,98	3,68
Resíduos	0,032740	7	0,000468		
Falta de ajuste	0,003207	5	0,000641	19,14	19,30
Erro puro	0,000067	2	0,000035		
Total	0,024247	16			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,865$, R^2 ajustado = 0,691

A capacidade do alginato de se intumescer é facilitada pelos grupos carboxílicos, que se associam fortemente a moléculas de água. Um aumento na concentração de íons cálcio diminui a disponibilidade destes grupos e conseqüentemente a hidroflicidade do sistema, induzindo a liberação da água pela rede polimérica. Roger *et al.* (2006) avaliando o grau de intumescimento de filmes de alginato com diferentes graus de substituição de íons sódio pelos íons cálcio, o qual era promovido através da imersão dos filmes em soluções de CaCl_2 por diferentes tempos, observaram que com a reticulação ocorria a formação de uma rede mais densa que obviamente intumescia menos. Observando a Figura 4.3a-c, pode-se concluir que, de maneira geral, o aumento da concentração de CaCl_2 nos dois estágios da fabricação dos filmes promove um aumento do grau de substituição dos íons Na^{+2} presentes nas moléculas de alginato pelos íons Ca^{+2} , e conseqüentemente um menor grau de intumescimento da matriz. Com relação ao tempo de tratamento, diversos autores (Rhim, 2004, Al-Musa *et al.*, 1999, Sartori *et al.*, 1997, Pavlath *et al.*, 1999) afirmam que o intumescimento é inversamente proporcional ao tempo de imersão, mas que após aproximadamente 30 minutos o grau de intumescimento fica praticamente constante. Roger *et al.* (2006) explicam que no momento inicial do contato do filme com a solução de cálcio, todos os sítios ativos presentes nas moléculas de alginato estão disponíveis, de forma que os cátions podem rapidamente se ligar para unir as cadeias do polímero. Com o tempo, os cátions precisam se difundir através da rede parcialmente formada, causando uma resistência à difusão e fazendo com que o processo de substituição seja mais lento. No presente trabalho o filme formado já continha cálcio na matriz, pois devido a limitações

práticas de manuseio definiu-se que a mínima concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio era de 0,01 g/g alginato, de forma que a difusão dos íons cálcio no 2º estágio possa ser mais lenta que em filmes que não contenham cálcio inicialmente. Roger *et al.* (2006) relatam que mais da metade da substituição entre sódio e cálcio ocorre dentro dos primeiros 5 minutos de tratamento e que após este período a concentração de cálcio aumenta lentamente até atingir um valor constante (por volta de 10 minutos), que corresponde ao máximo grau de substituição. Através da Figura 4.3 b e c observa-se que os menores valores de grau de intumescimento foram obtidos na faixa de 20 a 40 minutos de imersão, dependendo das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º e no 2º estágio. Com relação à concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º e no 2º estágio, pode-se dizer que os menores graus de intumescimento da matriz foram obtidos quando se utilizou mais que 0,04 g/g alginato e entre 5 e 6 g/100 mL, no 1º e no 2º estágio, respectivamente.

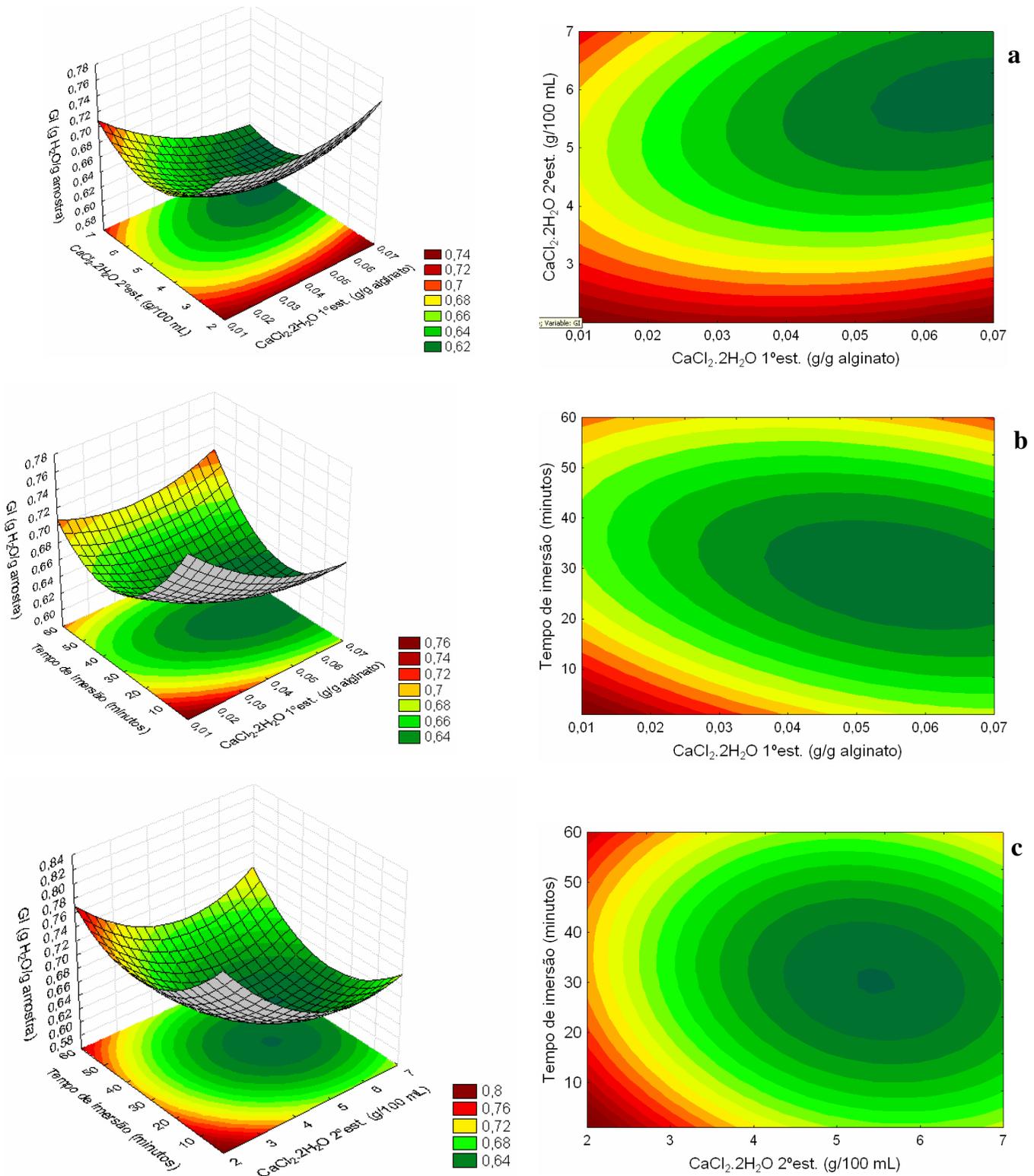


Figura 4.3: Superfícies de resposta e curvas de contorno para o grau de intumescimento dos filmes de alginato em função das concentrações de CaCl₂·2H₂O no 1^o e no 2^o estágio (a), da concentração de CaCl₂·2H₂O no 1^o estágio e do tempo de imersão (b) e da concentração de CaCl₂·2H₂O no 2^o estágio e do tempo de imersão (c)

4.1.2.4 Propriedades Mecânicas: Tensão e alongamento na ruptura dos filmes de alginato

A resistência mecânica dos filmes de alginato está diretamente relacionada com a quantidade de zonas de junção e a natureza das associações envolvidas nestas zonas formadas no processo de reticulação (Oakenfull, 1987). As propriedades mecânicas são características importantes, pois elas podem prever a estabilidade e a funcionalidade dos biofilmes.

A tensão de ruptura, TR, é uma medida da força, enquanto que o alongamento é uma medida da capacidade do filme em se esticar antes de se romper. Estas propriedades são características importantes para materiais de embalagens (Krochta e De Mulder Johnston, 1997). TR depende da área superficial e da força das ligações entre as cadeias dos polímeros. A TR variou de 82,0 a 99,4 MPa para filmes de alginato reticulados com íons Ca^{+2} (Tabela 4.1). Com relação ao alongamento, foram encontrados valores entre 1,8 a 10,0%.

As propriedades mecânicas de tensão e alongamento na ruptura foram analisadas em conjunto, pois estes dados são obtidos a partir de um mesmo ensaio. Inicialmente estão apresentados os resultados individuais da análise estatística, seguida de uma discussão global das superfícies de resposta obtidas.

Os valores dos efeitos das variáveis concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio, concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio e tempo de imersão sobre a tensão de ruptura dos filmes estão apresentados na Tabela 4.12. Pode-se observar que a um nível de significância de 5%, todos os termos do modelo quadrático, com exceção do termo linear do tempo de imersão e do termo de interação entre a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e o tempo de imersão (x_1x_3), apresentaram significância estatística. As variáveis $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio (termos lineares) foram as que apresentaram maior efeito sobre a TR dos filmes, sendo que um aumento de nível dessas variáveis de (-1) para (+1), provocam um aumento, em média, de 6 e 5 MPa, respectivamente. Apesar dos termos lineares das variáveis significativas terem apresentado efeito positivo sobre a resposta, a interação entre elas apresentou efeito negativo. As outras interações das concentrações de CaCl_2 com o tempo de imersão também foram negativas.

Tabela 4.12: Efeito das variáveis estudadas sobre a tensão na ruptura dos filmes de alginato

	Fatores	Efeito (MPa)	Desvio padrão	p (95% de confiança)
	média	97,2613	0,2842	0,0000*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1° estágio) [x ₁]	6,0075	0,2669	0,0020*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2° estágio) [x ₂]	5,0048	0,2669	0,0028*
	Tempo de imersão [x ₃]	-0,7592	0,2669	0,1046
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1° estágio)	-2,3183	0,2938	0,0157*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2° estágio)	-4,9761	0,2938	0,0035*
	Tempo de imersão	-2,6475	0,2938	0,0121*
Interações	x ₁ x ₂	-1,5760	0,3487	0,0456*
	x ₁ x ₃	-0,6972	0,3487	0,1836
	x ₂ x ₃	-4,3634	0,3487	0,0063*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, p < 0,05)

Após a análise dos efeitos de cada variável e de sua significância, foram definidos os termos a serem incluídos no modelo quadrático. Os coeficientes de regressão obtidos para o modelo estatístico codificado estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para a tensão na ruptura dos filmes de alginato

	Fatores	Coefficiente	Valor p
	Média	97,2613	<0,0001*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1° estágio) [x ₁]	3,0037	0,0020*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2° estágio) [x ₂]	2,5024	0,0028*
	Tempo de imersão [x ₃]	-0,3796	0,1046
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1° estágio)	-1,1592	0,0157*
	CaCl ₂ .2H ₂ O (2° estágio)	-2,4880	0,0035*
	Tempo de imersão	-1,3237	0,0121*
Interações	x ₁ x ₂	-0,7880	0,0456*
	x ₂ x ₃	-2,1817	0,0063*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, p < 0,05)

O termo linear do tempo de imersão foi mantido no modelo devido ao fato de seus termos quadrático e de interação como a concentração de CaCl₂ no 2º estágio serem significativos. A exclusão destes termos prejudicava o ajuste dos dados. Os demais termos foram descartados do modelo e adicionados aos resíduos.

De acordo com os valores encontrados na Tabela 4.13, o modelo codificado para a resposta tensão na ruptura dos filmes de alginato está apresentado na Equação 4.4.

$$TR = 97,2613 + 3,0037x_1 - 1,1592x_1^2 + 2,5024x_2 - 2,4880x_2^2 - 0,3796x_3 - 1,3237x_3^2 - 0,7880x_1x_2 - 2,1817x_2x_3 \quad (4.4)$$

Os resultados da análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo codificado da Equação 4.4 estão apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Análise de variância para a tensão na ruptura dos filmes de alginato

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	328,9155	8	41,1144	13,38	3,44
Resíduos	24,5883	8	3,0735		
Falta de ajuste	24,1018	6	4,0170	16,51	19,33
Erro puro	0,4865	2	0,2432		
Total	353,5038	16			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, R² = 0,930, R² ajustado= 0,861

Verifica-se um bom coeficiente de determinação (R²=0,93). A significância do modelo foi conferida pelo valor de F_{calculado} da regressão em relação aos resíduos o qual foi aproximadamente 3 vezes maior que o F_{tabelado}. O modelo não apresentou falta de ajuste, pois o valor do F_{calculado} da falta de ajuste em relação ao erro puro foi menor que o valor de F_{tabelado}. A partir da validação do modelo quadrático proposto obteve-se as superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno em função das variáveis estudadas (Figura 4.4 (a-c)).

Na Tabela 4.15 estão apresentados os efeitos das variáveis estudadas sobre o alongamento dos filmes de alginato puro. Pode-se verificar que, para o alongamento, as concentrações de CaCl_2 tanto no primeiro como no segundo estágio apresentaram efeito negativo, o que era esperado, pois com o aumento da concentração de agente reticulante a estrutura polimérica tende a se tornar mais rígida e menos flexível. Observa-se que o efeito da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio apresentou um efeito 1,7 maior na propriedade de alongamento dos filmes comparado ao efeito provocado pela concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio. Isto poderia sugerir que a pré-reticulação no 1º estágio atua mais internamente nas cadeias da matriz, enquanto que a reticulação final atuaria mais na superfície, dada a alta concentração de íons Ca^{+2} disponíveis no banho de imersão, fazendo com que estes fechem a superfície do filme rapidamente não permitindo a penetração de mais agente reticulante ao longo da espessura do mesmo. O tempo de imersão (termo linear, quadrático e interação) não apresentou significância estatística ao nível de 5% de probabilidade. Os demais termos de interação também não foram estatisticamente importantes.

Tabela 4.15: Efeito das variáveis estudadas sobre o alongamento na ruptura dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Efeito (%)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>p (95% de confiança)</i>
	média	9,3934	0,3515	0,0014*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-4,5434	0,3301	0,0052*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio) [x_2]	-2,6320	0,3301	0,0154*
	Tempo de imersão [x_3]	0,8699	0,3301	0,1189
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	-2,9363	0,3633	0,0150*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio)	-2,8288	0,3633	0,0161*
	Tempo de imersão	-1,2958	0,3633	0,0704
Interações	$x_1 x_2$	0,3100	0,4313	0,5469
	$x_1 x_3$	1,3175	0,4313	0,0925
	$x_2 x_3$	-1,0650	0,4313	0,1322

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Os coeficientes considerados para a formulação do modelo quadrático codificado que relaciona o alongamento dos filmes com as variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 4.16. Excluiu-se do modelo apenas o termo de interação entre as concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º e no 2º estágio, pois foi verificado que a exclusão dos demais termos não significativos piorava o ajuste dos dados. O termo excluído foi adicionado aos resíduos. Os dados da Tabela 4.16 permitiram a obtenção do modelo matemático codificado representado pela Equação 4.5.

Tabela 4.16: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para o alongamento na ruptura dos filmes de alginato

	<i>Fatores</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
Linear	Média	9,3934	0,0014*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-2,2717	0,0052*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio) [x_2]	-1,3160	0,0154*
	Tempo de imersão [x_3]	0,4349	0,1189
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	-1,4681	0,0150*
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2º estágio)	-1,4144	0,0161*
	Tempo de imersão	-0,6479	0,0704
Interações	$x_1 x_3$	0,6587	0,0925
	$x_2 x_3$	-0,5325	0,1322

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

$$\begin{aligned} \text{Alongamento} = & 9,3942 - 2,2717x_1 - 1,4681x_1^2 - 1,3160x_2 - 1,4144x_2^2 \\ & + 0,4349x_3 - 0,6479x_3^2 + 0,6587x_1x_3 - 0,5325x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.5)$$

A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo de segunda ordem da Equação 4.5 está apresentada na Tabela 4.17. Pode-se observar que o modelo proposto é válido, uma vez que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,94, indicando que para os filmes de alginato puro, 94% da variação no alongamento dos filmes de alginato pode ser explicada através do modelo da Equação 4.5. O modelo não apresentou falta de ajuste e o erro puro calculado foi baixo, indicando boa reprodutibilidade dos dados.

O modelo da Equação 4.5 foi então utilizado para gerar as superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.5 a-c.

Tabela 4.17: Análise de variância para o alongamento na ruptura dos filmes de alginato

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	138,6319	8	17,3290	15,64	3,44
resíduos	8,8629	8	1,1079		
Falta de ajuste	8,1188	6	1,3531	3,64	19,33
Erro puro	0,7441	2	0,3720		
Total	147,4948	16			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,940$, R^2 ajustado= 0,880

Através das Figuras 4.4 (a-c) pode-se observar que, na faixa de estudo analisada, os maiores valores de tensão na ruptura para os filmes de alginato puro são encontrados utilizando-se as maiores concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tanto no primeiro como no segundo estágio. Contrariamente, os maiores valores de alongamento na ruptura são obtidos utilizando-se as menores concentrações de CaCl_2 (Figuras 4.5 (a-c)). O aumento na tensão na ruptura e a respectiva diminuição no alongamento dos filmes de alginato devido ao tratamento com CaCl_2 se deve principalmente à reticulação da matriz polimérica formada entre os grupos carboxílicos do alginato e íons Ca^{+2} . Os valores de tensão e alongamento na ruptura encontrados no presente estudo são similares aos determinados por outros autores que trabalharam com filmes de alginato de cálcio, reticulados por imersão (Rhim, 2004; Pavlath *et al.* 1999, Chavez *et al.*, 1994). Por exemplo, Rhim (2004) obteve 85,9 MPa e 3,8% para a tensão e o alongamento na ruptura, respectivamente, de filmes de alginato reticulados por imersão em solução contendo 5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/100$ mL durante 5 minutos. No entanto, é importante ressaltar que este autor não realizou a pré-reticulação da matriz (1º estágio) nem utilizou glicerol na solução reticuladora do 2º estágio. A ausência de plastificante no 2º estágio resultou, em um menor valor de alongamento dos filmes obtidos por estes autores (3,8%) em comparação aos valores previstos pelo presente estudo em condições experimentais semelhantes ($\approx 8\%$) (Figuras 4.5 (a-c)).

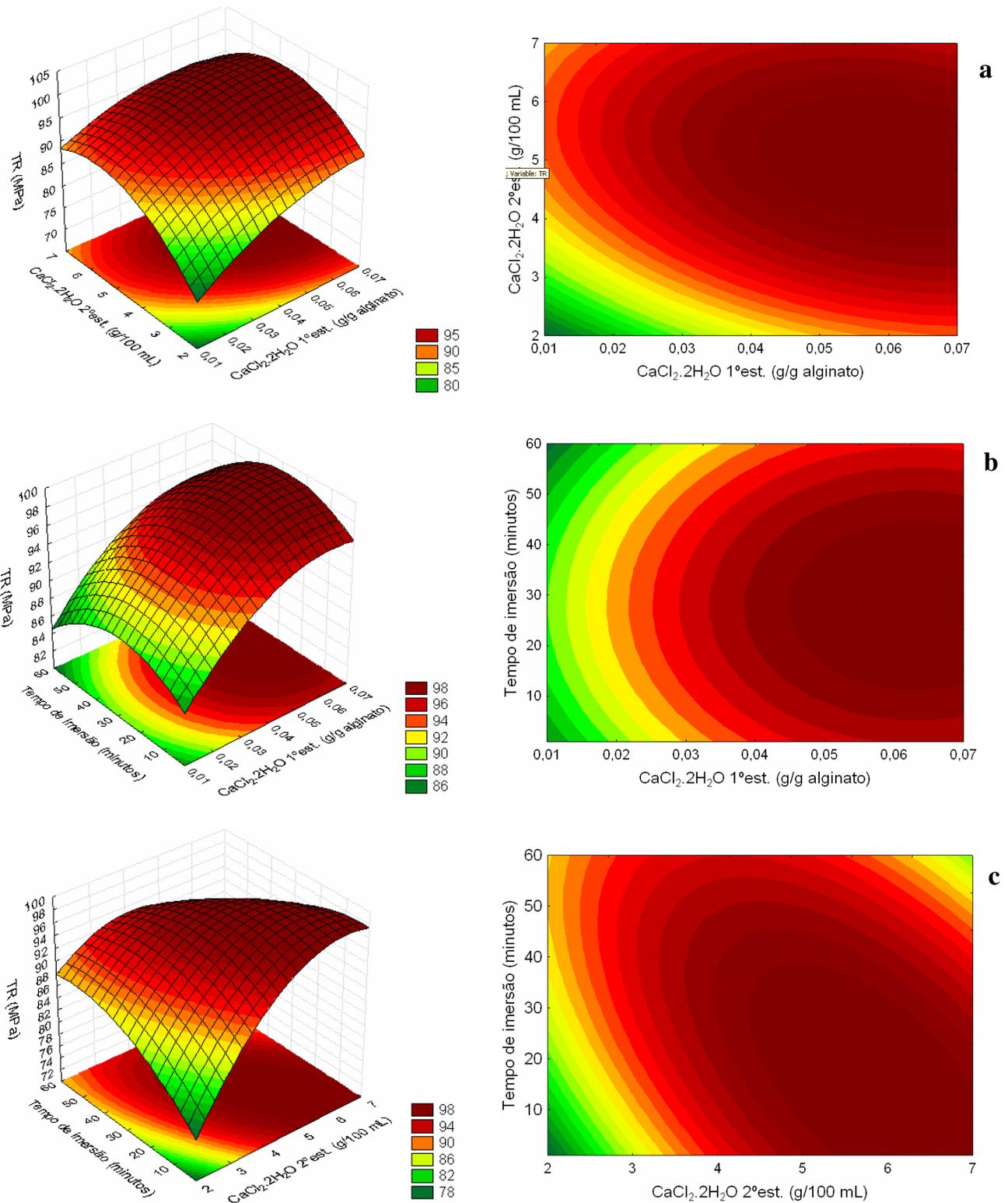


Figura 4.4: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a tensão na ruptura dos filmes de alginato em função das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1° e no 2° estágio (a), da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1° estágio e do tempo de imersão (b) e da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2° estágio e do tempo de imersão (c)

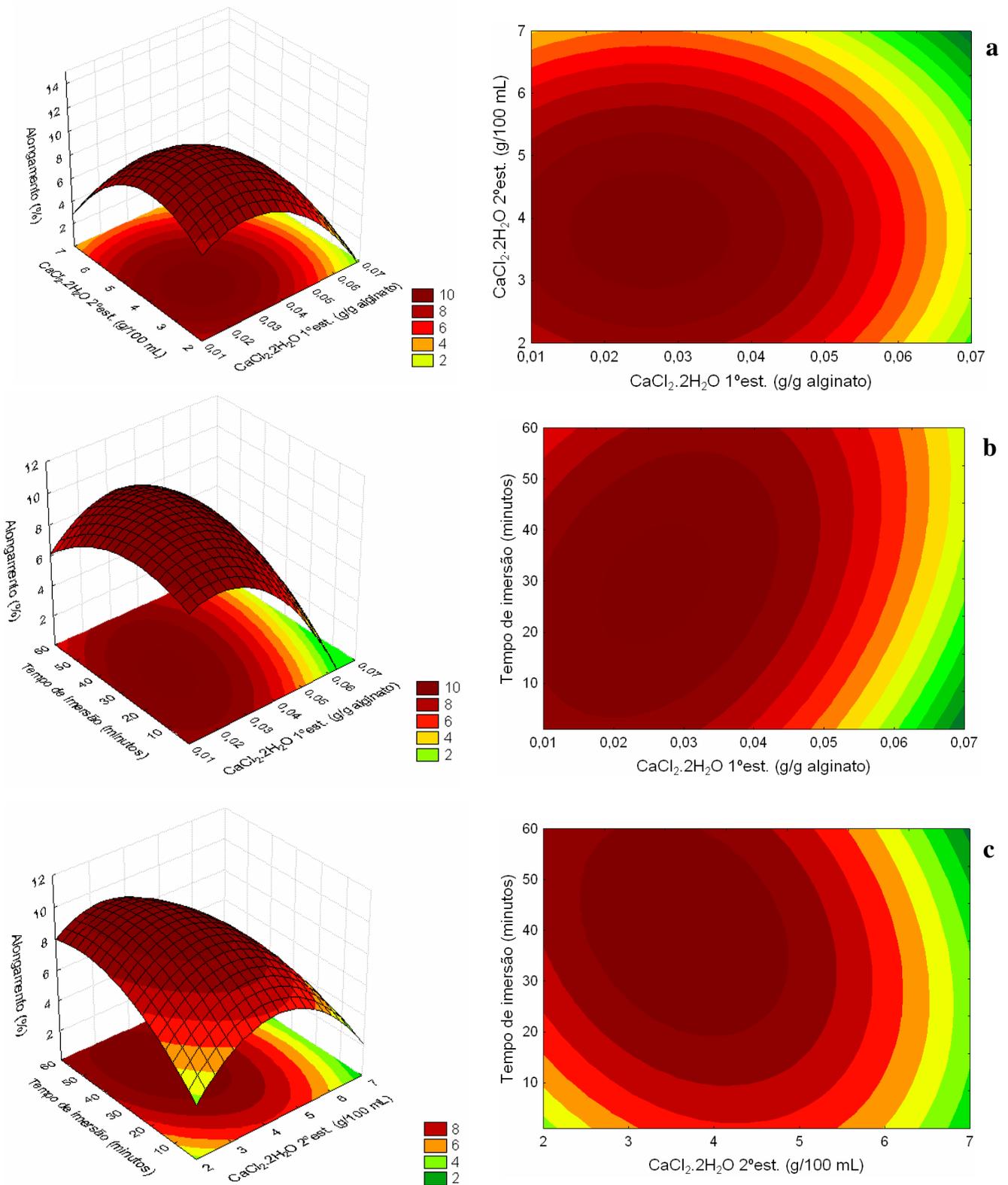


Figura 4.5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para o alongamento na ruptura dos filmes de alginato em função das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1^o e no 2^o estágio (a), da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1^o estágio e do tempo de imersão (b) e da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2^o estágio e do tempo de imersão (c)

4.1.3 Otimização da formulação do filme de alginato

Após a análise individual de cada resposta, o planejamento fatorial permitiu a escolha da melhor condição de processamento para os filmes de alginato, objetivando a obtenção de filmes com baixa massa solubilizada em água, PVA, grau de intumescimento e boa resistência mecânica (alta tensão e alongamento na ruptura).

Gontard *et al.* (1992) ressaltam que através das superfícies de resposta é possível estabelecer faixas de processamento ou formulação baseadas nas características desejadas para a aplicação específica a qual o filme se destina. Desta forma, utilizou-se uma ferramenta de otimização do *Software Statistica* chamada função “desejabilidade”, a qual permite apontar a melhor condição para as respostas desejadas. Assim, no caso dos filmes de alginato puro, os menores valores de massa solubilizada em água, PVA e grau de intumescimento, e os maiores valores de tensão e alongamento na ruptura são previstos quando se utiliza concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio de 0,04 g/g alginato, concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio de 4,75 g/100 mL e tempo de imersão de 32,5 minutos (Figura 4.6). Nestas condições os filmes de alginato puro devem apresentar as seguintes características:

$$\text{MS} = 0,139 \text{ g/g massa seca}$$

$$\text{PVA} = 4,57 \text{ g.mm/m}^2 \cdot \text{dia.kPa}$$

$$\text{GI} = 0,62 \text{ g H}_2\text{O/g amostra}$$

$$\text{TR} = 97,95 \text{ MPa}$$

$$\text{Alongamento} = 8,76\%$$

Por questões práticas os valores otimizados das variáveis foram aproximados para 0,04 g/g alginato, 5 g/100 mL e 30 minutos, para a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio, a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 2º estágio e o tempo de imersão, respectivamente. Para validar o planejamento experimental, filmes de alginato puro produzidos segundo esta formulação otimizada foram preparados e caracterizados. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.18.

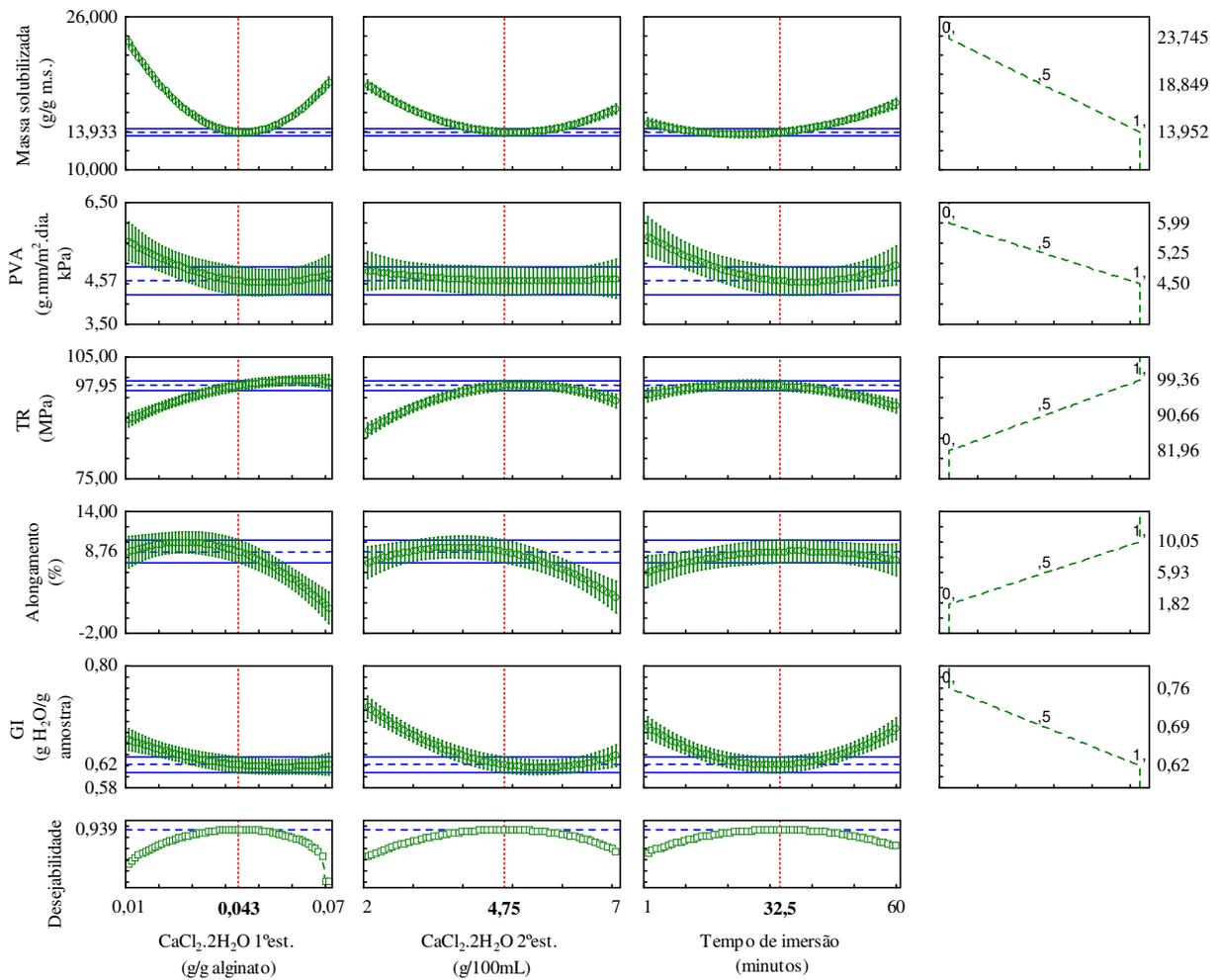


Figura 4.6: Gráfico das repostas da função “desejabilidade” para os filmes de alginato

Tabela 4.18: Resultados da caracterização da formulação otimizada dos filmes de alginato

δ^{**} (mm)	MS^* (g/g massa seca)	PVA^* (g.mm/m ² . dia.kPa)	GI^* (g H ₂ O/ g amostra)	TR^{**} (MPa)	$Alongamento^{**}$ (%)
0,048 (0,002)	0,148 (0,035)	4,04 (0,09)	0,68 (0,09)	96,25 (4,21)	8,37 (1,03)

δ = espessura, MS = massa solubilizada em água, PVA= coeficiente de permeabilidade ao vapor de água, GI = grau de intumescimento, TR = tensão na ruptura

Média (desvio padrão) de: * três determinações experimentais; ** dez determinações experimentais

4.2 Filmes compostos de alginato e quitosana

4.2.1 Ensaios preliminares

Foram realizados diversos ensaios preliminares com o intuito de obter filmes compostos de alginato e quitosana, baseando-se em resultados apresentados na literatura. Nestes ensaios foram avaliadas diversas seqüências de mistura das soluções filmogênicas, diferentes proporções entre as soluções dos biopolímeros, assim como a avaliação da necessidade de se realizar as etapas de reticulação com íons cálcio. A metodologia desenvolvida envolve as etapas descritas no Item 3.3.

Experimentalmente observou-se que era necessário utilizar uma forte agitação para se obter uma mistura homogênea. A reação entre os dois polímeros é muito rápida, sendo necessário a adaptação do sistema reacional para que a solução de quitosana fosse introduzida pelo fundo do béquer contendo inicialmente a solução de alginato. Deste modo a mesma é imediatamente homogeneizada ao entrar. Quando a solução de quitosana era adicionada pela parte de cima do béquer, ou seja, sobre a solução de alginato, observava-se imediatamente a formação de uma camada gelificada que impedia a dispersão de uma solução na outra.

Os filmes compostos resultantes do processo com este sistema adaptado eram homogêneos, porém menos transparentes que os filmes simples de alginato e quitosana e apresentavam algumas estrias finas uniformemente distribuídas, características da interação entre os dois polímeros. Yan *et al.*, 2001, produziram filmes compostos de alginato e quitosana, esta com diferentes massas molares (baixa, média e alta). Estes autores observaram que os filmes formados com quitosana de massa molar alta ($10,0 \times 10^5$ g/mol) apresentavam superfície heterogênea, áspera e bastante estriada. No entanto, os filmes formados com quitosana de massa molar média ($5,3 \times 10^5$ g/mol) e baixa ($1,3 \times 10^5$ g/mol) apresentavam superfície lisa com estrias finas uniformemente distribuídas. A quitosana utilizada neste trabalho, conforme indicado no Item 3.1, se enquadraria entre a de massa molar baixa e média ($3,7 \times 10^5$ g/mol) e está de acordo com as características descritas por estes autores.

4.2.2 Planejamento fatorial completo 2^2 para os filmes compostos de alginato e quitosana

Após a otimização da formulação dos filmes elaborados apenas com alginato, um segundo delineamento composto central rotacional, $2^2 + 4$ pontos axiais + 3 repetições no ponto central foi utilizado para estudar os efeitos da adição de quitosana e da concentração de CaCl_2 (1º estágio) nas propriedades de massa solubilizada em água, permeabilidade ao vapor de água, grau de intumescimento e propriedades mecânicas (tensão e alongamento na ruptura) de filmes compostos de alginato e quitosana.

Nos ensaios preliminares verificou-se que a máxima fração mássica de quitosana possível de se trabalhar, nas condições reacionais utilizadas, era de 0,35 (nível superior do planejamento). Acima deste valor, a solução ficava muito viscosa e, conseqüentemente, não fluía adequadamente, prejudicando a deposição uniforme no suporte.

Rajaonarivony *et al.* (1993) enfatizam que a condição de pré-gel formada entre o alginato de sódio e o cloreto de cálcio é essencial para permitir as interações iônicas entre o alginato e outro polímero catiônico. De *et al.* (2003), estudando a formação de nanopartículas de alginato e quitosana, relatam que uma baixa concentração de CaCl_2 (aproximadamente 0,2 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mg alginato) é necessária para a formação do pré-gel de alginato de cálcio carregado negativamente que é subsequentemente envelopado pela quitosana carregada positivamente. Os autores explicam que os polímeros catiônicos (ex. quitosana) restringem o avanço da ligação cooperativa entre os íons cálcio e o alginato. Porém quando a concentração de cálcio excede a concentração de pré-gel, os íons cálcio se ligam cooperativamente às moléculas de alginato impedindo a ligação de moléculas de quitosana suficientes para formar o complexo alginato/quitosana. A máxima concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ possível de ser adicionada à solução de alginato, nas condições operacionais utilizadas, foi de 0,07 g/g alginato (nível superior do planejamento), acima deste nível, a solução apresentava gelificação excessiva.

Todos os filmes compostos produzidos sem uma reticulação complementar (2º estágio), não eram capazes de manter a sua integridade em água e apresentaram alto grau de intumescimento. Optou-se, assim, por realizar o tratamento dos mesmos na mesma condição otimizada para os filmes de alginato puro, ou seja, os filmes eram imersos em 50 mL de solução contendo 5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100 mL e 5 mL glicerol/100 mL por 30 minutos.

Os valores de massa solubilizada em água, permeabilidade ao vapor de água, grau de intumescimento e propriedades mecânicas (tensão e alongamento na ruptura) dos filmes compostos de alginato e quitosana estão apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19: Resultados do planejamento fatorial completo 2² para os filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Ensaio</i>	<i>MS*</i> (g/g massa seca)	<i>PVA *</i> (g.mm/m ² . dia.kPa)	<i>GI*</i> (g H ₂ O/g amostra)	<i>TR**</i> (MPa)	<i>Alongamento**</i> (%)
1	0,217 (0,003) ^{cd}	4,90 (0,11) ^b	0,76 (0,01) ^a	74,70 (7,95) ^c	11,85 (2,04) ^{ab}
2	0,275 (0,003) ^f	6,91(0,01) ^f	1,27 (0,05) ^c	64,50 (5,89) ^{abc}	19,35 (2,67) ^{de}
3	0,163 (0,009) ^{ab}	4,30 (0,16) ^a	0,72 (0,03) ^a	95,11 (9,75) ^d	7,31 (1,91) ^a
4	0,238 (0,006) ^{cdef}	6,61 (0,02) ^{ef}	1,03 (0,06) ^c	56,14 (6,70) ^a	15,00 (2,32) ^{cd}
5	0,267 (0,004) ^{def}	6,47 (0,08) ^{de}	0,90 (0,01) ^b	59,44 (6,80) ^{ab}	17,89 (2,86) ^{de}
6	0,198 (0,010) ^{bc}	6,10 (0,32) ^d	0,62 (0,02) ^b	58,51 (3,22) ^a	13,19 (2,18) ^{bc}
7	0,144 (0,008) ^a	4,78 (0,07) ^b	0,74 (0,01) ^a	103,39 (10,60) ^d	9,45 (1,67) ^a
8	0,257 (0,005) ^{ef}	7,94 (0,17) ^g	2,03 (0,09) ^d	55,41 (4,70) ^a	21,56 (2,28) ^f
9	0,222 (0,004) ^{cde}	5,57 (0,01) ^c	0,98 (0,09) ^b	69,40 (5,61) ^{bc}	11,42 (2,91) ^{ab}
10	0,226 (0,004) ^{cde}	5,37 (0,06) ^c	1,04 (0,04) ^b	72,69 (10,15) ^c	11,47 (1,99) ^{abc}
11	0,223 (0,007) ^{cde}	5,35 (0,04) ^c	0,93 (0,02) ^b	68,78 (5,24) ^{bc}	10,10 (1,64) ^{ab}

MS = massa solubilizada em água, PVA= coeficiente de permeabilidade ao vapor de água, GI = grau de intumescimento, TR = tensão na ruptura

Média (desvio padrão) de: * três determinações experimentais; ** dez determinações experimentais.

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa (p < 0,05) entre as médias (teste de Tukey)

O conteúdo de umidade de equilíbrio a 52% de umidade relativa bem como as espessuras dos filmes compostos de alginato e quitosana não foram considerados no planejamento experimental, porém foram determinados e estão apresentados na Tabela 4.20. Pode-se observar que a massa solubilizada em água dos filmes variou entre 0,165 e 0,212 g/g massa seca, essas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças de hidrofiliicidade da estrutura polimérica que determina como as moléculas de água interagem com a matriz. As espessuras dos filmes compostos apresentaram diferenças significativas (p < 0,05) entre as formulações estudadas, apesar do volume de solução que era adicionada ao suporte ter sido constante. O filme mais espesso foi obtido na formulação que continha a maior fração mássica de quitosana (Ensaio 8). De maneira geral, os filmes que continham

fração mássica de quitosana até 0,175 não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na espessura, com exceção do filme que continha fração mássica de quitosana de 0,051 g/g polímero e concentração de CaCl_2 no 1º estágio de 0,02 (Ensaio 1). Pode-se dizer então que o aumento da espessura é principalmente influenciado pela presença de quitosana. A espessura do filme de alginato sem quitosana (Ensaio 7) foi similar à espessura encontrada para os filmes de alginato puro obtidos no primeiro planejamento experimental.

Tabela 4.20: Resultados de conteúdo de umidade de equilíbrio (UR=52%) e espessuras dos filmes produzidos segundo o planejamento fatorial completo 2^2 para os filmes compostos de alginato e quitosana

Ensaio	x_1	x_2	Conteúdo de umidade, ω * (g H_2O /g amostra)	Espessura, δ^{**} (mm)
1	0,02	0,051	0,176 (0,001) ^{ab}	0,066 (0,007) ^{cd}
2	0,02	0,299	0,165 (0,004) ^a	0,067 (0,003) ^{cd}
3	0,06	0,051	0,181 (0,004) ^{bc}	0,053 (0,001) ^a
4	0,06	0,299	0,173 (0,003) ^{ab}	0,062 (0,002) ^{bc}
5	0,01	0,175	0,186 (0,004) ^{bc}	0,063 (0,003) ^{bc}
6	0,07	0,175	0,185 (0,005) ^{bc}	0,058 (0,002) ^{abc}
7	0,04	0	0,186 (0,002) ^d	0,053 (0,001) ^a
8	0,04	0,350	0,212 (0,004) ^{bc}	0,072 (0,002) ^d
9	0,04	0,175	0,179 (0,001) ^c	0,055 (0,001) ^{ab}
10	0,04	0,175	0,192 (0,003) ^b	0,053 (0,001) ^a
11	0,04	0,175	0,179 (0,002) ^{ab}	0,053 (0,003) ^a

x_1 = concentração de CaCl_2 (1º estágio) (g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato), x_2 = fração mássica de quitosana (g quitosana/g biopolímero)

Média (desvio padrão) de: * três determinações experimentais; ** dez determinações experimentais.

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias (teste de Tukey)

4.2.2.1 Massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana

Os efeitos das variáveis estudadas sobre a resposta massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana estão apresentados na Tabela 4.21. Observa-se que, para um intervalo de confiança de 95%, todas as variáveis apresentaram efeito significativo sobre a resposta na faixa de trabalho estudada. A concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no primeiro estágio apresentou efeito negativo sobre a massa solubilizada, ou seja, a mesma

tende a diminuir com o aumento da concentração de íons Ca^{+2} adicionados na etapa de pré-reticulação da matriz polimérica. Contrariamente aumentando-se a fração mássica de quitosana, o valor da massa solubilizada tende a aumentar, de modo que um aumento do nível (+1) para (-1) dessa variável causou um aumento, em média, de 0,07 g/g massa seca na massa solubilizada dos filmes compostos. Os termos quadráticos e de interação apresentaram efeitos bem menos pronunciados na massa solubilizada, comparado ao efeito dos termos lineares, no entanto estes ainda foram estatisticamente significativos.

Tabela 4.21: Efeito das variáveis estudadas sobre a massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fatores</i>		<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i>	<i>p (95% de</i>
		<i>(g/g m.s.)</i>	<i>padrão</i>	<i>confiança)</i>
	média	0,224261	0,001123	< 0,0001*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,045835	0,001335	0,0008*
	Fração mássica de quitosana [x_2]	0,073568	0,001378	0,0003*
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	0,010481	0,001494	0,0197*
	Fração mássica de quitosana	-0,020220	0,001658	0,0066*
Interações	$x_1 x_2$	0,008800	0,001947	0,0456*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Os coeficientes de regressão obtidos estão apresentados na Tabela 4.22. O modelo codificado da massa solubilizada em água em função das variáveis estudadas está apresentado na Equação 4.6.

Tabela 4.22: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para a massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fatores</i>		<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
	Média	0,2243	<0,0001*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,0229	0,0008*
	Fração mássica de quitosana [x_2]	0,0368	0,0003*
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	0,0052	0,0197*
	Fração mássica de quitosana	-0,0101	0,0066*
Interação	$x_1 x_2$	0,0044	0,0456*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

$$MS = 0,2243 - 0,0229x_1 + 0,0052x_1^2 + 0,0368x_2 - 0,0101x_2^2 + 0,0044x_1x_2 \quad (4.6)$$

A análise de variância (Tabela 4.23) mostrou que o modelo quadrático proposto é válido, pois o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão em relação aos resíduos foi aproximadamente 15 vezes maior que o F_{tabelado} . O R^2 foi alto (0,987) e não foi constatada falta de ajuste. Com isto, pode-se obter a superfície de resposta e sua respectiva curva de contorno para a massa solubilizada dos filmes de alginato e quitosana, em função da concentração de CaCl_2 e da fração mássica de quitosana na faixa estudada, apresentada na Figura 4.7.

Tabela 4.23: Análise de variância para a massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (SQ/GL)	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	0,016409	5	0,003282	79,27	5,05
Resíduos	0,000207	5	0,0000414		
Falta de ajuste	0,000199	3	0,6663	17,54	19,16
Erro puro	0,000008	2	0,0374		
Total	0,016616	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,987$, R^2 ajustado = 0,975

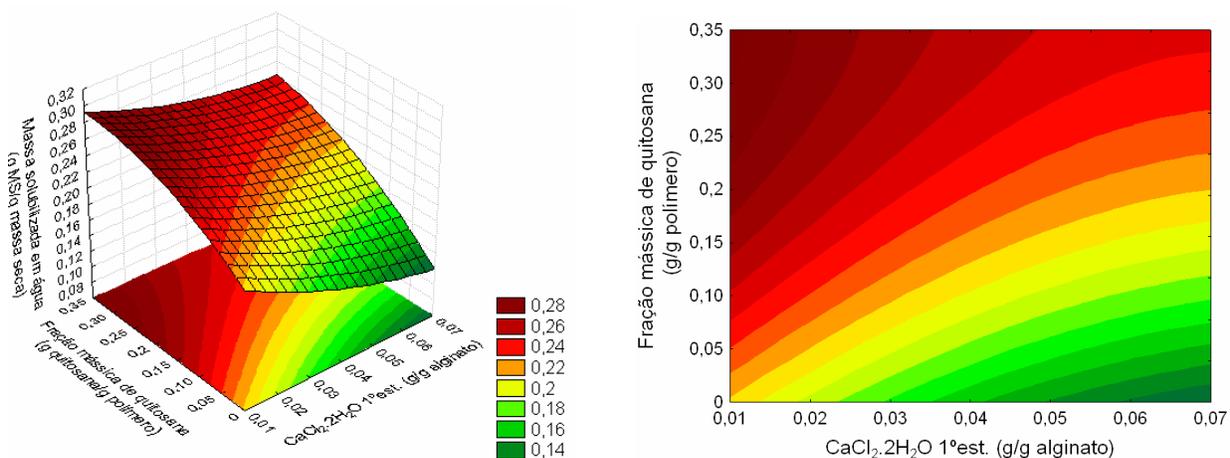


Figura 4.7: Superfície de resposta e curva de contorno para massa solubilizada em água dos filmes compostos de alginato e quitosana em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e da fração mássica de quitosana

Observa-se, através da Figura 4.7, que os menores valores de massa solubilizada em água são obtidos utilizando-se as menores frações mássicas de quitosana e as maiores concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio. A adição de quitosana nos filmes não foi eficiente para diminuir a massa solubilizada água dos mesmos.

4.2.2.2 Permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de alginato e quitosana

Os valores dos efeitos das variáveis independentes sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos estão apresentados na Tabela 4.24. Verifica-se que, a variável fração mássica de quitosana apresentou o maior efeito sobre a PVA dos filmes compostos. Observa-se que aumentando a concentração de quitosana de 5% (-1) para 30% (+1) obtêm-se, em média, um aumento na PVA de 2,2 $\text{g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$. A um nível de significância de 5%, a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na pré-reticulação não apresentou significância estatística. Observa-se também que não foi detectado efeito significativo de interação entre as variáveis.

Tabela 4.24: Efeito das variáveis estudadas sobre o PVA dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fator</i>		<i>Efeito (g.mm/m². dia.kPa)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>p (95% de confiança)</i>
	média	5,4087	0,0721	0,0002*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,3422	0,0858	0,0575
	Fração mássica de quitosana [x_2]	2,2025	0,0885	0,0016*
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	0,5310	0,0960	0,0311*
	Fração mássica de quitosana	0,6380	0,1065	0,0267*
Interação	$x_1 x_2$	0,1486	0,1251	0,3566

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Desconsiderando os fatores não significativos, foram obtidos os coeficientes de regressão para o modelo quadrático que relaciona a permeabilidade ao vapor de água em função das variáveis estudadas (Tabela 4.25). Apesar do termo linear da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio não ter sido estatisticamente significativo, o seu termo quadrático foi importante, desta forma ambos foram mantidos no modelo quadrático proposto

representado pela Equação 4.7. O termo de interação foi descartado do modelo e adicionado aos resíduos.

Tabela 4.25: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para o PVA dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fatores</i>		<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
	Média	5,4087	0,0002*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio) [x ₁]	-0,1711	0,0575
	Fração mássica de quitosana [x ₂]	1,1012	0,0016*
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio)	0,2655	0,0311*
	Fração mássica de quitosana	0,3190	0,0267*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, p < 0,05)

$$PVA = 5,4087 - 0,1711x_1 + 0,2655x_1^2 + 1,1012x_2 + 0,3190x_2^2 \quad (4.7)$$

O resultado da análise de variância está apresentado na Tabela 4.26. Pode-se considerar que o modelo estatístico é válido, uma vez que o valor de $F_{\text{calculado}}$ da regressão em relação aos resíduos foi mais que três vezes o valor de F_{tabelado} . Observa-se que, para os filmes compostos de alginato e quitosana, 93% da variação no PVA pode ser explicada através do modelo da Equação 4.7. O erro puro calculado foi baixo, indicando boa reprodutibilidade dos dados.

Tabela 4.26: Análise de variância para o PVA dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F calculado</i>	<i>F tabelado</i>
Regressão	10,7207	4	2,6801	19,58	4,53
Resíduos	0,8213	6	0,1369		
Falta de ajuste	0,7900	4	0,1975	12,63	19,25
Erro puro	0,0313	2	0,01564		
Total	11,5419	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,929$, $R^2_{\text{ajustado}} = 0,881$

Na Figura 4.8 tem-se a superfície de resposta e a respectiva curva de contorno obtida para o PVA.

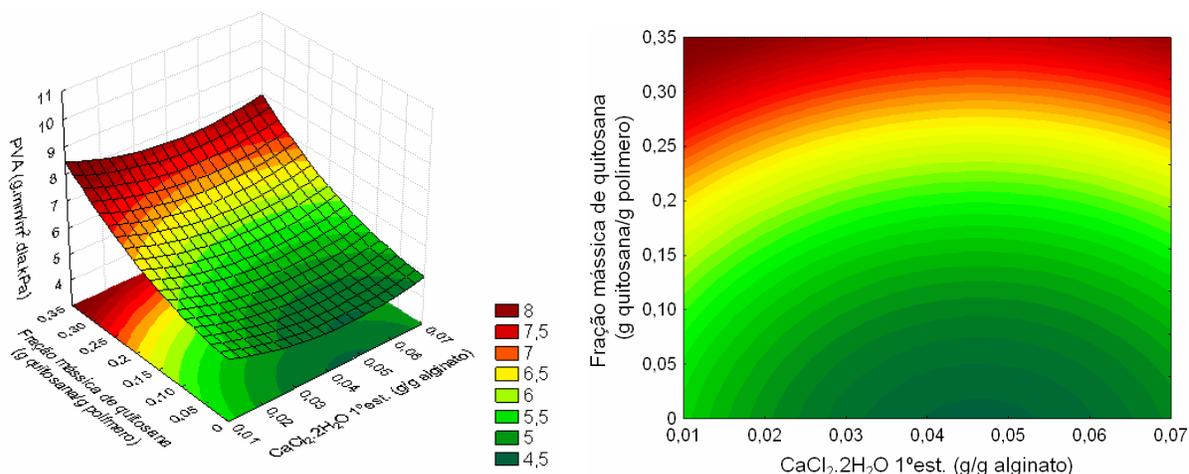


Figura 4.8: Superfície de resposta e curva de contorno para a permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de alginato e quitosana em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e da fração mássica de quitosana

Pode-se observar o efeito pronunciado do aumento da fração mássica de quitosana no PVA dos filmes compostos, aumentando o valor desta propriedade. Isto indica que a reticulação das cadeias de alginato parece ser mais efetiva e homogênea com íons cálcio do que com a quitosana. Isto se deve, provavelmente, à formação de fibras durante a reticulação do alginato com a quitosana, ocasionando a formação de caminhos intersticiais livres, favorecendo a migração das moléculas de água. A literatura sugere que seja feito um estado de pré-gel na solução de alginato com íons cálcio para aumentar os espaços entre as cadeias do polímero e facilitar a entrada e ligação do alginato com a quitosana (De *et al.*, 2003), o que também pode estar favorecendo a passagem das moléculas de água através da matriz polimérica.

4.2.2.3 Grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana

Pela Tabela 4.19, pode-se verificar que os valores de grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana variaram entre 0,72 e 2,03 g H_2O /g amostra, sendo que o maior valor foi encontrado para o filme que continha a mais alta fração mássica de quitosana (Ensaio 8). Os menores valores foram encontrados nas formulações com a menor fração mássica de quitosana (Ensaio 1, 3 e 7). Os valores dos efeitos das

variáveis concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e fração mássica de quitosana sobre o grau de intumescimento dos filmes compostos estão apresentados na Tabela 4.27.

Tabela 4.27: Efeito das variáveis estudadas sobre o grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fator</i>		<i>Efeito</i> (g H_2O /g amostra)	<i>Desvio</i> <i>padrão</i>	<i>p</i> (95% de <i>confiança</i>)
	média	0,9790	0,0315	0,0010*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,1628	0,0374	0,0490*
	Fração mássica de quitosana [x_2]	0,6621	0,0386	0,0034*
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	-0,2514	0,0419	0,0266*
	Fração mássica de quitosana	0,3301	0,0464	0,0192*
Interação	x_1x_2	-0,0969	0,0545	0,2175

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Pode-se observar que a um nível de significância de 5%, apenas o termo de interação entre as variáveis estudadas não foi estatisticamente significativo. As variáveis concentração de CaCl_2 no 1º estágio e fração mássica de quitosana apresentaram efeitos opostos, sendo o de primeira negativo e o da segunda positivo. Observa-se que o efeito positivo provocado pela variável fração mássica de quitosana foi 4 vezes maior que o efeito negativo da concentração de CaCl_2 na etapa de pré-reticulação.

Os coeficientes das variáveis estudadas através da regressão, excluindo o termo não significativo, estão apresentados na Tabela 4.28. Estes foram utilizados para a construção do modelo quadrático codificado proposto pela Equação 4.8.

Tabela 4.28: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para o grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fatores</i>		<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
	Média	0,9790	0,0010*
Linear	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio) [x_1]	-0,0814	0,0490*
	Fração mássica de quitosana [x_2]	0,3310	0,0034*
Quadrático	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1º estágio)	-0,1257	0,0266*
	Fração mássica de quitosana	0,1650	0,0192*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

$$GI = 0,9790 - 0,0814x_1 - 0,1257x_1^2 + 0,3310x_2 + 0,1650x_2^2 \quad (4.8)$$

Os resultados da análise de variância para o ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto estão apresentados na Tabela 4.29. Pode-se considerar que o modelo estatístico é válido uma vez que o valor de $F_{calculado} > F_{tabelado}$. O coeficiente de determinação (R^2) indica que para os filmes compostos, 88% da variação no grau de intumescimento pode ser explicada através do modelo da Equação 4.8.

Tabela 4.29: Análise de variância para o grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	1,3079	4	0,3270	10,63	4,53
Resíduos	0,1846	6	0,0308		
Falta de ajuste	0,1786	4	0,0447	15,01	19,25
Erro puro	0,0059	2	0,0030		
Total	1,4925	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,876$, R^2 ajustado = 0,794

A superfície de reposta e a curva de contorno que representa a variação do grau de intumescimento em função das variáveis estudadas estão apresentadas na Figura 4.9. Pode-se observar que os menores valores de GI foram obtidos utilizando-se frações mássicas inferiores a 0,15 e concentrações de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ no 1º estágio próxima de 0,07 g/g alginato.

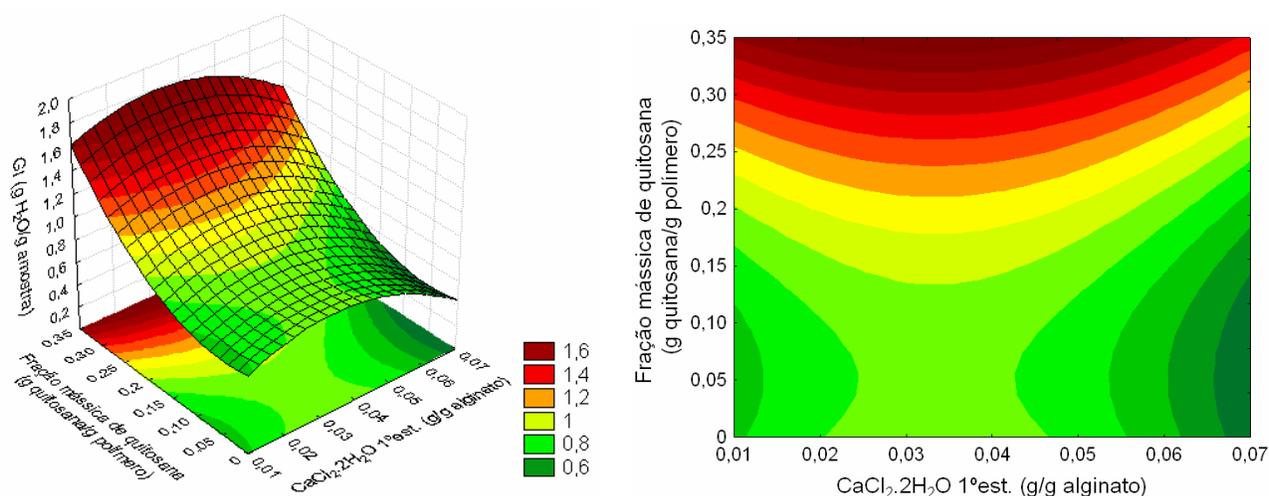


Figura 4.9: Superfície de resposta e curva de contorno para o grau de intumescimento dos filmes compostos de alginato e quitosana em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e da fração mássica de quitosana

4.2.2.4 Propriedades mecânicas: Tensão e alongamento na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

Da mesma forma que para os filmes de alginato puro, optou-se por avaliar conjuntamente as propriedades mecânicas (tensão e alongamento na ruptura) dos filmes compostos de alginato e quitosana. Observa-se, através dos dados da Tabela 4.19, que há uma tendência de diminuição significativa da tensão de ruptura acompanhada de um aumento significativo na elasticidade dos filmes compostos conforme a fração mássica de quitosana aumenta. Esta tendência pode ser evidenciada observando-se os valores dos efeitos das variáveis estudadas na tensão (Tabela 4.30) e alongamento (Tabela 4.31) de ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana. Observa-se que a fração mássica de quitosana apresenta um efeito negativo sobre a tensão de ruptura e um efeito positivo no alongamento dos filmes estudados. Ou seja, ao aumentar o nível da variável fração mássica de quitosana de 0,05 (-1) para 0,30 (+1) obtêm-se, em média uma diminuição de 29,3 MPa e um aumento de 8,1% na tensão e alongamento na ruptura dos filmes, respectivamente. Para a variável tensão de ruptura, a concentração de CaCl_2 no 1º estágio não apresentou significância estatística a um nível de probabilidade de 5%, enquanto que para o alongamento, o termo de interação não foi significativo.

Tabela 4.30: Efeito das variáveis estudadas sobre a tensão na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fatores</i>		<i>Efeito</i> (MPa)	<i>Desvio</i> <i>padrão</i>	<i>p (95% de</i> <i>confiança)</i>
	média	70,3948	1,211320	0,0003*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio) [x ₁]	2,5082	1,440707	0,2238
	Fração mássica de quitosana [x ₂]	-29,2817	1,486582	0,0026*
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio)	-8,9990	1,611880	0,0306*
	Fração mássica de quitosana	10,5175	1,788225	0,0277*
Interação	x ₁ x ₂	-14,3844	2,100173	0,0207*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Tabela 4.31: Efeito das variáveis estudadas sobre o alongamento na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fatores</i>		<i>Efeito (%)</i>	<i>Desvio</i> <i>padrão</i>	<i>p (95% de</i> <i>confiança)</i>
	média	10,9263	0,4500	0,0017*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1º estágio) [x ₁]	-3,7492	0,5352	0,0198*
	Fração mássica de quitosana [x ₂]	8,0887	0,5523	0,0046*
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (2º estágio)	3,3091	0,5988	0,0312*
	Fração mássica de quitosana	3,5898	0,6643	0,0326*
Interação	x ₁ x ₂	0,0968	0,7802	0,9126

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, $p < 0,05$)

Os coeficientes obtidos pela regressão dos dados estão apresentados nas Tabela 4.32 e Tabela 4.33, para a tensão e o alongamento na ruptura, respectivamente. No caso da tensão de ruptura o termo linear da variável concentração de CaCl₂ no 1º estágio não foi excluído, pois o seu termo quadrático e a interação foram significativos. A partir destes dados foram construídos os modelos quadráticos codificados que relacionam as propriedades mecânicas em função da concentração de CaCl₂ no 1º estágio e da fração mássica de quitosana, na faixa estudada (Equações 4.9 e 4.10).

Tabela 4.32: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para a tensão na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

	<i>Fatores</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
	Média	70,3948	0,0003*
Linear	CaCl ₂ .2H ₂ O (1° estágio) [x ₁]	1,2541	0,2238
	Fração mássica de quitosana [x ₂]	-14,6409	0,0026*
Quadrático	CaCl ₂ .2H ₂ O (1° estágio)	-4,4995	0,0306*
	Fração mássica de quitosana	5,2587	0,0277*
Interação	x ₁ x ₂	-7,1922	0,0207*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, p < 0,05)

Tabela 4.33: Coeficientes codificados estimados para as variáveis, excluindo termos não significativos, para o alongamento na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

	<i>Fatores</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Valor p</i>
	Média	10,9263	0,0017*
Linear	CaCl ₂ (1° estágio) [x ₁]	-1,8746	0,0198*
	Fração mássica de quitosana [x ₂]	4,0443	0,0046*
Quadrático	CaCl ₂ (1° estágio)	1,6545	0,0312*
	Fração mássica de quitosana	1,7949	0,0326*

* Fatores significativos ao nível de significância de 95% (ou seja, p < 0,05)

$$TR = 70,3948 + 1,2541x_1 - 4,4995x_1^2 - 14,6409x_2 + 5,2587x_2^2 - 7,1922x_1x_2 \quad (4.9)$$

$$Alongamento = 10,9263 - 1,8756x_1 + 1,6545x_1^2 + 4,0443x_2 + 1,7949x_2^2 \quad (4.10)$$

Através da determinação da análise de variância (Tabelas 4.34 e 4.35, para TR e alongamento, respectivamente) é possível concluir que os modelos propostos pelas Equações 4.9 e 4.10 para a tensão e o alongamento na ruptura, respectivamente, são válidos uma vez que seus valores de $F_{calculado}$ foram superiores a 5 vezes os valores de $F_{tabelado}$. Os modelos também não apresentaram falta de ajuste. Os coeficientes de determinação foram altos, podendo-se dizer que 96% da variação na tensão de ruptura e 95% da variação no alongamento dos filmes compostos de alginato e quitosana podem ser explicadas através das Equações 4.9 e 4.10, respectivamente. Estas equações foram então utilizadas para a

construção das superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno apresentadas nas Figuras 4.10 e 4.11.

Tabela 4.34: Análise de variância para a tensão na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	2357,0080	5	471,4016	25,46	50,05
Resíduos	92,56	5	18,512		
Falta de ajuste	83,739	3	27,9130	6,33	19,16
Erro puro	8,821	2	4,4105		
Total	2449,568	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,962$, R^2 ajustado = 0,924

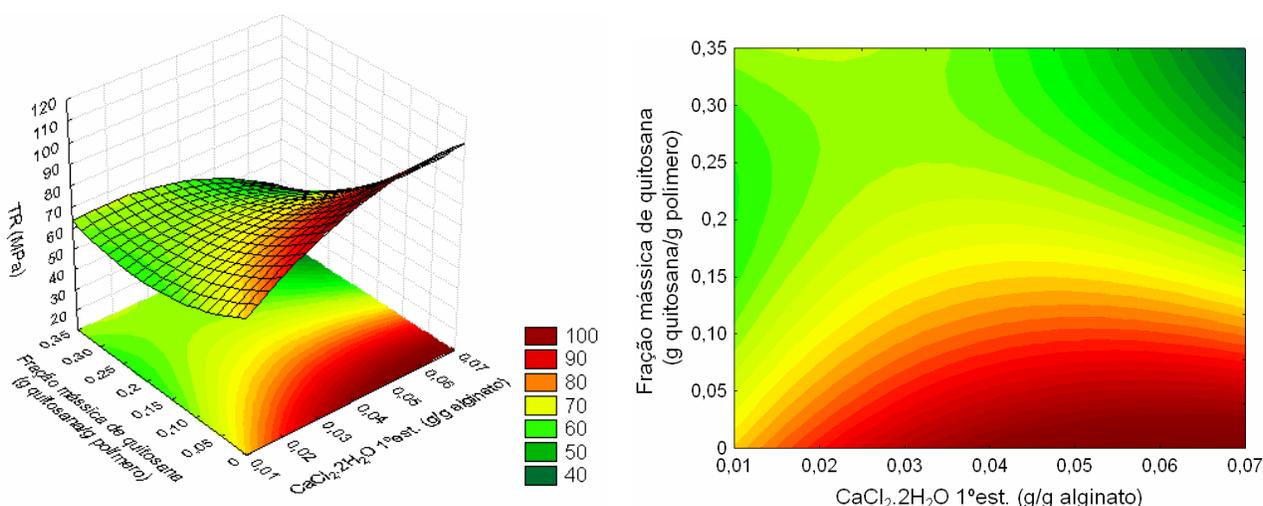


Figura 4.10: Superfície de resposta e curva de contorno para a tensão na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e da concentração de quitosana

As propriedades mecânicas dos filmes compostos de alginato e quitosana apresentam a mesma tendência dos filmes de alginato puro, tendo-se um aumento na tensão de ruptura e uma diminuição do alongamento à medida que a concentração de CaCl_2 no primeiro estágio aumenta, explicada pela desenvolvimento da rede reticulada entre os grupos carboxílicos e os íons cálcio. Por outro lado, a presença de quitosana aumentou

consideravelmente o alongamento na ruptura dos filmes. Os valores de alongamento na ruptura previstos para os filmes com 35% de quitosana tendem a se aproximar dos valores de alongamento de filmes de quitosana pura encontrados na literatura de aproximadamente 30% (Li *et al.*, 2006, Caner *et al.*, 1998).

Tabela 4.35: Análise de variância para o alongamento na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma dos quadrados (SQ)</i>	<i>Graus de Liberdade (GL)</i>	<i>Média Quadrática (SQ/GL)</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>F_{tabelado}</i>
Regressão	188,0379	4	47,0095	27,50	4,53
Resíduos	10,2550	6	1,7092		
Falta de ajuste	9,0374	4	2,2593	3,71	19,25
Erro puro	1,2176	2	0,6088		
Total	198,2929	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro, $R^2 = 0,948$, R^2 ajustado = 0,914

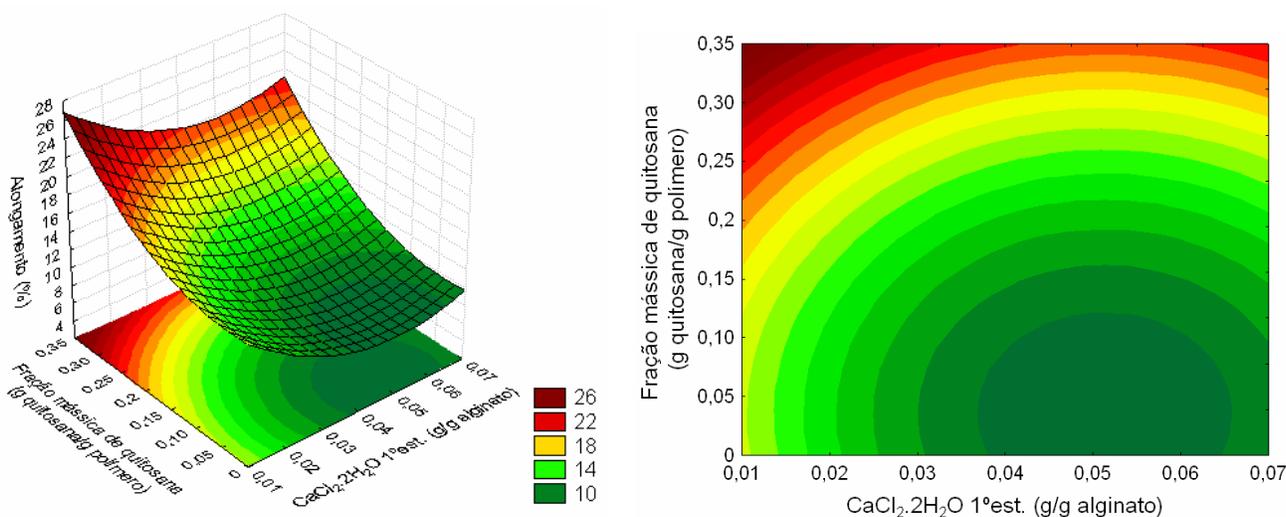


Figura 4.11: Superfície de resposta e curva de contorno para o alongamento na ruptura dos filmes compostos de alginato e quitosana em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no 1º estágio e da concentração de quitosana

4.2.3 Seleção dos filmes compostos de alginato e quitosana

Pela análise das respostas individuais realizadas com as respostas do planejamento dos filmes compostos, é possível concluir que, contrariamente ao que se esperava, a adição de quitosana na formulação dos filmes não foi capaz de melhorar (reduzir) as propriedades de massa solubilizada em água, grau de intumescimento e PVA, comparado aos filmes de alginato puro. No entanto, a principal diferença nos filmes contendo quitosana é o aumento no alongamento, característica desejável para biofilmes destinados a aplicações em alimentos, visto que os mesmos devem possuir flexibilidade suficiente para adaptar-se a eventuais deformações no alimento sem dano mecânico.

Mesmo não melhorando a maioria das características em relação aos filmes de alginato, os filmes compostos de alginato e quitosana ainda apresentam propriedades interessantes em relação às propriedades de filmes produzidos a partir de outros biopolímeros. Complementando, estes filmes foram desenvolvidos por atuarem como veículos de princípios ativos e o efeito da incorporação destes solutos sobre as propriedades dos filmes e a capacidade de liberação de antimicrobianos precisa ser estabelecida. Neste caso não foi estabelecida uma formulação otimizada para os filmes de alginato e quitosana, pois se os mesmos objetivos aplicados para a determinação da formulação otimizada dos filmes de alginato puro fossem levados em conta tender-se-ia a escolher filmes de alginato sem quitosana e com uma concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em torno de 0,04.

Desta forma, selecionou-se duas formulações de filmes compostos com fração mássica intermediária (0,175) e máxima (0,35) de quitosana, mantendo-se constantes as demais condições experimentais adotadas na formulação otimizada para os filmes de alginato puro (concentração de CaCl_2 no 1º estágio de 0,04 g/g alginato, concentração de CaCl_2 no 2º estágio de 5 g/100 mL e tempo de imersão de 30 minutos). Para simplificar estes filmes foram denominados *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, para a formulação com fração mássica intermediária e máxima, respectivamente.

4.3 Caracterização complementar dos filmes de alginato e filmes compostos

Tendo em vista os resultados obtidos no planejamento experimental realizado para os filmes de alginato e quitosana, algumas análises de caracterização química e física foram realizadas nas três formulações selecionadas (filme de alginato, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) na tentativa de se elucidar alguns aspectos da interação entre estes dois

polímeros nas condições reacionais utilizadas. Os resultados destas análises estão descritos a seguir nos Itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3.

4.3.1 Concentração de cálcio

A concentração de cálcio nos filmes de alginato e *Filmes Compostos 1 e 2* (antes e após a reticulação do 2º estágio) foi determinada por espectrometria de absorção atômica e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.36. Observa-se que nos filmes com apenas o primeiro estágio, a concentração de cálcio não apresentou diferença significativa, uma vez que a adição de cálcio foi proporcional à massa de alginato existente nas três formulações. No entanto, foi observada uma diminuição significativa no conteúdo de cálcio com o aumento da concentração de quitosana no filme após o tratamento (2º estágio). Estes resultados se correlacionam bem com as tendências encontradas para o grau de intumescimento, massa solubilizada em água, PVA e propriedades mecânicas, confirmando que um maior grau de reticulação das cadeias poliméricas pelo cálcio é obtido no filme de alginato puro comparado aos filmes compostos.

Tabela 4.36: Concentração de cálcio nos filmes das formulações otimizadas

<i>Filme</i>	Ca^{+2} ($\mu\text{mol Ca/mg}$ massa seca de alginato)	
	<i>1º estágio</i>	<i>2º estágio</i>
Alginato	0,386 (0,008) ^a	2,150 (0,016) ^a
<i>Filme Composto 1</i>	0,390 (0,014) ^a	1,852 (0,013) ^b
<i>Filme Composto 2</i>	0,397 (0,025) ^a	1,776 (0,026) ^c

Média (desvio padrão) de três determinações experimentais

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias (teste de Tukey)

Fazendo-se a diferença entre a concentração de cálcio dos filmes com e sem a etapa de reticulação final obtem-se, 1,764, 1,462 e 1,379 $\mu\text{mol Ca/mg}$ alginato para o filme de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, respectivamente. Esta concentração corresponde ao cálcio que foi incorporado à matriz polimérica durante o tratamento por imersão em solução de cloreto de cálcio. Este resultado permite concluir que a interação dos grupos NH_3^+ da quitosana com os grupos COO^- do alginato, nos filmes compostos, faz com que a quantidade de íons cálcio que participam da etapa de reticulação

do segundo estágio seja menor. Estes resultados também são um indicativo de que, nas condições reacionais utilizadas no presente trabalho, a reação de reticulação do alginato com íons cálcio foi mais intensa e refletiu em maiores mudanças nas propriedades dos filmes quando comparada às alterações provocadas pela interação das cadeias de alginato com a quitosana. A menor quantidade de cálcio encontrada nos filmes compostos corrobora com a informação obtida nos espectros de infravermelho (Item 4.3.2), de que as cadeias de quitosana estariam promovendo uma interação eletrostática com os grupos COO^- do alginato, dificultando o avanço da ligação entre o alginato e os íons cálcio.

Sartori *et al.* (1997) determinaram a concentração de cálcio por espectrometria de absorção atômica em filmes de alginato reticulados com íons cálcio por imersão dos mesmos em solução de cloreto de cálcio (0,8% m/m) em diferentes tempos (0 – 300 minutos), sem realização da etapa de 1º estágio e com etapa de lavagem dos filmes por 3 minutos em água destilada para retirar o excesso de cálcio. Nestas condições um filme de alginato reticulado por 30 minutos apresentou em média 3 $\mu\text{mol Ca/mg}$ alginato, sendo superior ao valor encontrado para o filme de alginato puro do presente trabalho (Tabela 3.46). No entanto, o alginato utilizado por estes autores era extraído da alga *Laminaria Hyperborea* e apresentava uma maior proporção de blocos G comparado ao alginato extraído da alga *Macrocystis pyrifera* utilizado no presente estudo. A difusão de uma maior concentração de cálcio poderia estar relacionada com a forte seletividade do cálcio pelos blocos G. Outra hipótese é que uma maior concentração de íons cálcio consiga difundir na matriz de alginato que não foi previamente reticulada (1º estágio).

Em outro trabalho, da Silva *et al.* (2009) obtiveram 4,354 $\mu\text{mol Ca/mg}$ alginato para filmes de alginato reticulados com 0,04g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / g alginato (1º estágio) e solução 3% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 30 minutos (2º estágio). Os filmes do referido estudo, no entanto, não foram submetidos à etapa de lavagem em água destilada para a retirada do excesso de cálcio. Sriamornsak e Kennedy (2008), utilizando o mesmo tipo de alginato do presente trabalho encontraram valores de concentração de cálcio semelhantes ao obtido para o filme de alginato puro, em filmes de alginato reticulados com solução de cloreto de cálcio.

4.3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) vem sendo amplamente utilizada para explicar qualitativamente a interação entre grupos funcionais de polímeros de cargas opostas (Simsek-Ege *et al.*, 2003). Desta forma, as possíveis modificações químicas ocasionadas nos filmes compostos foram analisadas por FTIR e os espectros de absorção no infravermelho dos filmes de alginato puro, quitosana puro e dos Filmes Compostos 1 e 2 podem ser observados na Figura 4.12. O filme de quitosana puro foi obtido segundo metodologia descrita no Item 3.3.4.

O filme de quitosana puro é tipicamente caracterizado por bandas de absorção nas seguintes regiões: uma banda intensa e larga com pico em 3350 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento axial das ligações O-H e N-H; bandas em 2931 e 2883 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento axial simétrico e assimétrico das ligações C-H; bandas centradas em 1649 cm^{-1} e em 1583 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C=O (conhecida como banda de amida I) e a deformação N-H de amina, bandas em 1421 e 1379 cm^{-1} resultantes da combinação do estiramento axial de C-N e da deformação angular de N-H; e as bandas em 1151 e 1036 cm^{-1} devido a estrutura polissacarídica incluindo as ligações glicosídicas, estiramentos dos grupos C-O e C-O-C. O espectro do filme de alginato puro mostrou picos característicos do estiramento dos grupos O-H, COO^- (simétrico), COO^- (assimétrico), C-O e C-O-C em 3330 , 1597 , 1421 , 1089 e 1034 cm^{-1} , respectivamente. As bandas entre 800 e 1200 , em ambos os polímeros, está relacionada com a estrutura polissacarídica. Estes picos correspondem a uma região chamada de “Impressão Digital” (*Finger print*) que é característica de cada polissacarídeo. Todas as bandas características encontradas nos filmes puros são semelhantes a dados descritos na literatura (Brugnerotto *et al.*, 2001; Canella e Garcia, 2001, Smitha *et al.*, 2005; Prashanth e Tharanathan, 2006; Charoenthai *et al.*, 2007; Sartori *et al.*, 1997).

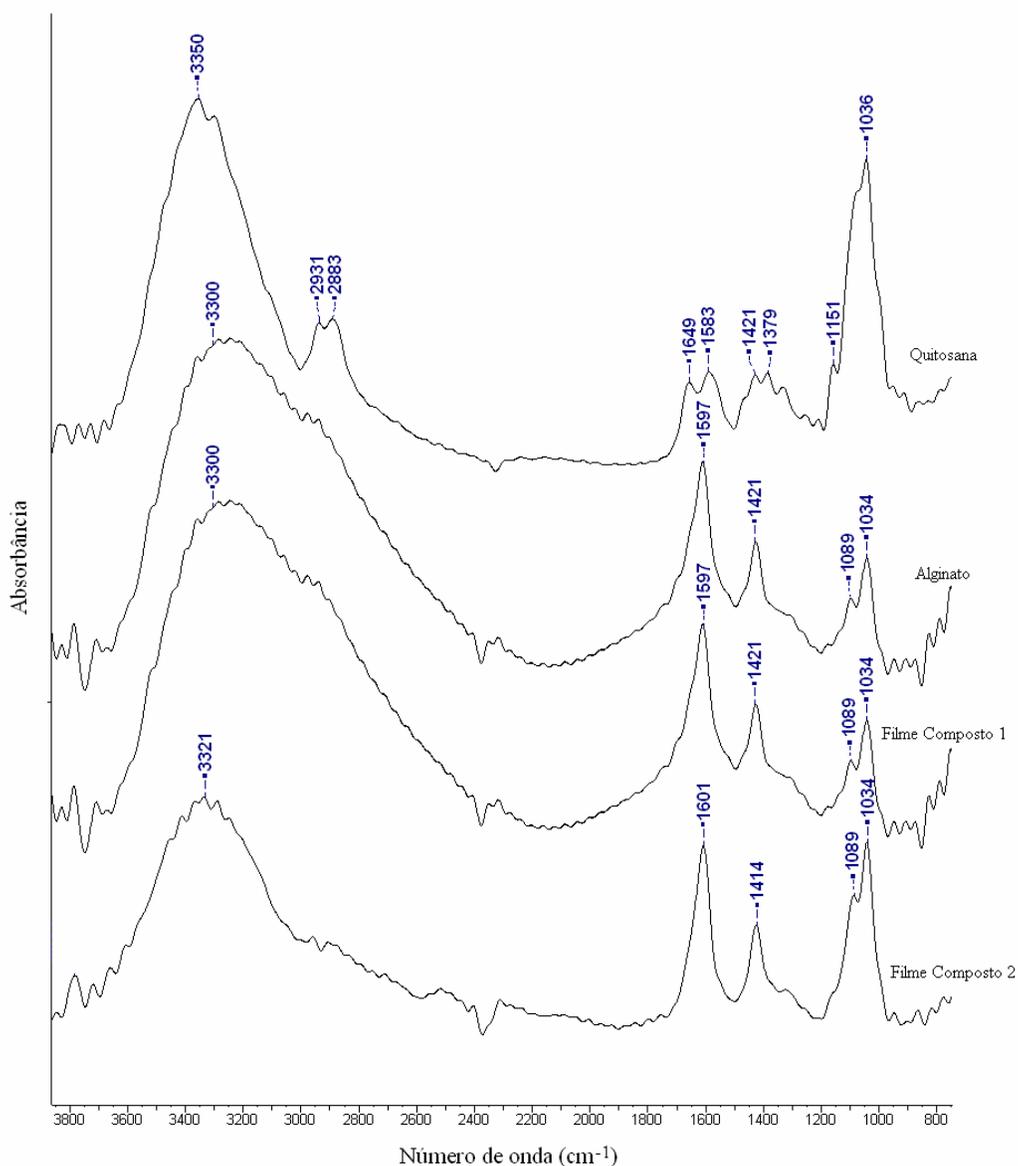


Figura 4.12: Espectros de infravermelho dos filmes de quitosana, alginato, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*

Comparando-se os espectros dos filmes dos polímeros puros com os das misturas verifica-se que há sobreposição das bandas de absorção características da quitosana e do alginato. Os espectros de infravermelho dos Filmes Compostos 1 e 2 repetiram os picos encontrados no espectro do filme de alginato, o que era esperado devido a maior proporção deste polímero nas misturas. A ausência de novas bandas e a preservação daquelas dos componentes puros pode ser um indicativo que as interações entre o alginato e a quitosana são puramente eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ da quitosana e COO^- do alginato, não havendo formação de ligação amídica. Resultados semelhantes foram observados por Tonhi

e Plepis (2002) em membranas de colágeno e quitosana, Charoenthai *et al.* (2007) e Simsek-Ege *et al.* (2003) estudando a formação de complexos de alginato e quitosana. Pinotti *et al.* (2007) também observaram que os espectros de FTIR de filmes compostos de quitosana e metilcelulose apresentaram preservação das bandas características dos polímeros puros, indicando pouca interação entre os mesmos, e que aumentando a concentração de quitosana, o espectro da mistura se aproximava ao do filme de quitosana puro. Por outro lado, Bernabé *et al.* (2005) observaram, através da análise dos espectros de infravermelho, a formação de ligações amídicas em membranas de quitosana e pectina tratadas termicamente (120°C por 2h). Estas membranas apresentaram uma redução de 50% no grau de intumescimento comparada as membranas originais não tratadas. No entanto não fica claro no trabalho qual foi a proporção de biopolímeros utilizada.

Simsek-Ege *et al.* (2003) relatam que complexos polieletrólíticos podem ser obtidos na forma de precipitados quando um polímero catiônico é misturado a um polímero aniônico em solução aquosa. A mistura das soluções poliméricas pode levar à precipitação mútua até mesmo em condições extremamente diluídas. Acredita-se que forças coulômbicas sejam as primeiras forças de ligação para a formação destes complexos, sendo que as interações acontecem principalmente entre os grupos ionizáveis de cargas opostas. Outras ligações, tais como pontes de hidrogênio ou ligações covalentes, também podem ser importantes na formação dos complexos. Este indicativo de atração eletrostática entre o alginato e a quitosana poderia explicar as características físicas observadas nos filmes compostos, ou seja, não se constatou os efeitos esperados nas propriedades de massa solubilizada em água, grau de intumescimento e PVA, comparado aos filmes de alginato puro. A mistura dos dois polímeros, nas condições reacionais utilizadas neste trabalho, não foi suficiente para produzir filmes homogêneos que não eram totalmente solubilizados em água, sendo necessária a realização da segunda etapa de reticulação com íons cálcio.

Através das observações subjetivas feitas no decorrer do trabalho, observando-se um limite crítico na quantidade de quitosana possível de ser adicionada sem comprometer a aparência e as características físicas, juntamente com evidências relatadas na literatura, é possível concluir que a formação de complexos polieletrólíticos insolúveis entre o alginato e a quitosana impossibilita a formação de uma matriz homogênea, desejada para a aplicação como embalagem para alimentos.

4.3.3 Análise dinâmico-mecânica (DMA)

A técnica de análise dinâmico-mecânica (DMA), também conhecida como análise térmica dinâmico-mecânica (DTMA), tem como uma de suas principais aplicações a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) de materiais. Os métodos dinâmico-mecânicos são muito sensíveis às transformações (ou movimentos) que ocorrem em nível molecular, sendo capazes de detectar movimentos significativos, denominados relaxações primárias (representadas pela letra grega α , por exemplo, a T_g , ou temperatura de fusão de cristais, T_m , de polímeros parcialmente cristalinos), bem como movimentos mais discretos como relaxações secundárias (Champion *et al.*, 2000; Lucas *et al.*, 2001; Mendieta-Taboada *et al.*, 2008).

Em biopolímeros, geralmente, a faixa de temperatura em que a transição vítrea (T_g) de biopolímeros ocorre é ampla e as mudanças no fluxo de calor decorrentes deste tipo de transição são sutis e difíceis de serem detectadas (Kalichevsky *et al.*, 1993). Desta forma, os métodos dinâmico-mecânicos parecem ser mais apropriados para este tipo de determinação quando comparados à calorimetria diferencial exploratória (DSC).

O conhecimento da temperatura de transição vítrea é essencial para a definição das condições de armazenamento, manuseio e transporte de biofilmes. A T_g de matrizes poliméricas destinadas à utilização como embalagem ativa devem ser próximas à temperatura de utilização. Se a T_g do filme for muito abaixo desta temperatura, poderá haver modificações das características físicas da estrutura polimérica inviabilizando a sua utilização. Em caso contrário, o filme vitrifica e não haverá difusão.

O comportamento dinâmico-mecânico dos filmes em função da temperatura foi avaliado através de análise dinâmico-mecânica (DMA), conforme metodologia descrita no Item 3.5.14. A transição vítrea está associada a uma inflexão na curva do módulo de armazenamento e/ou a um pico na curva de $\tan \delta$. Segundo Champion *et al.* (2000), fisicamente, a temperatura da transição vítrea seria representada pelo pico em $\tan \delta$, sendo este parâmetro utilizado pela maioria dos trabalhos na área de tecnologia de biofilmes. Um gráfico comparativo das curvas de $\tan \delta$ dos filmes de quitosana e alginato e dos *Filmes Compostos 1* e *2* está apresentado na Figura 4.13. Os gráficos individuais de cada filme com o registro dos módulos de armazenamento (E') e perda (E'') estão apresentados no Apêndice C. Os filmes simples de alginato e quitosana e os *Filmes Compostos 1* e *2*

apresentaram comportamentos característicos de polímeros amorfos, onde os picos das curvas de $\tan \delta$ correspondem a uma transição típica do estado vítreo para o estado gomoso (Cherian *et al.*, 1995).

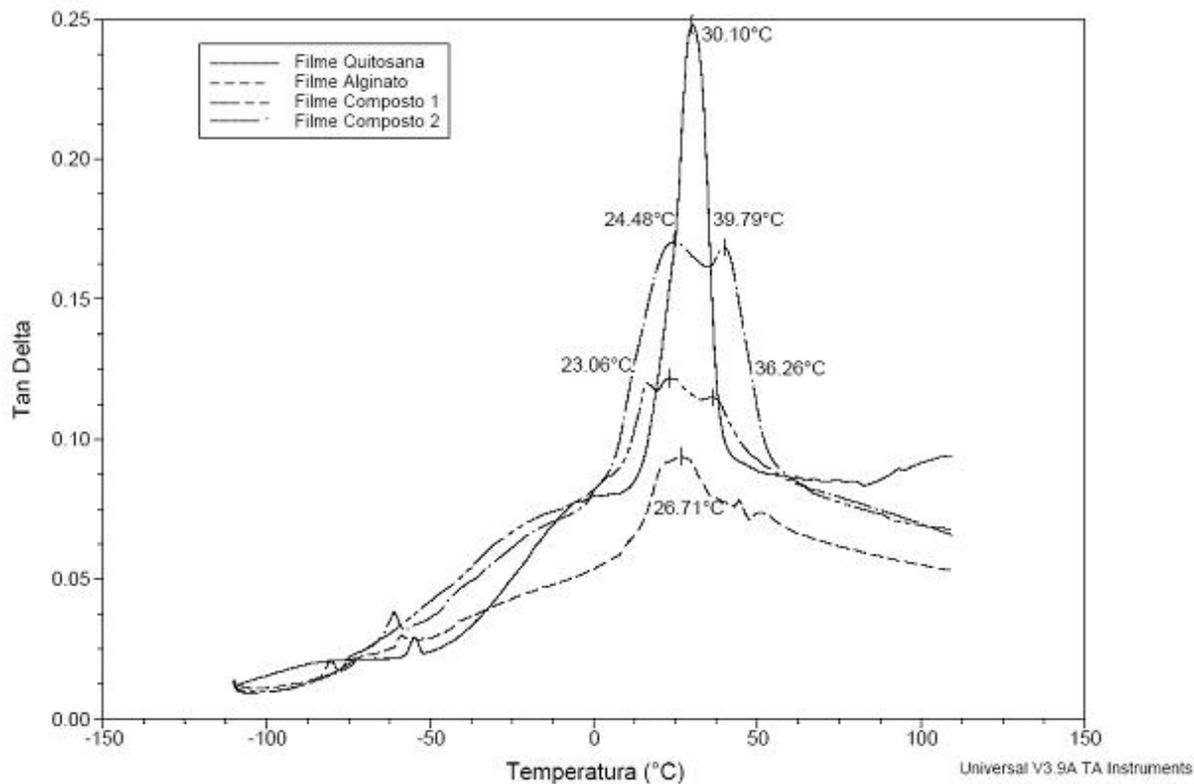


Figura 4.13: Comparação entre as curvas de $\tan \delta$ dos filmes de quitosana pura (—), alginato puro(---), *Filme Composto 1* (— · —) e *Filme Composto 2* (— · ·)

A temperatura de transição vítrea de uma mistura de polímeros é normalmente utilizada como critério para avaliar a miscibilidade dos componentes. Lucas *et al.* (2001) afirmam que sistemas miscíveis apresentam apenas um pico combinado, cuja localização dependerá do sistema. Os filmes de quitosana e alginato puros apresentaram uma única queda na curva do módulo de armazenamento, assim como um único pico de $\tan \delta$ (em 30,10 e 26,71°C, para o filme de quitosana e de alginato, respectivamente), ou seja, não foi observada evidência de separação de fases para estes filmes. Zactiti (2004) determinou uma Tg de 24,92°C para um filme de alginato de sódio (da mesma fonte e com a mesma concentração de glicerol e íons cálcio no primeiro estágio utilizada neste trabalho), porém sem tratamento posterior com solução reticuladora. No entanto, o mesmo filme reticulado por aspersão da superfície do filme com solução 5% de CaCl_2 apresentou dois picos na

curva de $\tan \delta$ (14,44 e 31,27°C). A autora atribui o aparecimento dos dois picos à ligação mais seletiva dos íons cálcio nas regiões ricas em blocos GG nas cadeias de alginato, de modo que a primeira transição estaria relacionada aos blocos MM e MG e a segunda com os blocos GG.

Os *Filmes Compostos 1 e 2*, por sua vez, apresentaram duas temperaturas de transição vítrea (dois picos de $\tan \delta$), sendo a primeira em uma temperatura mais baixa e a outra mais alta em relação as Tg's dos filmes dos polímeros puros (23,06/36,26°C e 24,48/39,79°C para o *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, respectivamente). O filme de quitosana puro, conforme descrito no Item 3.3.4, não foi submetido a etapa de reticulação (2º estágio). Nas condições de acondicionamento, este filme apresentou um conteúdo de umidade maior (em torno de 0,35 g/g filme), em relação aos outros filmes, e conseqüentemente a Tg da quitosana pode ter sido deslocada para uma temperatura mais baixa devido ao efeito plastificante da água. O efeito plastificante da água sobre a Tg é relacionado a um incremento no volume livre, diminuição das forças das interações intermoleculares e incremento na mobilidade das cadeias, e tem sido extensamente relatado na literatura para diversas macromoléculas (Slade e Levine, 2001; Lazaridou e Biliaderis, 2002; Lazaridou *et al.*, 2003). Assim pode-se supor que a Tg mais elevada nos filmes compostos estaria relacionada à quitosana, enquanto que a mais baixa seria referente à fração de alginato.

Assim, em conjunto com as análises de FTIR (Item 4.3.2) e propriedades físicas apresentadas pelos filmes compostos, pode-se supor que estes estariam apresentando separação de fases entre o alginato e a quitosana. A presença de dois picos de $\tan \delta$ e o alargamento observado na base dos picos de $\tan \delta$ dos filmes compostos pode estar relacionada à presença de separação de fases e micro-heterogeneidades do sistema (Gontard e Ring, 1996; Biliaderis *et al.*, 1999; Irissin-Mangata *et al.*, 2001, Famá *et al.* 2006; Kristo e Biliaderis, 2006).

Lazaridou e Biliaderis (2002) encontraram apenas uma Tg para filmes compostos de quitosana e amido e quitosana e pulunana, no entanto os autores destacam que o aparecimento de apenas um pico de $\tan \delta$ não implica necessariamente em uma miscibilidade do sistema a nível molecular, pois análises preliminares de imagens de microespectroscopia de FTIR indicaram claramente que havia microseparação de fases

entre os dois polímeros. A manifestação de uma única Tg em curvas de DMA de misturas pode ser atribuída à proximidade das Tg's individuais dos componentes poliméricos e um efeito plastificante similar. Assim, a utilização isolada do resultado da análise de DMA pode não ser conclusiva em relação à presença ou não de separação de fases em sistemas poliméricos, devendo esta estar associada a outros métodos analíticos.

A altura do pico de $\tan \delta$ tem sido relacionada com o grau de reticulação das cadeias poliméricas (Debeaufort e Voilley, 1997). Galiotta *et al.* (1998) observaram uma diminuição acentuada na amplitude do pico de $\tan \delta$ com o aumento da concentração do agente reticulante em filmes de proteína de soro de leite. Neste sentido, observa-se que a amplitude dos picos de $\tan \delta$ apresentados na Figura 4.15 sugerem que o grau de reticulação estaria aumentando na seguinte ordem: Filme de alginato > *Filme Composto 1* > *Filme Composto 2*. Esta tendência corrobora com os dados obtidos para concentração de cálcio nos filmes e também com as propriedades físicas observadas.

Na Figura 4.13 também pode-se observar a presença de fenômenos de relaxações secundárias em temperaturas negativas. Estas transições normalmente ocorrem abaixo da Tg e são representadas pelas letras gregas β , γ , δ , etc, na ordem que ocorrem da temperatura mais alta para a mais baixa. As transições secundárias estão relacionadas à relaxação de grupos, ou parte de grupos, laterais da cadeia polimérica quando a cadeia principal como um segmento contínuo não apresenta movimento (Lucas *et al.*, 2001; Lazaridou *et al.*, 2003). A ordem de grandeza destas transições é muito menor que a da α -relaxação principal e podem estar associadas a fenômenos de separação de fases entre a fração rica em polímero e a fração rica em plastificante (Sobral *et al.*, 2001). Esses fenômenos secundários também têm sido observados em biofilmes de pululana (Lazaridou *et al.*, 2003), caseinato de sódio (Kristo *et al.*, 2008) e quitosana-amido e quitosana-pululana (Lazaridou e Biliaderis, 2002).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO: FILMES ATIVOS

Nesta parte do trabalho estão apresentados os resultados e discussão pertinentes aos filmes de alginato e filmes compostos de alginato e quitosana contendo os agentes antimicrobianos (natamicina e sorbato de potássio). O capítulo foi dividido em 3 partes, sendo que a primeira apresenta os ensaios preliminares de incorporação dos agentes ativos nas matrizes poliméricas e a avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes ativos, frente a três microrganismos selecionados. No Item 5.2 estão apresentados os perfis de liberação da natamicina em água e a determinação dos coeficientes de difusão nas matrizes testadas. Por fim, no Item 5.3 tem-se a caracterização dos filmes ativos.

5.1 Filmes ativos (Formulações otimizadas)

As formulações selecionadas de acordo com os resultados obtidos nos planejamentos experimentais (Itens 4.2.3 e 4.3.3) para os filmes de alginato puro e para os filmes compostos de alginato e quitosana, respectivamente, foram utilizadas para a incorporação de agentes antimicrobianos. A efetividade destes agentes na inibição do crescimento microbiológico de algumas espécies de fungos selecionadas (Item 3.6.4.1), bem como a cinética de liberação da natamicina nos filmes ativos foram avaliadas. Por fim, estes filmes foram caracterizados para poder validar os planejamentos experimentais e determinar a influência da adição dos agentes antimicrobianos nas características dos mesmos.

5.1.1 Ensaios de incorporação de sorbato de potássio em filmes de alginato puro

Inicialmente foram produzidos filmes de alginato puro (conforme formulação otimizada, Item 4.1.3) ativos contendo diferentes concentrações de sorbato de potássio como agente antimicrobiano. As concentrações testadas foram 0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2 g/100g de solução filmogênica, ou em base de massa de polímero, 0,17, 0,33, 0,67, 1 e 1,33 g/g alginato. O sorbato de potássio era adicionado no solvente, antes da adição do biopolímero.

O processo de confecção de filmes de alginato envolve o contato dos filmes com soluções de CaCl_2 , no 1º e no 2º estágio. Os antimicóticos mais empregados pela indústria alimentícia, o sorbato de potássio e o benzoato de sódio formam sais insolúveis com o cálcio. Estes sais tendem a se depositar sobre a superfície do filme, tornando-os inadequados para o uso. Os filmes de alginato puro contendo sorbato de potássio em concentrações acima de 0,5 g/100g de solução apresentavam-se opacos e com depósitos de sorbato de cálcio na sua superfície (pó branco). Na concentração de 0,5 g/100g solução observou-se a formação de cristais no interior da estrutura polimérica, o que não invalida a liberação controlada desse agente (aliás, poderia até melhorar essa ação), porém prejudica as características mecânicas dos mesmos, assim como sua aparência. Como consequência, constatou-se que o limite crítico de adição de sorbato de potássio é de 0,25g/100 mL de solução filmogênica ou 0,17g sorbato/g alginato. Bertan (2008) mostrou que filmes ativos compostos de amido e gelatina e glúten e gelatina contendo sorbato de potássio são eficientes contra certos tipos de espécies fúngicas se a concentração desse agente ativo for pelo menos 8 vezes superior ao limite prático obtido com os filmes de alginato neste trabalho. Este mesmo autor relata que os filmes tornavam-se amarelados com o aumento da concentração do sorbato e que em alguns casos houve precipitação de sorbato na superfície do filme. Zactiti (2004) estabeleceu um máximo de 0,2 g/100 mL de solução filmogênica (0,13 g/g alginato), pois acima desta concentração de sorbato os filmes eram opacos e esbranquiçados. Turbiani (2007), trabalhando com filmes de alginato reticulados com benzoato de cálcio, constatou que a máxima concentração deste agente ativo possível de se obter filmes sem precipitação era 0,33 g/100 g de solução (0,22 g/g alginato). Flores *et al.* (2007a) estudando a difusão do sorbato de potássio em filmes de amido de mandioca, utilizaram este agente ativo na concentração de 0,3 g/g de amido. Porém, nestes trabalhos, a ação antimicrobiana dos filmes não foi avaliada.

Também foi testada a adição do sorbato de potássio durante o tratamento do 2º estágio com o intuito de maximizar a saturação do filme com o antimicrobiano e evitar a perda do mesmo no 2º estágio. Os resultados, entretanto, foram frustrados pela formação de um depósito de cristais de sorbato de cálcio sobre o filme, que se iniciava no momento da imersão do filme no banho, e se intensificava após a secagem. Turbiani (2007) observou esta mesma tendência ao tratar filmes de alginato com benzoato de cálcio.

Silveira (2005) constatou que a adição de ácido sórbico em concentração acima de 9%(m/m) em filmes de celulose resultava em filmes quebradiços e opacos.

Com base nas observações práticas sobre o limite de adição deste antimicrobiano e resultados de outros trabalhos relatados na literatura, decidiu-se testar a atividade antimicrobiana dos filmes de alginato puro contendo sorbato de potássio na concentração de 0,25 g/100 g de solução filmogênica. Os resultados deste teste estão descritos a seguir (Item 5.1.1.1).

5.1.1.1 Efeito antimicrobiano em filmes de alginato puro contendo sorbato de potássio

O teste de difusão em ágar é um método comumente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana frente à difusão de um componente testado através de um meio de cultura solidificado. A difusão depende do tamanho, da forma e polaridade do material testado. A estrutura química e o grau de reticulação dos filmes também afetam este fenômeno (Cagri *et al.*, 2001). Quando um agente antimicrobiano é incorporado, haverá a difusão do mesmo no ágar, resultando na formação de uma zona de inibição do crescimento microbiano.

O teste de difusão em ágar (Teste do Halo), conforme descrito no Item 3.6.4, foi realizado para os filmes de alginato puro contendo 0,25 g sorbato/100 g solução filmogênica. Com a suspeita de que a difusão do sorbato, da matriz polimérica para o meio externo, pudesse estar sendo impedida pelo alto grau de reticulação obtido no filme de alginato puro devido ao tratamento com cálcio no 2º estágio, avaliou-se o efeito do filme ativo antes e após a realização do 2º estágio. A eficácia do tratamento dos filmes através da exposição dos mesmos em luz ultravioleta por 30 min de cada lado antes dos ensaios também foi verificada. Fotografias das placas após 5 dias de incubação estão apresentadas na Figura 5.1.

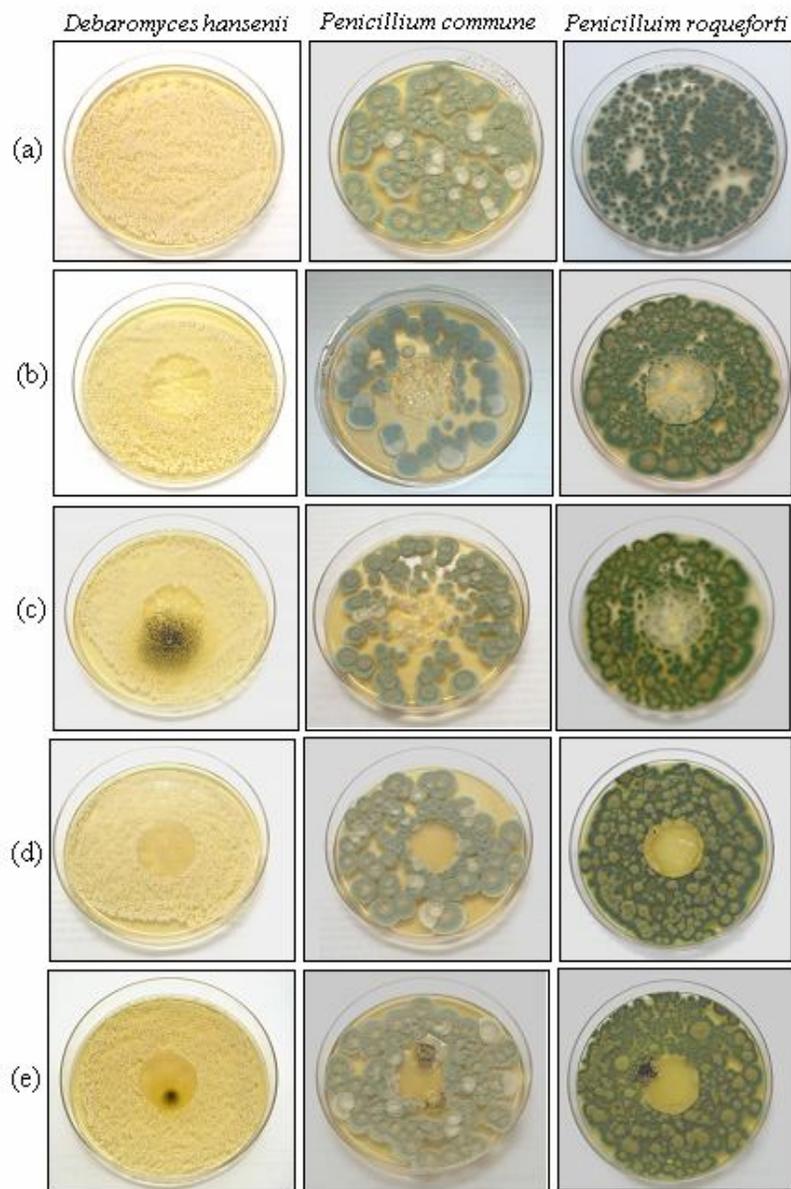


Figura 5.1: Efeito antimicrobiano em filmes de alginato puro contendo sorbato de potássio (0,25 g/100g solução filmogênica) em presença dos microrganismos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após 5 dias de incubação): (a) controle (placa sem filme); (b) filme antes do 2º estágio/com UV; (c) filme antes do 2º estágio/sem UV; (d) filme após 2º estágio/com UV; (e) filme após 2º estágio/sem UV

Observando a Figura 5.1 pode-se verificar que em todos os tratamentos testados, o filme de alginato puro ativo (0,25 g sorbato/100 g solução filmogênica) não apresentou zona de inibição de crescimento, sendo constatado inclusive o crescimento de colônias sobre e sob a superfície do filme. Os dados de contagem das UFC/mL estão apresentados na Tabela 5.1. Percebeu-se neste ensaio que era necessário adequar o inóculo para uma

concentração inicial mais baixa para que fosse possível a contagem das placas e verificação se houve redução significativa da mesma. Observa-se que os filmes sem o 2º estágio apresentaram um alto intumescimento da matriz polimérica e um aumento considerável no diâmetro do filme (Figura 5.1 (b) e (c)), enquanto que os filmes com o 2º estágio mantiveram a integridade sem intumescimento visualmente perceptível (Figura 5.1 (d) e (e)). Quanto ao tratamento com luz UV, foi observado que nos ensaios sem esta etapa de assepsia dos filmes houve contaminação por outro microrganismo em quase todas placas (Figuras 5.1 (c) e (e)), destacando a importância da realização deste procedimento.

Chen *et al.* (1996) estudaram as propriedades de filmes de metilcelulose com adição de sorbato de potássio (2%). Os autores constaram a formação de halo de inibição contra os microorganismos *Rhodotorula rubra* e *Penicillium notatum*. A interação entre os antimicrobianos e o biopolímero pode afetar o processo de formação do filme, a taxa de liberação do antimicrobiano e as propriedades mecânicas. Silveira *et al.* (2007) constataram uma redução na contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em massa de pastel acondicionada em filmes de celulose contendo 7% de ácido sórbico. Em outro trabalho, Cagri *et al.* (2002) relatam que filmes de proteína de soro de leite contendo 1% (m/v) de ácido sórbico inibiram o crescimento de *L. monocitogenes*, *E. coli* O157:H7 e *S. Typhimurium* DT104 em embutidos de carne.

A incorporação de 1% de sorbato de potássio (m/m) em filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) foi avaliada por Han e Floros (1997). Neste estudo os autores evidenciaram que a adição de sorbato diminuiu a taxa de crescimento das leveduras e aumentou a fase lag. No entanto, em outro trabalho Weng e Hotchkiss (1993) constataram que a adição de sorbato (polar) na mesma concentração, também em filmes de PEBD (apolar), não foi suficiente para inibir o crescimento fúngico. A mesma constatação foi verificada por Devlieghere *et al.* (2000) com filmes de EVA/PEBDL impregnados com 5% (m/m) de sorbato de potássio. A escolha do antimicrobiano é geralmente limitada pela incompatibilidade do agente ativo com o biopolímero ou algum outro componente do filme ou pela degradação do agente ativo durante a fabricação do filme (Weng e Hotchkiss, 1993; Han e Floros, 1997, Han, 2000).

Tabela 5.1: Perfil microbiológico da eficiência do filme de alginato puro ativo (0,25 g sorbato/100 g solução filmogênica) pelo teste de difusão em ágar (diâmetro do filme = 2,5 cm) para *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após cinco dias de incubação)

<i>Microorganismo</i>	<i>Filme de alginato puro ativo</i>	<i>UFC/mL*</i>	<i>Diâmetro do halo de inibição (cm)*</i>
<i>Debaromyces hansenii</i>	Controle	incontável	NA**
	1º estágio/com UV	incontável	0
	1º estágio/sem UV	incontável	0
	2º estágio/com UV	incontável	0
	2º estágio/sem UV	incontável	0
<i>Penicillium commune</i>	Controle	incontável	NA
	1º estágio/com UV	8,90x10 ²	0
	1º estágio/sem UV	1,00x10 ³	0
	2º estágio/com UV	1,14x10 ³	0
	2º estágio/sem UV	9,65x10 ²	0
<i>Penicillium roqueforti</i>	Controle	incontável	NA
	1º estágio/com UV	incontável	0
	1º estágio/sem UV	incontável	0
	2º estágio/com UV	incontável	0
	2º estágio/sem UV	incontável	0

** médias das três determinações experimentais, *** não aplicável

Rico-Pena e Torres (1991) observaram que a taxa de permeação do ácido sórbico em filmes de metil celulose diminuiu com o abaixamento do pH. Uma redução no pH aumenta a disponibilidade da maioria das formas ativas do ácido sórbico. O pH influencia a ionização (dissociação/associação) da maioria dos ativos, e pode alterar a atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e seus sais (Han, 2000, Quintavalla e Viccini, 2002). A atividade antimicrobiana e a estabilidade química das substâncias ativas também podem ser influenciadas pela atividade de água do meio. Segundo Tfouni e Toledo (2001) a atividade antimicrobiana dos sorbatos está relacionada com a molécula não dissociada, o que determina sua maior efetividade em alimentos ácidos ou acidificados. O pK_a do ácido sórbico é 4,8 e apresenta maior atividade em pH menor que 6,0, sendo praticamente

ineficiente em pH superior a 6,5. A solução filmogênica do filme de alginato puro apresentava pH entre 6 e 7, variando de acordo com a concentração de CaCl_2 adicionada, podendo sugerir a baixa efetividade antimicrobiana do filme ativo com sorbato de potássio. Outra hipótese é que a liberação do sorbato incorporado ao filme seja muito rápida, formando um elevado gradiente de concentração entre a superfície e o interior do ágar. Assim, o sorbato tende a se difundir rapidamente para o interior do ágar, não mantendo-se, na superfície, uma concentração suficiente para inibição do crescimento microbiano.

A idéia inicial deste trabalho era estudar filmes ativos com sorbato de potássio. No entanto, com vista nos resultados apresentados acima, considerando uma possível incompatibilidade do sorbato de potássio com a matriz de alginato e/ou sua precipitação com o cálcio, optou-se por estudar a incorporação de outro agente antimicrobiano, a natamicina.

5.1.2 Testes preliminares de incorporação de natamicina em filmes de alginato puro

A natamicina ou pimaricina (INS 235) é um antimicótico poliênico, extraído do *Streptomyces natalensis*, ativo contra uma grande variedade de fungos filamentosos e leveduras, incluindo os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* e *Candida* (Fletouris *et al.*, 1995; Vallvey *et al.*, 2000). É utilizada para o controle do crescimento de fungos na superfície de queijos e produtos embutidos, não sendo efetiva contra bactérias e vírus. Quando aplicada na superfície do alimento a natamicina apresenta um comportamento difusivo muito limitado, tendendo a ficar sobre a superfície do mesmo.

Em alguns trabalhos foi estudado o uso de natamicina como agente ativo em biofilmes. Oliveira *et al.* (2007) e Pires *et al.* (2008) obtiveram sucesso no controle do crescimento microbiano em queijos embalados com biofilmes de celulose contendo com natamicina.

Da mesma forma que para o sorbato, inicialmente decidiu-se testar a natamicina em filmes de alginato puro (conforme formulação otimizada, Item 4.1.3) ativos contendo natamicina na concentração de 8g/100g biopolímero. Esta é a concentração mais alta citada na literatura para filmes ativos com natamicina (Pires *et al.*, 2008). A natamicina foi adicionada após o preparo da solução filmogênica, ou seja, para filmes de alginato puro

após a reticulação do 1º estágio (Item 3.6.2). Avaliou-se também a influência da etapa de reticulação final (2º estágio) na atividade antimicrobiana dos filmes.

A estabilidade da natamicina pode ser afetada pelo pH, temperatura, exposição a luz, oxidantes e concentração de metais pesados. É eficiente na faixa de pH entre 5 e 7. Na forma de pó, se mantém estável à temperatura ambiente, mas deve ser protegida da luz (Stark e Tan, 2003). Alguns estudos apontam a sensibilidade desse agente ativo à radiação ultravioleta (Carter, 1986; Pedersen, 1992). Desta forma, decidiu-se testar filmes ativos com e sem tratamento prévio da superfície por luz UV.

Através da Figura 5.2 pode-se constatar que a natamicina incorporada em filmes de alginato puro na concentração de 8% em relação a massa total de biopolímero produziu halos de inibição bem definidos e uniformes em todos os tratamentos testados. A determinação do halo de inibição foi realizada medindo-se a distância entre o centro do filme em forma de disco ($d = 2,5$ cm) e a UFC mais próxima (Padgett *et al.*, 1998). A Tabela 5.2 apresenta o perfil microbiológico da atividade antifúngica dos filmes para os três microrganismos testados. A avaliação do tratamento considerando a contagem de UFC/mL só foi possível para o *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti*, pois a levedura (*Debaromyces hansenii*) apresentou uma contagem muito elevada impossibilitando sua quantificação. A maioria dos trabalhos que utiliza o teste do halo como método de determinação de atividade de agentes antimicrobianos não utiliza a contagem em UFC/mL como parâmetro de definição de inibição, e sim apenas a observação da formação da zona inibitória e seu respectivo diâmetro (Daeschel *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996; Cha *et al.* 2002; Millete *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2008). Estes autores utilizam um inóculo inicial mais carregado (da ordem de 10^6 UFC/mL), mas no presente trabalho optou-se por adequar o inóculo de forma a se conseguir obter estas informações. Assim como para os filmes com sorbato, observou-se que os filmes sem o 2º estágio apresentaram um alto intumescimento da matriz polimérica e um aumento considerável no diâmetro do filme (Figura 5.2 (b) e (c)), enquanto que os filmes com o 2º estágio mantiveram a integridade sem intumescimento perceptível visualmente (Figura 5.2 (d) e (e)). Ao contrário do que se previa, a reticulação do 2º estágio não afetou a liberação da natamicina.

Quanto ao tratamento com luz UV, os resultados indicaram que nos filmes de alginato com natamicina não houve degradação do agente ativo devido a exposição de cada lado dos filmes à luz UV por 30 minutos. Observou-se, inclusive, que na maioria dos casos,

houve até um aumento no diâmetro do halo de inibição comparado aos filmes que não passaram por este tratamento. No entanto, sem a realização desta etapa, contrariamente ao observado nos filmes de alginato contendo sorbato, não se observou a presença de contaminação externa. Desta forma, para os ensaios definitivos optou-se por realizar esta etapa em todos os tratamentos testados (Item 5.1.3).

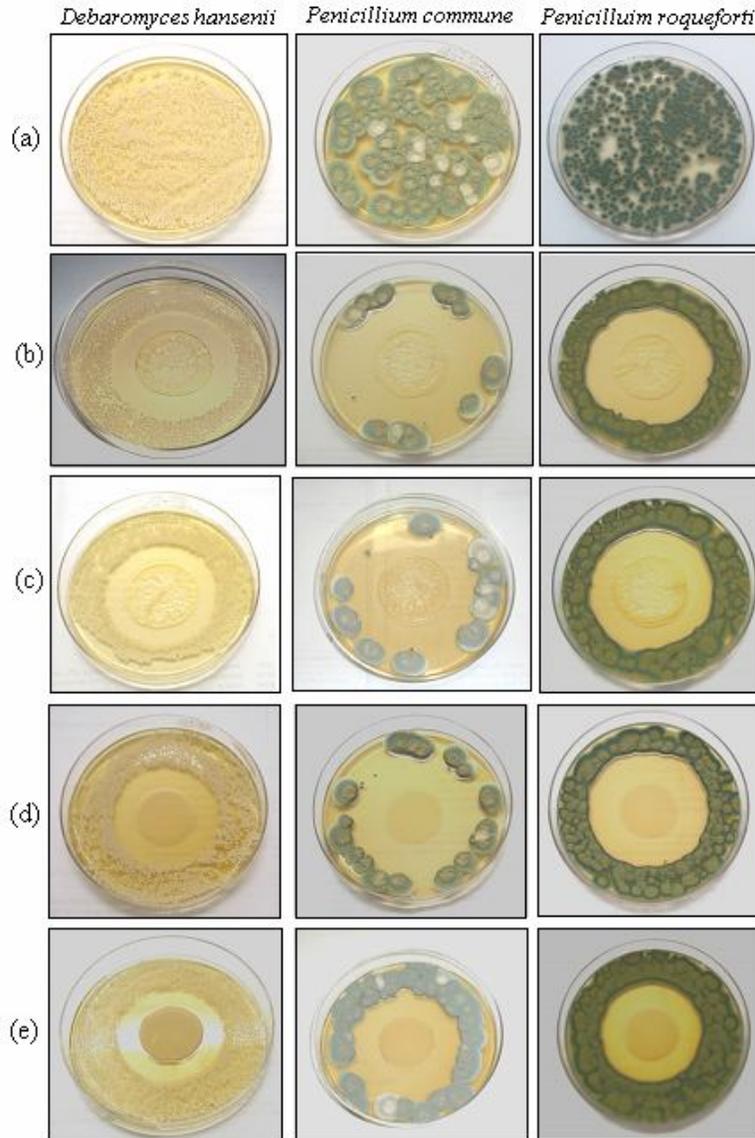


Figura 5.2: Efeito antimicrobiano em filmes de alginato puro contendo natamicina (8g/100g alginato) em presença dos microrganismos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após 5 dias de incubação): (a) controle (placa sem filme); (b) filme antes do 2° estágio/com UV; (c) filme antes do 2° estágio/sem UV; (d) filme após 2° estágio/com UV; (e) filme após 2° estágio/sem UV

Tabela 5.2: Perfil microbiológico da eficiência do filme de alginato puro ativo (8 g/100g alginato) pelo teste de difusão em ágar (diâmetro do filme = 2,5 cm) para *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após cinco dias de incubação)

<i>Microorganismo</i>	<i>Filme de alginato puro ativo</i>	<i>UFC/mL*</i>	<i>Diâmetro do halo de inibição (cm)*</i>
<i>Debaromyces hansenii</i>	Controle	incontável	NA**
	1º estágio/com UV	incontável	4,70
	1º estágio/sem UV	incontável	4,50
	2º estágio/com UV	incontável	4,70
	2º estágio/sem UV	incontável	4,70
<i>Penicillium commune</i>	Controle	1,27x10 ³	NA
	1º estágio/com UV	1,75x10 ²	5,4
	1º estágio/sem UV	2,50x10 ²	5,00
	2º estágio/com UV	2,50x10 ²	5,50
	2º estágio/sem UV	2,20x10 ²	5,00
<i>Penicillium roqueforti</i>	Controle	2,80x10 ³	NA
	1º estágio/com UV	1,27x10 ³	4,70
	1º estágio/sem UV	1,08x10 ³	4,60
	2º estágio/com UV	1,17x10 ³	5,30
	2º estágio/sem UV	1,38x10 ³	5,00

** médias das três determinações experimentais, *** não aplicável

5.1.3 Incorporação de natamicina nas formulações otimizadas

Nesta etapa do trabalho, foram produzidos filmes, conforme as formulações otimizadas (Filme de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) contendo diferentes concentrações natamicina (0, 0,5, 1, 2, 4 e 8 g/100 g de biopolímero).

A incorporação do agente ativo era realizada no final do processo de obtenção da solução filmogênica, ou seja, após a reticulação do 1º estágio (para o filme de alginato puro) e após a mistura das soluções de alginato e quitosana (no caso dos filmes compostos). Em ambos os casos, a solução contendo a natamicina era homogeneizada por mais 10 minutos antes da solução ser colocada nos moldes. Com o intuito de avaliar o efeito do tempo e das condições de preparo da solução filmogênica na estabilidade da natamicina,

bem como comparar as características dos filmes resultantes, as formulações contendo 4 g natamicina/100g de biopolímero foram preparadas de duas maneiras: com adição da natamicina no início do processo (na água antes da adição do alginato) e com adição no final do processo, com citado acima. Para simplificar, estas formulações serão chamadas de 4 (antes) e 4 (depois) g/100 g, respectivamente.

5.1.3.1 Efeito antimicrobiano das formulações otimizadas contendo natamicina

O efeito antifúngico dos filmes de alginato puro, do *Filme Composto 1* e do *Filme Composto 2*, contendo diferentes concentrações de natamicina pode ser visualmente observado nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente. Nota-se que, nos três tipos de filmes, para os três microrganismos testados, o diâmetro do halo de inibição aumentou com o aumento da concentração de natamicina. Os halos formados eram concêntricos ao disco do filme, sugerindo uma difusão uniforme do agente ativo no ágar. Nos controles (filme sem natamicina) observa-se que ocorreu aparecimento de colônias sobre o filme. Os filmes mantiveram-se íntegros durante os ensaios, mantendo um aspecto semelhante ao inicial.

Para o filme de alginato puro o halo de inibição já foi visualmente perceptível na primeira concentração testada (0,5% em relação a massa de biopolímero). No entanto, para os Filmes Compostos 1 e 2, o halo inibitório começou a aparecer a partir de 1 g/100g de biopolímero. Oliveira *et al.* (2007) testaram concentrações de 0 a 4% de natamicina (em relação a massa de biopolímero) em filmes de celulose contra *Penicillium roqueforti*, constatando que um efeito antimicrobiano é observado em concentrações a partir de 1% (para filmes com espessura de 95 µm) e a partir de 2% (para filmes com espessura de 33 µm), não apresentando crescimento do fungo ao redor e sobre os filmes. Millette *et al.* (2007) incorporaram filmes de alginato com nisina e observaram que em uma concentração de 1000 UI/mL o filme produziu um halo de inibição no ágar contendo *Staphylococcus Aureus*.

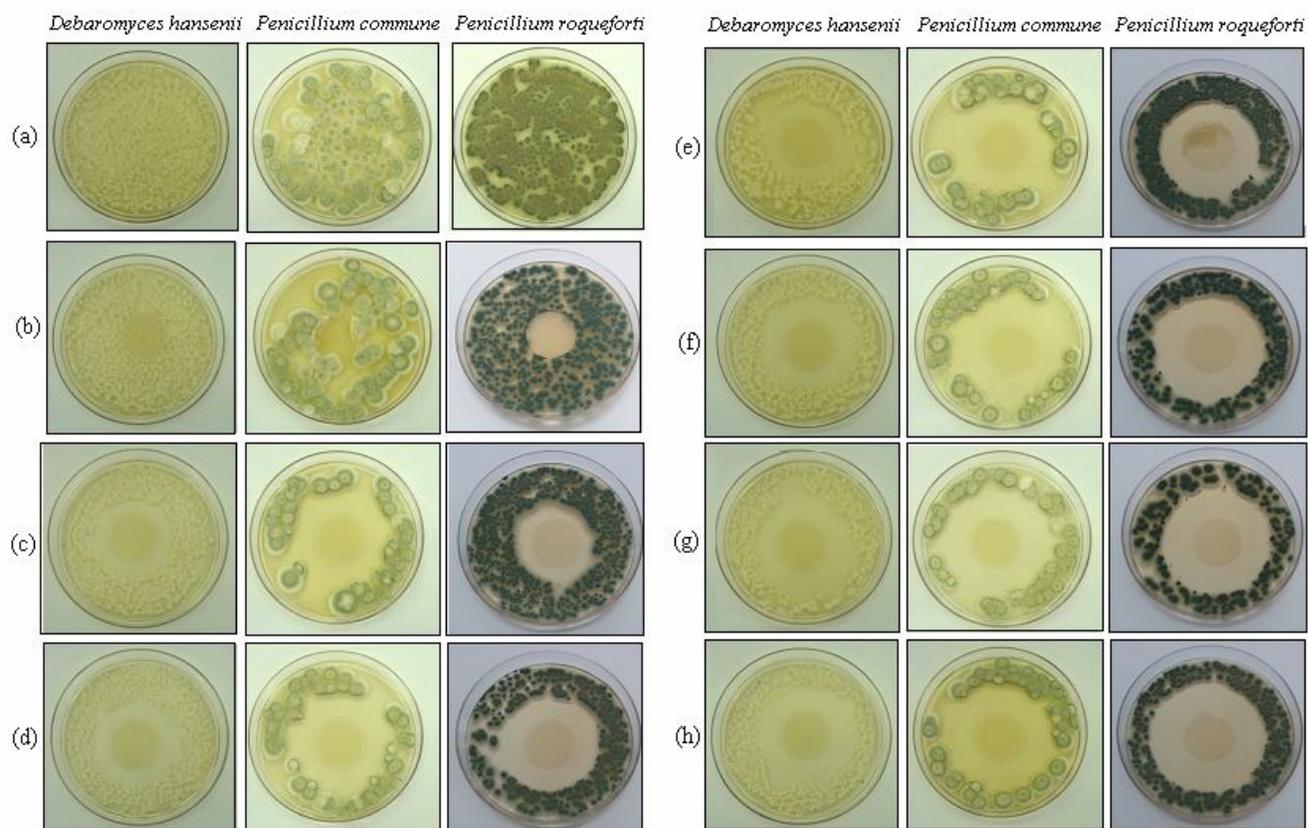


Figura 5.3: Efeito antimicrobiano em filmes de alginato puro contendo natamicina em presença dos microrganismos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após 5 dias de incubação): (a) placa sem filme; (b) 0 (c) 0,5; (d) 1; (e) 2; (f) 4 (depois); (g) 4 (antes); (h) 8 g natamicina/100g alginato

Muitos trabalhos na literatura mostram que a atividade antimicrobiana de filmes e coberturas ativos está relacionada com o modo de ação do antimicrobiano e com a interação entre o filme e o antimicrobiano (Appendini e Hotchkiss, 2002).

O efeito da incorporação de sorbato de potássio e benzoato de sódio em filmes de metilcelulose e quitosana contra os fungos *Rhodotorula rubra* e *Penicillium notatum* foi avaliado por Chen *et al.* (1996). Os autores constataram que o filme de metilcelulose com 2% de sorbato ou de benzoato apresentou efeito inibitório contra estes fungos, enquanto que o filme de quitosana (contendo a mesma concentração de agente ativo) não apresentou nenhum efeito. Neste último filme a ação inibitória só foi observada quando a concentração do agente ativo foi aumentada para 5%. Os autores atribuem este fato a interação entre a quitosana e o agente antifúngico sorbato, impedindo a liberação do mesmo.

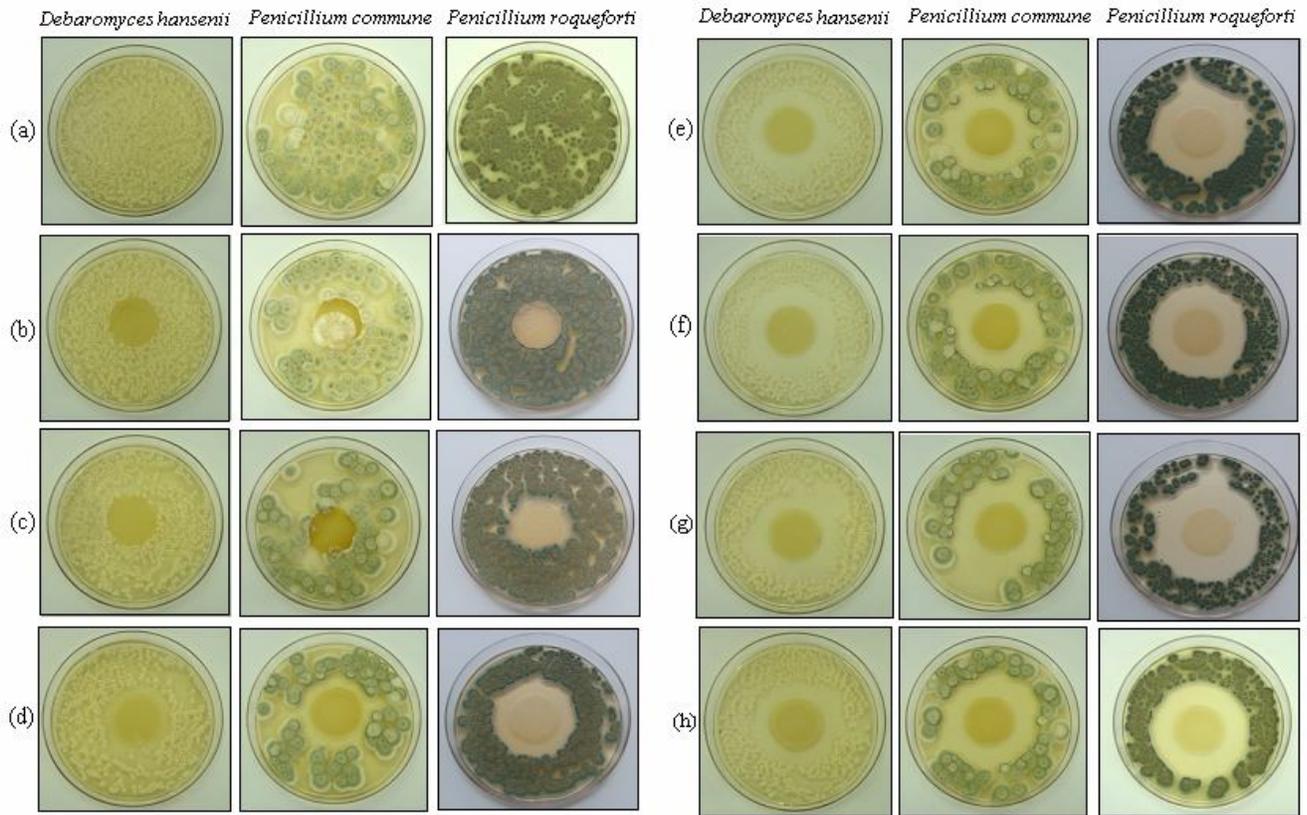


Figura 5.4: Efeito antimicrobiano do *Filme Composto I* contendo natamicina em presença dos microrganismos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após 5 dias de incubação): (a) placa sem filme; (b) 0 (c) 0,5; (d) 1; (e) 2; (f) 4 (depois); (g) 4 (antes); (h) 8 g natamicina/100g biopolímero

Estudando o efeito antimicrobiano de filmes ativos contendo sorbato de potássio contra fungos deteriorantes em pão de forma, Bertan (2008), obteve menores halos de inibição em filmes compostos de amido, glúten e gelatina (1:1:1) comparados aos filmes compostos de amido e gelatina (1:4) e glúten e gelatina (1:4). Em outro trabalho, Ko *et al.* (2001) demonstraram que a atividade inibitória da nisina contra *Listeria monocytogenes* era mais acentuada em filmes de isolado protéico de soro de leite do que em filmes de glúten de trigo. Os autores atribuem estas diferenças a hidrofiliçidade dos filmes.

Em um trabalho recente, Cong *et al.* (2007) estudaram o efeito inibitório de filmes bicamadas de quitosana e cera de polietileno contendo natamicina (20 mg/L) contra *Alternaria alternata* e *Fusarium semitectum*. Estes autores relatam que os filmes sem natamicina não apresentaram efeito inibitório. No entanto, quando a natamicina era adicionada, a maior ação inibitória foi observada para a espécie *A. alternata* e no filme contendo ambos biopolímeros (quitosana e cera de polietileno). Além disso, quando o filme

continha apenas cera de polietileno o efeito inibitório foi maior do que quando o filme era composto apenas de quitosana.

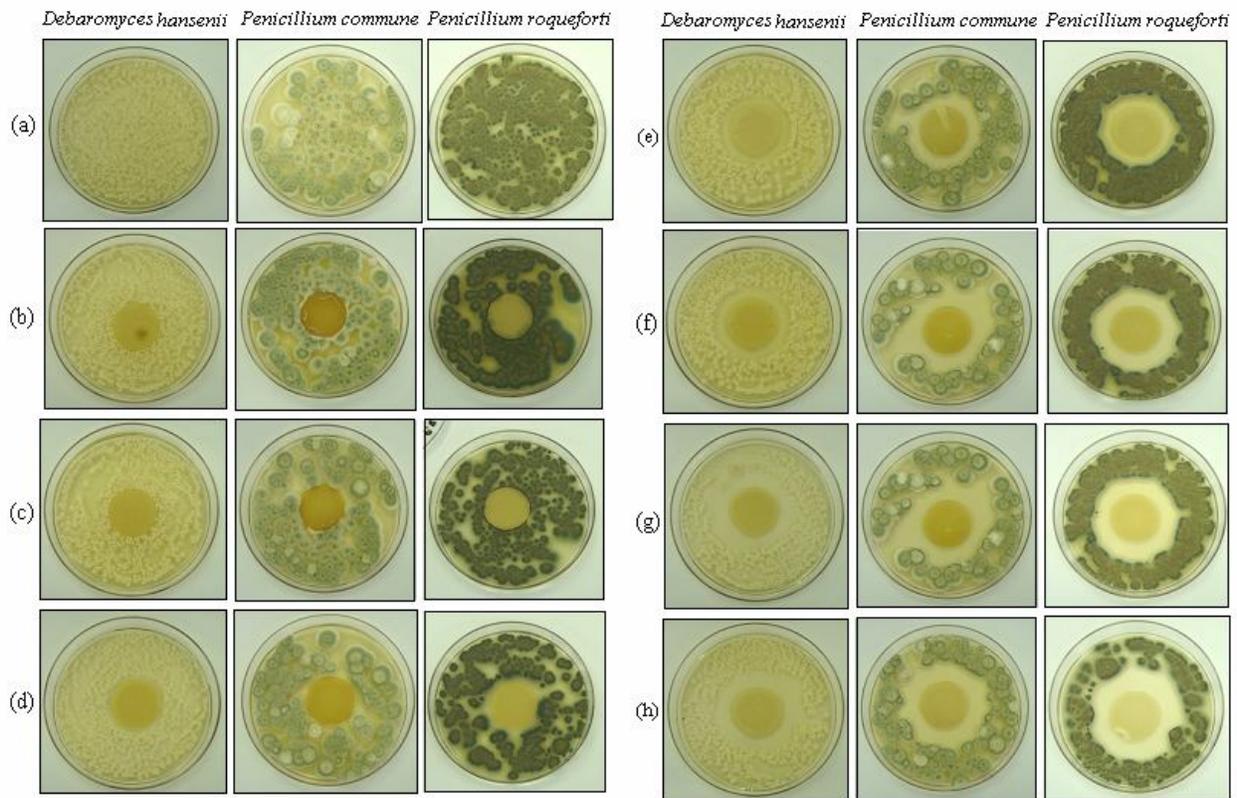


Figura 5.5: Efeito antimicrobiano do Filme Composto 2 contendo natamicina em presença dos microrganismos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti* (após 5 dias de incubação): (a) placa sem filme; (b) 0 (c) 0,5; (d) 1; (e) 2; (f) 4 (depois); (g) 4 (antes); (h) 8 g natamicina/100g biopolímero

Teerakarn *et al.* (2002) compararam a liberação de nisina em biofilmes de base protéica e constataram que os filmes que mais retiveram a nisina eram compostos de zeína de milho. No entanto os autores reforçam que a taxa de liberação adequada do antimicrobiano que resultaria no maior efeito inibitório de microorganismos deveria ter sido avaliada separadamente. O efeito antimicrobiano de filmes de alginato e κ -carragena contendo diversos antimicrobianos foi avaliado por Cha *et al.* (2002). Os autores observaram que, contra os microrganismos avaliados, maiores diâmetros da zona de inibição foram observados para os filmes de alginato. Os autores também atribuem este fato às diferenças de hidrofiliçidade dos filmes de alginato e κ -carragena.

Muitos trabalhos apontam um efeito antimicrobiano da quitosana (Coma *et al.*, 2002; Durango *et al.* 2006; Yingyuad *et al.* 2006). Contrariamente a essas informações, nenhum efeito antimicrobiano adicional da quitosana (presente nas formulações do *Filme Composto 1* e 2) foi observado para as espécies fúngicas testadas. Para verificar se a quitosana isolada possuía algum efeito antimicrobiano contra os microrganismos testados neste trabalho, um filme de quitosana pura foi submetido ao teste de difusão em ágar, não tendo sido observado halo de inibição e tendo, inclusive, crescimento de colônias sobre o filme (resultados não mostrados). Pranoto *et al.* (2005) também não observaram halo de inibição em filmes de quitosana contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *B. cerues*. O crescimento de *L. monocytogenes* e *B. cereus*, no entanto, foi limitado na área sob o filme. Os autores relatam que o efeito antimicrobiano da quitosana ocorre sem a migração de agentes ativos, de forma que somente os microrganismos que estão em contato direto com os sítios ativos da quitosana seriam inibidos. A mesma observação foi feita por Li *et al.* (2006), que não constataram halos de inibição ao redor de filmes de quitosana, mas apenas inibição do crescimento sobre os mesmos. Alguns autores citam a possibilidade da quitosana não ser eficiente na forma de filme ou membrana. Coma *et al.* (2002), por exemplo, não observaram a formação de halo de inibição contra *Listeria monocytogenes* pela aplicação do filme de quitosana no meio de cultura, no entanto, a inibição total deste microrganismo foi observada quando o biopolímero era incorporado diretamente no meio de cultura numa concentração de 8% (v/v).

As Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5 mostram o perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) contendo diferentes concentrações de natamicina de acordo com o teste de difusão em ágar para os fungos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti*, respectivamente. Observa-se uma tendência de diminuição do diâmetro do halo de inibição com o aumento da concentração de quitosana no filme, em todos os microrganismos testados. Esta informação pode ser melhor confirmada nas Figuras 5.6, 5.7, e 5.8 que apresentam a variação do diâmetro do halo de inibição com a concentração inicial de natamicina nos filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) para os fungos *Debaromyces hansenii*, *Penicillium commune* e *Penicillium roqueforti*, respectivamente. Esses resultados podem ser um indicativo de uma interação da natamicina com a quitosana, que estaria afetando a sua liberação para o ágar. Observando-se o grau de intumescimento

dos filmes ativos (Tabela 5.14) era esperado que a liberação da natamicina fosse mais facilitada nos filmes contendo quitosana (*Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*), e conseqüentemente estes apresentariam um maior efeito inibitório. Essa informação reforça a hipótese de que a natamicina esteja interagindo com a quitosana, dificultando a liberação da mesma para o ágar. Stark e Tan (2003) relatam que a estabilidade química da natamicina é favorecida em pH neutro, podendo haver degradação da mesma em pH baixos. O pH da solução filmogênica do filme de alginato puro era em torno de 7,0, enquanto que as soluções dos filmes com quitosana (*Filme Composto 1* e *2*) era aproximadamente 5,5. Esta informação também poderia sugerir que os menores halos de inibição obtidos para os filmes compostos tenham sido causados devido à degradação química do antimicrobiano.

Tabela 5.3: Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos (diferentes concentrações de natamicina) pelo teste de difusão em ágar (diâmetro do filme=2,5cm) para *Debaromyces hansenii* (após cinco dias de incubação)

Natamicina (g/100g biop.)	UFC/mL*			Diâmetro do halo de inibição (cm)**		
	Alginato	F. C. 1	F. C. 2	Alginato	F. C. 1	F. C. 2
Sem filme		1,15x10 ⁴			NA***	
0 (controle)	8,86x10 ³	9,98x10 ³	9,64x10 ³	0 ^a	0 ^a	0 ^a
0,5	6,70x10 ³	7,54x10 ³	7,42x10 ³	3,92 (0,01) ^b	2,50 ^a	2,50 ^a
1	5,46x10 ³	5,86x10 ³	7,58x10 ³	4,12 (0,01) ^c	3,44 (0,08) ^b	2,64 (0,02) ^a
2	5,92x10 ³	6,32x10 ³	7,34x10 ³	4,30 (0,00) ^d	4,14 (0,12) ^c	3,44 (0,06) ^b
4 (depois)	4,58x10 ³	6,12x10 ³	7,38x10 ³	4,76 (0,01) ^e	4,52 (0,01) ^c	3,70 (0,04) ^{bc}
4 (antes)	4,92x10 ³	6,14x10 ³	7,62x10 ³	4,66 (0,04) ^e	4,34 (0,03) ^c	3,82 (0,08) ^c
8	5,30x10 ³	5,34x10 ³	7,32x10 ³	5,14 (0,01) ^f	4,48 (0,01) ^c	4,32 (0,01) ^d

*média aritmética das três determinações experimentais, ** Média (desvio padrão) de três determinações experimentais, *** Não aplicável

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p< 0,05)

Comparando os filmes contendo 4% de natamicina adicionados no início e no final do processo de elaboração da solução filmogênica, ou seja, 4% (antes) e 4% (depois), observa-se que não houve diferença significativa no diâmetro do halo de inibição (Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5). Isto indica que, não houve degradação da natamicina com as condições de processo utilizadas e nem diferença na forma como esta é liberada da matriz polimérica para o ágar.

Tabela 5.4: Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos (diferentes concentrações de natamicina) pelo teste de difusão em ágar (diâmetro do filme=2,5cm) para *Penicillium commune* (após cinco dias de incubação)

Natamicina (g/100g biop.)	UFC/mL*			Diâmetro do halo de inibição (cm)**		
	Alginate	F. C. 1	F. C. 2	Alginate	F. C. 1	F. C. 2
Sem filme		1,44x10 ³			NA***	
0 (controle)	5,00x10 ²	7,40x10 ²	1,11x10 ³	0 ^a	0 ^a	0 ^a
0,5	4,60x10 ²	7,15x10 ²	1,06x10 ³	4,40 (0,07) ^b	0 ^a	0 ^a
1	4,20x10 ²	6,55x10 ²	9,25x10 ²	4,74 (0,02) ^b	3,82 (0,08) ^b	3,00 (0,06) ^b
2	3,70x10 ²	5,75x10 ²	6,80x10 ²	4,92 (0,01) ^{bc}	4,46 (0,04) ^c	3,90 (0,01) ^c
4 (depois)	4,25x10 ²	6,20x10 ²	6,45x10 ²	5,52 (0,01) ^d	4,48 (0,06) ^c	4,10 (0,08) ^{cd}
4 (antes)	4,85x10 ²	5,40x10 ²	7,10x10 ²	5,32 (0,16) ^{cd}	4,62 (0,06) ^{cd}	4,40 (0,07) ^{de}
8	6,65x10 ²	6,35x10 ²	6,85x10 ²	5,60 (0,01) ^d	4,90 (0,03) ^d	4,60 (0,06) ^e

*média aritmética das três determinações experimentais, ** Média (desvio padrão) de três determinações experimentais, *** Não aplicável

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p< 0,05)

Quanto à contagem do número de UFC/mL das placas com os filmes ativos, pode-se observar que houve redução do número de UFC/mL com a adição da natamicina nos filmes (visualmente observada nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5), porém, exceto para o *Filme Composto 2* na presença do fungo *Penicillium commune*, esta redução não foi decimal. Isto pode indicar que a natamicina causou um efeito fungistático e não fungicida nas espécies testadas, inibindo o crescimento microbiano naquela área do halo de inibição. É importante ressaltar que a contagem das placas foi realizada no 3º dia de incubação, pois neste período as colônias apresentavam um diâmetro menor facilitando a contagem, sem variação do número de colônias em relação ao 5º dia. Já as fotografias foram registradas após o 5º dia de incubação das placas. Nos testes com os fungos *Debaromyces hansenii* e *Penicillium commune*, a presença do filme (placa com filme, mas sem natamicina) reduziu em um ciclo logarítmico o número de células comparada à placa sem o filme. Bertan (2008) quantificou a concentração de UFC/mL dos fungos *Eurotium chevalieri*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Cladosporium sp* e *Penicillium raistrickii* em teste de filmes ativos de amido, glúten e gelatina contendo sorbato de potássio (2 e 4% m/v) e também não observou redução de ciclo logarítmico em nenhum dos casos estudados, porém detectou a presença de halos de inibição.

Tabela 5.5: Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos (diferentes concentrações de natamicina) pelo teste de difusão em ágar (diâmetro do filme = 2,5 cm) para *Penicillium roqueforti* (após cinco dias de incubação)

Natamicina (g/100g biop.)	UFC/mL*			Diâmetro do halo de inibição (cm)**		
	Alginato	F. C. 1	F. C. 2	Alginato	F. C. 1	F. C. 2
sem filme		3,04x10 ³			NA***	
0 (controle)	2,68x10 ³	2,93x10 ³	1,46x10 ³	0 ^a	0 ^a	0 ^a
0,5	2,52x10 ³	2,72x10 ³	1,63x10 ³	3,20 (0,07) ^b	2,56 (0,02) ^a	2,50 ^a
1	2,58x10 ³	2,97x10 ³	1,51x10 ³	4,60 (0,07) ^c	3,76 (0,01) ^b	2,90 (0,11) ^a
2	2,63x10 ³	2,44x10 ³	1,13x10 ³	4,92 (0,01) ^c	4,06 (0,05) ^b	4,00 (0,08) ^b
4 depois	1,85x10 ³	1,34x10 ³	1,28x10 ³	5,48 (0,01) ^d	4,48 (0,04) ^c	4,50 (0,06) ^b
4 antes	1,87x10 ³	1,94x10 ³	1,26x10 ³	5,52 (0,01) ^d	4,44 (0,08) ^c	4,32 (0,02) ^b
8	1,51x10 ³	2,93x10 ³	1,26x10 ³	5,80 (0,07) ^d	5,28 (0,01) ^d	4,56 (0,15) ^b

*média aritmética das três determinações experimentais, ** Média (desvio padrão) de três determinações experimentais, *** Não aplicável

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p < 0,05)

Os halos de inibição formados ao redor dos filmes ativos testados tenderam a aumentar com o aumento da concentração de natamicina incorporada em todos os casos estudados (Figuras 4.21, 4.22 e 4.23). Pereira *et al.* (2005) avaliaram a eficiência antimicrobiana de filmes laminados contendo com natamicina contra os fungos *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* Os autores demonstram que a elevação da concentração de natamicina proporcionou um aumento na inibição dos fungos, provocando uma maior liberação do antifúngico para o ágar. No mesmo trabalho, fica demonstrado que o *Penicillium roqueforti* apresentou maior susceptibilidade à ação da natamicina comparado aos outros fungos estudados. Em outro trabalho, Limjaroen *et al.* (2003) constataram que o aumento da concentração de nisina (2 para 2,5% m/v) e ácido sórbico (1,5 para 2% m/v) incorporados em filmes de cloreto de polivinilideno aumentaram o diâmetro do halo de inibição contra *L. monocytogenes*. Pranoto *et al.* (2005) estudando o efeito inibitório de filmes de quitosana contendo óleo de alho (0 – 400 µL/g de quitosana) observaram um aumento significativo dos halos de inibição com o aumento da concentração do agente ativo contra os microrganismos *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*. Padgett *et al.* (1998) observaram halos de inibição crescentes para filmes de isolado protéico de soja, aumentando a concentração de lisozima e nisina contra *Lactobacillus plantarum*. Santiago-

Silva *et al.* (2009) estudando a ação inibitória de filmes de celulose contendo pediocina contra *Salmonella sp.*, observaram halos de inibição de 0,2 e 0,3 cm para filmes incorporados com 25 e 50% (m/m) do agente antimicrobiano, respectivamente.

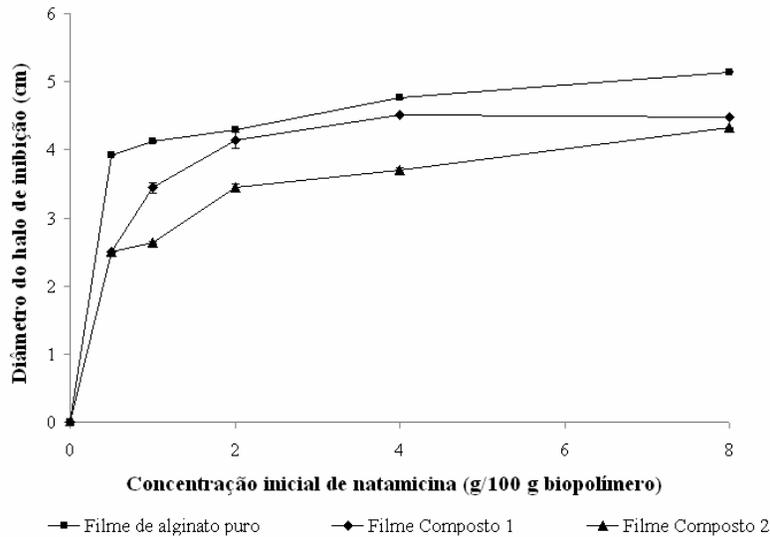


Figura 5.6: Variação do halo de inibição formado ao redor de filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) com o aumento da concentração inicial de natamicina para o fungo *Debaromyces hansenii*

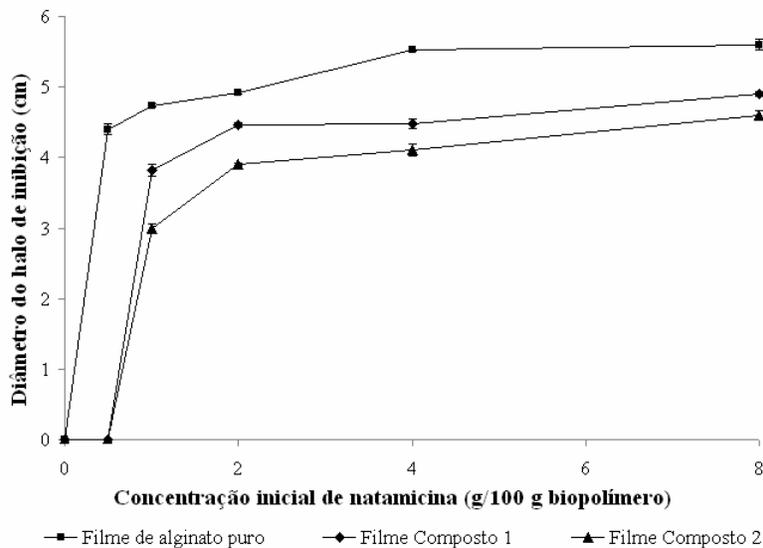


Figura 5.7: Variação do halo de inibição formado ao redor de filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) com o aumento da concentração inicial de natamicina para o fungo *Penicillium commune*

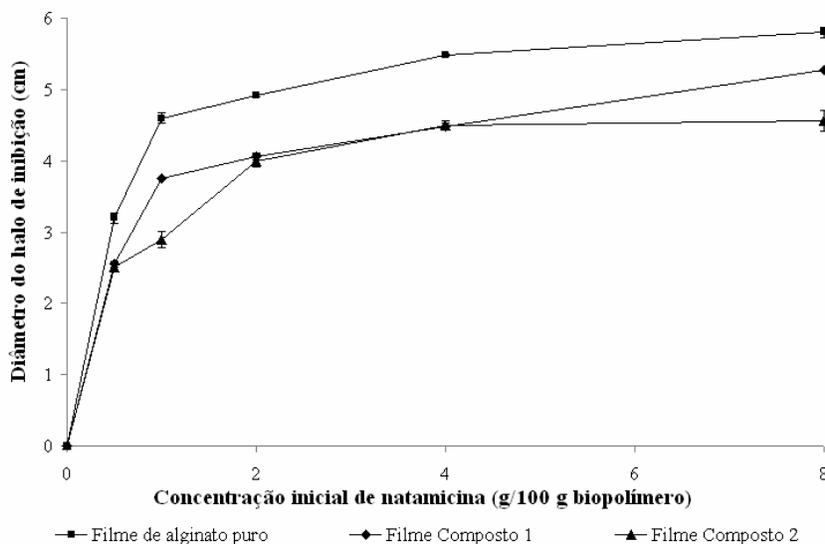


Figura 5.8: Variação do halo de inibição formado ao redor de filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) com o aumento da concentração inicial de natamicina para o fungo *Penicillium roqueforti*

5.2 Ensaio de liberação da natamicina em água

A determinação dos coeficientes de difusão de substâncias ativas em matrizes poliméricas tem grande importância tanto do ponto de vista tecnológico quanto do científico, que utiliza esses coeficientes como forma de extrair informações sobre a estrutura das redes poliméricas.(Westrin *et al.*, 1994). O conhecimento da difusividade permitirá estimar a cinética de liberação em sistemas de liberação controlada, de grande interesse nas indústrias farmacêutica, bioquímica e de alimentos.

No caso de biofilmes ativos, o antimicrobiano está inicialmente imobilizado em uma matriz hidrofílica seca. Quando este filme seco é colocado em contato com o solvente (neste caso, a água), moléculas do solvente irão penetrar a matriz levando ao intumescimento da mesma, em maior ou menor grau, dependendo de suas características (composição química, grau de reticulação, porosidade, entre outros fatores). Quando a água se difunde da solução para o interior do filme, a mobilidade macromolecular da rede polimérica aumenta gradualmente, permitindo que o antimicrobiano se solubilize e se difunda através da matriz. Assim, pode-se assumir que a cinética de liberação da natamicina será influenciada pelos seguintes processos: (1) difusão da água, (2) relaxação da matriz, (3) solubilização e difusão da natamicina através da matriz intumescida.

Uma preocupação em experimentos de liberação é o intumescimento dos filmes durante os ensaios. Redl *et al.* (1996) observaram que o intumescimento dos filmes causou desvios ao comportamento Fickiano, e sugerem um pré-acondicionamento dos filmes em ambientes com alta umidade relativa antes dos ensaios a fim de se minimizar tais efeitos. Por outro lado, Teerakarn *et al.* (2002) relataram que o pré-acondicionamento dos filmes em UR = 96% não teve efeito no intumescimento de filmes de proteína. No presente trabalho os dados de grau de intumescimento dos filmes (Figura 5.15) indicaram que nos 10 minutos iniciais de contato com a solução aquosa, ocorre considerável transferência de massa para o interior do filme, promovendo aumento de volume e, provavelmente, uma relaxação da matriz polimérica, e que mais de 50% da embebição ocorre no primeiro minuto de imersão em água. Assim, tendo em vista os longos tempos necessários para a realização dos ensaios com a natamicina considerou-se desnecessário este pré-acondicionamento das amostras em UR alta, sendo a espessura final, ou seja, aquela determinada após o término do ensaio, utilizada para o cálculo dos coeficientes de difusão. A máxima massa de natamicina que poderia ser liberada (M_{∞}) em água foi considerada como sendo a massa total que foi extraída até atingir equilíbrio, isto é, quando não se observou mais variação na concentração da solução.

A Tabela 5.6 apresenta a massa de natamicina adicionada no filme e a massa de natamicina que foi liberada por cada filme no final dos ensaios de liberação. Observa-se que, para o filme de alginato puro, praticamente 100% da massa de natamicina adicionada conseguiu ser extraída pela água. Esta informação também confirma, que não houve lixiviação da natamicina durante o processo de reticulação dos filmes (2º estágio) em que os mesmos eram imersos em solução de cloreto de cálcio, seguido de lavagem em água. Zactiti (2004) observou que grande parte do sorbato de potássio incorporado na matriz de alginato era extraída nestas etapas do processo. A Tabela 5.6 indica também que para os filmes compostos a máxima massa de natamicina liberada foi menor do que massa adicionada, sendo aproximadamente 74,8% e 61,3% para o *Filme Composto 1* e *2* contendo inicialmente 4% de natamicina, respectivamente. A análise estatística indica que não houve diferença entre a forma de incorporação da natamicina, ou seja, antes ou depois do processo de elaboração da solução filmogênica. Estas constatações reforçam a hipótese de que nos filmes compostos, esteja ocorrendo uma interação entre a natamicina e a matriz com quitosana. Quando a concentração inicial era de 8% os filmes compostos liberaram em

torno 93% da massa inicial de natamicina. Esse aumento ocorreu, provavelmente, devido a um excesso de agente antimicrobiano em relação aos sítios ativos disponíveis nas cadeias de quitosana. Chen *et al.* (1996) observaram que em ensaios de liberação de antimicrobianos (sorbato de potássio e benzoato de sódio) incorporados em filmes de quitosana e metilcelulose, apenas 60% da massa total adicionada foi liberada, atribuindo esta constatação a uma possível interação entre os grupos NH_3^+ da quitosana e os grupos COO^- dos antimicrobianos.

Tabela 5.6: Massa de natamicina inicial e massa de natamicina liberada após o ensaios em água (M_∞), em relação à massa de filme

<i>Filme</i>	<i>Concentração de natamicina*</i>	<i>Massa de natamicina inicial** (mg/g filme)</i>	<i>Massa de natamicina liberada, M_∞*** (mg/g filme)</i>
Alginato puro	4% antes	12,03	12,62 (1,04) ^c
	4% depois	12,03	12,62 (0,95) ^c
	8%	24,07	26,29 (2,08) ^e
<i>Filme Composto 1</i>	4% antes	12,03	8,17 (0,13) ^{a,b}
	4% depois	12,03	9,82 (0,26) ^b
	8%	24,07	22,50 (0,95) ^d
<i>Filme Composto 2</i>	4% antes	12,03	6,73 (0,38) ^a
	4% depois	12,03	8,02 (0,82) ^{a,b}
	8%	24,07	22,60 (0,05) ^d

*Expressa em relação a massa de polímero.

**Estimada pela relação de massa adicionada em uma placa com área de 153,94 cm² (d = 14cm) e a área da amostra utilizada (4x4 cm).

***Estimada pela máxima massa de natamicina liberada nos ensaios de liberação, quantificada por espectrofotometria.

Médias com a mesma letra indicam que não há diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

O mecanismo envolvido no processo de difusivo foi avaliado, levando-se em consideração o Modelo da Lei de Potência (Crank, 1975), que relaciona a perda de soluto no período inicial de liberação ($M_t/M_\infty < 0,60$) com o tempo através de uma exponencial simples (Equação 2.4). O expoente difusional (n) foi calculado a partir do coeficiente angular da reta obtida plotando-se $\ln(M_t/M_\infty)$ versus $\ln(t)$, enquanto a constante difusional (k) foi calculada a partir do coeficiente linear (Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Expoente difusional (n) e constante difusional (k) para os filmes ativos de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2* contendo diferentes concentrações iniciais de natamicina

<i>Filme</i>		n^*	$k (s^{-1})^*$	R^2
Alginato puro	4% antes	0,568 (0,007)	7,970 (0,077)	0,997
				0,997
				0,997
	4% depois	0,608 (0,023)	8,581 (0,270)	0,997
				0,997
				0,998
	8%	0,619 (0,029)	9,251 (0,051)	0,998
				0,997
				0,997
<i>Filme Composto 1</i>	4% antes	0,501 (0,035)	7,594 (0,047)	0,992
				0,994
				0,995
	4% depois	0,545 (0,039)	8,587 (0,610)	0,996
				0,995
				0,995
	8%	0,511 (0,065)	6,791 (0,098)	0,989
				0,991
				0,993
<i>Filme Composto 2</i>	4% antes	0,536 (0,022)	7,778 (0,395)	0,997
				0,996
				0,996
	4% depois	0,539 (0,008)	7,892 (0,069)	0,998
				0,998
				0,998
	8%	0,495 (0,006)	7,714 (0,034)	0,999
				0,998
				0,997

* Média (desvio padrão) de três determinações experimentais.

A difusão Fickiana é caracterizada por um coeficiente difusional igual a 0,5, ou seja, o processo de transferência de massa é controlado pelo coeficiente de difusão (Caso I). Um valor de n igual a 1 (Caso II) indica que a difusão é muito rápida comparada ao processo de relaxação da matriz polimérica (Choi *et al.*, 2005). Difusão não-Fickiana ou difusão anômala é caracterizada por valores de n entre 0,5 e 1. Nesse caso a taxa de difusão

do soluto e a relaxação do polímero são de magnitude equivalente (Crank, 1975). Os valores dos coeficientes difusionais obtidos para a natamicina nos filmes estudados encontram-se entre 0,49 e 0,62, indicando que a difusão Fickiana tende a ser o mecanismo predominante. Esses valores confirmam que o processo de intumescimento da matriz atingiu o equilíbrio muito mais rápido do que a liberação do agente ativo, afetando portanto pouco o processo de difusão. Como os filmes que continham quitosana demoravam mais tempo para liberar o antimicrobiano, o desvio da lei de Fick foi menor, ou seja, o processo de relaxação da matriz nos estágios iniciais não influencia a difusão, e consequentemente os valores dos coeficientes difusionais foram mais próximos de 0,5.

Zactiti e Kieckbusch (2009) obtiveram valores de n próximos de 0,8 para filmes de alginato reticulados com cálcio contendo diferentes concentrações iniciais de sorbato de potássio. No entanto, 95% da liberação do sorbato de potássio nos filmes acontecia nos primeiros 4 minutos de contato com a água, ou seja, ainda no período de intumescimento dos mesmos. Em outro trabalho, Buonocore *et al.* (2003) propõem a utilização de um modelo derivado da 2ª lei de Fick que leva em consideração a difusão do solvente para estimativa das difusividades de lisozima, nisina e benzoato de sódio em filmes de polivinilálcool. Flores *et al.* (2007b) também observaram a influência da relaxação da matriz no desvio do comportamento Fickiano ideal em ensaios de difusão de sorbato de potássio em filmes de amido de mandioca. A mesma constatação foi feita por Ozdemir e Floros (2001) investigando o mecanismo de difusão de sorbato de potássio em filmes de proteínas. Por outro lado, Choi *et al.* (2005) estimaram valores de n entre 0,45 e 0,53 estudando a difusão de sorbato de potássio em filmes de κ -carragena concluindo que o transporte do agente ativo ocorreu principalmente por difusão.

Os filmes de alginato puro e os *Filmes Compostos 1 e 2* contendo 4% de natamicina (adicionada antes e depois do processo de elaboração da solução filmogênica) e 8% de natamicina foram submetidos a ensaios de liberação em água a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), segundo metodologia descrita no Item 3.6.3.

Os coeficientes de difusão da natamicina nos filmes estudados foram estimados através dos ajustes dos pontos experimentais dos ensaios de liberação até o equilíbrio ao modelo apresentado na Equação 2.3. Além disso, realizou-se o ajuste dos dados experimentais nos momentos iniciais da liberação ($M_t/M_\infty < 0,6$) à equação do modelo de difusão para sólidos semi-infinitos (tempos curtos) (Equação 2.5). Neste caso, a liberação

segue a cinética de ordem $\frac{1}{2}$, e os valores obtidos para a fração de massa liberada devem exibir ajuste linear em função de \sqrt{t} . Os valores dos coeficientes de difusão obtidos pelos dois modelos estão apresentados na Tabela 5.8. As curvas obtidas pelo ajuste dos dados experimentais à Equação 2.5 para todos os filmes estudados estão apresentadas nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11. Complementando, a evolução da liberação da natamicina incorporada nos filmes em água e o ajuste dos pontos experimentais através da Equação 2.3 são mostrados nas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14.

Pela Tabela 5.8, observa-se que os coeficientes de difusão estimados pelos dois métodos citados apresentaram valores semelhantes, permitindo reafirmar que o processo de embebição da matriz teve pouca influência na difusividade. Os valores dos coeficientes de determinação do ajuste dos dois modelos utilizados variaram de 0,968 a 0,999, demonstrando um bom ajuste dos pontos experimentais em todos os casos estudados. Os valores dos coeficientes de difusão em água encontrados variaram entre $2,49 \times 10^{-12}$ a $2,80 \times 10^{-11}$ cm^2/s . Estes valores são muito baixos quando comparados a valores encontrados para outros antimicrobianos incorporados em matrizes poliméricas, podendo constituir-se em uma vantagem no uso destes filmes como embalagem ativa. Por exemplo, para o sorbato de potássio os valores reportados na literatura são da ordem de 10^{-7} cm^2/s em filmes de proteína do soro do leite (Franssen *et al.*, 2004; Ozdemir e Floros, 2001), filmes de alginato de sódio (Zactiti e Kieckbusch, 2009), filmes de glúten (Redl *et al.*, 1996) e filmes de amido de mandioca (Flores *et al.*, 2007b) e da ordem de 10^{-9} cm^2/s em filmes de κ -carragena (Choi *et al.*, 2005). A lisozima apresentou valores de difusividade na ordem de 10^{-10} cm^2/s em filmes de acetato de celulose (Gemili *et al.*, 2009). Mastromatteo *et al.* (2009) reportam valores da ordem de 10^{-8} cm^2/s para timol incorporado em filmes de zeína de milho. Já a nisina apresenta difusividades na ordem de 10^{-10} cm^2/s em filmes de glúten e 10^{-11} cm^2/s em filmes de zeína de milho (Teerakarn *et al.*, 2002). Franssen *et al.* (2004) determinaram coeficientes de difusão da natamicina em filmes de proteína do soro do leite entre $3,76 \times 10^{-9}$ e $6,16 \times 10^{-10}$ cm^2/s de acordo com a concentração de glicerol presente na matriz.

Tabela 5.8: Espessuras finais (δ_{final}) e coeficientes de difusão (D) dos filmes de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2* contendo diferentes concentrações iniciais de natamicina

<i>Filme</i>	δ_{final} (mm)	D ($\times 10^{11}$) (cm^2/s)*	R^2	D ($\times 10^{11}$) (cm^2/s)**	R^2	
Alginato puro	4% antes	0,102 (0,002)	1,586 (0,084) ^c	0,995	1,639 (0,071) ^c	0,985
				0,994		0,981
				0,993		0,982
	4% depois	0,107 (0,005)	1,648 (0,084) ^c	0,994	1,638 (0,055) ^c	0,980
				0,989		0,978
				0,993		0,980
	8%	0,111 (0,010)	0,986 (0,080) ^b	0,999	0,975 (0,065) ^b	0,986
				0,999		0,984
				0,999		0,987
<i>Filme Composto 1</i>	4% antes	0,137 (0,008)	0,782 (0,020) ^b	0,995	0,775 (0,047) ^{a,b}	0,994
				0,992		0,991
				0,989		0,996
	4% depois	0,145 (0,011)	0,597 (0,024) ^{a,b}	0,998	0,549 (0,076) ^{a,b}	0,998
				0,992		0,994
				0,993		0,992
	8%	0,145 (0,012)	0,249 (0,036) ^a	0,997	0,357 (0,012) ^a	0,968
				0,995		0,979
				0,994		0,977
<i>Filme Composto 2</i>	4% antes	0,180 (0,007)	2,818 (0,374) ^d	0,998	2,679 (0,433) ^d	0,998
				0,999		0,997
				0,998		0,998
	4% depois	0,183 (0,018)	2,612 (0,290) ^d	0,999	2,530 (0,329) ^d	0,999
				0,999		0,999
				0,999		0,998
	8%	0,183 (0,006)	1,077 (0,128) ^b	0,996	1,024 (0,178) ^b	0,996
				0,995		0,997
				0,996		0,994

Média (desvio padrão) de três determinações experimentais

*Calculado a partir da Equação 2.5 (Solução para tempos curtos)

**Calculado a partir da Equação 2.3 (Ensaio completos)

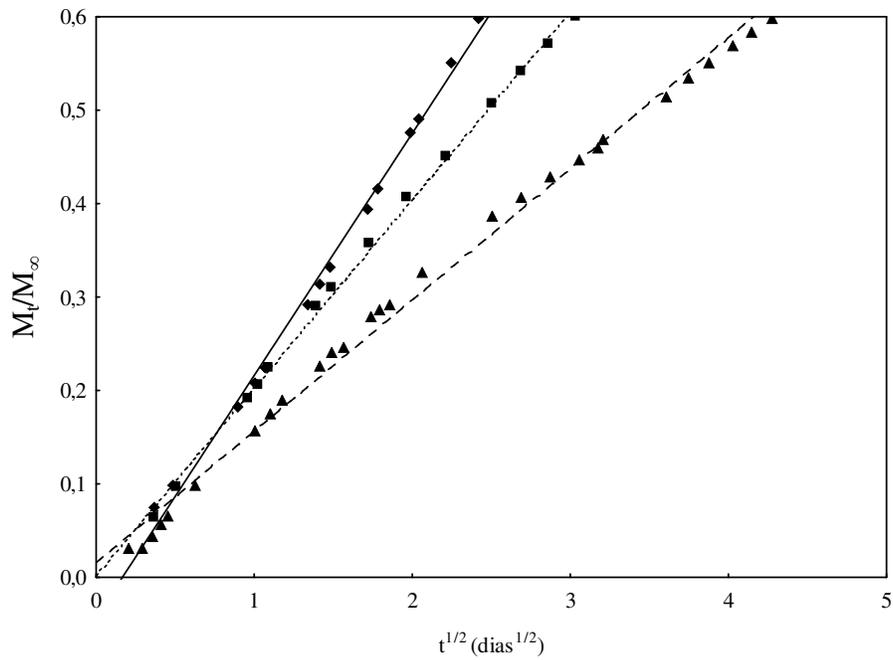


Figura 5.9: Ajuste ao modelo de tempos curtos para filme de alginato puro (\diamond), *Filme Composto 1* (\triangle) e *Filme Composto 2* (\square) contendo 4% de natamicina (adicionada no início do processo de elaboração da solução filmogênica)

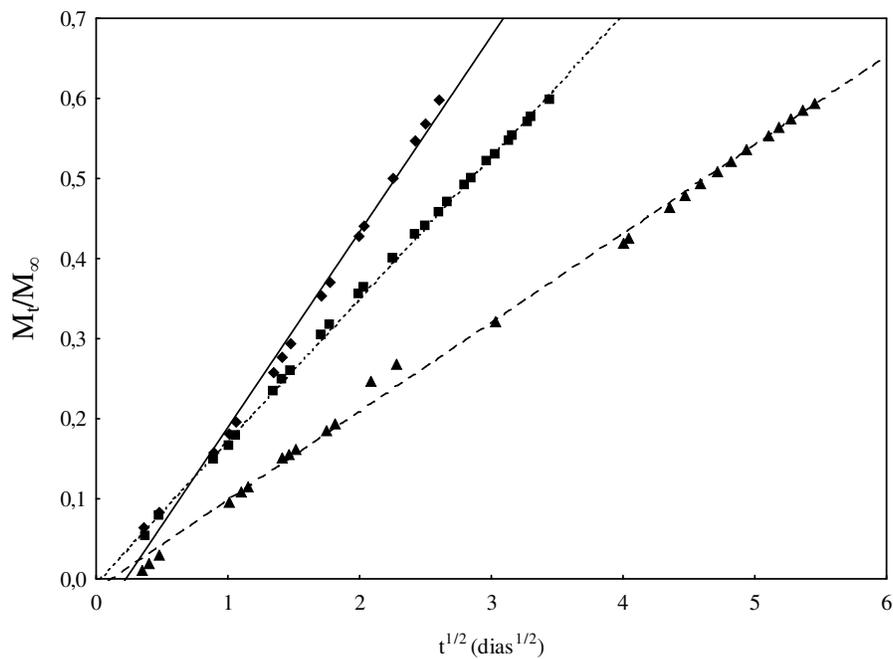


Figura 5.10: Ajuste ao modelo de tempos curtos para filme de alginato puro (\diamond), *Filme Composto 1* (\triangle) e *Filme Composto 2* (\square) contendo 4% de natamicina (adicionada no final do processo de elaboração da solução filmogênica)

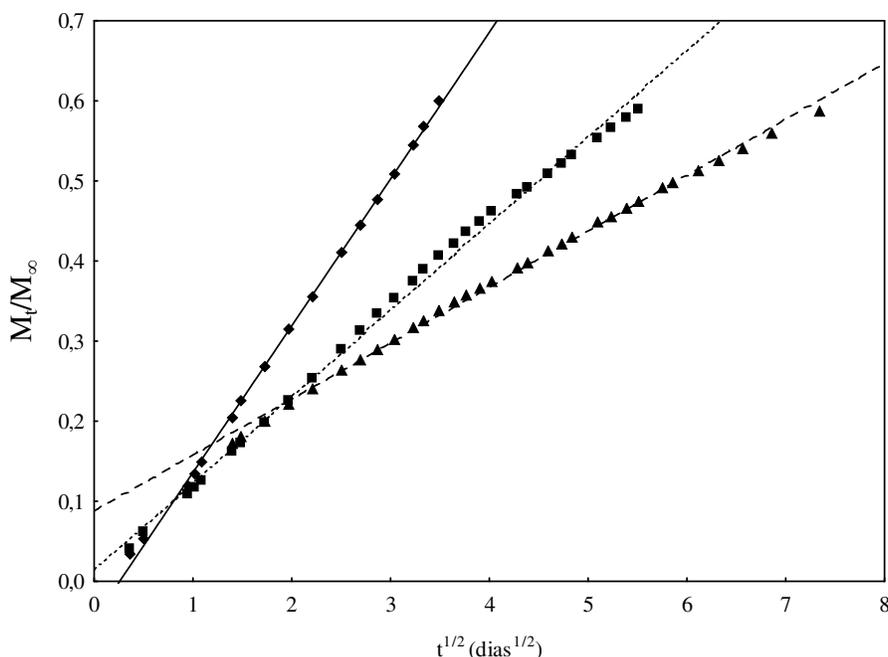


Figura 5.11: Ajuste ao modelo de tempos curtos para filme de alginato puro (\diamond), *Filme Composto 1* (\square) e *Filme Composto 2* (\triangle) contendo 8% de natamicina (adicionada no final do processo de elaboração da solução filmogênica)

Através da Tabela 5.8 pode-se observar também que os coeficientes de difusão da natamicina nos filmes de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2* com concentração inicial de 4%, não apresentaram diferença significativa em relação à forma de incorporação do antimicrobiano (antes ou depois). No entanto, contrariamente ao que se esperava, o aumento da concentração da natamicina nos filmes de 4 para 8%, diminuiu a sua difusividade, sendo esta diferença estatisticamente significativa para o filme de alginato puro e o *Filme Composto 2*. Isto pode estar relacionado com o fato de que na matriz mais carregada, devido à baixa solubilidade da natamicina, a formação de cristais foi maior, fazendo com que o processo de liberação seja mais lento, pois inicialmente será necessário a dissolução do cristal e só então a sua liberação. Kurnik e Potts (1997) explicam que um tipo específico de sistema de liberação controlada é composto de uma mistura da substância ativa tanto na forma solúvel quanto na forma cristalina dispersa na fase polimérica. No trabalho os autores investigam o efeito do tamanho inicial dos cristais da substância ativa no perfil de liberação de droga incorporada em um filme polimérico de uma e duas camadas. Eles enfatizam que a modelagem matemática para estes sistemas contendo a substância dissolvida e na forma cristalina é mais complexa do que em sistemas em que

toda a droga está uniformemente dissolvida, devido à incorporação de um termo da reação de dissolução. Esses sistemas são eficientes quando se quer retardar a liberação de substâncias. Wallace e Rosenblatt (2003) apontam que quando se trabalha com ativos que apresentam baixa solubilidade em água, deve-se aumentar a carga do agente ativo, induzindo a formação de cristais que deverão primeiro se solubilizar e então se difundir. A maior ocorrência de cristais nos filmes contendo 8% de natamicina pode ser verificada nas micrografias das superfícies dos filmes (Figuras 5.17 (g), 5.18 (g) e 5.19 (g)), que serão discutidos em detalhes posteriormente.

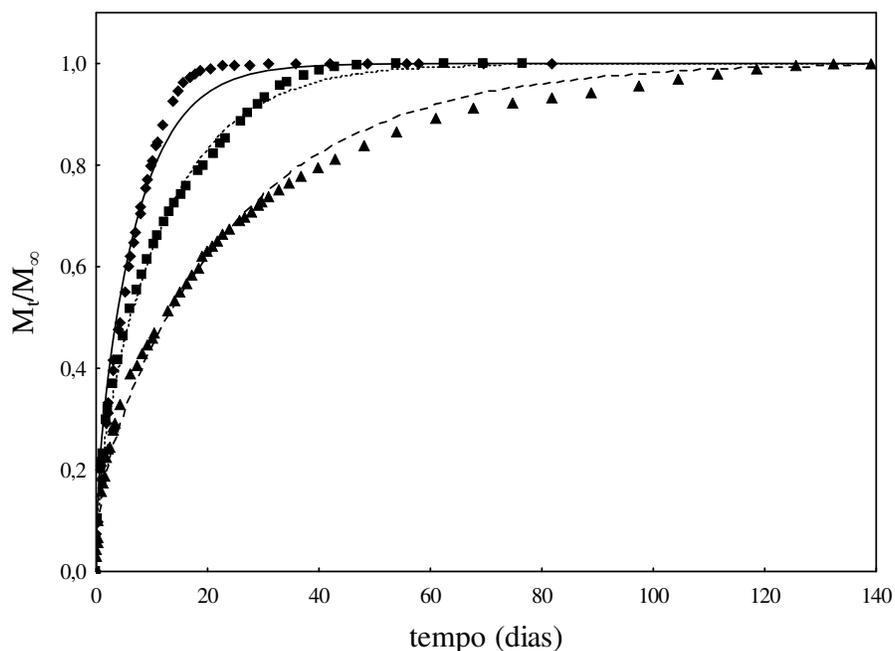


Figura 5.12: Evolução da liberação de natamicina (4% antes) em água: Filme de alginato (\diamond , —), Filme Composto 1 (\triangle , ----) e Filme Composto 2 (\square ,). Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas o ajuste ao modelo da Equação 2.5

Em outro trabalho, Siepmann e Peppas (2001), estudando os mecanismos envolvidos na liberação controlada de fármacos em matrizes de hidroxipropilcelulose, enfatizam que as características físico-químicas dos polímeros e dos agentes ativos devem ser consideradas na escolha do modelo matemático a ser usado para prever a liberação. Os autores ilustram que de maneira geral, o aumento da concentração da droga aumenta a porosidade da matriz à medida que a droga vai sendo liberada. Assim, a resistência à difusão diminui levando a um aumento da taxa de transferência. No entanto, quando a quantidade da droga excede o limite de solubilidade no sistema, deve-se considerar o efeito

do excesso de soluto não dissolvido e, portanto, não disponível para difusão. Nestes casos, este efeito pode se sobrepor ao efeito da porosidade.

Estudando a liberação de um fármaco incorporado em matrizes de alginato e gelatina reticuladas com íons Ca^{+2} , Dong *et al.* (2006) também constataram que a taxa de liberação da droga diminuía com o aumento da concentração da mesma na matriz.

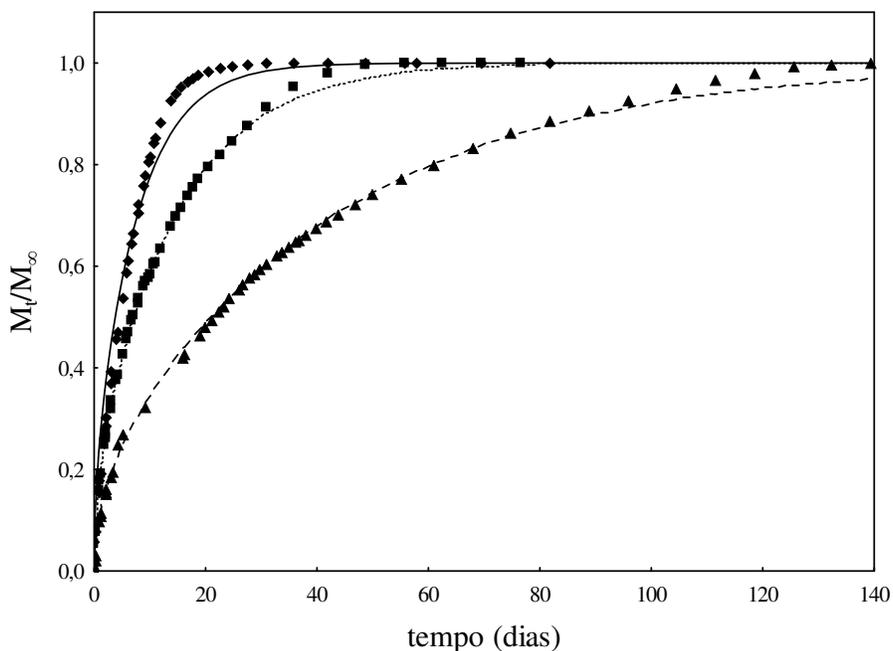


Figura 5.13: Evolução da liberação de natamicina (4% depois) em água: Filme de alginato (\diamond , —), Filme Composto 1 (\triangle , ----) e Filme Composto 2 (\square ,). Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas o ajuste ao modelo da Equação 2.5

Comparando-se as curvas de liberação da natamicina incorporada aos filmes de alginato e aos *Filmes Compostos 1* e *2* em água (Figuras 5.12, 5.13 e 5.14) pode-se observar que a cinética de liberação das matrizes que contêm quitosana foi muito mais lenta. Observa-se que, nas concentrações iniciais de 4% antes e depois, o filme de alginato atingiu o equilíbrio em aproximadamente 20 dias, enquanto que este período foi em torno de 45 dias para o *Filme Composto 2* e superior a 120 dias para o *Filme Composto 1*. Estas constatações confirmam que estaria havendo uma interação entre a quitosana e a natamicina. Para os filmes com concentração inicial de natamicina de 8%, os períodos para chegar no equilíbrio foram 40, 140 e maior que 190 dias para o filme de alginato, o *Filme Composto 2* e o *Filme Composto 1*, respectivamente.

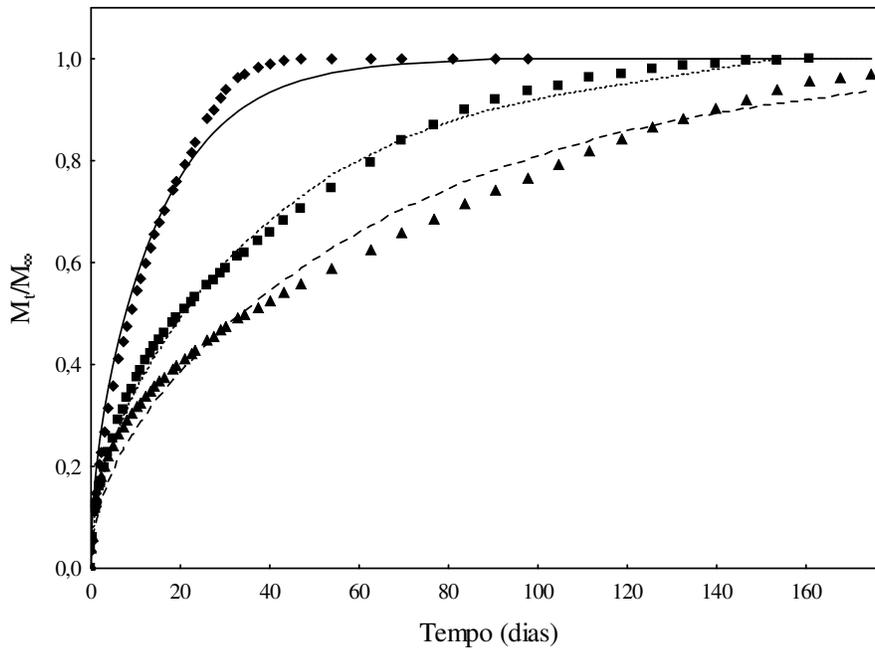


Figura 5.14: Evolução da liberação de natamicina (8% depois) em água: Filme de alginato (\diamond , —), Filme Composto 1 (\triangle , ----) e Filme Composto 2 (\square ,). Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas o ajuste ao modelo da Equação 2.5

Os valores da Tabela 5.8 indicam que a difusividade da natamicina no *Filme Composto 2*, é mais alta que a difusividade do filme de alginato. Isto pode ser explicado pelas características estruturais da matriz deste filme. Observações visuais destes filmes imersos em água durante os ensaios de liberação indicaram um alto grau de intumescimento e a formação de bolhas na superfície do filme. Desta forma, apesar da liberação ter sido mais lenta (conforme mostram as Figuras 5.12, 5.13 e 5.14) e da provável interação da quitosana com a natamicina, refletida na menor massa de ativo liberada em relação ao filme de alginato (Tabela 5.6), esta desestruturação da matriz no meio líquido pode promover uma saída mais rápida da natamicina. O *Filme Composto 1* apresentou um grau de intumescimento bem menos acentuado e a aparência do filme durante todo o ensaio se manteve muito próxima à do filme original. Pode-se observar que a cinética de liberação foi ainda mais lenta (Figuras 5.12, 5.13 e 5.14) e que os coeficientes de difusão foram aproximadamente 2,11, 2,98 e 2,73 vezes menor do que os da natamicina nos filmes de alginato, para os filmes com concentração inicial de 4% (antes), 4% (depois) e 8%, respectivamente.

Diante dos dados cinéticos encontrados nos ensaios de liberação da natamicina presente nos filmes compostos em água, ou seja, a observação de uma liberação mais lenta e uma menor massa de natamicina liberada no equilíbrio para estes filmes, é possível assumir que uma interação eletrostática esteja ocorrendo entre os grupos NH_3^+ da quitosana e grupos COO^- da natamicina nas condições experimentais utilizadas. Liao *et al.* (2005) estudando a liberação de diversas substâncias ativas em fibras de quitosana e alginato comentam que a capacidade de liberação controlada deste tipo de sistema depende da interação incompleta entre os dois polímeros, deixando grupos iônicos expostos para se ligarem com o ativo. Os autores concluem que a cinética de liberação em sistemas de alginato e quitosana é governada por dois fatores principais: a massa molar do soluto e a cargas características presentes no polímero e no soluto.

Siepmann *et al.* (2006) compararam o perfil de liberação de três substâncias ativas (ibuprofeno, maleato de clorfeniramina e metoprolol) em matrizes de Eudragit. Os autores explicam que como os solutos foram incorporados abaixo dos limites de solubilidade, as diferenças encontradas nos perfis de liberação seriam explicadas pelas interações eletrostáticas entre os solutos e o polímero. O ibuprofeno é carregado negativamente em pH 7,4 podendo então interagir com os grupos amônio do Eudragit, e conseqüentemente sua difusão foi significativamente retardada. Em outro trabalho, Wallace e Rosenblatt (2003) relatam que períodos mais longos de liberação de solutos podem ocorrer devido à ligação entre certos compostos ativos e a matrizes de colágeno. Singh *et al.* (1995 a e b) desenvolveram um modelo matemático para modelar os perfis de liberação de compostos catiônicos (polilisina e gentamicina) de matrizes de colágeno, os quais são governados por difusão e por interações eletrostáticas. Os autores observaram que 90% da gentamicina incorporada foi liberada da matriz de colágeno nativo (que não apresenta cargas nas cadeias) em 2,5 dias, enquanto que, neste mesmo período de tempo, foram liberados apenas 70% e 50% da carga inicial de gentamicina a partir de matrizes carregadas negativamente, colágeno succinilado e colágeno fosfonilado, respectivamente. Isotermas de adsorção foram determinadas por estes autores para caracterizar as interações e aplicar o modelo proposto.

Conforme a literatura sugere, modelos matemáticos mais complexos, considerando a difusão e a desorção como mecanismos envolvidos na liberação devem ser adaptados e utilizados para analisar estes fenômenos com mais detalhes. No entanto, tal análise requer o

conhecimento de dados experimentais adicionais e que estavam além do escopo proposto para o presente trabalho.

Como forma de confirmar qualitativamente a afinidade da natamicina pelas matrizes poliméricas testadas, determinou-se a massa de natamicina adsorvida durante a imersão dos filmes em solução aquosa contendo uma concentração conhecida de natamicina (Tabela 5.9). Pode-se observar que, conforme a tendência encontrada na liberação, a natamicina apresentou uma maior afinidade pelas matrizes poliméricas que continham quitosana (*Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*), comparada à matriz de alginato puro. A massa adsorvida tendeu a aumentar com o aumento da concentração de quitosana. Kuijpers *et al.* (1998) observaram que a interação da lisozima com uma matriz de gelatina do tipo B é maior que a interação deste mesmo ativo com uma matriz de gelatina do tipo A, sendo a massa adsorvida no primeiro caso consideravelmente maior. Os autores atribuem esta característica a maior concentração de grupos carboxílicos presentes na gelatina do tipo B que estariam disponíveis para interagir com a lisozima. Singh *et al.* (1995a) levantaram isotermas de adsorção de polilisina em filmes de colágeno nativo, colágeno succinilado e colágeno fosfonilado. As máximas massas de soluto que foram adsorvidas nas matrizes poliméricas, aumentaram com a presença de cargas na matriz, sendo a maior interação observada para a matriz de colágeno fosfonilado, o qual, além de apresentar cargas negativas, apresenta uma valência maior comparada ao colágeno succinilado. O colágeno nativo não apresenta cargas e, portanto não apresentou adsorção da polilisina.

Tabela 5.9: Máxima massa de natamicina adsorvida pelos filmes

<i>Filme</i>	<i>Concentração inicial na solução, t = 0 (mg/mL)</i>	<i>Concentração final na solução, t = 85 dias (mg/mL)</i>	<i>Massa adsorvida (mg/g filme)</i>
Alginato puro	1,098	0,926	30,714
<i>Filme Composto 1</i>	1,098	0,420	121,071
<i>Filme Composto 2</i>	1,098	0,334	136,429

Correlacionando esses resultados de difusão com a atividade antimicrobiana apresentada pelos filmes (Item 5.1.3.1), pode-se concluir que a concentração do agente

ativo liberada foi importante na determinação da magnitude do halo de inibição. O mecanismo que irá governar o efeito inibitório da natamicina liberada é a difusão desta no ágar, que era o mesmo em todos os tratamentos. Através das curvas das Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 e dos valores de M_{∞} , pode-se estimar uma relação entre a concentração de natamicina liberada nos cinco dias de incubação das placas pelos três tipos de filmes. Para os filmes de alginato, obteve-se aproximadamente 6,94, 6,94 e 10,52 mg natamicina/ g filme, para o filme com 4% antes, 4% depois e 8%, respectivamente. Estes dados explicam o maior halo de inibição observado para o filme de alginato com 8% de natamicina e o mesmo tamanho de halo observado para os filmes com 4% de natamicina, independentemente do método de incorporação da mesma. Da mesma forma, para o *Filme Composto 1*, estimou-se concentrações de 2,77, 2,65 e 5,17 mg/g filme, para o filme com 4% antes, 4% depois e 8%, respectivamente. Já para o *Filme Composto 2*, estimou-se 3,03 e 3,29 e 5,65 mg/g filme, para o filme com 4% antes, 4% depois e 8%, respectivamente. De maneira similar a encontrada para os filmes de alginato, confirma-se a tendência de se obter maiores halos de inibição para os *Filmes Compostos* com o aumento da concentração inicial de natamicina. Além disso, pode-se observar que os dados encontrados se correlacionam bem com a tendência observada nos ensaios microbiológicos de que os filmes de alginato foram mais eficientes comparados aos *Filmes Compostos* nos 5 primeiros dias de aplicação. Infelizmente por ocasião da realização dos ensaios microbiológicos não se tinha uma estimativa do período de tempo ativo dos ensaios de liberação. Seguindo a rotina do laboratório de microbiologia fez-se o descarte das placas depois de cinco dias de incubação, após as contagens das UFC e as medições dos halos de inibição. Caso esses ensaios microbiológicos tivessem sido prolongados por vários dias poderiam fornecer dados mais conclusivos sobre a real eficiência e persistência do efeito inibitório da natamicina juntamente com os dados de liberação. A correlação entre os resultados dos ensaios microbiológicos e dos ensaios de difusão aqui obtidos permitem afirmar que os filmes desenvolvidos no presente trabalho apresentam uma excelente perspectiva de atuação como filmes ativos (antimicóticos) para alimentos.

5.3 Caracterização física e química das formulações otimizadas contendo natamicina

Apesar do crescente interesse na incorporação de compostos antimicrobianos em biofilmes, a literatura é relativamente escassa no que diz respeito aos seus efeitos nas

propriedades físicas e na microestrutura destes filmes. Os filmes produzidos conforme as formulações otimizadas (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) contendo diferentes concentrações de natamicina foram caracterizados com o intuito de se verificar o efeito da adição deste antimicrobiano nas propriedades dos mesmos.

5.3.1 Espessura

Os valores das espessuras dos filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) nas diferentes concentrações de natamicina testadas estão apresentados na Tabela 5.10. Os resultados para as formulações do filme de alginato puro e *Filme Composto 1* mostraram diferenças significativas entre os valores de espessura dos filmes, indicando que a incorporação da natamicina em concentrações crescentes tendeu, de maneira geral, a causar um incremento na espessura. No caso das formulações do *Filme Composto 2*, as diferenças não foram significativas. O menor aumento da espessura com o aumento da concentração de natamicina nos filmes contendo quitosana, ou seja, *Filme Composto 1* e *2*, pode ser devido à interação da natamicina, explicando o menor efeito inibitório destes filmes, ou ainda devido à maior intensidade de agitação utilizada durante a incorporação do antimicrobiano nos filmes com quitosana (14000 rpm) comparada a utilizada na fabricação dos filmes de alginato puro (1500 rpm). Santiago-Silva *et al.* (2009), estudando a incorporação de pediocina em filmes de celulose, obtiveram um aumento de aproximadamente 2 e 3 vezes na espessura comparado ao filme controle, para filmes contendo 25 e 50% de antimicrobiano em relação à massa do polímero, respectivamente. Em outro trabalho também com filmes de celulose, Pires *et al.* (2008) relatam aumentos significativos em relação ao filme sem o agente ativo para filmes contendo natamicina. Ko *et al.* (2001) observaram que a incorporação de nisina não aumentou significativamente a espessura de filmes de proteína do soro de leite e de albumina de ovo, mas aumentou a espessura de filmes de glúten de trigo e de isolado protéico de soja. Garcia *et al.* (2009) relatam que filmes de quitosana apresentaram espessuras superiores comparados a filmes de metilcelulose e que os filmes compostos destes dois biopolímero apresentaram espessuras intermediárias à dos filmes simples.

Tabela 5.10: Espessuras das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	Espessura (mm)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	0,047 (0,003) ^{a,A}	0,054 (0,004) ^{a,B}	0,062 (0,003) ^{ab,C}
0,5	0,047 (0,001) ^{a,A}	0,056 (0,003) ^{ab,B}	0,065 (0,005) ^{ab,C}
1	0,059 (0,005) ^{bc,A}	0,056 (0,002) ^{ab,A}	0,066 (0,003) ^{ab,B}
2	0,055 (0,006) ^{ab,A}	0,059 (0,003) ^{bc,A}	0,062 (0,002) ^{ab,B}
4 (depois)	0,058 (0,003) ^{bc,A}	0,060 (0,003) ^{cd,A}	0,065 (0,002) ^{ab,B}
4 (antes)	0,056 (0,005) ^{bc,AB}	0,055 (0,003) ^{ab,A}	0,060 (0,004) ^{a,B}
8	0,065 (0,008) ^{c,A}	0,063 (0,002) ^{d,A}	0,068 (0,004) ^{b,A}

* Média (desvio padrão) de dez determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

5.3.2 Conteúdo de umidade e massa solubilizada em água

Os valores do conteúdo de umidade de equilíbrio ($UR = 52\%$) e da massa solubilizada em água dos filmes ativos (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) nas diferentes concentrações de natamicina testadas estão apresentados nas Tabela 5.11 e 5.12, respectivamente. A umidade dos filmes variou de 0,18 a 0,20 g H₂O/g amostra. Esses valores são típicos encontrados para biofilmes (Rhim, 2004; Garcia *et al.*, 2006). Rhim (2004) obteve umidades entre 15,7 e 17,7% para filmes de alginato tratados por imersão com soluções de CaCl₂. Park *et al.* (2004) obtiveram valores de umidade entre 0,19 a 0,23 g H₂O/g amostra para filmes de quitosana incorporados com lisozima (0-100% em relação a massa de biopolímero).

Um baixo valor de massa solubilizada em água é uma das características mais importantes e desejáveis para biofilmes que visam aplicações nas áreas alimentícia. Apesar de sua importância, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura apresentam apenas características físicas como propriedade mecânicas e de barreira (Kim *et al.*, 2002; Rhim, 2004).

Os valores das massas solubilizadas em água dos filmes de alginato puro não apresentaram diferenças significativas com o aumento da concentração de natamicina

(Tabela 5.12). Rhim (2004) obteve massa solubilizada em torno de 16% para filmes de alginato puro sem adição de antimicrobiano.

Tabela 5.11: Conteúdo de umidade das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	ω (g H ₂ O/g amostra)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	0,187 (0,001) ^{bc,B}	0,178 (0,002) ^{a,A}	0,197 (0,007) ^{b,B}
0,5	0,186 (0,001) ^{bc,A}	0,181 (0,004) ^{ab,A}	0,201 (0,006) ^{b,B}
1	0,189 (0,002) ^{c,A}	0,184 (0,001) ^{ab,A}	0,181 (0,003) ^{a,A}
2	0,190 (0,004) ^{c,B}	0,181 (0,004) ^{ab,A}	0,186 (0,004) ^{a,A}
4 (depois)	0,179 (0,006) ^{ab,A}	0,186 (0,004) ^{b,B}	0,191 (0,002) ^{a,B}
4 (antes)	0,175 (0,002) ^{a,A}	0,190 (0,003) ^{bc,B}	0,189 (0,002) ^{a,B}
8	0,192 (0,004) ^{c,A}	0,198 (0,006) ^{c,A}	0,186 (0,005) ^{a,A}

* Média (desvio padrão) de três determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa (p < 0,05)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa (p < 0,05)

Para os filmes compostos de alginato e quitosana um aumento significativo da massa solubilizada, em relação aos filmes sem natamicina, foi observado em concentrações de natamicina acima de 1 e 4 g/100 g biopolímero, para o *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, respectivamente. Confirmando os resultados obtidos nos planejamentos experimentais, o aumento da concentração de quitosana nos filmes, independente da concentração de natamicina utilizada, aumentou significativamente a massa solubilizada em água. O maior valor de massa solubilizada, 0,27 g/g de massa seca, foi observado para o *Filme Composto 2* contendo 8% de natamicina. Apesar disso o efeito da adição de natamicina nos filmes estudados foi relativamente ameno quando comparado a outros trabalhos descritos na literatura com a incorporação de agentes antimicrobianos. Bertan (2008) obteve aumentos significativos na massa solubilizada em água de filmes compostos de amido, gelatina e glúten com a adição de sorbato de potássio (2 e 4% p/v), atribuindo este aumento à solubilização do próprio sorbato durante os ensaios, sendo que os valores de massa solubilizada variaram entre 29,97 e 50,81%. Zactiti (2004) também observou que a adição de sorbato de potássio (0,07 g/g alginato) quase duplicou o valor de massa

solubilizada em água. Flores *et al.* (2007b) determinaram valores de massa solubilizada de aproximadamente 22% para filmes de amido de mandioca utilizando diferentes métodos de fabricação. Estes filmes, no entanto, apresentaram um aumento de massa solubilizada em água quando sorbato de potássio (6 g/100g amido) foi incorporado aos filmes, elevando a massa solubilizada para \cong 30%. Estes autores relatam que uma rede polimérica menos organizada é formada quando o antimicrobiano está presente, ocasionando este aumento na massa solubilizada em água. Garcia *et al.* (2006) determinaram uma massa solubilizada de 30% para filmes de amido de milho com 0,28 g glicerol/g amido. Em outro trabalho Sébastien *et al.* (2006) reportam valores de 30 a 35% para a massa solubilizada em água de filmes compostos de quitosana e ácido polilático (PLA).

Tabela 5.12: Massa solubilizada em água das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	MS (g/g m.s.)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	0,141 (0,001) ^{a,A}	0,195 (0,004) ^{a,B}	0,234 (0,011) ^{a,C}
0,5	0,143 (0,020) ^{a,A}	0,209 (0,010) ^{ab,B}	0,248 (0,008) ^{ab,C}
1	0,146 (0,009) ^{a,A}	0,215 (0,006) ^{bc,B}	0,254 (0,007) ^{ab,C}
2	0,160 (0,006) ^{a,A}	0,216 (0,005) ^{bc,B}	0,252 (0,011) ^{ab,C}
4 (depois)	0,166 (0,005) ^{a,A}	0,216 (0,004) ^{bc,B}	0,260 (0,005) ^{b,C}
4 (antes)	0,162 (0,002) ^{a,A}	0,212 (0,007) ^{bc,B}	0,260 (0,009) ^{b,C}
8	0,163 (0,003) ^{a,A}	0,232 (0,008) ^{c,B}	0,270 (0,005) ^{b,C}

* Média (desvio padrão) de três determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

5.3.3 Permeabilidade ao vapor de água

Os filmes de alginato puro e filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina foram avaliados quanto a sua permeabilidade ao vapor de água (PVA). Os valores de PVA variaram de 3,95 a 7,81 g.mm/m².dia.kPa (Tabela 5.13). Um aumento significativo na PVA só foi observado com a adição de 8% de natamicina aos filmes de alginato puro e com a adição de 4 (depois) e 8% para o *Filme Composto 1*. Para o *Filme Composto 2* não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de

natamicina testadas. É interessante notar que apesar da adição de 4% (depois) de natamicina ter provocado um aumento significativo no PVA do *Filme Composto 2*, o filme com a mesma concentração do antimicrobiano, porém adicionado no início do processo fabricação (4% antes) não apresentou diferença significativa em relação ao PVA do filme sem antimicrobiano. Isto pode sugerir que a natamicina adicionada no início do processo foi melhor solubilizada e conseqüentemente melhor incorporada à matriz polimérica. A permeabilidade ao vapor de água, por se tratar de um processo de dissolução e difusão, é governada não somente pela concentração e estrutura química dos componentes da matriz, mas também da mobilidade da cadeia polimérica da matriz do filme que, por sua vez, depende da cinética de formação, forças de ligação entre as cadeias, grau de reticulação e cristalinidade. Micrografias dos filmes serão apresentadas no Item 5.3.9, mas antecipando os resultados, analisando a Figura 5.18 (e) e (f) que mostra a microestrutura da superfície do *Filme Composto 2* contendo 4% de natamicina adicionado depois e antes do processo de preparação da solução filmogênica, respectivamente, é possível observar a maior quantidade de cristais de natamicina presentes no filmes em que a mesma foi adicionada no fim do processo (Figura 4.18 (f)).

Tabela 5.13: Coeficiente de permeabilidade ao vapor de água das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	PVA (g.mm/m ² .dia.kPa)*		
	Alginate puro	<i>Filme Composto 1</i>	<i>Filme Composto 2</i>
0	4,06 (0,26) ^{a,A}	4,91 (0,09) ^{a,B}	7,41 (0,15) ^{a,C}
0,5	3,95 (0,03) ^{a,A}	4,87 (0,03) ^{a,B}	7,81 (0,57) ^{a,C}
1	4,05 (0,33) ^{a,A}	5,04 (0,15) ^{a,B}	7,79 (0,23) ^{a,C}
2	4,01 (0,18) ^{a,A}	5,00 (0,18) ^{a,B}	7,61 (0,07) ^{a,C}
4 (depois)	4,13 (0,05) ^{a,A}	6,00 (0,42) ^{b,B}	7,65 (0,15) ^{a,C}
4 (antes)	3,95 (0,21) ^{a,A}	5,17 (0,34) ^{a,B}	7,43 (0,09) ^{a,C}
8	5,63 (0,47) ^{b,A}	6,39 (0,24) ^{b,A}	7,72 (0,15) ^{a,B}

* Média (desvio padrão) de três determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa (p < 0,05)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa (p < 0,05)

Türe *et al.* (2009) não observaram alterações significativas nos coeficientes de PVA de filmes de proteína de trigo e metilcelulose contendo até 2mg de natamicina por g de solução filmogênica (ou seja, 1,33% e 6,67% em relação a massa de polímero, para o filme de proteína do trigo e o filme de metilcelulose, respectivamente). Flores *et al.* (2007b) relatam que a adição de sorbato de potássio não alterou a PVA de filmes de amido de mandioca. Resultados similares foram obtidos por Zactiti (2004), que não observou aumento significativo da PVA de filmes de alginato com a adição de sorbato de potássio (0,07 g/g alginato) e Cagri *et al.* (2002) com filmes de base protéica contendo 0,5 e 0,75% (m/m) de ácido sórbico. No entanto para filmes compostos de amido, gelatina e glúten (1:1:1), Bertan (2008) obteve, para o filme contendo 2% (p/v), um aumento de quase 4 vezes o valor de PVA do filme sem sorbato. Pranoto *et al.* (2005) observaram um aumento significativo da PVA de filmes de quitosana com a incorporação de sorbato de potássio em concentrações acima de 150 mg/g de quitosana e de nisina na concentração de 204×10^{-3} UI/g de quitosana, enquanto que a adição de óleo de alho (até 400 μ L/g de quitosana) não alterou esta propriedade.

Assim como para a massa solubilizada em água, também foi observado um aumento significativo na PVA com o aumento da concentração de quitosana nos filmes estudados. Contrariamente, Garcia *et al.* (2006) observaram uma diminuição de PVA de filmes de amido de milho com a adição de quitosana.

Analisando a classificação de propriedades de biofilmes de Krochta e De Mulder Johnston, 1997 é relevante observar que mesmo com a adição de natamicina na maior concentração estudada, ou seja 8%(m/m), todos os filmes (alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) se enquadram na categoria moderada em relação à permeabilidade ao vapor de água.

5.3.4 Grau de intumescimento

O transporte da água através de biofilmes depende da rigidez intrínseca do polissacarídeo, bem como do grau de reticulação da matriz polimérica. Visto que a hidratação e o intumescimento são considerados mecanismos-chave no processo de difusão de substâncias ativas, estudou-se o efeito do tipo de formulação e da concentração de antimicrobiano no grau de intumescimento dos filmes ativos. A massa de natamicina e de

polímero liberada na água no equilíbrio foi considerada desprezível em comparação com a massa de água absorvida durante o ensaio de intumescimento. A cinética de absorção de água dos filmes testados indica que apesar dos valores de GI variarem, o tempo para atingir o equilíbrio em todos os casos era entre 5 e 10 minutos. Após este período a massa do filme úmido permanecia praticamente constante. Desta forma, decidiu-se apresentar no trabalho apenas uma curva de cada formulação (Figura 5.15), sendo os outros resultados apresentados como o valor do grau de intumescimento de equilíbrio após 40 minutos de imersão em água (Tabela 5.14). Os filmes das três formulações estudadas, em todas as concentrações de natamicina, apresentaram-se íntegros após os ensaios e com aparência semelhante à das amostras originais. Resultados semelhantes foram obtidos por diversos outros autores (Remuñán-López e Bodmeier, 1997; Buonocore *et al.*, 2003; Sriamornsak e Kennedy, 2008; Rivero *et al.*, 2009).

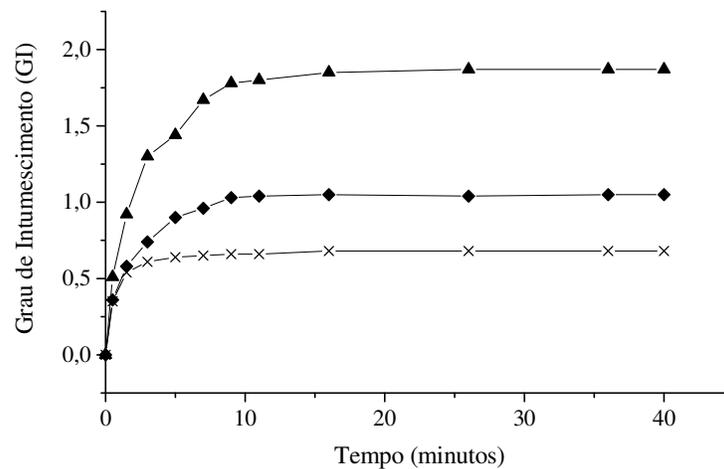


Figura 5.15: Perfil cinético de absorção de água do: (x) Filme de alginato puro, (♦) *Filme Composto 1* e (▲) *Filme Composto 2* sem natamicina

Pela Tabela 5.14 observa-se um aumento significativo do grau de intumescimento para os filmes de alginato puro e para o *Filme Composto 1* a partir da menor concentração de natamicina testada, variando de 0,70 para 0,78 g H₂O/g amostra e de 1,02 para 1,16 g H₂O/g amostra, para o alginato puro e para o *Filme Composto 1*, respectivamente. No entanto, não houve variação significativa nestes valores em relação a todas as outras concentrações testadas, para o filme de alginato puro, e com até 8% de natamicina para o *Filme Composto 1*. O grau de intumescimento das formulações contendo a maior concentração de quitosana (*Filme Composto 2*) não apresentou variação significativa com a

incorporação de natamicina até o limite de 8% (m/m). Esse mesmo comportamento foi observado com relação à PVA. Zactiti (2004) constatou que um filme de alginato reticulado com íons cálcio contendo 7 g de sorbato de potássio por 100 g de alginato absorveu 2 vezes mais água do que o filme sem sorbato.

Tabela 5.14: Grau de intumescimento de equilíbrio das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	Grau de intumescimento (g H ₂ O/g amostra)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	0,70 (0,02) ^{a,A}	1,02 (0,04) ^{a,B}	1,95 (0,12) ^{a,C}
0,5	0,78 (0,02) ^{b,A}	1,16 (0,01) ^{bc,B}	1,87 (0,05) ^{a,C}
1	0,81 (0,01) ^{b,A}	1,15 (0,08) ^{b,B}	1,75 (0,06) ^{a,C}
2	0,81 (0,03) ^{b,A}	1,14 (0,04) ^{b,B}	1,89 (0,05) ^{a,C}
4 (depois)	0,80 (0,02) ^{b,A}	1,14 (0,02) ^{b,B}	1,92 (0,10) ^{a,C}
4 (antes)	0,81 (0,01) ^{b,A}	1,15 (0,03) ^{bc,B}	1,94 (0,03) ^{a,C}
8	0,82 (0,01) ^{b,A}	1,27 (0,04) ^{c,B}	1,97 (0,10) ^{a,C}

* Média (desvio padrão) de três determinações experimentais.

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Como para as outras propriedades, a composição dos biopolímeros e o método de preparação mostraram ter influência nas propriedades de transporte e incorporação de água nos filmes. Comparando as três formulações estudadas, observa-se que o grau de intumescimento tendeu a aumentar com o aumento da concentração de quitosana. A presença de quitosana provavelmente alterou a conformação das ligações entre o alginato e o cálcio, aumentando a afinidade da água pela matriz polimérica, confirmado pelos resultados da análise de cálcio (Item 4.3.1). É interessante ressaltar que, pelos resultados obtidos na presente pesquisa, as condições de processo utilizadas não foram adequadas para formar complexos polieletrólitos insolúveis entre o alginato e a quitosana. Desta forma, a interação entre o íons cálcio e o alginato acabou sendo mais efetiva do que a mistura de alginato e quitosana no que se refere à diminuição da afinidade das moléculas de água pela matriz polimérica formada. Bernabé *et al.* (2005) obtiveram grau de intumescimento para membranas compostas de quitosana e pectina, sem tratamento com cálcio, aproximadamente duas vezes maior que os valores obtidos para o *Filme Composto 2*. No

entanto quando estas membranas foram tratadas termicamente (120°C por 2 horas) os valores foram semelhantes aos obtidos pelo *Filme Composto 2*. Os autores justificam esta redução em razão da formação de ligações amídicas entre os dois polímeros devido ao tratamento térmico. Diversos trabalhos apontam que o aumento do grau de reticulação da matriz diminui o intumescimento. Zactiti (2004) obteve valores decrescentes de grau de intumescimento aumentando a concentração de íons cálcio na solução reticuladora (2º estágio) de filmes de alginato. Remuñán-López e Bodmeir (1997) também observaram que a absorção de água no equilíbrio diminuía com o aumento da concentração de CaCl₂, sendo que o filme de alginato tratado por imersão em solução de 5% CaCl₂ por 30 minutos apresentou, assim como no presente trabalho, grau de intumescimento de 0,7 g H₂O/g amostra. A mesma observação foi feita por Buonocore *et al.* (2003) pelo aumento do grau de reticulação de filmes de polivinilálcool. Neste último trabalho os autores também concluem que o aumento do grau de reticulação, conseqüentemente a diminuição do GI, diminui a difusividade de agentes antimicrobianos (lisozima, nisina e benzoato de sódio) através dos filmes. Flores *et al.* (2007b) obtiveram valores de grau de intumescimento diferentes para filmes de amido de mandioca contendo sorbato de potássio produzidos por diferentes métodos.

5.3.5 Resistência mecânica

O comportamento dos filmes de alginato puro contendo natamicina nos ensaios de tração foi típico de materiais quebradiços, com valores altos de tensão na ruptura e baixos valores de alongamento. Por outro lado, os filmes compostos de alginato e quitosana apresentaram comportamento mais parecido com o de materiais dúcteis, com maiores valores de alongamento e menores valores de resistência a tração. Comparando as três formulações (Filme de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*), independentemente da concentração de natamicina, diferenças significativas entre a tensão de ruptura e o alongamento dos filmes foram observadas, sendo que a tensão tendeu a diminuir e o alongamento a aumentar com o aumento da concentração de quitosana. Os valores obtidos para estas propriedades estão apresentados nas Tabelas 5.15 e 5.16. Li *et al.* (2006) observaram que filmes compostos de quitosana e *Konjac* glicomanana apresentaram um pico de máxima tensão na ruptura (120 MPa) observada quando a concentração de quitosana era de 20% (m/m), sendo este pico atribuído à presença de interações

intermoleculares entre os dois biopolímeros. No entanto, o alongamento destes filmes não variou significativamente.

Tabela 5.15: Tensão de ruptura das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	TR (MPa)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	108,16 (4,03) ^{c,A}	75,37 (3,67) ^{b,B}	58,88 (3,22) ^{a,C}
0,5	99,69 (5,58) ^{c,A}	76,21 (5,38) ^{b,B}	53,82 (5,07) ^{a,C}
1	96,89 (3,97) ^{c,A}	75,83 (4,75) ^{b,B}	54,75 (4,42) ^{a,C}
2	81,67 (11,01) ^{b,A}	63,88 (4,83) ^{a,B}	56,68 (3,53) ^{a,C}
4 (depois)	83,97 (6,19) ^{b,A}	71,44 (6,82) ^{ab}	52,90 (4,31) ^{a,C}
4 (antes)	84,46 (8,90) ^{b,A}	73,43 (4,24) ^{b,B}	54,93 (4,32) ^{a,C}
8	69,61 (7,17) ^{a,A}	64,48 (5,47) ^{a,A}	54,02 (3,08) ^{a,B}

* Média (desvio padrão) de dez determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Na Tabela 5.15 observa-se também que a tensão na ruptura apresentou uma redução significativa com o aumento da concentração de natamicina a partir da concentração de 2% (m/m) para os filmes de alginato puro, sendo esta variação de 108,16 para 69,71 MPa quando 8% de natamicina era adicionado. Para as formulações do *Filme Composto 1* obteve-se redução significativa da TR nas concentrações de natamicina de 2 e 8% (m/m), no entanto, a diminuição foi menor comparada a redução observada para o filme de alginato puro, variando de 75,37 para 64,48 MPa com adição de 8% de natamicina. A TR do *Filme Composto 2* não apresentou variação significativa na faixa de concentração de natamicina estudada.

Analisando a Tabela 5.16 constata-se que o alongamento na ruptura não foi alterado pela adição de natamicina em nenhuma das formulações testadas. De acordo com estes resultados pode-se supor que as alterações na estrutura dos filmes com a adição de natamicina foram mais acentuadas no filme de alginato puro, provavelmente devido à melhor solubilização e homogeneização do antimicrobiano na matriz polimérica obtida pela

agitação mais intensa utilizada nos filmes compostos. Estas suposições corroboram com as observações feitas através das micrografias das superfícies dos filmes (Item 5.3.9).

Tabela 5.16: Alongamento na ruptura das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	Alongamento (%)*		
	Alginate puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	7,04 (1,66) ^{a,A}	12,49 (2,37) ^{a,B}	17,07 (2,19) ^{a,C}
0,5	7,11 (1,60) ^{a,A}	12,15 (2,06) ^{a,B}	18,03 (1,61) ^{a,C}
1	6,22 (1,06) ^{a,A}	11,48 (2,87) ^{a,B}	17,29 (3,28) ^{a,C}
2	6,09 (1,62) ^{a,A}	12,44 (1,98) ^{a,B}	17,86 (1,39) ^{a,C}
4 (depois)	8,16 (1,92) ^{a,A}	11,55 (2,31) ^{a,B}	17,32 (2,45) ^{a,C}
4 (antes)	5,90 (1,14) ^{a,A}	12,28 (3,11) ^{a,B}	17,45 (3,77) ^{a,C}
8	6,15 (1,12) ^{a,A}	11,99 (1,40) ^{a,B}	18,47 (3,85) ^{a,C}

* Média (desvio padrão) de dez determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Estudando as propriedades mecânicas de filmes de celulose contendo natamicina, nisina e uma mistura destes dois antimicrobianos, Pires *et al.* (2008), constataram que a presença destes agentes ativos provocou uma redução tanto na TR como no alongamento dos filmes. No entanto, os autores destacam que o efeito mais pronunciado foi causado pela adição de nisina e a da mistura de nisina e natamicina, de forma que os filmes contendo nisina e nisina + natamicina apresentavam-se bastante heterogêneos. Em outro trabalho, Türe *et al.* (2009) observaram uma redução significativa na TR de filmes de metilcelulose contendo natamicina em concentrações superiores a 3,33% (em relação a massa de polímero, ou 1 mg/g solução filmogênica). No entanto, em filmes de proteína de trigo, a adição de natamicina até 13,3% (2 mg/g solução filmogênica) não promoveu alteração das propriedades mecânicas. Park *et al.* (2004) obtiveram reduções lineares de tensão e alongamento na ruptura com o aumento da concentração de lisozima em filmes de quitosana, sendo que filmes contendo 1 g lisozima/g de quitosana apresentaram redução de 43 e 48% na tensão e no alongamento, respectivamente, em relação ao filme sem o antimicrobiano.

Pranoto *et al.* (2005), observaram um maior efeito na tensão (diminuição) e alongamento (aumento) na ruptura de filmes de quitosana quando estes eram adicionados de sorbato de potássio e nisina do que quando óleo de alho era utilizado como antimicrobiano. Em relação ao filme controle, o alongamento aumentou aproximadamente 3 vezes quando sorbato de potássio era adicionado (150 mg/g quitosana) e 9 vezes com a adição de nisina (204×10^{-3} IU/g de quitosana).

Enquanto que a maioria das pesquisas demonstram variações na tensão e alongamento na ruptura de biofilmes incorporados com agentes antimicrobianos, Zactiti (2004) não obteve diferenças significativas nas propriedades mecânicas de filmes de alginato contendo 3% (m/m) de sorbato de potássio. O mesmo foi observado por Han e Floros (1997) para filmes de polietileno contendo com sorbato de potássio.

5.3.6 Cor e transparência

Em aplicações na área de tecnologia de alimentos, a aparência é considerada um dos estímulos mais importantes, pois acredita-se que se o produto não apresentar um aspecto atraente, muito provavelmente o consumidor não avaliará as outras características como o sabor e a textura.

A cor é um atributo visual resultante da luz emitida, transmitida ou refletida pelos objetos. A cor caracteriza o aspecto global do objeto em questão e qualquer alteração ocorrida na sua estrutura ou composição tende a se refletir neste atributo. O sistema CIELCh é uma representação polar do sistema de coordenadas retangulares (CIELab) e utiliza três coordenadas para localizar a cor em um espaço colorido em termos de luminosidade (L^*), saturação (chroma, C^*) e tonalidade da cor (ângulo *hue*, h^*) (Nemtanu, 2008).

Subjetivamente, os filmes de alginato puro apresentavam-se transparentes e homogêneos sendo que a transparência parecia diminuir com o aumento da concentração de natamicina adicionada. Já os filmes compostos de alginato e quitosana eram visualmente mais amarelados e também tornavam-se menos transparentes com a adição do antimicrobiano. A análise de cor e transparência é uma forma de se quantificar estas observações visuais subjetivas comparando as respostas obtidas com padrões de cor pré-estabelecidos.

Os dados experimentais não mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de L^* (luminosidade) em todos os ensaios realizados, sendo a média destes $94,46 \pm 0,77\%$ indicando um alto grau de luminosidade das amostras. Garcia *et al.* (2004) e Rivero *et al.* (2009) obtiveram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho para filmes compostos de metilcelulose e quitosana e gelatina e quitosana, respectivamente, para todas as formulações testadas. Flores *et al.* (2007b) obteve valores de L para filmes de amido de mandioca em torno de 82 a 85% e verificaram que a presença de sorbato de potássio diminuía este valor. Zactiti (2004) também observou diminuição significativa do parâmetro L com o aumento do grau de reticulação de filmes de alginato com íons cálcio.

Os valores das variáveis do CIELCh para os filmes de alginato puro e filmes compostos de alginato e quitosana (*Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) estão ilustrados na Figura 5.16. Pelo padrão de cor utilizado neste sistema de coordenadas polares, valores de ângulo *hue* entre 80 e 120 representam a cor amarela. Observa-se que todas as amostras apresentam valor de ângulo *hue* no quadrante do amarelo, variando de 85,70 a 92,55 graus. No entanto as amostras apresentaram uma grande variação no valor do Chroma (C^*) que descreve a saturação, ou seja, o quão intensa é a cor representada pelo valor h^* . Os filmes de alginato puro (símbolos pretos na Figura 5.16) apresentaram menores valores de h^* comparados as amostras do *Filme Composto 1* (símbolos vermelhos na Figura 5.16) e do *Filme Composto 2* (símbolos verdes na Figura 5.16). Desta forma confirma-se as observações visuais de que o aumento da concentração de quitosana aumenta a intensidade da cor amarela dos filmes. Resultados similares foram obtidos por Garcia *et al.* (2004) que observaram um aumento do tom amarelo (parâmetro b^* do sistema CIELab) com o aumento da concentração de quitosana em filmes de metilcelulose.

O aumento da concentração de natamicina provocou aumento significativo no valor do Chroma (C^*) a partir da menor concentração testada (0,5%), em relação às formulações sem antimicrobiano. Pranotto *et al.* (2005) observaram aumento significativo do parâmetro b^* de filmes de quitosana com a incorporação de sorbato de potássio (100 mg/g de quitosana) e nisina (204×10^{-3} UI/g quitosana). O mesmo foi observado por Flores *et al.* (2007b) com a incorporação de sorbato de potássio (0,3 g/g amido) em filmes de amido de mandioca.

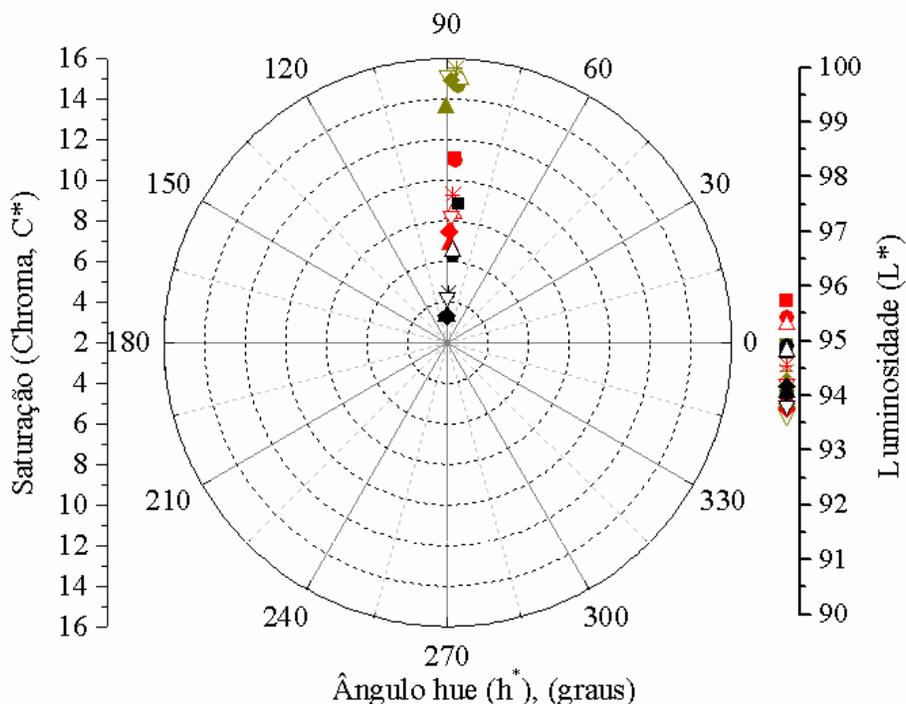


Figura 5.16: Parâmetros CIELCh dos filmes de alginato puro (símbolos pretos), *Filme Composto 1* (símbolos vermelhos) e *Filme Composto 2* (símbolos verdes) contendo: 0 (▲), 0,5 (◆), 1 (▽), 2 (*), 4 depois (△), 4 antes (●) e 8 (■) g de natamicina/100g de biopolímero

As características de transparência dos filmes de alginato puro e dos filmes compostos de alginato e quitosana (*Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*), determinadas através do colorímetro no modo de transmitância, estão apresentadas na Tabela 5.17. A transparência de biofilmes pode variar por diversos fatores, tais como tipo de biopolímero, grau de reticulação, adição de aditivos, processo de fabricação, etc (Banjyekan *et al.*, 2006). Na literatura, a maioria dos trabalhos determina a transparência de biofilmes por espectrofotometria (Chen *et al.*, 2009; Bangyekan *et al.* 2006). Conforme o antecipado pelas observações visuais subjetivas, os valores da Tabela 5.17 indicam que o aumento da concentração de quitosana provocou uma diminuição da transparência dos filmes. Na maior concentração de natamicina utilizada (8%), no entanto, as três formulações apresentaram valores de transparência equivalentes, ou seja, nessa concentração o efeito da adição do antimicrobiano se sobrepõe ao efeito da composição de biopolímero. Em relação às formulações sem natamicina, o aumento da concentração de quitosana provocou uma diminuição na transparência dos mesmos, devido às interações formadas entre os dois polímeros.

Tabela 5.17: Transparência das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	Transparência (%)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	92,96 (0,41) ^{a,A}	63,27 (1,61) ^{a,B}	41,23 (0,72) ^{a,C}
0,5	89,85 (0,41) ^{a,A}	63,59 (0,52) ^{a,B}	37,58 (0,79) ^{c,C}
1	85,54 (0,88) ^{b,A}	53,62 (0,75) ^{b,B}	40,20 (1,12) ^{ab,C}
2	77,29 (0,54) ^{c,A}	41,24 (2,26) ^{c,B}	38,36 (0,22) ^{bc,C}
4 (depois)	48,33 (3,94) ^{d,A}	37,56 (0,61) ^{d,B}	27,52 (0,36) ^{e,C}
4 (antes)	51,03 (2,60) ^{d,A}	35,11 (0,44) ^{d,B}	35,28 (0,91) ^{d,B}
8	21,85 (0,52) ^{e,A}	20,95 (0,63) ^{e,A}	17,38 (1,43) ^{f,A}

* Média (desvio padrão) de cinco determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

5.3.7 Ângulo de contato

Outro parâmetro que tem sido avaliado em biofilmes é o ângulo de contato formado por uma gota de água sobre o filme, também chamado de ângulo de molhabilidade. O ângulo de contato representa o valor em graus que uma determinada substância líquida forma com a superfície. Os valores de ângulo de contato para biofilmes, assim como as demais propriedades, podem ser afetados por fatores como constituição do material, tipo de solvente, incorporação de aditivos, entre outros. (Bruno *et al.*, 1995; Aburto *et al.*, 1999; Bengtsson *et al.*, 2003). O conhecimento do ângulo de contato pode ser útil como uma forma de prever o comportamento do filme em contato com ambientes úmidos.

Os valores dos ângulos de contato, formados entre a superfície do filme e uma gota de água, determinados para os filmes de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2* contendo diferentes concentrações de natamicina estão apresentados na Tabela 5.18.

Em relação à composição de biopolímero na matriz do filme, observou-se que os filmes com quitosana apresentaram maiores valores de ângulo de contato comparado ao filme de alginato puro, ou seja, apresentaram menor hidrofobicidade. Este fenômeno pode ser atribuído à maior hidrofobicidade das moléculas de quitosana, associada aos grupos

acetil presentes na cadeia deste biopolímero. Bangyekan *et al.* (2006) relatam que o recobrimento de filmes de amido de mandioca com soluções de quitosana diminuiu significativamente o valor do ângulo de contato dos mesmos. Um filme de amido (6%), por exemplo, apresentou um ângulo de contato de 29,8°, enquanto que o mesmo filme recoberto com soluções de quitosana nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% m/m apresentou ângulos de contato de 40,6, 48,2, 55,8 e 68,6°, respectivamente. Os maiores valores de ângulo de contato, estão associados ao aumento do número de grupos hidrofóbicos.

Tabela 5.18: Ângulo de contato das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	Ângulo de contato (°)*		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	26 (0,0) ^{a,A}	31 (1,2) ^{a,B}	39 (1,0) ^{a,C}
0,5	29 (1,2) ^{b,A}	34 (1,5) ^{a,B}	41 (0,6) ^{a,C}
1	29 (1,2) ^{b,A}	34 (2,1) ^{a,B}	41 (1,2) ^{a,C}
2	28 (0,6) ^{ab,A}	40 (0,6) ^{b,B}	39 (1,2) ^{a,B}
4 (depois)	30 (1,0) ^{b,A}	39 (0,6) ^{b,B}	40 (0,0) ^{a,B}
4 (antes)	30 (0,6) ^{b,A}	38 (1,0) ^{b,B}	41 (0,6) ^{a,B}
8	29 (1,2) ^{b,A}	39 (0,6) ^{b,B}	40 (1,5) ^{a,B}

* Média (desvio padrão) de três determinações experimentais.

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Analisando-se a tendência encontrada para outras propriedades como massa solubilizada em água e grau de intumescimento, esperava-se que os filmes compostos apresentassem menores valores de ângulo de contato em relação aos filmes de alginato. Porém, pela Tabela 5.18 observa-se que estes aumentaram com a introdução de quitosana na matriz, indicando um maior grau de hidrofobicidade nos filmes compostos. No entanto, Jayasekara *et al.* (2004) relatam que o ângulo de contato está correlacionado com a rugosidade da superfície dos biofilmes, e que este aumenta com o aumento desta propriedade. Os filmes compostos de alginato e quitosana apresentaram rugosidades superficiais crescentes com o aumento da concentração de quitosana como pode ser

observado na Tabela 5.19 e visualizado nas microfotografias das superfícies dos filmes (Figuras 5.17, 5.18 e 5.19) podendo explicar a tendência observada.

Silva *et al.* (2007) compararam os ângulos de contato de filmes de amido de milho, fécula de mandioca e fécula de batata. Os autores relatam que o aumento da concentração do biopolímero diminuiu o valor do ângulo de contato dos filmes de fécula de mandioca e de batata, mas não teve efeito significativo no filme de amido de milho. De acordo com Mali (2004), uma maior concentração de amido proporciona uma matriz amilácea com maior número de grupos hidrofílicos, ou seja, haveria maior interação desses grupos com a água. Por conseqüência, menores ângulos de contato da água com a superfície dos filmes são formados. A mesma observação foi relatada por Bialopiotrowicz (2003) para filmes de amido de milho e batata em diferentes concentrações, nos quais os valores de ângulo de contato diminuíram linearmente com o aumento da concentração do amido.

O aumento da concentração de natamicina provocou um aumento significativo no ângulo de contato a partir da concentração de 4% no filme de alginato puro e a partir de 2% para o *Filme Composto 1*. No entanto, não foi observada diferença significativa no ângulo de contato para o *Filme Composto 2* até a concentração mais alta testada, ou seja 8 g/100 g biopolímero.

5.3.8 Rugosidade

A rugosidade superficial dos filmes de alginato puro, e dos filmes compostos de alginato e quitosana foi expressa em função da rugosidade média (R_a), que representa a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas dos afastamentos dos pontos do perfil de rugosidade, em relação à linha média, dentro do percurso de medição L_m . Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 5.19.

A rugosidade (defeitos microgeométricos) é o conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências (picos) e reentrâncias (vales) que caracterizam uma superfície. A rugosidade desempenha um papel importante na caracterização de superfícies de filmes, podendo influenciar na resistência oferecida pela superfície ao transporte de fluidos, aderência, resistência mecânica, aparência, entre outros fatores. A medida da rugosidade é uma maneira de quantificar as irregularidades observadas através das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Fabra *et al.*, 2009).

Tabela 5.19: Rugosidade das formulações otimizadas contendo natamicina

Natamicina (g/100g biopolímero)	R_a (μm) *		
	Alginato puro	Filme Composto 1	Filme Composto 2
0	0,20 (0,06) ^{a,A}	0,89 (0,07) ^{a,B}	1,47 (0,18) ^{a,C}
0,5	0,21 (0,04) ^{a,A}	0,94 (0,08) ^{ab,B}	1,48 (0,09) ^{ab,C}
1	0,62 (0,07) ^{bc,A}	0,96 (0,08) ^{ab,B}	1,50 (0,10) ^{ab,C}
2	0,67 (0,11) ^{cd,A}	0,98 (0,08) ^{ab,B}	1,66 (0,13) ^{bc,C}
4 (depois)	0,73 (0,15) ^{de,A}	1,02 (0,06) ^{b,B}	1,65 (0,19) ^{bc,C}
4 (antes)	0,48 (0,09) ^{b,A}	0,91 (0,07) ^{a,B}	1,50 (0,10) ^{ab,C}
8	0,86 (0,08) ^{e,A}	1,16 (0,10) ^{c,B}	1,77 (0,09) ^{c,C}

* Média (desvio padrão) de 10 determinações experimentais

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Médias com a mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

A rugosidade tendeu a aumentar com o aumento da concentração de quitosana, que pode ser confirmado pela observação das microfotografias das superfícies dos filmes (Figuras 5.17, 5.18 e 5.19), que indicam que os filmes com quitosana apresentavam estrias que eram mais intensas no filme contendo a maior concentração de quitosana (*Filme Composto 2*). Fabra *et al.* (2009) determinaram a rugosidade de filmes de caseinato de sódio, contendo ácido oléico e cera de abelhas, através de microscopia de força atômica. Os autores relatam que os valores de R_a aumentaram significativamente com a adição dos componentes lipídicos, em todas as concentrações testadas, em relação ao filme controle. Em outro trabalho Villalobos *et al.* (2005), também utilizando microscopia de força atômica, determinaram o efeito da adição de surfactantes em filmes de hidroxipropil metilcelulose na rugosidade dos mesmos. Os autores observaram que o aumento da concentração de surfactante aumentava o valor de R_a .

A adição de natamicina nos filmes provocou aumentos significativos na rugosidade dos filmes em concentrações acima de 1% para o filme de alginato puro, acima de 4% para o *Filme Composto 1* e acima de 2% para o *Filme Composto 2*. Essa informação pode ser relacionada as observações obtidas nas microfotografias das superfícies dos filmes (Figuras 5.17, 5.18 e 5.19), nas quais se observa que os grânulos de antimicrobiano são evidentes em concentrações mais baixas no filme de alginato puro do que nos filmes compostos. A maior uniformidade da natamicina nos filmes compostos pode estar

associada a maior intensidade de agitação utilizada na elaboração destes filmes em relação à agitação usada na solução de alginato puro. Outra observação importante é a diferença obtida entre os valores de rugosidade dos filmes contendo 4% de natamicina dependendo da forma como o antimicrobiano era adicionado (antes e depois do processo de elaboração da solução filmogênica). Nota-se que, para os três tipos de filme, a rugosidade do filme contendo 4% de natamicina adicionado no início do processo foi menor comparada à do filme com a mesma concentração, porém adicionada no final do processo. Observa-se, inclusive, que para os filmes compostos, não houve alteração significativa na rugosidade com a adição de 4% de natamicina (adicionado antes do preparo) em relação ao filme sem o antimicrobiano. Isto pode ser explicado pelo maior tempo que a natamicina foi homogeneizada no sistema, no caso dos filmes que receberam o antimicrobiano no início do processo. Santiago-Silva *et al.* (2009) observam subjetivamente que a superfície de filme de celulose adicionados de pediocina eram mais rugosas.

Fabra *et al.* (2009) relatam que o rearranjo dos componentes na matriz polimérica do filmes durante o preparo e a secagem, o qual define sua estrutura interna e externa, é de fundamental importância na determinação das propriedades dos filmes. Assim, a medida da rugosidade permite que se tenha um melhor entendimento da relação entre as propriedades físicas e estruturais dos diferentes filmes estudados.

5.3.9 Morfologia dos filmes – Microscopia eletrônica de varredura

A estrutura interna e superficial dos filmes representa um papel importante no entendimento das propriedades dos mesmos. As micrografias das superfícies e das seções transversais (após fratura) dos filmes de alginato puro e filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina estão apresentadas nas Figuras 5.17, 5.18 e 5.19.

Através da observação da Figura 5.17 (a) pode-se dizer que na ampliação obtida tanto a superfície como a seção transversal do filme de alginato apresentam-se lisas e homogêneas, não apresentando irregularidades.

Conforme observado macroscopicamente e pelos dados de rugosidade obtidos, as micrografias sugerem uma alteração evidente na morfologia das superfícies e estruturas internas dos filmes com o aumento da concentração de quitosana (Figuras 5.18 (a) e 5.19 (a)), principalmente no caso do *Filme Composto 2* (Figura 5.19 (a)), onde a superfície se

apresentou estriada e a seção transversal apresentou ondulações. Resultados semelhantes foram obtidos por Yan *et al.* (2001) para filmes compostos de alginato e quitosana. Estes autores relatam que os filmes que utilizavam quitosana de baixa e média massa molar apresentaram superfície com estrias finas e homogêneas distribuídas. No entanto filmes com quitosana de massa molar alta apresentaram superfície mais ondulada e com estrias mais intensas. Cabe ressaltar que a massa molar da quitosana utilizada neste trabalho está entre a massa molar média e a baixa utilizada no trabalho de Yan *et al.* (2001). A mesma observação de superfície estriada foi relatada por Bernabé *et al.* (2005) para membranas de alginato e pectina tratadas termicamente. Os autores apontam esta morfologia como sendo típica de complexos polieletrólíticos.

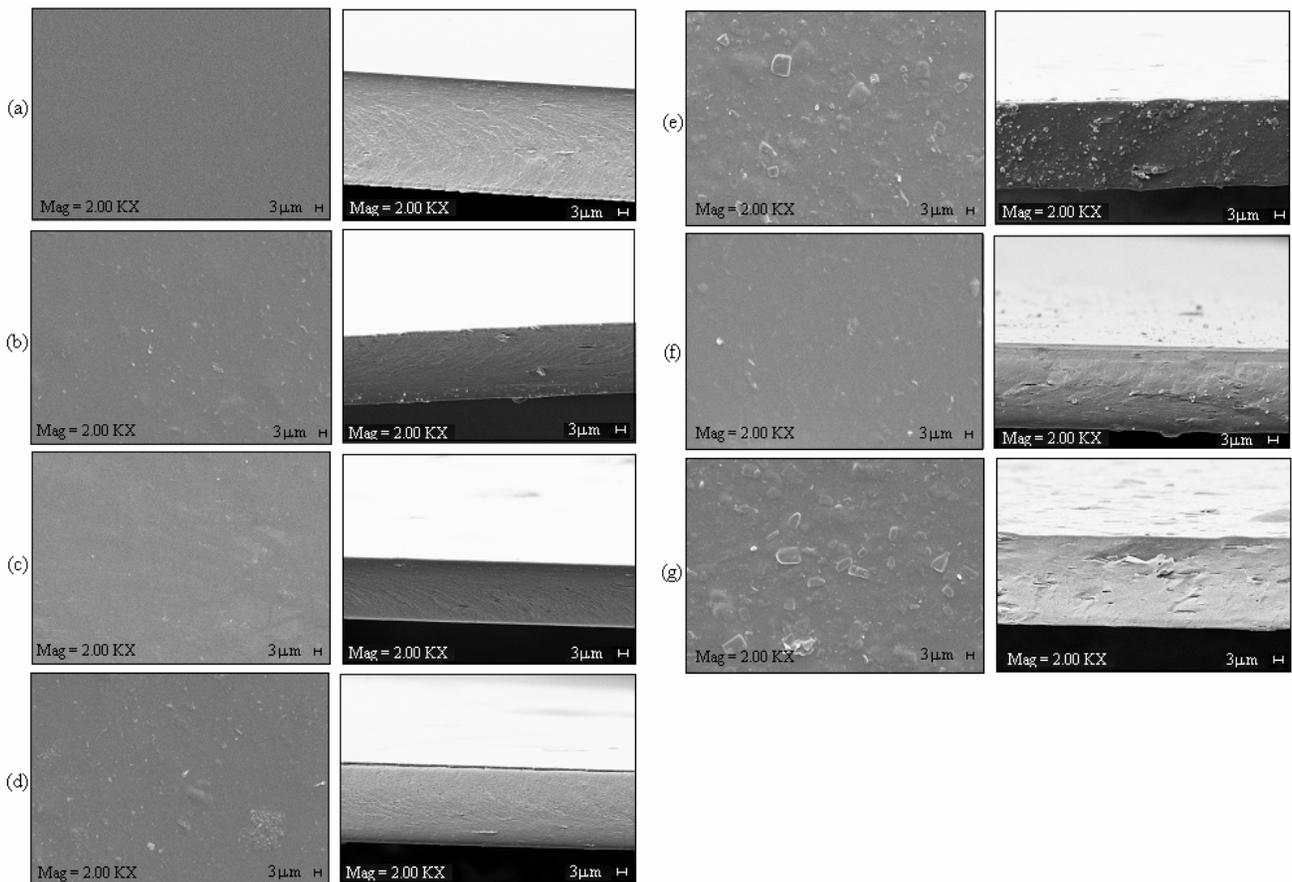


Figura 5.17: Micrografias da superfície e seção transversal (após fratura) do filme de alginato puro contendo: (a) 0; (b) 0,5; (c) 1; (d) 2; (e) 4 (depois); (f) 4 (antes) e (g) 8 g natamicina/100 g alginato

A influência da adição de natamicina, em diferentes concentrações, na estrutura dos filmes, pode ser observada através das Figuras 5.17, 5.18 e 5.19 (a-g) para os filmes de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, respectivamente. Observa-se que os filmes controle apresentam superfície e seção transversal mais homogêneas do que os filmes contendo o antimicrobiano. Pequenos grânulos de antimicrobiano começam a aparecer na superfície dos filmes de alginato puro a partir da concentração de 0,5 % (Figura 5.17 (b)) e essa quantidade de grânulos tende a aumentar com o aumento da concentração da natamicina. Para os filmes compostos, a existência dos grânulos de natamicina começa a surgir em concentrações mais altas, 4% (depois) (Figuras 5.18 (e) e 5.19 (e)). Visualmente já se havia constatado que os filmes com natamicina ficavam menos transparentes e mais rugosos à medida que se aumentava a concentração de natamicina. Estas observações confirmam os resultados de transparência e rugosidade obtidos neste trabalho.

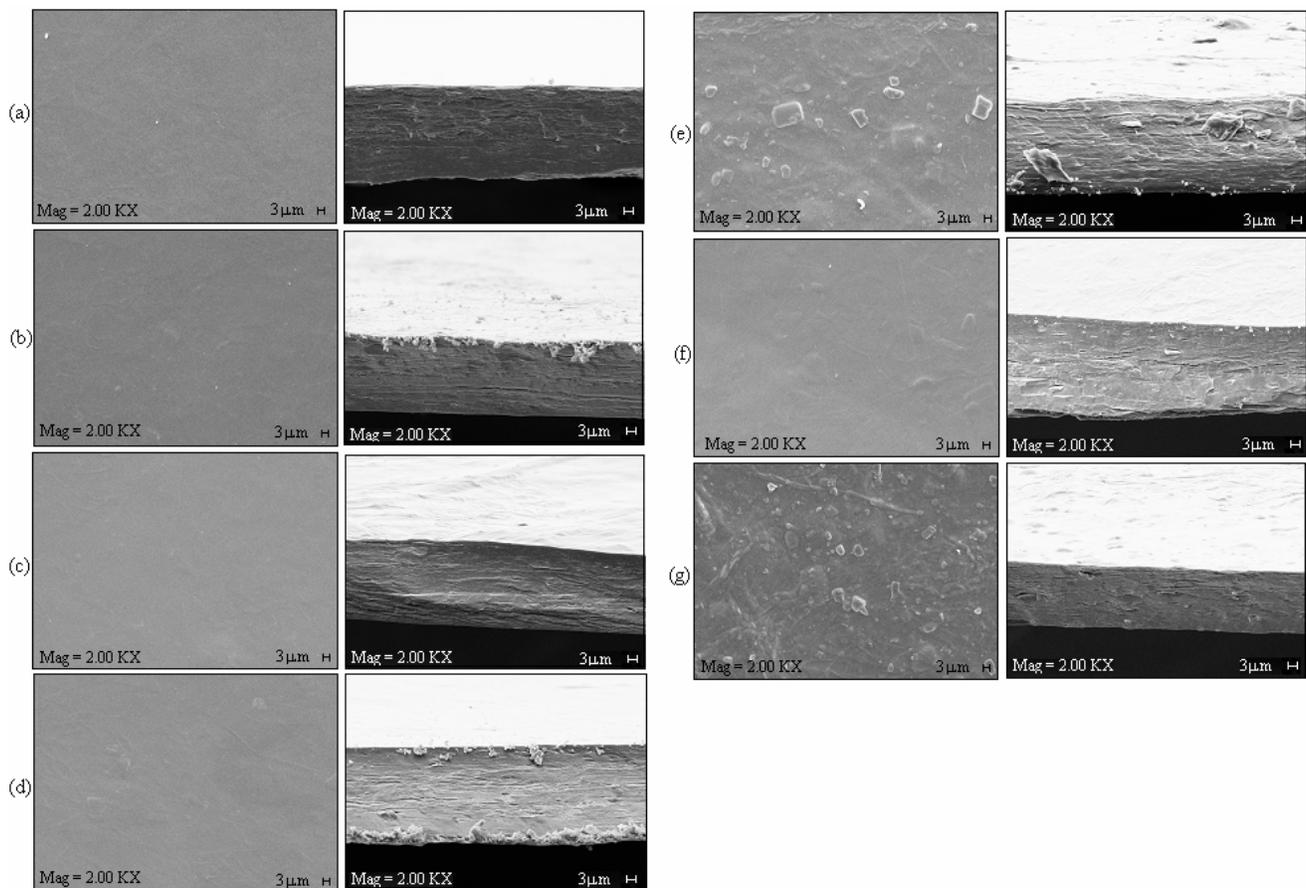


Figura 5.18: Micrografias da superfície e secção transversal (após fratura) do *Filme Composto 1* contendo: (a) 0; (b) 0,5; (c) 1; (d) 2; (e) 4 (depois); (f) 4 (antes) e (g) 8 g natamicina/100 g alginato

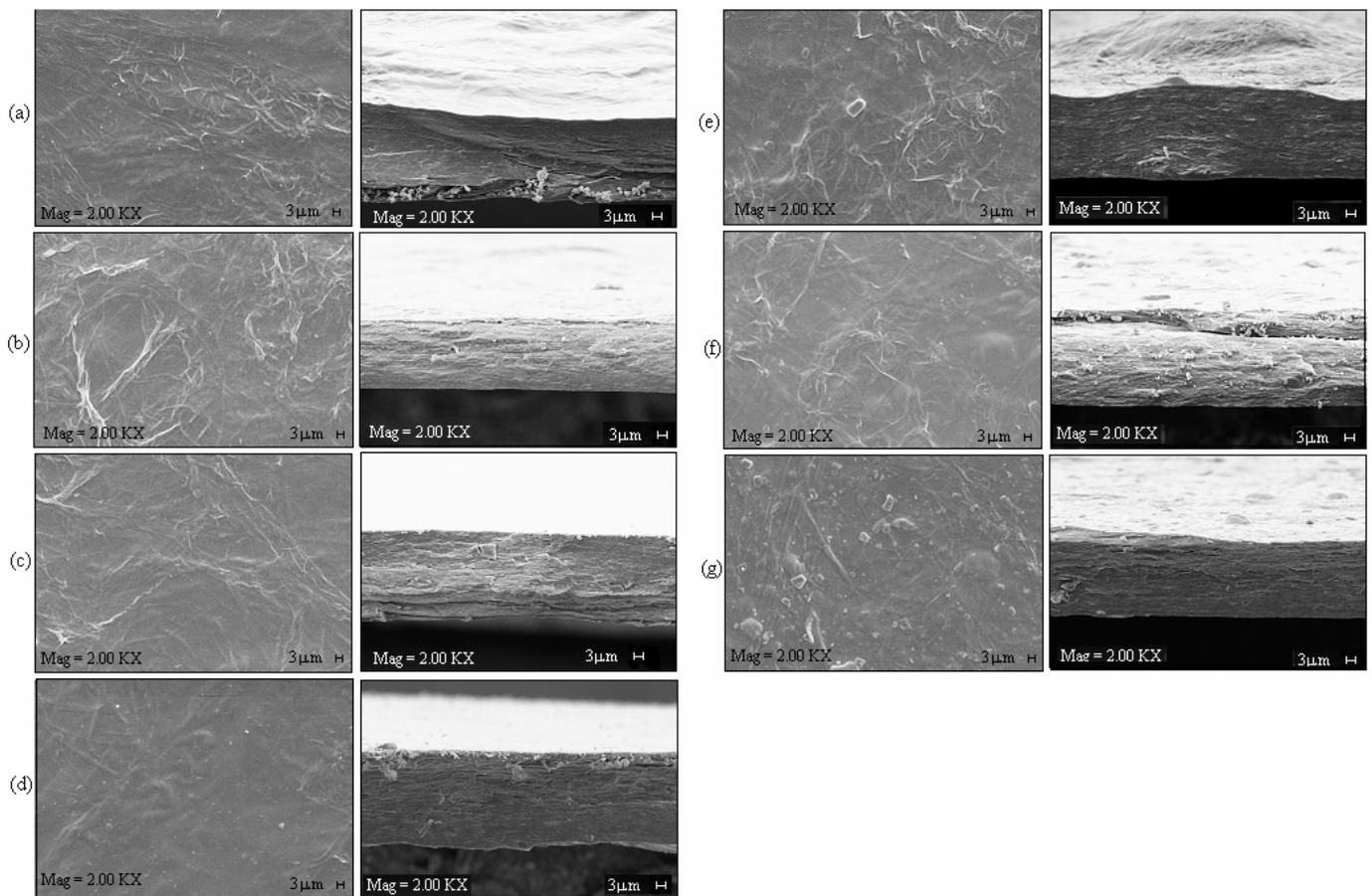


Figura 5.19: Micrografias da superfície e seção transversal (após fratura) do *Filme Composto 2* contendo: (a) 0; (b) 0,5; (c) 1; (d) 2; (e) 4 (depois); (f) 4 (antes) e (g) 8 g natamicina/100 g alginato

Santiago-Silva *et al.* (2009) descrevem que os filmes de celulose sem antimicrobiano eram mais homogêneos e transparentes. No entanto, à medida que a concentração de pediocina aumentava, as micrografias apresentavam superfícies mais rugosas e com presença de grânulos dispersos na matriz devido à baixa solubilidade deste antimicrobiano. Silveira (2005) estudando a influência da incorporação de ácido sórbico, também na microestrutura de filmes de celulose, descreve que a ocorrência de microcristais na superfície dos filmes aumentava à medida que a concentração de ácido sórbico também aumentava. Em outro trabalho, Pires *et al.* (2008) também observaram a presença de cristais na estrutura morfológica de filmes celulósicos adicionados de nisina, natamicina e uma mistura destes dois antimicrobianos. É interessante notar que a micrografia do filme com natamicina (8% em relação a massa de celulose) apresentou superfície muito semelhante às obtidas no presente trabalho para a mesma concentração de natamicina

(Figuras 5.17 (g), 5.18 (g) e 5.19 (g)). Türe *et al.* (2009) incorporaram natamicina em filmes de proteína de trigo e filmes de metilcelulose. Estes autores observaram, através das micrografias, que em concentrações de natamicina de 13,33% e 6,67% (em relação a massa de polímero, ou 2 mg/g de solução filmogênica), para o filme de proteína de trigo e o de metilcelulose, respectivamente, estruturas cristalinas do antimicrobiano eram observadas na superfície dos mesmos. É interessante ressaltar que neste último trabalho a natamicina era adicionada após a preparação da solução filmogênica.

As micrografias apresentadas nas Figuras 5.17 (f), 5.18 (f) e 5.19 (f) sugerem que, assim como para a rugosidade, o método de adição do antimicrobiano influenciou a morfologia dos filmes. Observa-se que os filmes cuja adição da natamicina foi feita no início do processo de elaboração da solução filmogênica quase não apresentaram cristais do antimicrobiano na superfície.

5.3.10 Temperatura de transição vítrea

A técnica de análise dinâmico-mecânica (DMA) também foi utilizada para verificar a influência da adição de natamicina na temperatura de transição vítrea dos filmes. Os gráficos comparativos da curva de $\tan \delta$ dos filmes sem e com adição de 8% (em relação à massa de biopolímero) de natamicina estão apresentados na Figuras 5.20, 5.21 e 5.22 para os filmes de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, respectivamente. Os gráficos individuais de cada filme com o registro dos módulos de armazenamento (E') e perda (E'') estão apresentados no Apêndice C. Os filmes apresentaram comportamentos característicos de polímeros amorfos, onde os picos das curvas de $\tan \delta$ correspondem a uma transição típica do estado vítreo para o estado gomoso (Cherian *et al.*, 1995). Observa-se que a presença da natamicina não provocou um efeito muito acentuado na temperatura de transição vítrea em nenhum dos filmes estudados, sendo a maior variação das T_g 's do filmes com e sem natamicina encontrada para o *Filme Composto 2* (2,64°C). Kristo *et al.* (2008) observaram um deslocamento da T_g de filmes de caseinato de sódio para temperaturas mais baixas com a adição de sorbato de potássio (10 e 25% m/m). Contrariamente, a adição de lactato de sódio (até 20%) aumentou a T_g dos filmes, provavelmente devido à maior interação dos íons sódio com a água, aumentando assim a interação polímero-polímero (fenômeno de *salting-out*).

Os filmes com natamicina confirmam a tendência observada para os filmes sem natamicina (discutida no Item 4.3.3), ou seja, o filme de alginato puro apresentou um único pico na curva enquanto que os filmes compostos apresentaram dois picos separados, provavelmente indicando uma separação entre as fases dos polímeros.

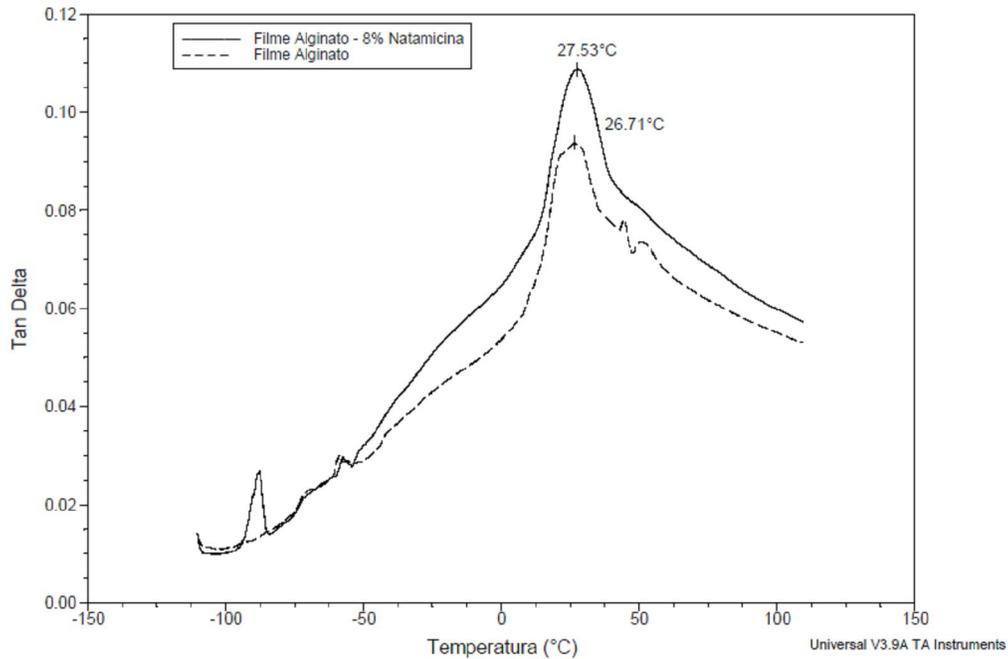


Figura 5.20: Curvas de $\tan \delta$ para o filme de alginato puro: (----) sem natamicina, (—) com 8% natamicina

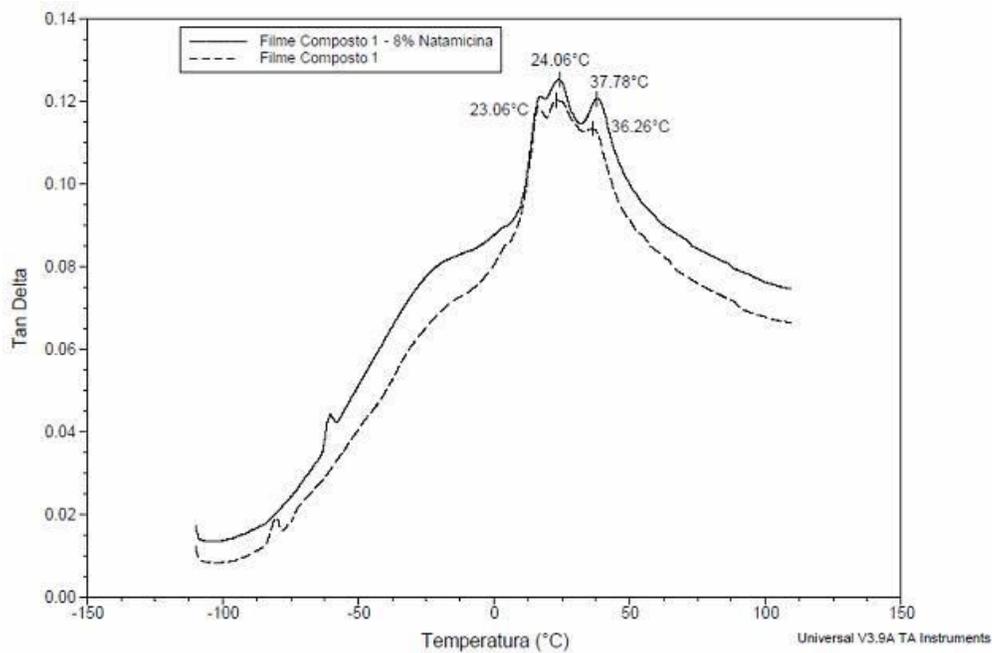


Figura 5.21: Curvas de $\tan \delta$ para o Filme Composto 1: (----) sem natamicina, (—) com 8% natamicina

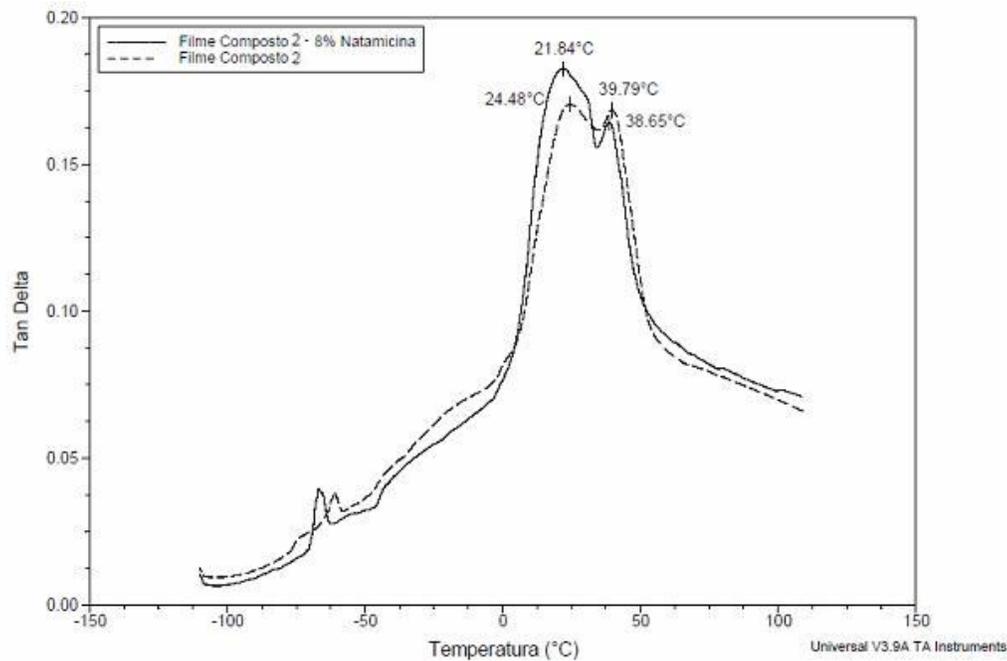


Figura 5.22: Curvas de $\tan \delta$ para o *Filme Composto 2*: (----) sem natamicina, (—) com 8% natamicina

5.3.11 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi utilizada com o intuito de se avaliar uma possível interação da natamicina com a matriz polimérica dos filmes de alginato puro e dos *Filmes Compostos 1* e *2*. Os espectros obtidos para os filmes sem e com a adição de 8% (em relação a massa de polímero) estão apresentados nas Figuras 5.23, 5.24 e 5.25 para o filme de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*, respectivamente.

Todos os espectros dos filmes com natamicina apresentaram um padrão similar, observando-se a preservação das mesmas bandas de absorção dos filmes sem o antimicrobiano. Desta forma, pode-se concluir que na máxima concentração utilizada nos filmes não foi possível detectar, por esta técnica, nenhuma interação da natamicina com a matriz polimérica. Apesar disso, os padrões de liberação da natamicina em água pelos filmes sugerem que esteja havendo alguma interação eletrostática entre as cadeias de quitosana e a natamicina. Türe *et al.* (2009) também não detectaram, em análise de FTIR, interações entre a natamicina e matrizes de proteína do trigo e metilcelulose. Por outro lado Pranoto *et al.* (2005) e Chen *et al.* (1996) detectaram possíveis interações entre a quitosana e os antimicrobianos (sorbato de potássio e nisina; sorbato de potássio e benzoato de sódio).

Estes autores indicam uma interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ da quitosana e COO^- dos antimicrobianos.

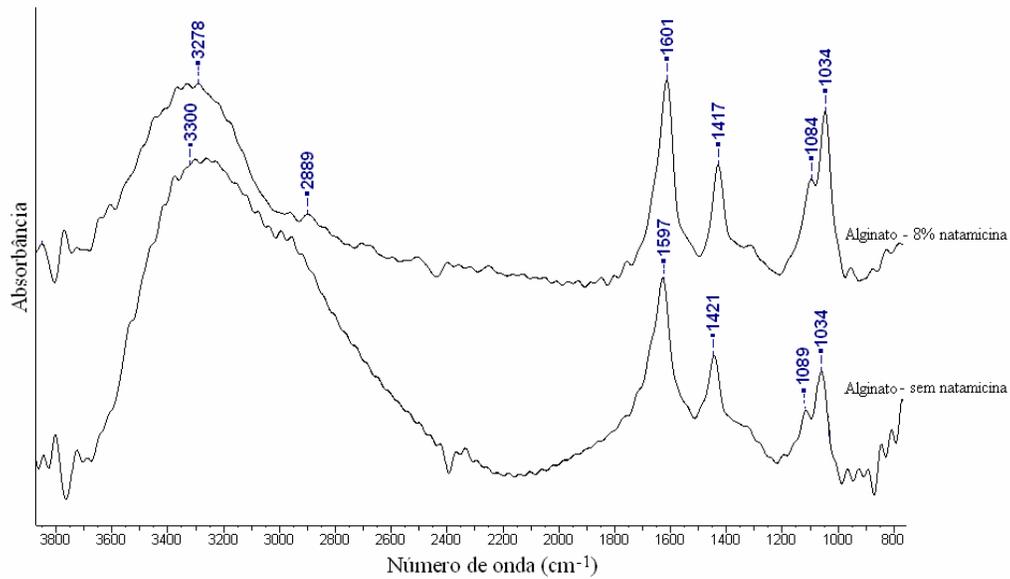


Figura 5.23: Espectros de infravermelho do filme de alginato puro sem e com adição de 8% de natamicina

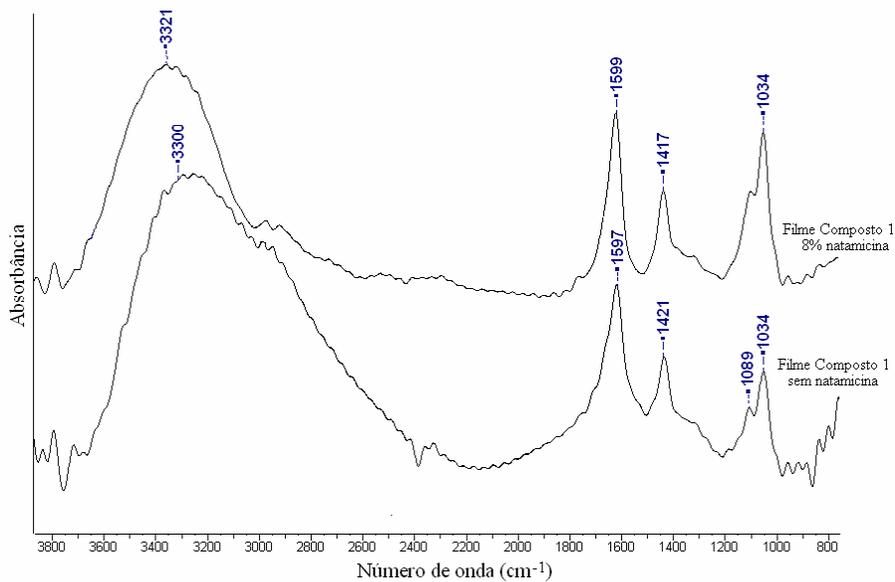


Figura 5.24: Espectros de infravermelho do *Filme Composto 1* sem e com adição de 8% de natamicina

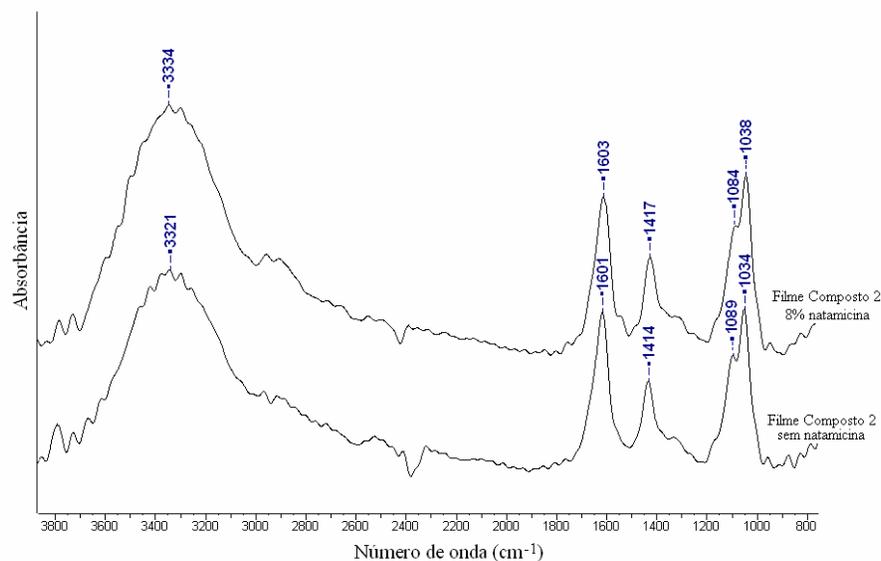


Figura 5.25: Espectros de infravermelho do *Filme Composto 2* sem e com adição de 8% de natamicina

5.3.12 Isotermas de adsorção de umidade

As isotermas de adsorção de umidade a 25°C das formulações otimizadas (filme alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2*) sem e com 8% (m/m) de natamicina, determinadas segundo a metodologia descrita no Item 3.5.9, estão apresentadas nas Figuras 5.26, 5.27 e 5.28.

As amostras atingiram o equilíbrio em aproximadamente 18-20 dias e o modelo de GAB (Equação 3.19) foi utilizado para ajustar os pontos experimentais das isotermas, sendo que a Tabela 5.20 apresenta os parâmetros de ajuste do modelo.

Todas as curvas mostraram a mesma tendência, ou seja, um aumento no conteúdo de umidade de equilíbrio com o aumento da atividade de água. Este comportamento é manifestado pelo formato sigmoidal das curvas, classificadas como isotermas do Tipo II, segundo a classificação de Brunauer. Este formato de isoterma é tipicamente encontrado para alimentos e materiais biológicos (Roos, 1995). Outros autores observaram o mesmo tipo de comportamento, típico de biopolímeros hidrofílicos, para outros tipos de biofilmes tais como filmes de glúten, amido, caseinato e hidroximetilcelulose, os quais apresentam um aumento exponencial da umidade na região de atividade de água mais elevada (acima de 0,6) (Gontard *et al.*, 1993; Mali *et al.*, 2002; Villalobos *et al.* 2006; Kristo *et al.*, 2007, Vargas *et al.*, 2009). Esse comportamento não linear das isotermas é possivelmente causado

pelo intumescimento da matriz hidrofílica, que resulta em alterações na estrutura dos filmes.

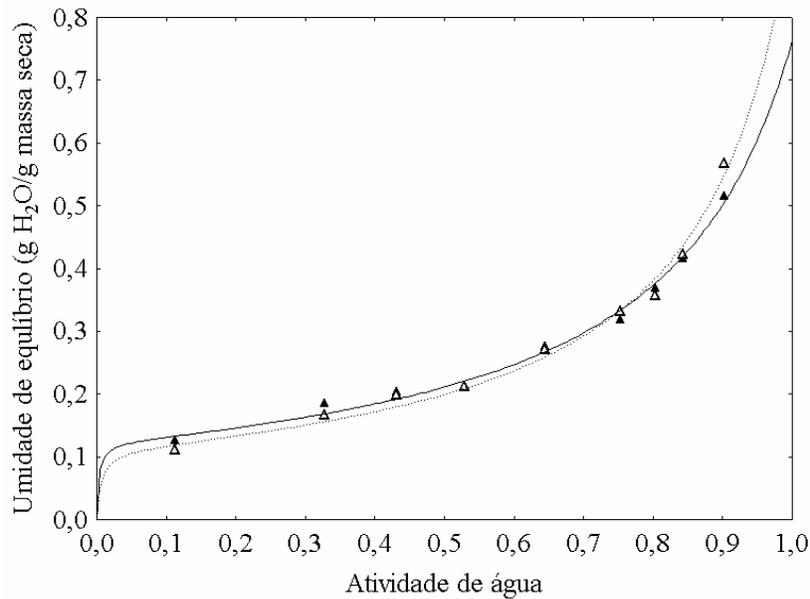


Figura 5.26: Isotermas de adsorção de vapor de água a 25°C do filme de alginato puro: (▲) sem natamicina e (△) com 8% de natamicina

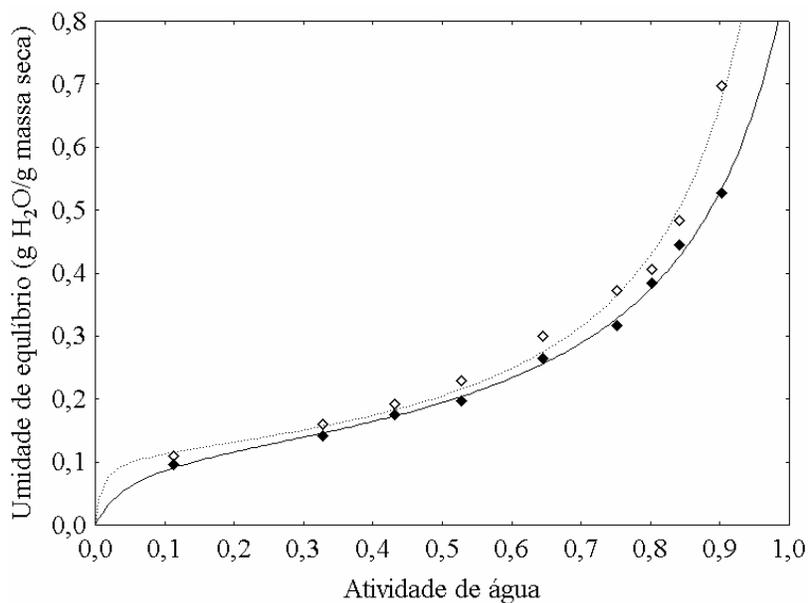


Figura 5.27: Isotermas de adsorção de vapor de água a 25°C do Filme Composto I: (◆) sem natamicina e (◇) com 8% de natamicina

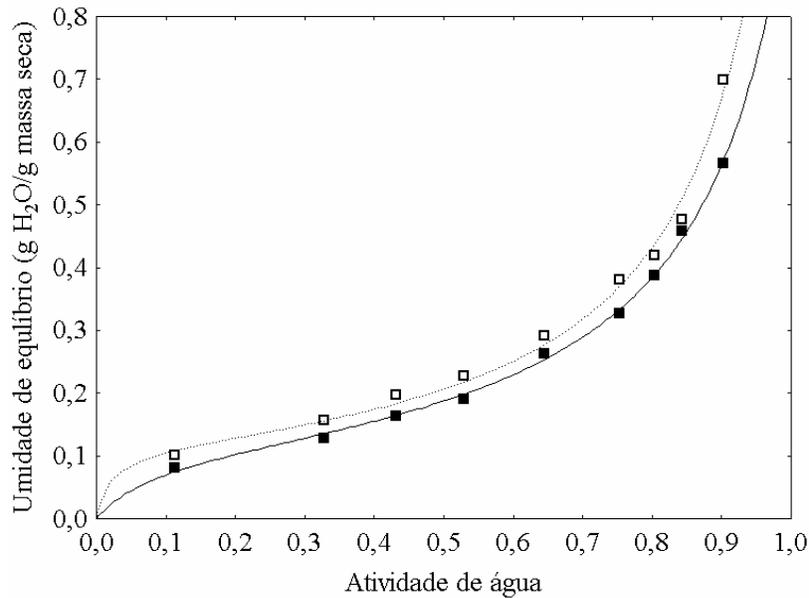


Figura 5.28: Isotermas de adsorção de vapor de água a 25°C do *Filme Composto 2*: (■) sem natamicina e (□) com 8% de natamicina

Os altos coeficientes de correlação obtidos (Tabela 5.20) demonstram que o modelo de GAB foi adequado para o ajuste dos dados experimentais em toda a faixa de atividade de água.

Tabela 5.20: Parâmetros estimados pelo modelo de GAB para o filme de alginato puro, *Filme Composto 1* e *Filme Composto 2* sem e com adição de 8% de natamicina

<i>Filme</i>	<i>Parâmetro</i>			
	X_m (gH ₂ O/g sólido)	C_{GAB}	k_{GAB}	R^2
Alginato puro	0,123 ^a	423,718	0,839	0,991
<i>Filme Composto 1</i>	0,116 ^a	21,882	0,869	0,996
<i>Filme Composto 2</i>	0,114 ^a	12,782	0,890	0,998
Alginato puro com 8% de natamicina	0,112 ^a	185,467	0,882	0,988
<i>Filme Composto 1</i> com 8% de natamicina	0,111 ^a	110,715	0,926	0,990
<i>Filme Composto 2</i> com 8% natamicina	0,114 ^a	50,414	0,923	0,992

Médias com a mesma letra minúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

Observa-se pela Tabela 5.20 que os valores estimados para o conteúdo de umidade da monocamada (X_m) dos filmes com e sem natamicina foram muito semelhantes. No

entanto, através das Figuras 5.26, 5.27 e 5.28 nota-se que a adição da natamicina não ocasionou mudança significativa no comportamento do filme de alginato puro, mas tendeu a tornar os filmes compostos ligeiramente mais higroscópicos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusões

A metodologia desenvolvida neste trabalho permitiu a obtenção de filmes ativos de alginato e filmes ativos compostos de alginato e quitosana contendo natamicina, através da definição de um protocolo padrão e otimização das formulações com o uso de planejamento experimental. A confecção de filmes com características adequadas para aplicação como embalagem de alimentos (aparência atraente, baixa massa solubilizada em água, baixa permeabilidade ao vapor de água, baixo grau de intumescimento e propriedades mecânicas apropriadas para o manuseio) exige duas etapas de reticulação com íons cálcio: um pré-filme é obtido através de uma reticulação incipiente (1º estágio) e esse filme sofre uma reticulação complementar (2º estágio). Os resultados obtidos permitem afirmar que os filmes desenvolvidos contendo natamicina apresentam excelente perspectiva de atuação como filmes ativos (antimicrobianos) para alimentos.

As principais conclusões obtidas neste trabalho, que utilizou alginato de sódio com massa molar média de $1,3 \times 10^6$ g/gmol e quitosana com grau de desacetilação de 96,7% e massa molar média de $3,7 \times 10^5$ g/gmol, são apresentadas a seguir.

6.1.1 Propriedades dos filmes de alginato

- a) A adição de pequenas quantidades de íons cálcio no 1º estágio é necessária para diminuir a taxa inicial de solubilização e permitir a manuseabilidade do filme. A quantidade máxima que se consegue adicionar nas condições operacionais utilizadas é de 0,07 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato;
- b) A imersão dos filmes em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ contendo glicerol reduz drasticamente a massa solubilizada em água, o PVA, e o grau de intumescimento;

c) Filmes de alginato puro, com excelente compromisso entre os atributos físicos, são obtidos utilizando-se 0,04g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato no 1º estágio, 5g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /100 mL de solução reticuladora no 2º estágio e tempo de imersão de 30 minutos. Nestas condições os filmes com espessura média de 48 μm apresentaram massa solubilizada em água de 0,15 g/g massa seca, coeficiente de permeabilidade ao vapor de água de 4,04 $\text{g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{kPa}$, grau de intumescimento de 0,68, tensão na ruptura de 96 MPa e alongamento de 8,4%.

6.1.2 Propriedades dos filmes compostos de alginato e quitosana

a) Filmes compostos homogêneos são somente obtidos sob forte agitação e adição da solução de quitosana pelo fundo do béquer que já contem a solução de alginato;

b) A máxima fração mássica de quitosana que pode ser adicionada, nas condições operacionais utilizadas, é de 0,35 g/g biopolímero. Acima dessa concentração não é possível espalhar a solução no suporte;

c) Uma reticulação complementar (2º estágio) nos filmes compostos é necessária para reduzir a massa solubilizada em água desses filmes;

d) A adição de quitosana ao alginato aumenta significativamente o alongamento dos filmes, mas aumenta também a massa solubilizada em água, a permeabilidade ao vapor de água e o grau de intumescimento dos mesmos;

e) A interação entre o alginato e a quitosana nos filmes compostos é predominantemente eletrostática entre os grupos COO^- do alginato com os grupos NH_3^+ da quitosana. Não existem indícios de formação de ligações covalentes entre os dois polímeros, por análise de FTIR;

f) A interação entre os dois polímeros é discreta, pois os filmes apresentam valores de T_g correspondentes a cada um deles.

6.1.3 Filmes de alginato incorporados com sorbato de potássio

a) A concentração limite de sorbato de potássio nos filmes de alginato é de 17 g/100g alginato; acima desta ocorre a precipitação do antimicrobiano sobre a superfície do filme;

b) Na concentração limite os filmes ativos de alginato não apresentam nenhum efeito inibitório contra as espécies fúngicas testadas no teste de difusão em ágar;

6.1.4 Efeito antimicrobiano dos filmes de alginato puro e filmes compostos contendo natamicina

- a) Efeito inibitório ocorre a partir de 0,5 g/100g biopolímero para o filme de alginato puro e a partir de 1 g/100g biopolímero para os filmes compostos;
- b) Os halos de inibição aumentam com o aumento da concentração do antimicrobiano;
- c) Não ocorre degradação da natamicina com o tratamento prévio dos filmes sob luz UV por trinta minutos de cada lado;
- d) Não há diferença significativa na atividade antimicrobiana dos filmes com o método de incorporação da natamicina, ou seja, se esta é adicionada no início ou no final do processo de elaboração da solução filmogênica;
- e) Para os três microrganismos testados, os halos de inibição foram maiores para o filme de alginato puro.

6.1.5 Cinética de liberação da natamicina em água

- a) O mecanismo envolvido no processo de liberação da natamicina de filmes de alginato e filmes compostos de alginato e quitosana é predominantemente difusivo, tendo pouca influência do intumescimento polimérico;
- b) Os dados experimentais de liberação apresentam um bom ajuste à Equação da Segunda Lei de Fick, permitindo a determinação dos coeficientes efetivos de difusão;
- c) A liberação em água da natamicina incorporada aos filmes é muito lenta. Os coeficientes de difusão da natamicina foram da ordem de 10^{-11} cm²/s para o filme de alginato e para o filme composto com 35% de quitosana e da ordem de 10^{-12} cm²/s para o filme composto com 17% de quitosana;
- d) O aumento da concentração de quitosana no filme diminui a máxima massa de natamicina que poderia ser liberada em água (M_{∞}), devido a uma possível interação eletrostática entre o antimicrobiano e as cadeias de quitosana;
- e) A aumento da concentração de natamicina incorporada no filme diminui a taxa de liberação em água, provavelmente devido à maior quantidade de soluto em forma cristalina;

- f) A forma de incorporação da natamicina (adição antes ou depois da elaboração da solução filmogênica) não afeta a cinética de liberação em água;
- g) A estrutura física da matriz polimérica do filme composto com 35% de quitosana era menos compacta e facilitou a difusão da natamicina;
- h) A concentração de natamicina liberada exerceu maior influência no teste de difusão em ágar. O efeito inibitório da natamicina no crescimento microbiano foi superior no filme de alginato puro, o qual apresentou uma maior massa liberada após os 5 dias de incubação das placas.

6.1.6 Caracterização física dos filmes de alginato puro e filmes compostos contendo natamicina

- a) A massa solubilizada em água, grau de intumescimento, a permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas não são extensivamente afetadas pela adição de natamicina;
- b) A análise de cor e transparência dos filmes confirma a avaliação visual subjetiva, de que os filmes tornam-se menos transparentes e mais amarelados com a adição de natamicina;
- c) A rugosidade dos filmes aumenta significativamente com o aumento da concentração de natamicina, principalmente para o filme de alginato puro, confirmado através das micrografias das superfícies dos filmes.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a eficiência antimicrobiana dos filmes ativos por períodos mais longos;
- Levantar isotermas de adsorção da natamicina pelas matrizes poliméricas para viabilizar a aplicação de um modelo matemático que considere a difusão acoplada à adsorção;
- Estudar outras concentrações de quitosana no filme composto (entre 10 a 20%) e o efeito na liberação da natamicina;
- Avaliar o efeito do pH do meio sorvedouro na cinética de liberação da natamicina;
- Estudar a difusão da natamicina incorporada aos filmes em contato com um meio semi-sólido (simulando um alimento de umidade intermediária) ou um alimento real (ex.: queijo).

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação brasileira de Normas Técnicas. *Rugosidade das superfícies* (PNB-13), Rio de Janeiro, 1980, 9p.

Aburto, J.; Thiebaud, S.; Alric, I.; Borredon, E.; Bikiaris, D.; Prinos, J.; Panayiotou, C. Properties of octanoated starch and its blends with polyethylene. *Carbohydrate Polymers*, v.34, p.101-112, 1997.

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

Al-Musa, S.; Fara, D.A.; Badwan, A.A. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*, v.57, p.223-232, 1999.

Álvarez, M.F. Revisión: envasado activo de los alimentos. *Food Science and Technology Internacional*, v.6, n.2, p. 97-108, 2000.

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

Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A.; Aiba, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, v.37, p.371-382, 1998.

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

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

ASTM. *Standard test method for haze and luminous transmittance of transparent plastics*. D1003. Annual Book of ASTM Standards Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1995c.

Axelsson, A.; Persson, B. Determination of effective diffusion coefficients in calcium alginate gel plates with varying yeast cell content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.18, p.231-250, 1988.

- Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O.; Baker, R.A. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.35, n.6, p.509-524, 1995.
- Bangyekan, C.; Aht-Ong, D.; Srikulkit, K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, v.63, p.61-71, 2006.
- Bégin, A.; Van Calsteren M.R. Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.26, p.63-67, 1999.
- Bengtsson, M.; Koch, K.; Gatenholm, P. Surface octanoylation of high-amylose potato starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p.1-11, 2003.
- Bernabé, P.; Peniche, C.; Arguelles-Monal, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. *Polymer Bulletin*, v.55, p.367-375, 2005.
- Bertan, L. C. *Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 164p. Tese (doutorado).
- Bialopiotrowicz, T. Wettability of starch gel films. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p.141-147, 2003.
- Biliaderis, C.G.; Lazaridou, A.; Arvanitoyannis, I. Glass transition and physical properties of polyol-plasticised pullulan–starch blends at low moisture. *Carbohydrate Polymers*, v.40, n.1, p. 29-47, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, 1996.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 540, de 28 de outubro de 1997, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001, 2001.
- Brugnerotto J.; Lizardi J.; Goycoolea F.M.; Arguelles-Monal W.; Desbrieres J.; Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, v.42, p.3569-3580, 2001.
- Bruno, F.F.; Akkara, J. A.A.; Ayyagari, M.; Kaplan, D.L.; Gross, R.; Swift, G.; Dordick, J.S. Enzymatic modification of insoluble amylose in organic solvents. *Macromolecules*, v.28, n.26, p.8881-8883, 1995.
- 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, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based films containing p-Amminobenzoic or sórbico acid. *Journal of Food Science*, v.66, n.6, p.865-870, 2001.
- Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E.T. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. *Journal of Food Science*, v.67, n.6, p.2317-2324, 2002.
- Canella, K.M.N.C.; Garcia, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influencia do método de preparação e do solvente. *Química Nova*, v.24, n.1, p.13-17, 2001.
- Caner, C., Vergano, P.J., Wiles, J.L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer and storage. *Journal of Food Science*, v.63,n.6, p. 1049-1053, 1998.
- Capitán-Vallvey, L.F.; Checa-Moreno, R.; Navas, N. Rapid ultraviolet spectrophotometric and liquid chromatographic methods for the determination of natamycin in lactoserum matrix. *Journal of AOAC International*, v.83, n.4, p.802-808, 2000.
- Carter, A.F. *Anti-fungal feed compositions containing natamycin*. United States Patent nº. 4600706, 1986.
- Cha, D.S.; Choi, J.H.; Chinnan, M.S.; Park, H.J. Antimicrobial films based on Na-alginate and k-carrageenan. *LWT - Food Science and Technology*, v.35, p.715-719, 2002.
- Champion, D.; Le Meste, M.; Simatos, D. Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range. *Trends in Food Science and Technology*, v.11,p. 41-55, 2000.
- Charoenthai, N.; Kleinebudde, P.; Puttipipatkachorn, S. Use of chitosan-alginate as alternative pelletization aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.96, n.9, p.2469-2484.
- Chavez, M.S., Luna, J.A. e Garrote, R.L. Crosslinking kinetics of thermally preset alginate gels. *Journal of Food Science*, v.59, n. 1114, p.1108-1110, 1994.
- Chen, M-C.; Yeh, G.H-C.; Chiang, B-H. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.20, p.379-390, 1996.
- Chen, C-H; Kuo, W-S.; Lai, L-S. Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum films. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.714-721, 2009.
- Cherian, G.; Gennadios, A.; Weller, C.; Chinachoti, P. Thermo mechanical behavior of wheat films: effects of sucrose, glycerin and sorbitol. *Cereal Chemistry*, v.72, n.1, 1-6, 1995.
- Chillo, S.; Flores, S.; Mastromatteo, M.; Conte, A.; Gerschenson, L.; Del Nobile, M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, v. 88, p.159-168, 2008.
- Choi, J.H.; Choi, W.Y.; Cha, D.S.; Chinnan, M.J.; Park, H.J.; Lee, D.S.; Park, J.M. Diffusivity of potassium sorbate in k-carrageenan based antimicrobial film. *LWT - Food Science and Technology*, v.38, n.4, p.417-423, 2005.

- Ci, S.X.; Huynh, T.H.; Louie, L.W.; Yang, A.; Beals, B.J.; Ron, N.; Tsang, W-G.; Soon-Shiong, P.; Desau, N.P. Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.864, p.199-210, 1999.
- Coma, V.; Martial-Gros, A.; Garreau, S.; Copinet, A.; Salin, F.; Deschamps, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, v.67, n.3, p.1162-1169, 2002.
- Cong, F.; Zhang, Y.; Dong, W. Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, v.46, p.71-75, 2007.
- Coviello, T.; Matricardi, P.; Marianecchi, C.; Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, v.119, p.5-24, 2007.
- Crank, J. The mathematics of Diffusion. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1975.
- 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.
- Daeschel, M.A.; McGuire, J.; Al-Makhlafi, H. Antimicrobial activity of nisin adsorbed of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Food Protection*, v.55, n.9, p.731-735, 1992.
- De, S., Robinson, D. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-l-lysine-alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release*, v.89, p.101-112, 2003.
- Debeaufort, F.; Voilley, A. Methylcellulose-based edible films and coatings: 2. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.685-689, 1997.
- 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.
- Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Bockstal, A.; Debevere, J. Study on antimicrobial activity of a food packaging material containing potassium sorbate. *Acta Alimentaria*, v.29, n.2, p.137-146, 2000.
- Dong, Z.; Wang, Q.; Du, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, v.280, p.37-44, 2006.
- Draget, K.I.; Østgaard, K.; Smidsrød, O. Homogeneous alginate gels: a technical approach. *Carbohydrate Polymer*, v.14, p.159-178, 1991.
- Draget, K.I.; Skjåk-Bræk, G.; Smidsrød, O. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.21, p.47-55, 1997.
- Durango, A.M.; Soares, N.F.F.; Benevides, S.; Teixeira, J.; Carvaloh, M.; Wobeto, C.; Andrade, N.J. Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan. *Packaging Technology and Science*, v.19, p.55-59, 2006.
- Einbu, A.; Vårum, K.M. Structure-Property Relationships in Chitosan. In: Tomasik, P. *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. London: CRC Press, 2004.
- Ertesvåg, H.; Valla, S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, p.85-91, 1998.

- Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p.676-683, 2009.
- Famá, L.; Flores, S.K.; Gerschenson, L.; Goyanes, S. Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers*, v.66, n.1, p.8-15, 2006.
- Fletouris, D.J.; Botsoglou, N.A.; Mantis, A.J. rapid spectrophotometric method for analysing natamycin in cheese and cheese rind. *Journal of AOAC International*, v.78, n.4, p.1024-1029, 1995.
- Flores, S.; Conte, A.; Campos, C.; Gerschenson, L.; Del Nobile, M. Mass transport properties of tapioca-based active edible films. *Journal of Food Engineering*, v.81, p.580-586, 2007a.
- Flores, S.; Famá, L.; Rojas, A.M.; Goyanes, S.; Gerschenson, L. Physical properties of tapioca-starch edible films: influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, v.40, p.257-265, 2007b.
- Franssen, L.R.; Rumsey, T.R.; Krochta, J.M. Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science*, v. 69, n.5, p.347-350, 2004.
- Galiotta, G.; Di Gioia, L.; Guilbert, S.; Cuq, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizers and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, v.81, p.3123-3130, 1998.
- Gallo, J.A. Q.; Debeaufort, F.; Callegarin, F.; Voilley, A. Lipid hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. *Journal of Membrane Science*, v180, p.37-46, 2000.
- Gallo, L.I.; Jagus, R.J.; Pilosof, A.M.R. Modelling *Saccharomyces cerevisiae* Inactivation by Natamycin in Liquid Cheese Whey. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 4, p. 311-316, 2006.
- Garcia, M.A.; Pinotti, A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p.339-345, 2004.
- Garcia, M.A.; Pinotti, A.; Zaritzky, N. E. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *Starch/Stärke*, v.58, p.453-463, 2006.
- Garcia, M.A.; Pinotti, A.; Martino, M.; Zaritzky, N. Electrically treated composite films based on chitosan and methylcellulose blends. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.722-728, 2009.
- Gemili, S.; Yemenicioğlu, A.; Altınkaya, S.A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*, v.90, p.453-462, 2009.
- Gennadios, A.; Hanna, M.A.; Kurth, L.B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT - Food Science and Technology*, v.30, n.4, p.337-350, 1997.
- Glicksman, M. Red seaweed extracts. *Food Hydrocolloids*, v.2, p.73, 1983.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. Edible wheat films: influence of the main process variables on film using response surface methodology. *Journal of Food Science*, v.57, n.1, p.190-199, 1992.

Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J.L. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, v.58, p.206-211, 1993.

Gontard, N.; Ring, S. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.3474-3478, 1996.

Slade, L.; Levine, H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.30, n.2-3, p.115-360, 1991.

Grant, G.T.; Morris, E.R.; Rees, D.A.; Smith, P.J.C.; Thom, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *Febs Letters*, v.32, n.1, p.195-198, 1973.

Güçbilmez, C.M.; Yemencioğlu, A.; Arslanoğlu, A. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein Wlms incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, v.40, p.80-91, 2007.

Guilbert, S.; Gontard, N.; Gorris, L.G.M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - Food Science and Technology*, v.29, p.10-17, 1996.

Guilbert, S.; Cuq, B.; Gontard, N. Recent innovations in edible film and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, v.14, n.6, p.741-751, 1997.

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

Han, J.H.; Floros, J.D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, v.13, n.4, p.287-298, 1997.

Haugaard, V.K.; Udsen, A.M.; Mortensen, G.; Hoegh, L.; Petersen, K.; Monahan, F. Potential food applications of biobased materials. An EU-concerted action project. *Starch/Stärke*, v.53, p.189-200, 2001.

Hiorth, M.; Tho, I.; Sande, S.A. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.56, p.175-182, 2003.

Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B.; Gontard, N. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, v.37, p.1533-1541, 2001.

Jayasekara, R.; Harding, I.; Bowater, I.; Christie, G.B.Y.; Lonergan, G.T. Preparation, surface modification and characterization of solution cast starch PVA blended films. *Polymer Testing*, v.23, p.17-27, 2004.

Jiang, X., Chen, L., Zhong, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v.54, p.457-463, 2003.

- Johansson, L.; Löfroth, J-E. Diffusion and interaction in gels and solutions. I. method. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.142, n.1, p.116-120, 1991.
- Kalichevsky, M.T., Jaroszkiewicz, E.M.; Blanshard, J.M.V. A study of the glass transition of amylopectin-sugar mixtures. *Polymer*, v.34, p.346-358, 1993.
- Kampf, N.; Nussinovitch, A. Hydrocolloid coating of cheeses. *Food Hydrocolloids*, v.14, p.531-537, 2000.
- Kanti, P.; Srigowri, K.; Madhuri, J.; Smitha, B.; Sridhar, S. Dehydration of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by prevaporation. *Separation and Purification Technology*, v.40, p.259-266, 2004.
- Kayseriiloğlu, B.S.; Bakir, U.; Yilmaz, L.; Akkas, N. Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. *Bioresource Technology*, v.87, n.3, p.239-246, 2003.
- Kester, J.J.; Fennema, O.R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v.40, n.12, p.47-59, 1986.
- Khuri, A. I., Cornell, J.A. *Response surface design and analyses*. New York: Marcel Dekker Inc., 1987.
- Kim, Y-M.; An, D-S.; Park, H-J.; Park, J-M.; Lee D.S. Properties of nisin-incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. *Packaging Technology and Science*, v.15, p.247-254, 2002.
- Kittur, F.S.; Soroja, N.; Tharanathan, H.R.N. Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *European Food Research and Technology*, v.213, p.306-311, 2001.
- Ko, S.; Janes, M.E.; Hettiarachchy, N.S.; Johnson, M.G. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, v.66, n.7, p.1006-1011, 2001.
- Koonst, J. L.; Marcy, J. E. Formation of natamycin: cyclodextrin inclusion complexes and their characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, n. 51, p. 7106-7110, 2003.
- Kristo, E.; Biliaderis, C.G. Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate-pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, v.20, n.7, p. 1057-1071, 2006.
- Kristo, E.; Biliaderis, C.G.; Zampraka, A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulate films: biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, v.101, p.753-764, 2007.
- Kristo, E.; Koutsoumanis, K.P.; Biliaderis, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, v.22, p.373-386, 2008.
- Krochta, J.M.; De Mulder-Johnston, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, v.51, n.2, p. 61-74, 1997.
- Kuijpers, A.J.; Engbers, G.H.M.; Van Wachem, P.B.; Krijgsveld, J.; Zaat, S.A.J.; Dankert, J.; Feijen, J. Controlled delivery of antibacterial proteins from biodegradable matrices. *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 235-247, 1998.

- Kurnik, R.T.; Potts R.O. Modelling of diffusion and crystal dissolution in controlled release systems. *Journal of Controlled Release*, v. 45, p. 257-264, 1997.
- Lazaridou, A.; Biliaderis, C.G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*, v.48, p.179-190, 2002.
- Lazaridou, A.; Biliaderis, C.G.; Kontogiorgos, V. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*, v.52, p.151-166, 2003.
- Levine, H.; Slade, L. Glass transition in foods. In: SWARTZBERG, H. G.; HARTEL, R. W. *Physical Chemistry of Foods*, 1 ed., New York: Marcel Dekker, 1992. p.83-221
- Li, B., Kennedy, J.F., Peng, J.L., Yie, X., Xie, B.J. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers*, v.65, p. 488-494, 2006.
- Liao, I-C.; Wan, A.C.A.; Yim, E.K.F.; Leong, K.W. Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes. *Journal of Controlled Release*, v. 104, p.347-358, 2005.
- Limjaroen, P.; Ryser, E.; Lockhart, H.; Harte, B. Development of a a food packaging coating materail with antimicrobial properties. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, v.19, p.95-109, 2003.
- López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Pérez-Mateos, M.; Montero, P. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, v.19, p.303-311, 2005.
- Lucas, E.F., Soares, B.G., Monteiro, E. *Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica*. Rio de Janeiro: Editora e-papers, 2001.
- Macleod, G.S.; Collett, J.H.; Fell, J.T. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v.58, p.303-310, 1999.
- Mali, S.; Grossmann, M.V.E.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, v.50, p.379-386, 2002.
- Mali, S.; Grossmann, M.V.E.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, v.56, p.129-135, 2004.
- 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.
- Mariniello, L.; Di Pierro, P.; Esposito, C.; Sorrentino, A.; Mais, P.; Porta, R. Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, v.102, p.191-198, 2003.
- 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 Agricultural Food Chemistry*, v.40, p.413-418, 1992.
- Martinsen, A.; Skajak-Braek, G.; Smidsrod, O.; Zanetti, F.; Paoletti, S. Comparison of different methods for determination of molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate Polymers*, v.15, p.171-193, 1991.
- Marudova, M.; Macdougall, A.J.; Ring, S.G. Pectin-chitosan interactions and gel formation. *Carbohydrate Research*, v.339, p.1933-1939, 2004.

- Mastromatteo, M.; Barbuzzi, G.; Conte, A.; Del Nobile, M.A. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, p. 222–227, 2009.
- Mendieta-Taboada, O.; Carvalho, R.A.; Sobral, P.J.A. Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis. *Química Nova*, v.31, n.2, p.348-393, 2008.
- Miller, K.S.; Krochta, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v.8, p.228-237, 1997.
- Millette, M.; Le Tien, C.; Smoragiewicz, W.; Lacroix, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, v.18, p.878–884, 2007.
- Nemtanu, M.R. Influence of the electron beam irradiation on the colorimetric attributes of starches. *Romanian Journal of Physics*, v.53, n.7-8, p.873-879, 2008.
- Nussinovitch, A.; Hershko, V. Gellan and alginate vegetable coatings. *Carbohydrate Polymers*, v.30, p.185-192, 1996.
- Oakenfull, M. Gelling agents. *CRC – Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.26, n.1, p.1-25, 1987.
- Ofori-Kwakye, K.; Fell, J.T. Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. *International Journal of Pharmaceutics*, v.226, p.139-145, 2001.
- Olivas, G. I.; Barbosa-Canovas, G.V. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT - Food Science and Technology*, v.41, n.2, p.359-366, 2008.
- 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, p.147-153, 2007.
- Ouattara, B.; Simard, R.E.; Piette, G.; Bégin, A.; Holley, R.A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p.139-148, 2000 a.
- Ouattara, B.; Simard, R.E.; Piette, G.; Bégin, A.; Holley, R.A. Diffusion of acetic and propionic acid from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, v.65, n.5, p.768-773, 2000 b.
- Ozdemir, M.; Floros, J.D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, v.47, n.2, p.149-155, 2001.
- Ozdemir, M.; Floros, J.D. Composition effects on diffusion of potassium sorbate through whey protein films. *Journal of Food Science*, v.68, n.2, p.511-516, 2003.
- Padgett, T.; Han, I.Y.; Dawson, P.L. Incorporation of food grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*, v.61, n.10, p.1330-1335, 1998.
- Park, H.J.E.; Chinnan, M.S. Gas and water barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*, v.25, p. 497-507, 1995.
- Park, S.I.; Daeschel, M.A.; Zhao, Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme – chitosan composite films. *Journal of Food Science*, v.69, n.8, p.215-221, 2004.

- Park, S.Y.; Lee, B.I.; Jung, S.T.; Park, H.J. Biopolymer composite films based on k-carrageenan and chitosan. *Materials Research Bulletin*, v.36, p.511-519, 2001.
- Parris, N.; Coffin, D.R.; Joubran, R.F.; Pessen, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.43, p.1432-1435, 1995.
- Paschoal, L.R.; Ferreira, W.A.; Prado, M.R.D.; Vilela, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n.1, p. 105-113, 2003.
- Pavlat, A.E.; Gossett, C.; Camirand, W. E Robertson, G.H. Ionomeric films of alginic acid. *Journal of Food Science*, v.64, p.61-63, 1999.
- Pedersen, J.C. Natamycin as a fungicide in Agar Media. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.3, p.1064-1066, 1992.
- Pereira, R.M.; Soares, N.F.F; Fontes, E.A.F.; Andrade, N.J.; Ramos, N.M.; Fraga, K.F.; Avaliação e desenvolvimento de filme antimicrobiano laminado na conservação de queijo tipo gorgonzola. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.60, n.345, p.292-294, 2005.
- Pinotti, A.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, v.21, n.1, p.66-72, 2007.
- Pires, A.C.S., Soares, N.F.F., Pereira, R.M., Andrade, N.J., Silva, L.H.M., Camilloto, G.P., Bernardes, P.C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, v.21, n.7, p. 375-383, 2008.
- Pitt, J.I. Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Sydney: Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 187p.
- Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Sydney: Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 187p.
- Pothakamury, U.R.; Barbosa-Cánovas, G.V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and 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, 2005.
- Prashanth, K.V.H.; Tharanathan, R.N. Crosslinked chitosan-preparation and characterization. *Carbohydrate Research*, v. 341, p.169-173, 2006.
- Quintavalla, S.; Vicini, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, v. 62, p. 373-380, 2002.
- Rajaonarivony, M, Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F., Couvreur, P. Development of a new carrier made from alginate. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.82, n.2, p.912-917, 1993.
- Redl A.; Gontard, N.; Guilbert, S. Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films. *Journal of Food Science*, v.61, p.116-120, 1996.

- Remuñán-López, C.; Bodmeier, R. Mechanical, water uptake, and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, v.44, p.215-225, 1997.
- Rhim, J-W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT - Food Science and Technology*, v.37, p.323-330, 2004.
- Rico-Peña, D.C.; Torres, J.A. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. *Journal of Food Science*, v.56, n.2, p.497-499, 1991.
- Rivero, S.; García, M.A.; Pinotti, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, v.90, p.531-539, 2009.
- 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.
- Roos, Y. H. *Phase Transitions in Foods*. 1ed. California: Academic Press, Inc., 1995. 360p.
- Santiago-Silva, P.; Soares, N.F.F.; Nóbrega, J.E.; Júnior, M.A.W.; Barbosa, K.B.F.; Volp, A.C.P.; Zerdas, E.R.M.A.; Würllitzer, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_ 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, v.20, p.85-89, 2009.
- Sartori, C.; Finch, D.S.; Ralph, B. E Gilding, K. Determination of the cation content of alginate thin films by Fti.r. spectroscopy. *Polymer*, v.38, n.1, p.43-51, 1997.
- Sébastien, F.; Stéphane, G.; Copinet, A.; Coma, V. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers*, v.65, p.185-193, 2006.
- Sebti, I.; Blanc, D.; Carnet-Ripoche, A.; Saurel, R.; Coma, V. Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels. *Journal of Food Engineering*, v.63, p.185-190, 2004.
- Shu, X.Z.; Zhu, K.J.; Song, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, v.212, p.19-28, 2001.
- Siepmann, F.; Le Brun, V.; Siepmann, J. Drugs acting as plasticizers in polymeric systems: A quantitative treatment. *Journal of Controlled Release*, v.115, p.298-306, 2006.
- 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.
- Silva, W.A.; Pereira, J.; Carvalho, C.W.P.; Ferrua, F.Q. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.1, p.154-163, 2007.
- Silveira, M.F. *Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 64p. Tese (doutorado).
- Silveira, M.F. A.; Soares, N.F.; Geraldine, R.M.; Andrade, N.J.; Gonçalves, M.P.J. Antimicrobial efficiency and sorbic acid migration from active films into pastry dough. *Packaging Technology and Science*, v.20, n.4, p.287-292, 2007.

Simpson, N.E.; Stabler, C.L.; Simpson, C.P.; Sambanis, A.; Constantinidis, I. The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 cells. *Biomaterials*, v.25, p.2603-2610, 2004.

Simsek-Ege, F.; Bond G.M.; Stringer, J. Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as function of pH. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 88, p.346-351, 2003.

Singh, M.P.; Lumpkin, J.A.; Rosenblatt, J. Effect of electrostatic interactions on polylysine release rates from collagen matrices and comparison with model predictions. *Journal of Controlled Release*, v.35,p.165-179, 1995a.

Singh, M.; Stefko, J.; Lumpkin, J.; Rosenblatt, J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharmaceutical Research*, v.12, p.1205-1210, 1995b.

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

Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A.A. Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal*, v. 41, p.1859-1866, 2005.

Sobral, P.J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.6, p.1251-1259, 2000.

Sobral, P.J.A.; Menegalli, F.C.; Hubinger, M.D.; Roques, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, v.15, p.423-432, 2001.

Spiess, W. E. L., Wolf, W. R. The results of the COST 90 project on water activity. In: Escher, F., Hallstrom, B., Meffert, H. S., Spiess, W. E. L., Voss, G. (Eds.), *Physical Properties of Foods*, New York: Applied Science Publishers, 1983. p.65-87.

Sriamornsak, P.; Kennedy, R.A. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. *International Journal of Pharmaceutics*, v.323, n.1-2, p.72-80, 2006.

Sriamornsak, P.; Kennedy, R.A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, v.358, p.205-213, 2008.

Stark, J.; Tan, H.S. Natamycin. In: Russell, N.J.; Gould, G.W. *Food Preservatives*. 2 ed. New York: Springer, 2003. p.179-193.

Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S.W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, v.68, n.2, p. 408- 420, 2003.

Teerakarn, A.; Hirt, D.E.; Acton, J.C.; Rieck, J.R.; Dawson, P.L. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*, v.67, n.8, p.3019-3025, 2002.

Tfouni, S.A.V.; Toledo, M.C.F. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico - uma revisão. *Boletim da SBCTA*, v.35, n.1/2, p.41-53, 2001.

- Tharanathan, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, v.14, p.71-78, 2003.
- Tonhi, E.; Plepis, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas de colágeno-quitosana. *Química Nova*, v.25, n.6, p.943-948, 2002.
- Turbiani, F.R.B. *Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Ativos de Alginato de Sódio Reticulados com Benzoato de Cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 126p. Tese (doutorado)
- Türe, H.; Eroğlu, E.; Ören, 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.
- Turquois, T.; Gloria, H. Determination of the absolute molecular weight averages and molecular weight distributions of alginates used as ice cream stabilizers by using multiangle laser light scattering measurements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.48, p.5455-5458, 2000.
- Vallvey, L.F.C.; Moreno, R.C.; Navas, N. Rapid ultraviolet spectrophotometric and liquid chromatographic methods for the determination of natamycin in lactoserum matrix. *Journal of AOAC International*, v.83, p.802-808, 2000.
- Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; González-Matínez, C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p.536-547, 2009.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P.; Chiralt, A. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, v.20, n.4, p.502-509, 2006.
- Villalobos, R.; Chanona, J.; Hernandez, P.; Gutierrez, G.; Chiralt, A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, v.19, p.53-61, 2005.
- Wallace, D.G.; Rosenblatt, J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.55, p.1631-1649, 2003.
- Wang, X.; Du, Y.; Luo, J.; Lin, B.; Kennedy, J.F. Chitosan/organic rectorite nanocomposite films: structure, characteristic and drug delivery behaviour. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, p.41-49, 2007.
- Weller, C.L.; Gennadios, A.; Saraiva, R.A. Edible Bilayer Films from Zein and Grain Sorghum Wax or Carnauba Wax. *LWT - Food Science and Technology*, v.31, p.279-285, 1998.
- Weng, Y.M.; Hotchkiss, J.H. Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Packaging Technology and Science*, v.6, n.3, p.123-128, 1993.
- Weng, Y-M.; Chen, M-J. Sorbic anhydride as antimycotic additive in polyethylene food packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, v.30, p.485-487, 1997.
- Westrin, B.A.; Axelsson, A.; Zacchi, G. Diffusion measurement in gels. *Journal of Controlled Release*, v.30, p.189-199, 1994.
- Wijmans, J.G., Baker, R.W. The solution-diffusion model: a review. *Journal of Membrane Science*, v.107, p.1-21, 1995.

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, Y.X.; Kim, K.M.; Hanna, M.A.; Nag, D. *Industrial Crops and Products*, v.21, p.185-192, 2005.

Yan, X-L.; Khor, E.; Lim, L-Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.48, n.7, p.941-946, 2000.

Yan, X-L.; Khor, E.; Lim, L-Y. Chitosan-alginate films prepared with chitosan of different molecular weights. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, v.58, n.4, p.358-365, 2001.

Yang, L.; Paulson, A.T. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, v.33, p.563-570, 2000.

Yao, K.D.; Liu, J.; Cheng, G.X.; Lu, X.D.; Tu, H.L.; Silva, J.A.L.D. Swelling behavior of pectin/chitosan complex films. *Journal of Applied Polymer science*, v.60, p.279-283, 1996.

Yingyuad, S.; Ruamsin, S.; Reekprkhon, D.; Douglas, S.; Pongamphai, S.; Siripatrawan, U. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science*, v.19, p.149-157, 2006.

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, 2004. 154p. Tese (doutorado)

Zactiti, E.M.; Kieckbusch, T.G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, v.77, n.3, p.462-467, 2006.

Zactiti, E.M.; Kieckbusch, T.G. Release of potassium sorbate from active films of sodium alginate crosslinked with calcium chloride. *Packaging Technology and Science*, DOI: 10.1002/pts.860, 2009.

Zhang, W.; Franco, C.M.M. Critical assessment of quasi-steady-state method to determine effective diffusivities in alginate gel membranes. *Biochemical Engineering Journal*, v.4, p.55-63, 1999.

APÊNDICE A

CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

A.1 Grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por titulação ácido-base ou titulação potenciométrica linear segundo o procedimento descrito por Ke e Chen, citado por Jiang *et al.* (2003). O objetivo é determinar a quantidade de grupos acetil presente na molécula de quitosana. Uma amostra de quitosana ($\pm 0,2$ g em base seca) foi dissolvida em 25 mL de solução de ácido clorídrico 0,1N completando-se o volume para 100 mL com água destilada. A solução resultante foi então titulada com solução de NaOH (0,1N). O titulante foi adicionado sob agitação lenta e contínua até atingir pH 2,0 (início da titulação). A partir deste ponto a adição era feita em intervalos de 0,5 mL e tempo de 25 segundos, anotando-se os valores de pH. A titulação foi interrompida quando o pH da solução era igual a 6,0. Uma curva linear de titulação foi obtida plotando-se $f(x)$ (Equação A.1) versus volume de NaOH correspondente. O volume de NaOH no ponto de extremidade, V_e , é estimado extrapolando-se a curva linear de titulação.

$$f(x) = \left(\frac{V_o + V}{N_B} \right) * ([H^+] - [OH^-]) \quad (A.1)$$

sendo $[H^+] = \alpha_H^+ \times 10^{0,08}$ e $[OH^-] = \frac{k_w}{[H^+]}$, onde K_w é o produto iônico da água, que equivale a 10^{-14} .

O grau de desacetilação da quitosana foi calculado através da Equação A.2.

$$\%GD = \frac{\phi}{\left[\frac{(W - 161\phi)}{204 + \phi} \right]} * 100 \quad (\text{A.2})$$

onde $\phi = (N_A V_A - N_B V_e) / 1000$, N_A é a concentração de HCl (N), V_A é o volume de HCl (mL), N_B é a concentração do NaOH (N), V_e é o volume do NaOH no ponto de extremidade (mL), W é a massa de amostra (g) e 161 corresponde a massa molar do monômero (D-glucosamina) da quitosana ($\text{mg} \cdot \text{mol}^{-1}$).

O grau de desacetilação da quitosana utilizada neste trabalho foi de $96,73 \pm 0,05$ (%), sendo que os experimentos foram realizados em triplicata.

A.2 Massa molar viscosimétrica média da quitosana e do alginato

A.2.1 Procedimento

As massas molares médias do alginato e da quitosana foram determinadas através do método viscosimétrico utilizando-se um viscosímetro capilar tipo Ostwald-Cannon-Fenske (n° 200).

Para o alginato foram preparadas soluções diluídas a diferentes concentrações (0,002; 0,005; 0,007; 0,010; 0,015; 0,020 g/mL) utilizando-se como solvente solução de NaCl 0,1M. Para a quitosana foram preparadas soluções diluídas nas concentrações 0,001; 0,003; 0,006; 0,009 e 0,012 g/mL utilizando-se como solvente o sistema aquoso - ácido acético 0,1M - cloreto de sódio 0,2M. As soluções foram filtradas em papel de filtro antes das determinações. O volume de solução no viscosímetro era mantido constante (10 mL) e, para cada concentração, foram realizadas cinco medidas de tempo de escoamento entre os dois meniscos do aparelho. Durante as determinações o viscosímetro foi mantido imerso em um banho termostático com circulação a 25°C. A viscosidade intrínseca $[\eta]$, que pode ser expressa através de uma relação entre as viscosidades inerente e específica reduzida, foi calculada utilizando-se as Equações A.3 a A.7 (Lucas *et al.*, 2001).

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad (A.3)$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (A.4)$$

$$\eta_{esp.red} = \frac{\eta_{esp}}{c} \quad (A.5)$$

$$\eta_{ine} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} \quad (A.6)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0}(\eta_{ine}) = \lim_{c \rightarrow 0}(\eta_{esp.red}) \quad (A.7)$$

onde η_{rel} é a viscosidade relativa, η_{esp} é a viscosidade específica, $\eta_{esp.red}$ é a viscosidade específica reduzida, η_{ine} é a viscosidade inerente, $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, t é o tempo de escoamento da solução no viscosímetro, t_0 é o tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro, c é a concentração do polímero na solução.

A massa molar viscosimétrica média, \overline{M}_v , foi determinada através da Equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação A.8) na qual as constantes para o alginato no solvente utilizado são $1,2 \times 10^{-2}$ mL/g e $a=0,96$ (Mancini *et al.*, 1996) e para a quitosana são $K=1,8 \times 10^{-3}$ mL/g e $a=0,93$ (Canella e Garcia, 2001).

$$[\eta] = K \cdot \overline{M}_v^a \quad (A.8)$$

A.2.2 Massa molar média (\overline{M}_v) da quitosana

Usualmente a quitosana é preparada a partir da quitina utilizando-se soluções extremamente concentradas de hidróxido de sódio, o que costuma promover reações de degradação do polímero. Esta reação de hidrólise pode remover total ou parcialmente os grupos acetilados da quitina, liberando grupos amino, os quais impõem a natureza catiônica da quitosana resultante, resultando em uma mistura de polímeros de diferentes tamanhos. A quitosana comercial possui, geralmente, grau de desacetilação variando de 75 a 95% com massa molar na faixa de 10^4 - 10^6 g/gmol. Como muitas das propriedades destes

polissacarídeos estão intimamente relacionadas a estes dois parâmetros, torna-se imprescindível a determinação dos mesmos (Canella e Garcia, 2001).

A determinação da massa molar pelo método viscosímetro é de fácil execução. A dificuldade em se obter dados confiáveis de viscosidade de amostras de baixa concentração, no entanto, pode acarretar erros consideráveis na análise (Ci *et al.*, 1999). Medidas de viscosidade de soluções diluídas de polímeros são amplamente utilizadas para a determinação de suas massas molares, sendo estas apropriadas em casos de polímeros solúveis e sem ocorrência de reações químicas ou degradação. A viscosidade intrínseca (η) é uma característica da macromolécula em um dado solvente e é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado pelo próprio polímero. Ela depende primordialmente da massa molar, da rigidez das cadeias e do tipo de solvente (Mancini *et al.*, 1996).

A viscosidade intrínseca (η) da quitosana foi determinada por extrapolação da curva de η_{esp}/c em função da concentração das soluções para diluição infinita ($C=0$) ($R^2 = 0,951$) (Figura A.1), sendo esta 273,3 mL/g.

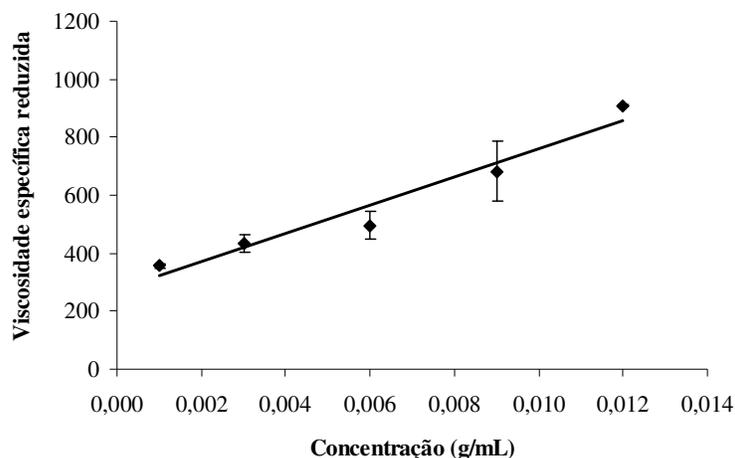


Figura A.1: Viscosidade específica reduzida em função da concentração da solução de quitosana

A massa molar viscosimétrica média, \overline{M}_v , foi determinada através da Equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação A.8) que relaciona viscosidade intrínseca e massa molar. A massa molar obtida foi de $3,7 \times 10^5$ g/gmol, caracterizando a matéria-prima como quitosana de massa molar média segundo Yan *et al.* (2001).

A.2.2 Massa molar média (\overline{M}_v) do alginato

O conhecimento da massa molar de alginatos é de fundamental importância para um melhor entendimento da relação entre a estrutura e suas propriedades em um grande número de aplicações na área alimentícia e farmacêutica (Turquois e Gloria, 2000). Enquanto que a seletividade para a reação com íons cálcio e as propriedades de géis de alginato dependem fortemente no conteúdo relativo e distribuição dos dois monômeros (G e M), a viscosidade está principalmente relacionada à massa molar (Martinsen *et al.*, 1991).

A viscosidade intrínseca (η) do alginato (12,13 mL/g) foi determinada por extrapolação da curva de η_{esp}/c em função da concentração das soluções para diluição infinita ($C=0$) ($R^2 = 0,985$) (Figura A.2).

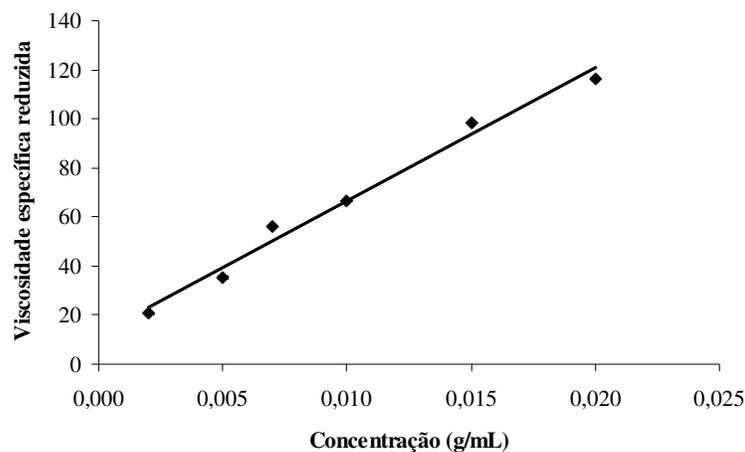


Figura A.2: Viscosidade específica reduzida em função da concentração da solução de alginato

A massa molar viscosimétrica média do alginato utilizado neste trabalho, determinada através da Equação A.8, foi de $1,3 \times 10^6$ g/gmol. Este valor está próximo ao determinado por Zactiti (2004) para alginato da mesma fonte e do mesmo fabricante ao utilizado neste trabalho. No entanto esta pesquisadora determinou a massa molar por cromatografia de permeação em gel (CPG).

APÊNDICE B

CURVA PADRÃO DA NATAMICINA

A concentração de natamicina liberada na água durante os ensaios de liberação foi quantificada pelo método de espectrofotometria de derivadas (Oliveira *et al.*, 2007).

Um dos problemas da espectrofotometria nas regiões do ultravioleta – visível (UV-Visível) está relacionado com a sobreposição das bandas (*overlapping*). A diferenciação do espectro de ordem zero não aumenta as informações do espectro original, mas ocorre supressão das bandas largas, realce das bandas estreitas, a resolução de um “ombro” para uma banda, etc., obedecendo, ainda, a Lei de Beer-Lambert (Paschoal *et al.*, 2003). Assim, o espectro de terceira ordem aumenta a intensidade dos picos e transforma o espectro normal de ordem zero em uma série de picos e vales que podem ser utilizados para definir e localizar a banda analítica de interesse.

A grande vantagem da utilização da espectrofotometria de derivadas está relacionada com a possibilidade de se minimizar os problemas com interferentes, sem necessidade de utilizar complicados procedimentos de separação ou extração prévios, bem como não necessitar de padrões ultrapuros exigidos na CLAE. Este método tem sido utilizado por vários autores na quantificação de natamicina em queijos (Fletouris *et al.*, 1995; Capitán-Vallvey *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2007, Pires *et al.*, 2008).

A Figura B1 apresenta a curva padrão obtida a partir de soluções contendo concentrações conhecidas de natamicina padrão (Sigma-Aldrich Inc., EUA). O padrão (20mg) foi dissolvido em 50 mL de metanol P.A., e a partir desta solução estoque foram preparadas as soluções padrão (diluídas em água destilada) de concentração crescente (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 e 15 ppm). Água destilada foi utilizada como branco. O equipamento utilizado para a realização das análises foi um espectrofotômetro (HP, modelo 8453, EUA),

equipado com controlador de temperatura HP 89090A e *software UV-Visible ChemStation*. O espectro de ordem zero dessas soluções era obtido na faixa de 290 a 350 nm e então se procedia a obtenção da terceira derivada da curva de absorção, através do *software* do equipamento. A curva de calibração foi obtida relacionando-se a amplitude do pico negativo em 317 nm em relação a linha de base com a concentração da solução padrão. Através do ajuste linear dos pontos obteve-se a equação que relaciona concentração com absorvância (Equação B1). O coeficiente de determinação (R^2) para esta equação foi de 0,9968.

$$C(\text{ppm}) = -0,0022x \left(\frac{d^3 \text{abs}}{d\lambda^3} \right) \quad (\text{B1})$$

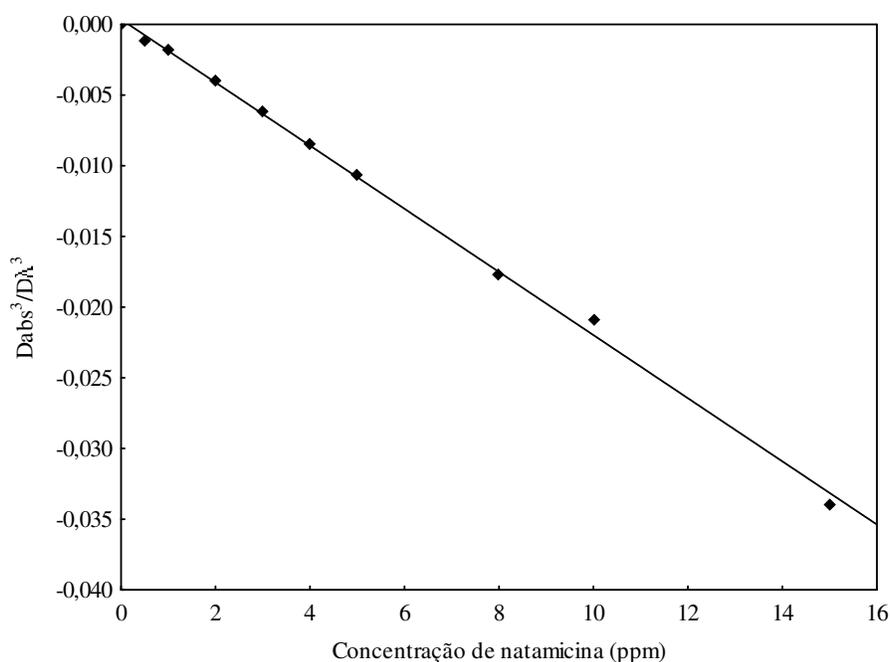


Figura B1: Curva padrão da natamicina em $\lambda = 317$ nm

As Figuras B2 e B3 apresentam os espectros de absorção de ordem zero e de terceira ordem, respectivamente, das soluções de natamicina padrão utilizadas na obtenção da curva padrão.

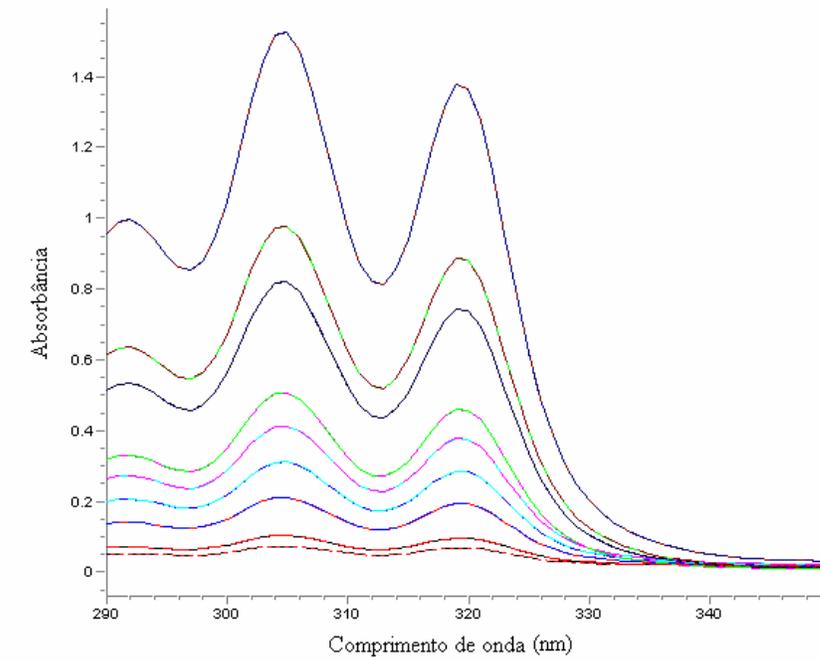


Figura B2: Espectros de absorção (ordem zero) das soluções de natamicina utilizadas na construção da curva padrão

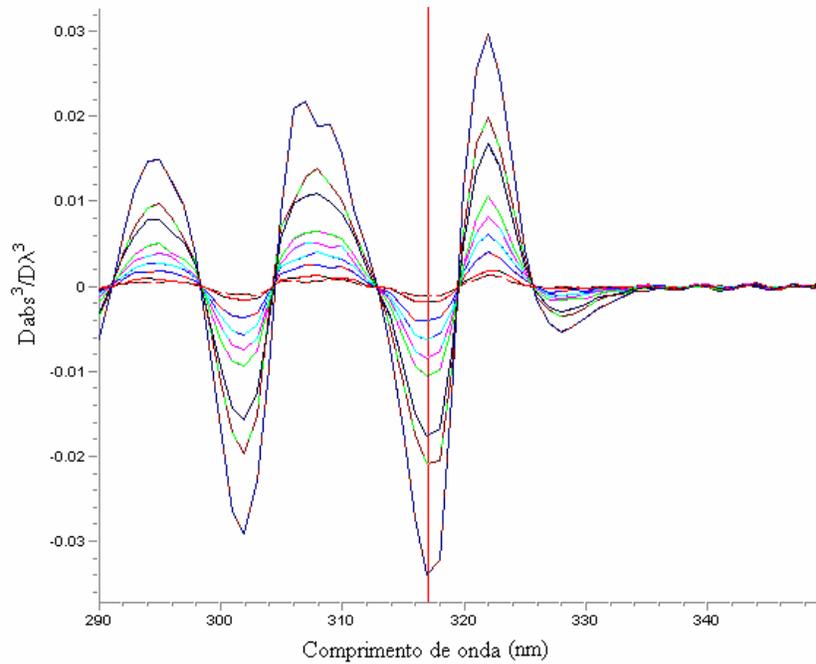


Figura B3: Espectros de absorção (terceira ordem) das soluções de natamicina utilizadas na construção da curva padrão

APÊNDICE C

GRÁFICOS DE DMA DOS FILMES SEM E COM NATAMICINA

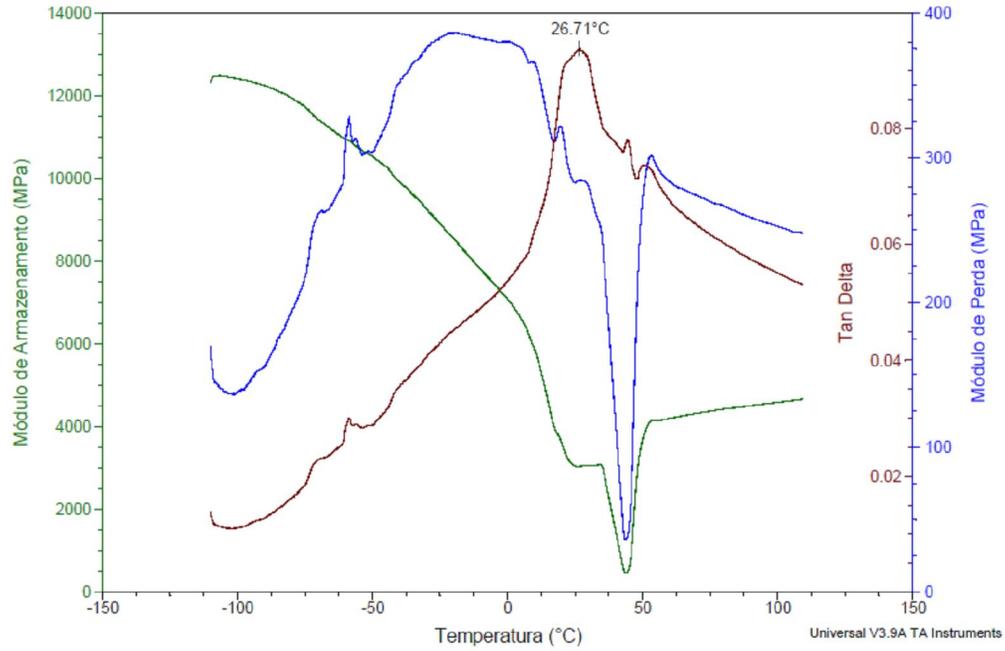


Figura C1: Curva de DMA para o filme de alginato puro

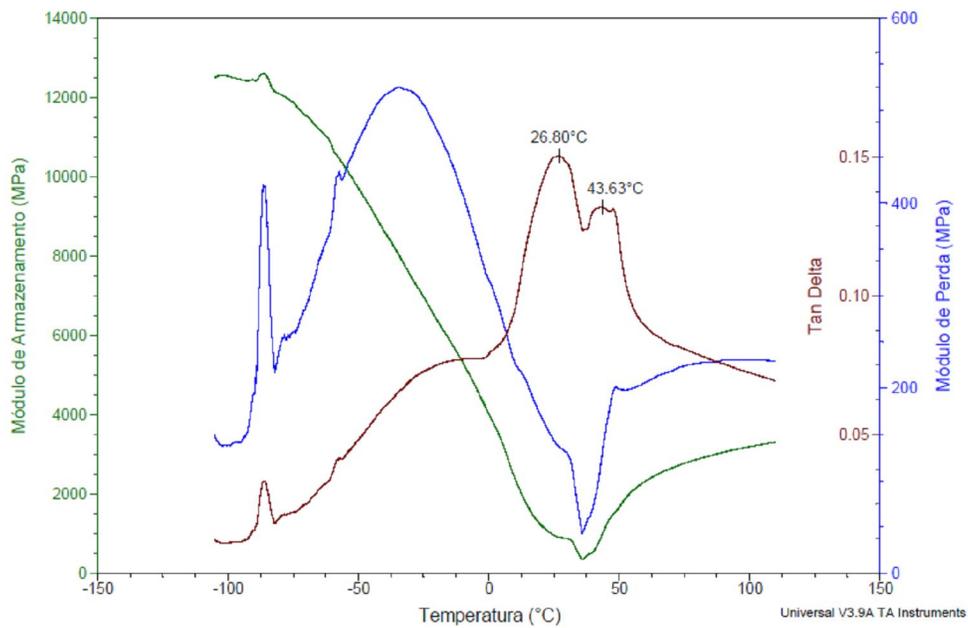


Figura C2: Curva de DMA para o Filme Composto 1

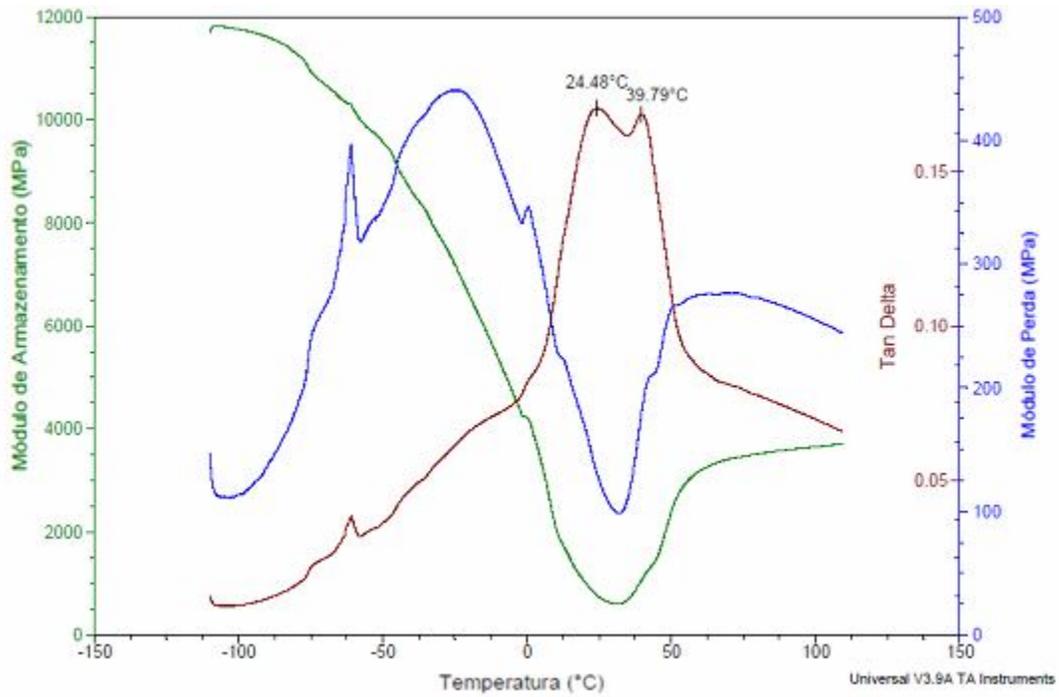


Figura C3: Curva de DMA para o Filme Composto 2

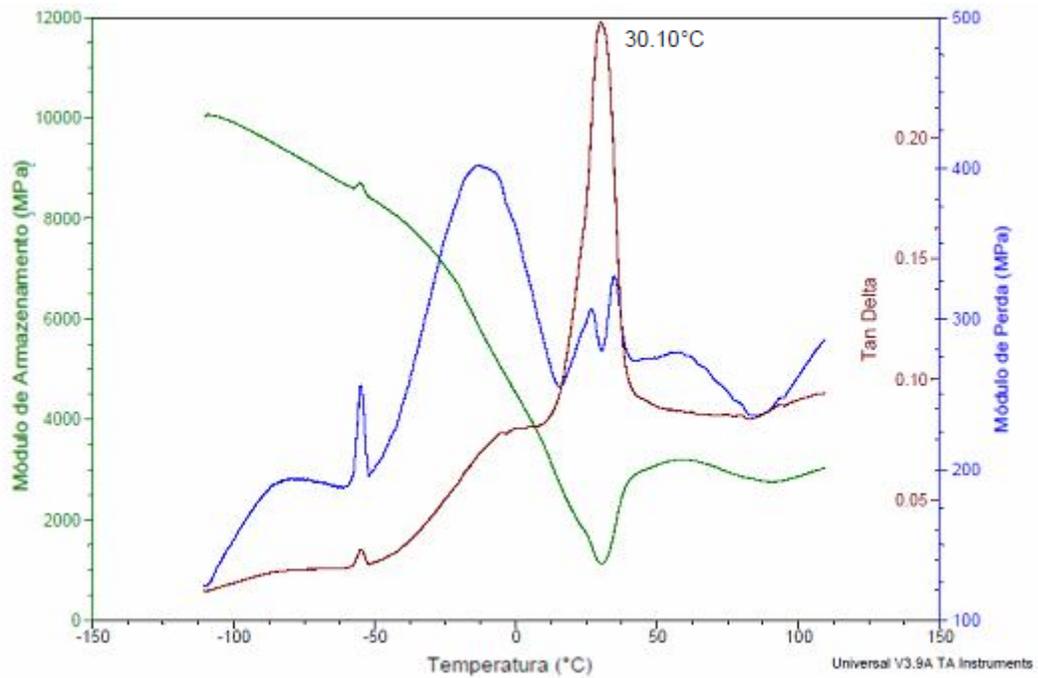


Figura C4: Curva de DMA para o Filme de quitosana

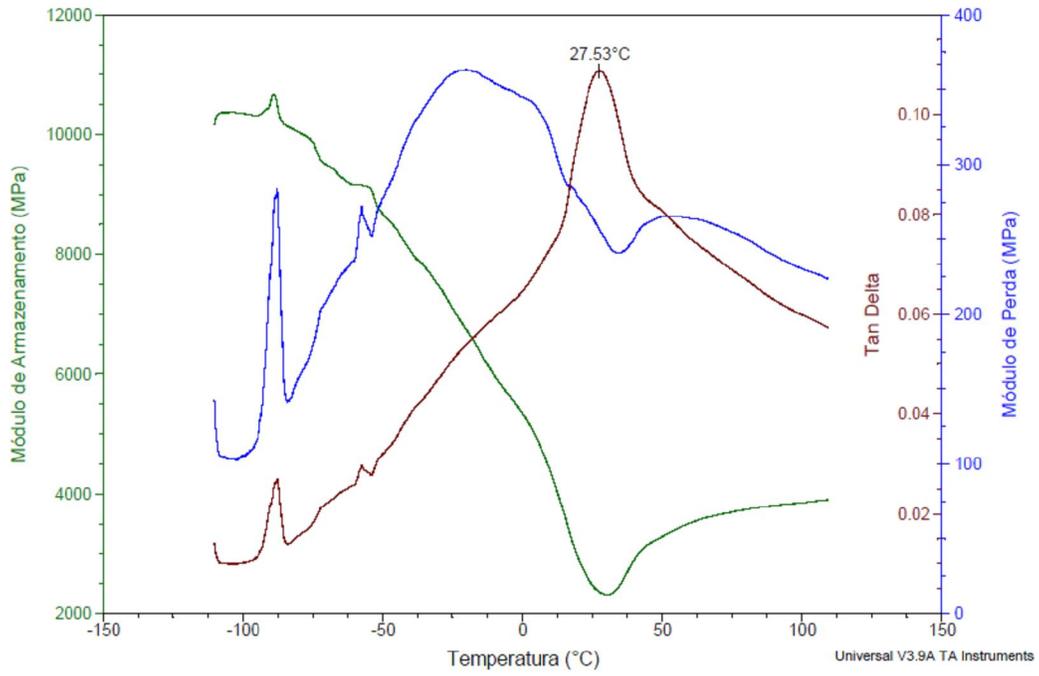


Figura C5: Curva de DMA para o filme de alginato puro com 8% natamicina

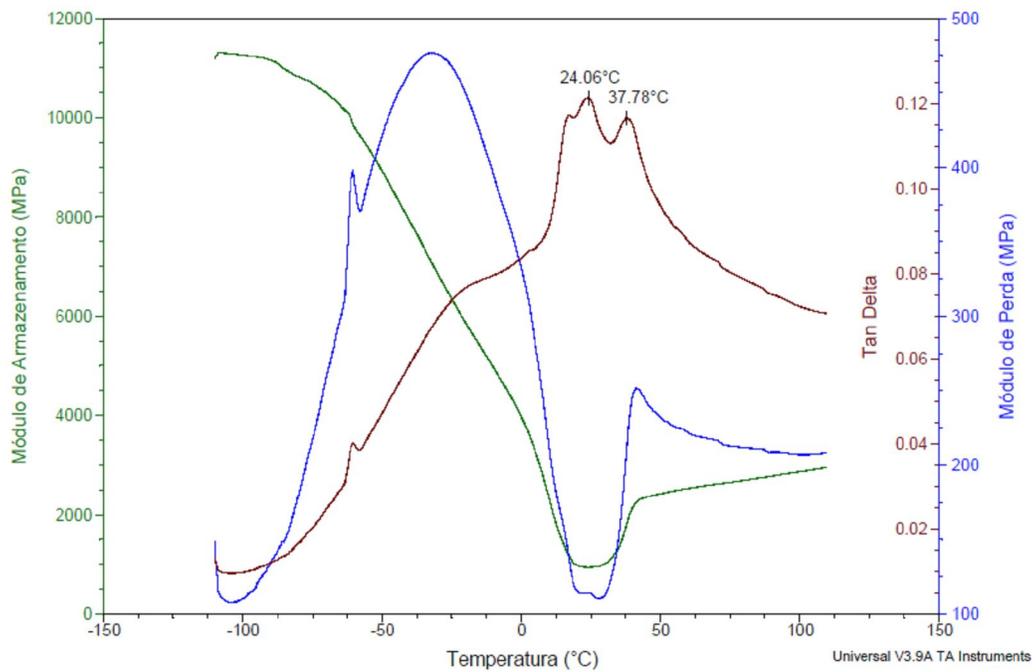


Figura C6: Curva de DMA para o Filme Composto 1 com 8% natamicina

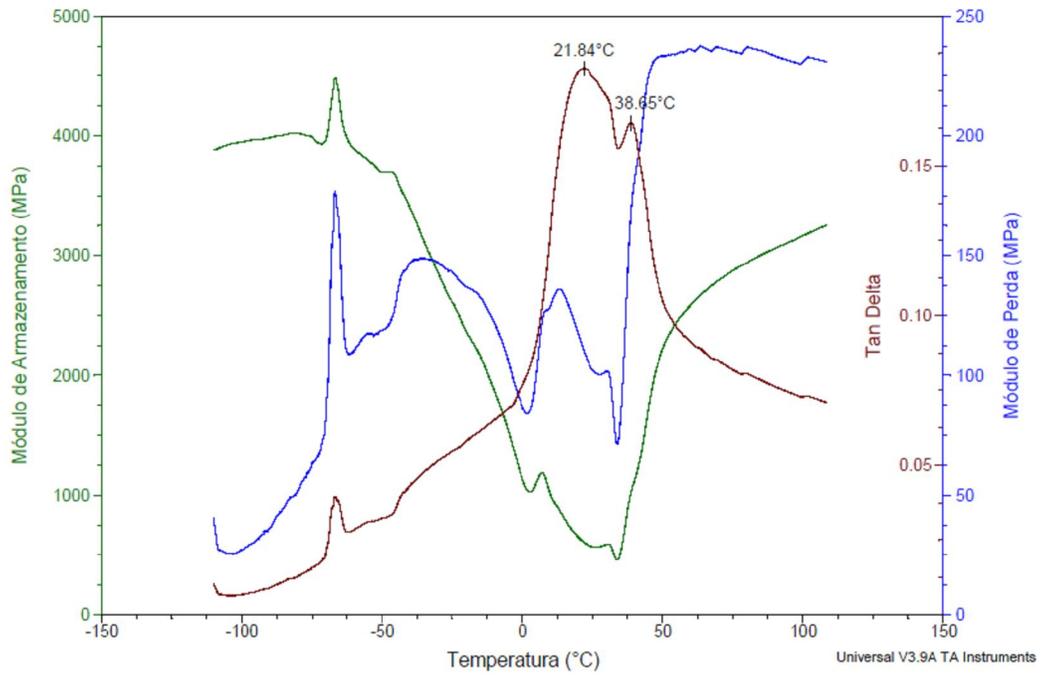


Figura C7: Curva de DMA para o *Filme Composto 2* com 8% natamicina

ANEXO 1



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration

Mariana Altenhofen da Silva, Andréa Cristiane Krause Bierhalz, Theo Guenter Kieckbusch*

Faculdade de Engenharia Química, University of Campinas, UNICAMP, P.O. Box 6066, Campinas, SP 13083-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2008

Received in revised form 11 February 2009

Accepted 17 February 2009

Available online 21 February 2009

Keywords:

Alginate

Pectin

Biofilms

Plasticizer

Crosslinking

ABSTRACT

The manufacture of composite biofilms of alginate and LM-pectin crosslinked with calcium ions requires a two-step contact with Ca^{2+} : initially a low-structured pre-film is formatted which is further crosslinked in a second contact with a more concentrated Ca^{2+} solution containing plasticizer. This research evaluated the influence of the plasticizer (glycerol) concentration (1–15% w/v) in this finishing reticulation step on final films characteristics. The results indicated that the extent of the simultaneous Ca^{2+} crosslinking and plasticization with glycerol was determined by the level of structural organization obtained in the pre-reticulation. Increasing the glycerol concentration of the crosslinking solution increased film solubility in water, moisture content, volumetric swelling and flexibility and decreased the resistance to tensile stress. Transparent alginate and pectin composite films with acceptable mechanical properties, low solubility and limited degree of swelling were obtained with 10% glycerol in the second contact solution.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing consumers concern on environmental problems ensuing from the use of synthetic packaging materials, as well as the demand for higher quality foods have contributed to the development of packaging manufactured with natural sources such as polysaccharides, proteins and/or lipids. Although edible films are not meant to totally replace traditional synthetic packagings they do have the potential to reduce their use, as well as to function as controlled release systems of active substances, and to limit moisture, aroma, and lipid migration between food components (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997).

The use of edible films in food applications depends on several features like cost, availability, functional attributes, mechanical properties (strength and flexibility), optical quality (gloss and opacity), barrier requisites (water vapor, O_2 and CO_2 permeability), structure resistance to water and sensorial acceptance. These characteristics are greatly influenced by parameters such as the type of material used as structural matrix (conformation, molecular mass, charge distribution), film manufacturing conditions (solvent, pH, concentration, temperature, etc.) and the type and concentration of additives (plasticizers, crosslinking agents, antimicrobials, antioxidants, etc.) (Debeaufort, Quezada-Gallo, & Voilley, 1998; Guilbert, Gontard, & Gorris, 1996).

A recent approach to edible and biodegradable films technology contemplates the production of composite films, by combining

different polysaccharides, proteins and lipids in order to improve their functionality. Composite films may be designed to take synergistic advantages of the pure components features, even though, as with synthetic polymers, the mechanical and barrier properties of composite biofilms strongly depend on the constituting polymer characteristics and their compatibility (Garcia, Pinotti, Martino, & Zaritzky, 2004).

Pectin and alginate, both polyuronates, are two characteristic examples of natural ionic polysaccharides undergoing chain–chain association and forming hydrogels upon addition of divalent cations (e.g. Ca^{2+}) (Fang et al., 2008).

Alginates are structural polysaccharides extracted from brown algae. On a molecular basis alginates are composed of guluronic (G) and mannuronic (M) acid units forming regions of M-blocks, G-blocks and blocks of alternating sequence (MG-blocks), where the relative proportions of these sequential organizations depends on the source (Ertesvåg & Valla, 1998).

Pectin is a major structural component of cell walls, being one of the largest constituent in citrus by-products. Pectin is a complex anionic polysaccharide composed of β -1,4-linked d-galacturonic acid residues, wherein the uronic acid carboxyls are either fully (HMP, high methoxyl pectin, DE > 50%) or partially (LMP, low methoxyl pectin, DE < 50%) methyl esterified. Like alginates, low methoxyl pectins, form gel with divalent cations (Marudova, MacDougall, & Ring, 2004; Walkenström, Kidman, Hermansson, Rasmussen, & Hoegh, 2003).

Calcium induced gelation has been demonstrated to result from specific and strong interactions between calcium ions and guluronate and galacturonate blocks in alginate and pectin, respectively

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 3930; fax: +55 19 3521 3922.

E-mail address: theo@feq.unicamp.br (T.G. Kieckbusch).

(Braccini & Perez, 2001; Fang et al., 2008). In this process the solvent is confined in the interstices of a three dimensional network linked by junction zones that involve cooperative association of extended segments of the polymer chains (Bryce, McKinnon, Morris, Rees, & Thom, 1974). The mechanism that better describes gel formation in alginate and LM-pectin in the presence of calcium ions is the so called “egg-box” model.

Pectin and alginate tend to form strong films, but with poor resistance to water due to their hydrophilic nature. Their ability to form strong and insoluble gels with divalent cations can be used to improve these shortcomings (Pavlat, Gossett, Camirand, & Robertson, 1999). Allen, Nelson, Steinberg, and McGill (1963) studying different calcium salts for alginate gel coating formation, classified calcium chloride as the most effective crosslinking agent.

The dehydration of these gelified structures produces strong cohesive films that require plasticizers. The addition of plasticizer leads to a decrease in intermolecular forces along polymer chains which improves the flexibility and chain mobility. They are added to enhance film flexibility, decrease brittleness, avoid shrinking during handling and storage and therefore make it easier for film to be peeled off from the support during manufacture (Guilbert et al., 1996). Several studies, however, have also evidenced adverse effects of plasticizers on edible film attributes. Most of them describe an increase in gas, solute and water vapor permeability and the decrease in cohesion affects mainly mechanical properties. The characteristics of films based on polyuronated matrices depend therefore, of an equilibrium between the degree of crosslinking with Ca^{2+} (necessary to reduce the solubility in water but induces brittleness) and the addition of plasticizers for better workability. Above a critical concentration the plasticizer can exceed the compatibility limit with the biopolymer and phase separation with plasticizer exclusion is usually observed. The more commonly used plasticizers in edible carbohydrate based films are polyols, mainly glycerol and sorbitol (Yang & Paulson, 2000).

The present work evaluated the effect of the plasticizer (glycerol) concentration on the solubility in water, swelling degree and mechanical properties of alginate/pectin composite films crosslinked with calcium ions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Medium viscosity sodium alginate, obtained from *Macrocystis pyrifera* seaweed, purchased from Sigma–Aldrich (USA), with an average molecular mass (M_w) measured by gel permeation chromatography of 1.61×10^6 Da, and low methoxy pectin kindly donated by CPKelco (Denmark), with M_w of 4.28×10^5 Da, were used as biopolymers matrices in the composite and single films. Calcium chloride dihydrate (Merck, Germany) was used as crosslinking agent and glycerol (Synth, Brazil) as plasticizer.

2.2. Film preparation

Alginate and pectin composite films were made by casting in a two-stage crosslinking procedure. In the first stage a low reticulated film was prepared as follows. Polysaccharide solution with equal mass fractions of alginate and pectin (0.75% w/v of each polysaccharide) was prepared in distilled water already containing 0.6 g glycerol/g biopolymer at room temperature. The solution was mechanically stirred at 1000 rpm (Fisatom, model 713, Brazil) for about 1 h to ensure homogeneity. Afterwards, the temperature of the system was raised to 70 °C and a dilute aqueous calcium chloride solution was slowly added to the biopolymer solution at a flow rate of 1 mL/min delivered by a peristaltic pump (Masterflex C/L,

model 77120-70, USA) until a total amount of 0.02 or 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ biopolymers was transferred (approximately 30 min). The increase in temperature, the low flow rate and the strong agitation were necessary to avoid local gelation, and as a consequence, film heterogeneities. A defined amount (70 g) of the partially crosslinked film forming solution was poured into polystyrene Petri dishes ($d = 14$ cm) and dried in a convection oven (Nova Ética, 420D, Brazil) at 40 °C for 20 h. After detaching the resulting film from the support, the crosslinking was complemented in a second stage, by total immersion of the films in 50 mL of an aqueous calcium chloride solution (3% w/v) containing glycerol (1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 12% and 15% v/v) for 30 min. The excess surface liquid was removed and the films were placed over inverted Petri dishes and dried in a ventilated ambient for about 6 h, at room temperature and RH > 60% having the borders fixed by Teflon® rings to avoid wrinkling of the film edges. All films were conditioned at room temperature and 52% RH inside desiccators for 3 days before characterization. Films prepared with 0.02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ biopolymer in the first stage were denominated low calcium films (LCa film), whereas films prepared with 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ biopolymer were referred as high calcium films (HCa film).

Simple films manufactured only with alginate or pectin and using 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ biopolymer in the first stage (HCa film) and 5% and 10% of glycerol in the crosslinking solutions of the second stage were also prepared following the same procedure as for the composite films.

2.3. Film characteristics

2.3.1. Film thickness, δ

The film thickness was controlled by pouring a constant mass (70 g) of the film forming solution over the support. Thickness of the conditioned films was measured using a digital micrometer (Mitutoyo, MDC-25S, Japan). Measurements were taken at ten different positions of the film and the mean value was used in the calculations of the mechanical properties.

2.3.2. Solubility in water, S_w

The solubility in water of the films was measured as proposed by Irissin-Mangata, Bauduin, Boutevin, and Gontard (2001). The moisture weight fraction, ω , of the film was gravimetrically determined in a vacuum oven (Lab-Line, Squaroid, USA) at 105 °C for 24 h. Disks cut from the same film, were weighed (total mass m_o) and immersed in 50 mL of distilled water using a 250 mL beaker maintained under mild agitation (175 rpm) at 25 °C for 24 h (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, USA). The final dry matter (m_f) of the sample was determined in the same vacuum oven (105 °C/24 h). The fractional solubilized matter (S_w) was calculated as a function of the initial dry matter using Eq. (1).

$$S_w = \frac{m_o(1 - \omega) - m_f}{m_o(1 - \omega)} \quad (1)$$

2.3.3. Swelling degree, SD

The swelling degree of the films was determined as described by Xu, Bartley, and Johnson (2003). The initial mass (m_o) of a circular cut ($d = 2.5$ cm) of the film was quantified and the sample was immersed in 100 mL of stirred distilled water at 25 °C for different periods of time. The wet sample was carefully blotted between filter paper to remove the excess water from the surface and reweighed. The swelling degree (SD) was measured in terms of the amount of absorbed water relative to the initial mass (Eq. (2)).

$$SD = \frac{(m_w - m_o)}{m_o} \quad (2)$$

where m_w is the swollen film mass.

The swelling behavior of the films was also monitored by measuring changes in the thickness of the swollen films.

2.3.4. Mechanical properties

Tensile strength (TS) and percentage tensile elongation at break (E) of the preconditioned films were determined at room temperature using a TA.XT2 (Stable Microsystems SMD, England) according to ASTM standard method D882 (ASTM, 1995). Films were cut into strips (10 × 2.54 cm) and mounted between the corrugated tensile grips of the instrument. The initial grip spacing and cross-head speed were set at 50 mm and 0.1 cm/s, respectively. The tensile strength was expressed as the maximum force at break divided by the initial cross-sectional area of the film strip and the elongation at break as a percentage of the original length.

2.3.5. Calcium content

The concentration of calcium in the crosslinked films was determined according to Sriamornsak and Kennedy (2008), using an atomic absorption spectrophotometer (PerkinElmer, model 373, USA) in the absorption mode with an air-acetylene flame detector. Film samples (about 8 mg) were dissolved in 10 mL of a 2% sodium citrate solution. Each determination was performed in triplicate.

2.3.6. Statistical analysis

Analysis of variance and Tukey test were used to determine statistically significant differences ($p < .05$) among averages, using the Software Statistica V.1.1.5.

3. Results and discussion

Alginate and pectin composite films produced by the two-stage crosslinking method were homogeneous, transparent and visually attractive. However, composite films made with the two higher concentrations of plasticizer (12% and 15%), showed vestiges of phase separation on the surface of the film and films with 3% or less glycerol were very brittle. The use of a limited amount of crosslinking agent (first stage) before the total consolidation of the film structure was necessary to allow a proper handling of the films. These partially reticulated films produced were very flexible and completely water soluble. The same characteristics were

found for the partially reticulated pure alginate or pure pectin simple films, however alginate films were more transparent than pectin films, the latter showing slightly hazy appearance. Zactiti and Kieckbusch (2006) also obtained highly soluble alginate films manufactured without the final crosslinking contact. Completely soluble alginate films were also obtained by Pavlath et al. (1999) by adding up to 0.18 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginate in a single stage procedure.

3.1. Film thickness

The results of averaged thickness measurements are shown in Fig. 1. The thickness of the composite films increases steadily when the glycerol concentration in the second stage was increased leveling off at higher concentration, probably due to glycerol exudation. In all studied conditions the HCa composite films were thicker than LCa composite films. These tendencies at a macroscopic level can be attributed to an increase in molecular volume due to a more intense plasticizing effect of higher concentration of glycerol. The values in Fig. 1 also indicate that single component films were thinner compared to composite films and that pure pectin films produce thicker films compared to pure alginate films. The latter observation is probably due to a more organized structure formed in alginate simple films (Sriamornsak & Kennedy, 2008).

3.2. Moisture content and solubility in water

The moisture content and the water solubility of the alginate and pectin composite films (LCa and HCa film), treated with different concentrations of glycerol in the second stage are shown in Table 1. Low solubility of edible films is one of the most important requirement in food and pharmaceutical applications, however most of the published studies on biopolymer films deal mainly with film characteristics such as mechanical and barrier properties (Kim, Ko, & Park, 2002; Rhim, 2004).

The equilibrium moisture content and the solubility in water of the films conditioned at 52% RH increased consistently and significantly by increasing the glycerol content present in the crosslinking solution. Since the final reticulation conditions for the LCa and HCa films were the same it is reasonable to associate the variation in moisture content to the amount of glycerol present in the film.

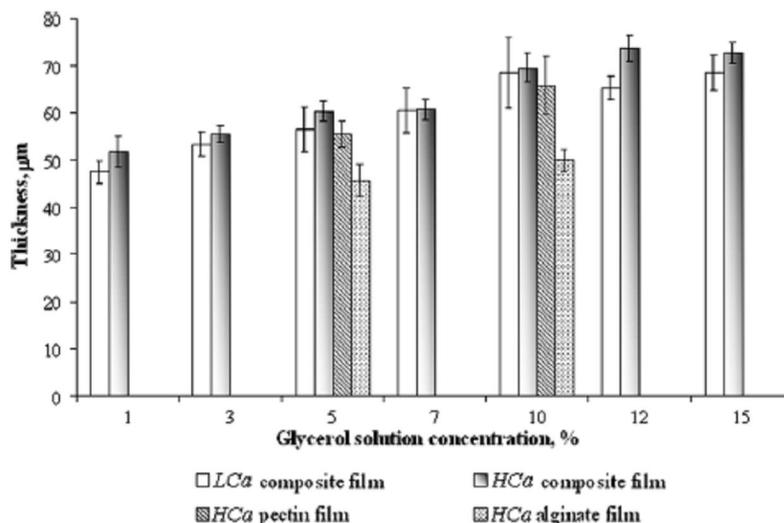


Fig. 1. Thickness of LCa and HCa composite films and HCa pectin and alginate simple films with different glycerol concentration in the second stage crosslinking solution. (Standard deviation is shown through error bars.)

Table 1

Moisture content (ω) and solubility in water (S_w) of LCa and HCa composite films equilibrated at 52% RH with different glycerol concentration in the second stage crosslinking solution.

Glycerol solution concentration, %	LCa composite film		HCa composite film	
	ω gH ₂ O/g film	S_w g/g dry matter	ω gH ₂ O/g film	S_w g/g dry matter
1	0.152 (0.003) ^a	0.121 (0.004) ^a	0.134 (0.006) ^a	0.088 (0.003) ^a
3	0.153 (0.003) ^a	0.170 (0.006) ^b	0.140 (0.002) ^a	0.151 (0.007) ^b
5	0.160 (0.008) ^a	0.230 (0.017) ^c	0.141 (0.005) ^a	0.199 (0.007) ^c
7	0.213 (0.007) ^b	0.246 (0.007) ^c	0.162 (0.008) ^a	0.237 (0.010) ^d
10	0.234 (0.008) ^b	0.296 (0.026) ^d	0.224 (0.004) ^b	0.234 (0.020) ^d
12	0.241 (0.004) ^b	0.288 (0.001) ^d	0.254 (0.001) ^b	0.233 (0.001) ^d
15	0.233 (0.001) ^b	0.379 (0.012) ^e	0.299 (0.008) ^f	0.372 (0.011) ^f

Average (standard deviation) of three experimental determinations.

Average with the same letter, in the same column, indicate no significant difference ($p < .05$).

Higher glycerol content unfastens the polymeric structure allowing more charged sites to be accessible to water molecules. More important, glycerol itself is very hygroscopic and therefore, probably responsible for most of the water uptake. The main contribution to the increase in S_w with increasing amount of plasticizer is the leaching of the glycerol, since after 24 h contact with water, the re-dehydrated films lost their flexibility. Schou et al. (2005) also observed a significant increase in the moisture content, with increasing plasticizer concentration in sodium caseinate films. These authors concluded that increasing the glycerol:protein ratio from 0.16 to 0.32 almost doubled the moisture content. The values in Table 1 indicate that LCa films showed higher solubility in water compared to HCa films. This is probably caused by the higher initial crosslinking degree obtained by the alginate and pectin chains when higher concentration of calcium was used in the first stage and the better aligned incipient polymeric structure assisted the strengthening action when additional Ca²⁺ was available at the second stage.

The moisture content and solubility of simple pectin and alginate HCa films treated with 5% and 10% of glycerol in the second stage crosslinking solutions are presented in Table 2. Differently from the composite films the equilibrium moisture content of the simple films did not significantly change with the increase in the glycerol concentration. The solubility in water, however, showed a statistically significant increase for both simple films when the plasticizer solution concentration was increased from 5% to 10%, in the second stage. Pure alginate films showed much lower solubility in water compared to pure pectin films. Because of the strong similarities of the molecular structures of the two polymers, most studies treat pectin and alginate as almost equivalent regarding their calcium binding mechanisms and gel formation abilities. Donati, Benegas, and Paoletti (2006), for example, formulated a common theoretical framework to describe the chain-chain associations of alginate and of pectin with calcium. In contrast, the literature that highlights the dissimilarities in the binding and gelation mechanisms of these two biopolymers is sparse. Brac-

cini and Perez (2001) using molecular modeling pointed out significant differences in the gelation mechanisms and strength of pectin and alginate. In another work, Fang et al. (2008) found important differences between alginate and pectin with regard to their Ca-binding behaviors. These authors suggest that the different distribution patterns of binding sites, blockwise for alginates and randomly for pectin, could account for the differences with regard to their reactivity with Ca²⁺. These structural distinctions could explain the higher solubility of pectin films and also the differences found in thicknesses (Fig. 1).

3.3. Swelling

Composite and simple polymer films were submitted to water uptake and swelling in contact with distilled water at 25 °C and the swelling kinetics obtained are showed in Fig. 2. For pure alginate film the water uptake at equilibrium was the lowest (SD = 0.85) and was reached after about 5 min of immersion in water for all treatments. Similar period of time was reported by Zactiti and Kieckbusch (2006) for alginate films. Pure pectin films showed the highest equilibrium SD, reached after more than 20 min of immersion and the composite films scored intermediate values. Sriamornsak and Kennedy (2008) evaluating the swelling of alginate and pectin films also crosslinked with Ca²⁺ found a hydration equilibrium of 2 h for both polymers. Their gelation and hardening method was different, and they did not use plasticizers. Sriamornsak and Kennedy (2008) also observed much higher swelling degree for pectin films compared to alginate films. These authors explained that a reduction in the extent of crosslinking would be expected to lead to a reduced retractive force and would allow more water to be absorbed. Therefore, the greater swelling of pectin films in water could be due to a lower number of crosslinking sites.

The striking feature of the results in Fig. 2 is the tendency of the swelling degree to decrease with an increase in the glycerol concentration of the crosslinking solution (second stage). This can be better observed by the asymptotic values of SD given in Table 3. The trend of the calculated SD values is misleading, however, since the leaching of higher amounts of plasticizers by the water during the experiments inversely affects the numerator of Eq. (2). The structure weakening effect of higher glycerol content can be better appreciated by observing the decay of the water uptake equilibration time with increasing plasticizer solution concentration. An increase in the calcium concentration used in the first stage seems to slightly decrease the extent of water uptake of the composite films and extends the equilibration time. These findings corroborate with the suggestion that the performance of the final film crosslinking depends on the quality of the pre-film structure.

All composite films kept their integrity even after 36 min of immersion in water and the general visual appearance was similar

Table 2

Moisture content and solubility in water of pure pectin and alginate HCa films with 5% and 10% of glycerol in the second stage crosslinking solution.

Film	Glycerol solution concentration, %	ω gH ₂ O/g film	S_w g/g dry matter
HCa pectin film	5	0.183 (0.003) ^a	0.204 (0.006) ^c
HCa pectin film	10	0.176 (0.002) ^a	0.251 (0.007) ^d
HCa alginate film	5	0.202 (0.004) ^b	0.129 (0.003) ^a
HCa alginate film	10	0.196 (0.002) ^b	0.156 (0.007) ^b

Average (standard deviation) of three experimental determinations.

Average with the same letter, in the same column, indicate no significant difference ($p < .05$).

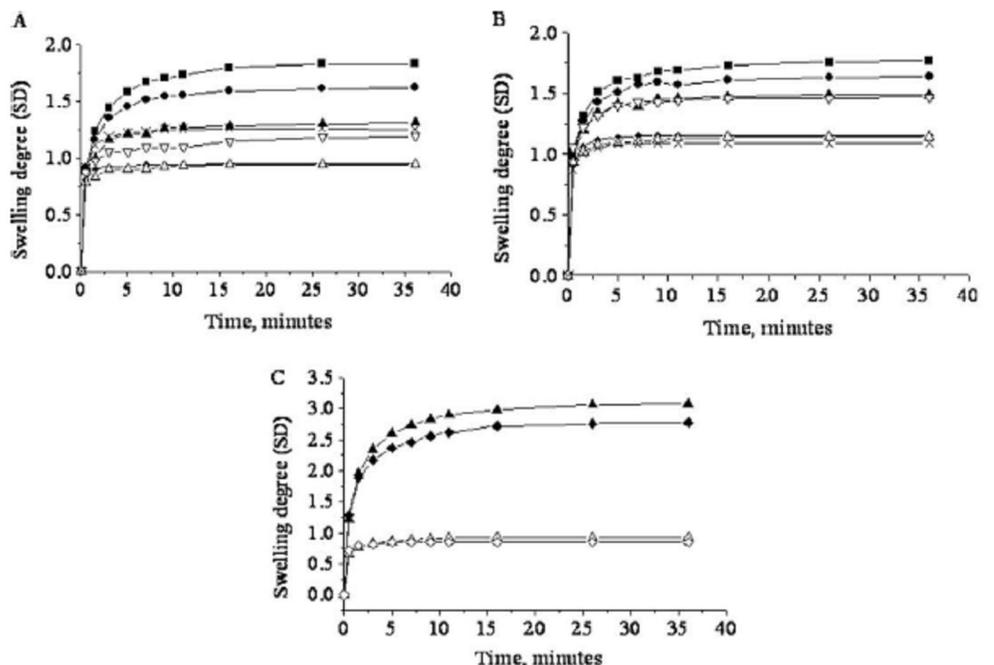


Fig. 2. Swelling degree: (A) *LCa* and (B) *HCa* composite films with 1% (■), 3% (●), 5% (▲), 7% (▽), 10% (◆), 12% (△), (×) 15% of glycerol in the crosslinking solution (second stage); (C) *HCa* simple films: pectin 5% (▲), pectin 10% (◆), alginate 5% (△), alginate 10% (◇) of glycerol in the crosslinking solution (second stage).

to the original film. However an increase in thickness was observed and is also given in Table 3. As can be seen, the thickness ratio increases with higher glycerol concentrations, and, therefore, should be considered a more adequate index to measure the structure relaxation by water.

3.4. Mechanical characteristics

The values of the mechanical properties of *LCa* and *HCa* composite films and of the *HCa* simple alginate and pectin films are given in Figs. 3 and 4. The tensile strength (*TS*) accounts for the film mechanical resistance due to the cohesion between the chains, while the elongation at break (*E*) measures its plasticity, which is the capacity of the film to extend before breaking. Due to the structural nature of these attributes, usually films with high *TS* show low *E* so that both properties should be analyzed simultaneously. Tensile strength values found ranged from 39.7 to 61.5 MPa for *LCa* composite films and from 41.6 to 75.7 MPa for *HCa* composite

films and their variation according to the second stage glycerol solution content are given in Fig. 3. The values of *E* varied from 2.1% to 19.8% for *LCa* composite films and from 1.5% to 12.9% for *HCa* composite films and are shown in Fig. 4. According to the classification established by Krochta and De Mulder-Johnston (1997), the mechanical attributes obtained by the composite alginate and pectin films can be considered as moderate, compared to synthetic films.

TS of the simple alginate film in both concentration of glycerol evaluated (5% and 10%) were significantly higher than the respective pectin film and the composite films. Subsequently, the elongation for those alginate films were low. The remarkably higher *TS* values found for the simple alginate films can only be partially attributed to their denser molecular structure. The alginate films have the smallest thickness (Fig. 1) and according to Cuq, Gontard, Cuq, and Guilbert (1996) the tensile strength of films manufactured with the same formulation increases with the decrease in film thickness. A comparison between the experimental data of Figs. 3 and 4 confirms that variations in the plasticizer concentration exert an appreciable positive effect on film elongation but only a moderate reducing effect on tensile strength.

Figs. 3 and 4 also indicate that an increase in the calcium concentration in the first stage promoted an increase in *TS* and a decrease in *E* for almost all formulations. This *E* values tendency is even more significant than revealed by Fig. 3 since the film thicknesses of *HCa* films are larger *LCa* films, which would tend to depress *TS*.

Similar results were found by other authors. Rhim (2004) observed an increase in the *TS* and a decrease in the *E* by $CaCl_2$ treatment of alginate films, though the degree of change was dependent on the contact method and concentration of $CaCl_2$ treatment. Kang, Job, Leeb, Kwona, and Byunb (2005), studying pectin films, found a *TS* of 193 MPa and a *E* of 2.6% for pectin films containing glycerol (2.5% v/v) and crosslinked by total immersion of the films with a 5% $CaCl_2$ solution. Pavlath et al. (1999) obtained higher values of

Table 3
Equilibrium swelling degree and thickness ration of pure pectin, pure alginate and composite *HCa* films with 5% and 10% of glycerol in the second stage crosslinking solution.

Film	Glycerol solution concentration, %	SD _{eq}	δ_f / δ_i^*
<i>HCa</i> pectin film	5	3.08 (0.13) ^f	2.69 (0.11) ^{b,c}
<i>HCa</i> pectin film	10	2.77 (0.10) ^e	3.15 (0.08) ^d
<i>HCa</i> alginate film	5	0.92 (0.01) ^b	1.98 (0.04) ^a
<i>HCa</i> alginate film	10	0.85 (0.10) ^a	2.84 (0.12) ^c
<i>HCa</i> composite film	5	1.49 (0.08) ^d	2.44 (0.06) ^b
<i>HCa</i> composite film	10	1.15 (0.06) ^c	3.08 (0.07) ^d

Average (standard deviation) of three experimental determinations.
Average with the same letter, in the same column, indicate no significant difference ($p < 0.05$).
* Thickness variation: δ_f (final equilibrium thickness), δ_i (initial thickness).

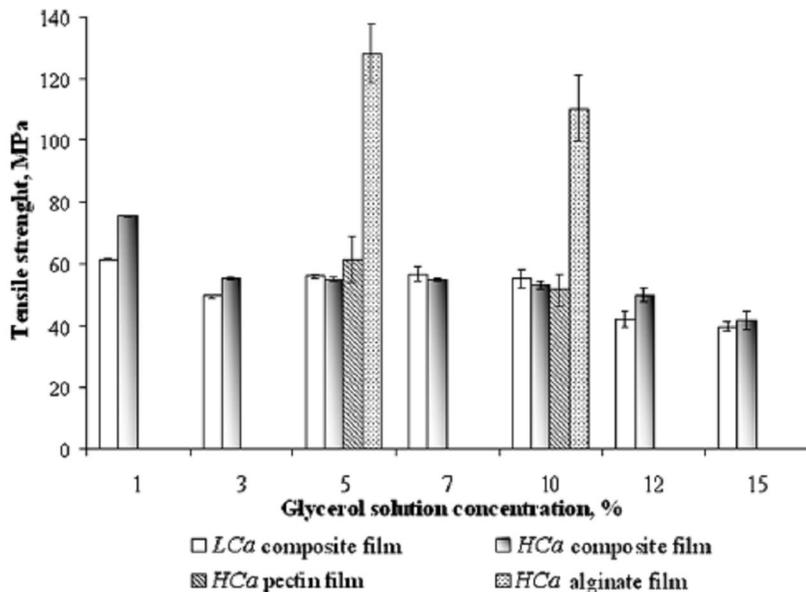


Fig. 3. Tensile strength of LCa and HCa composite films and of the HCa pectin and alginate simple films with different glycerol concentration in the crosslinking solution (second stage). (n = 10; standard deviation is shown through error bars.)

TS for alginate films crosslinked with CaCl₂ without plasticizers compared to the same film with addition of 40% (w/w) of glycerol, but the increase in the E values was not so pronounced.

3.5. Calcium content

The calcium content of HCa composite films, HCa alginate films and HCa pectin films containing 5% and 10% (w/v) of glycerol in the crosslinking solution of the second stage is presented in Table 4. As expected higher calcium contents, on dry basis, were observed for HCa alginate films, followed by HCa composite films and HCa pectin films. The concentration of glycerol used in the second stage

crosslinking solution did not significantly influence the calcium content. These results correlate well with the tendency found for water uptake, solubility in water and mechanical properties of the corresponding films, reinforcing the assumption that a more effective crosslinking is obtained by alginate polymeric matrix compared to pectin.

Sriamornsak and Kennedy (2008) also found less calcium in pectin based films compared to alginate films. However their values of calcium content are approximately two times lower than the amount determined in the present work for the same type of alginate and pectin. The higher calcium contents can be attributed to the different crosslinking method used.

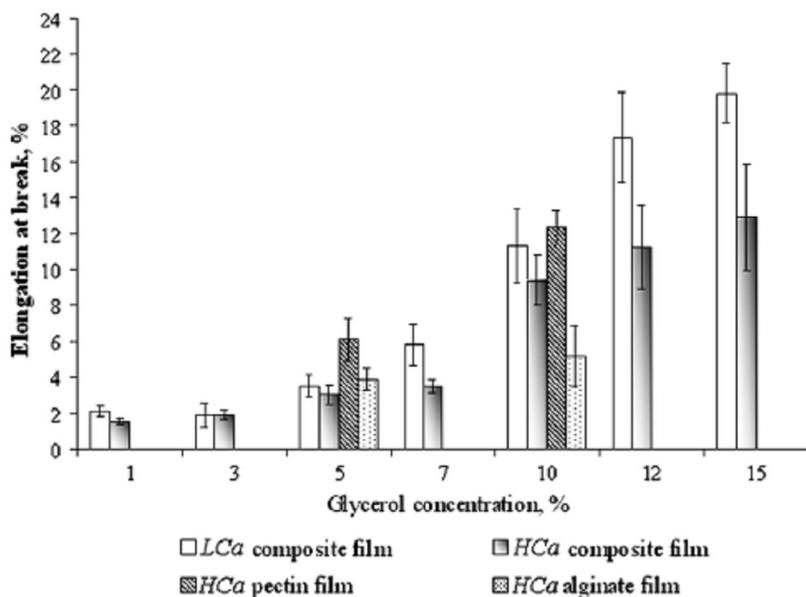


Fig. 4. Elongation at break of LCa and HCa composite films and of the HCa pectin and alginate simple films with different glycerol concentration in the crosslinking solution (second stage). (n = 10; standard deviation is shown through error bars; n = 8 for LCa composite film with 7% and 10% glycerol.)

Table 4

Calcium content of pure pectin, pure alginate and composite HCa films with 5% and 10% of glycerol in the second stage crosslinking solution.

Film	Glycerol solution concentration, %	Calcium content, $\mu\text{mol}/\text{mg}$ dry film
HCa pectin film	5	2.251 (0.003) ^a
HCa pectin film	10	2.539 (0.022) ^a
HCa alginate film	5	4.354 (0.017) ^c
HCa alginate film	10	4.265 (0.005) ^c
HCa composite film	5	3.291 (0.025) ^b
HCa composite film	10	3.529 (0.012) ^b

Average (standard deviation) of three experimental determinations.

Average with the same letter, in the same column, indicate no significant difference ($p < .05$).

4. Conclusions

Transparent and homogenous alginate/pectin films were obtained after a low Ca^{2+} reticulated pre-film manufactured by casting was exposed for 30 min to 3% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solutions containing glycerol.

The increase in glycerol concentration in the finishing crosslinking solution decreases the tensile strength (TS) of the alginate and pectin composite films, and increases the solubility in water, moisture content and their elongation at break. Alginate and pectin simple films, despite using the same crosslinking procedure showed different calcium content, indicating a less effective crosslinking for pectin films. Composite films tend to present characteristics properties values compared to films based on pure polymeric components.

As a compromise between film mechanical resistance and flexibility, keeping low solubility and swelling in water, the use of 5–10% glycerol in the finishing crosslinking step is recommended. Concentrations lower than 3% glycerol produce brittle films and phase separation was observed on the film surface when concentrations higher than 12% glycerol were used.

Acknowledgments

The authors acknowledge The State of São Paulo Research Foundation – FAPESP for financial support (Proc. 2005/55499-3 and Proc. 2008/52830-9).

References

Allen, L., Nelson, A. I., Steinberg, M. P., & McGill, J. N. (1963). Edible corn-carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch-alginate coating. *Food Technology*, 17, 1437.

- ASTM. (1995) Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-02. In *Annual book of ASTM standards*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Braccini, I., & Perez, S. (2001). Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: The egg box model revisited. *Biomacromolecules*, 2, 1089–1096.
- Bryce, T. A., McKinnon, A. A., Morris, E. R., Rees, D. A., & Thom, D. (1974). Chain conformations in the sol-gel transitions for polysaccharide systems, and their characterization by spectroscopic methods. *Faraday Discussions Chemical Society*, 57, 221–229.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1996). Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, 61(3), 580–584.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science*, 38(4), 299–313.
- Donati, I., Benegas, J. C., & Paoletti, S. (2006). Polyelectrolyte study of the calcium-induced chain association of pectate. *Biomacromolecules*, 7, 3429–3447.
- Ertesvåg, H., & Valla, S. (1998). Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 85–91.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K., Funami, T., & Williams, P. A. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 334–341.
- Garcia, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymer*, 56, 339–345.
- Guilbert, S., Gontard, N., & Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 10–17.
- Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B., & Gontard, N. (2001). New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, 37, 1533–1541.
- Kang, H. J., Job, C., Leeb, N. Y., Kwona, J. H., & Byunb, M. W. (2005). A combination of gamma irradiation and CaCl_2 immersion for a pectin-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymer*, 60, 547–551.
- Kim, K. W., Ko, C. J., & Park, H. J. (2002). Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *Journal of Food Science*, 67, 218–222.
- Krochta, J. M., & De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2), 61–74.
- Marudova, M., MacDougall, A. J., & Ring, S. G. (2004). Pectin-chitosan interactions and gel formation. *Carbohydrate Research*, 339, 1933–1939.
- Pavlath, A. E., Gossett, C., Camirand, W., & Robertson, G. H. (1999). Ionomeric films of alginic acid. *Journal of Food Science*, 64, 61–63.
- Rhim, J.-W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37, 323–330.
- Schou, M., Longares, A., Montesinos-Herrero, C., Monahan, F. J., O'Riordan, D., & O'Sullivan, M. (2005). Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *Food Science Technology*, 38(6), 605–610.
- Sriamornsak, P., & Kennedy, R. A. (2008). Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, 358, 205–213.
- Walkenström, P., Kidman, S., Hermansson, A. M., Rasmussen, P. B., & Hoegh, L. (2003). Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17, 593–603.
- Xu, J. B., Bartley, J. P., & Johnson, R. A. (2003). Preparation and characterization of alginate-chitosan hydrogel films crosslinked using a water soluble carbodiimide (WSC). *Journal of Membrane Science*, 218, 131–146.
- Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33, 563–570.
- Zactiti, E. M., & Kieckbusch, T. G. (2006). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 462–467.

ANEXO 2



Brazil, August 31 to September 4, 2008

MULTILAYER FILMS OF SODIUM ALGINATE AND CHITOSAN

MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA¹, THEO GUENTER KIECKBUSCH²

¹ Graduate student, PhD program, FEQ/UNICAMP/Campinas – Brazil. e-mail: mariana@feq.unicamp.br

² Researcher, PhD, FEQ/UNICAMP/Campinas – Brazil. e-mail: theo@feq.unicamp.br

Presented at

CIGR INTERNATIONAL CONFERENCE OF AGRICULTURAL ENGINEERING
XXXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA – CONBEA 2008
Brazil, August 31 to September 4, 2008

ABSTRACT: Alginate and chitosan multilayer films were produced by casting and sequential layering. The films were assembled by three different adjacent layers: an alginate layer, a central chitosan layer and another alginate layer. Initially, an alginate layer was confectioned from an alginate aqueous solution (1.5g/100g solvent) containing 0.06 g CaCl₂/100mL. The chitosan layer was formed by a chitosan solution (1.5g/100g solvent), containing 1% acetic acid, poured over the alginate film, and another alginate layer was then casted over the chitosan free surface. Each layer was obtained following the same drying procedure (40°C/12h). The resulting multilayer films underwent a final crosslinking by immersion in 50mL of a calcium chloride solution (3%) containing glycerol (5%). The water solubility and swelling degree of the films were determined. The morphology of the films was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The water solubility varied from 0.11 to 0.15 g/g dry matter and the swelling degree was about 0.80. The film surface was smooth with characteristics similar to pure alginate films while the cross-section showed the formation of three well defined layers.

KEYWORDS: alginate, chitosan, crosslinking, films, multilayer

INTRODUCTION:

In recent years release systems were incorporated to biofilms and became part of a wide category of new food packaging concept known as “active packaging materials”. The aim of these systems is to extend the shelf life of the packaged foodstuff, inhibiting the microbial growth and preserving its sensory properties. In order to achieve a controlled release of active compound to the food surface, the use of a multilayer film (control layer/active matrix layer/barrier layer) was proposed by HAN (2000) and by FLOROS *et al.* (2000). The outer layer is a barrier layer which prevents loss of active substances to the environment, the matrix layer contains active substance and exhibit a very fast diffusion behavior.

Alginate is a structural polysaccharide extracted from brown algae. On a molecular basis alginate is composed of guluronic (G) and mannuronic (M) acid units forming regions of M-blocks, G-blocks and blocks of alternating sequence (MG-blocks) (ERTESVÁG & VALLA, 1998). Upon introduction of divalent ions such as Ca⁺⁺, junction zones between consecutive G-residues are formed, conventionally described in terms of the egg-box model (BRYCE *et al.*, 1974).

Chitosan [(1-4)-2-amino-2-deoxy-, -D-glucan], a linear cationic polysaccharide obtained by deacetylation of chitin, is one of the most abundant naturally occurring polysaccharides after cellulose. Chitosan is mainly extracted from outer skeletons of crustaceans, and is also found in many other species such as molluscs, insects and fungi. There are several potential applications for chitosan, mainly because of its biodegradability and biocompatibility, polyelectrolytic behavior and antimicrobial activity (KROCHTA & DE MULDER JOHNSTON, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2003, WANG *et al.*, 2007).



Brazil, August 31 to September 4, 2008

The objective of the present work was to characterize alginate and chitosan multilayer films with different proportion of biopolymers aiming a possible application as an antimicrobial packaging for food products.

METHODOLOGY:

Materials

Medium viscosity sodium alginate (Sigma Aldrich, USA); chitosan (Polymar, Ceará, Brazil) with deacetylation degree 97% and average molar mass $\overline{M}_v = 3.7 \times 10^5$ g/mol, determined by the intrinsic viscosity using Mark-Houwink-Sakurada Equation; glacial acetic acid (Merck, Germany); dihydrated calcium chloride (Merck, Germany) as crosslinking agent and glycerol (Synth, Brazil) as plasticizer.

Film preparation

Alginate (6g) was added to mechanically stirred (1000 rpm) water (400mL) containing 0.6 g/g alginate of glycerol. After 1h, the viscous solution was heated to 77°C. Then, 30mL of an aqueous calcium chloride solution (0.8 g/100mL) was added to the alginate solution at a flow rate of 1mL/min controlled through a peristaltic pump (Masterflex C/L, model 77120-70, USA). Separately, chitosan (6g) was added to mechanically stirred (1000 rpm) water with 1% acetic acid (400mL) containing 0.6 g/g alginate of glycerol. After 1h, the viscous solution was vacuum filtered to remove undissolved material. Multilayer films were formed by pouring a certain amount of alginate solution into a polystyrene petridish (d=14cm). This solution was dried in a convection oven at 40°C for 12h. Thereafter, a second layer of chitosan solution was deposited over the alginate dried layer. The chitosan solution was then dried in the same conditions for another 12 hours. A third layer composed of alginate solution was formed following the same drying procedure. After detaching the resulting multilayered films from the support, a final crosslinking stage, called second stage, was performed by total immersion of the films in 50mL of an aqueous calcium chloride solution (3%) containing glycerol (5%) for 30 min. The excess liquid was removed and the films were dried for about 6h, at room temperature, onto a petridish with the borders fixed by Teflon rings to avoid shrinking of the edges. All films were conditioned at room temperature and 52% relative humidity for 2 days before characterization. Three different architectures were confectioned and the amount of solution used to form each layer of these films is showed in Table 1.

Table 1 – Amount of alginate and chitosan solution used in each layer of the films

Film	1 st layer	2 nd layer	3 rd layer
	V _{alginate} (mL)	V _{chitosan} (mL)	V _{alginate} (mL)
A	30	30	30
B	30	50	30
C	50	30	50

Solubility in water

The solubility in water of the films was measured as proposed by IRISSIN-MANGATA *et al.* (2001). The moisture content, ω , of the film was gravimetrically determined in a vacuum oven at 105°C for 24 h (Lab-Line, Squaroid, USA).

Disks, of the same film, with a total mass m_o were then immersed in 50 mL of distilled water and the system was maintained under constant stirring (175 rpm) at 25°C for 24h (Shaker Bath Orbit, Lab-Line, USA). The final dry matter (m_f) of the sample was determined in the same vacuum oven (105°C/24h). The solubilized matter (MS) was calculated as a function of the initial dry matter by Equation (1).

$$MS = \frac{m_o(1 - \omega) - m_f}{m_o(1 - \omega)} \quad (1)$$



Brazil, August 31 to September 4, 2008

Swelling degree (SD)

The swelling degree of the films was determined as described by XU *et al.* (2003). The initial mass (m_i) of a circular sample ($d = 2.5$ cm) was quantified and the sample was immersed in 100 mL of stirred distilled water for different periods of time. The wet sample was blotted between filter paper to remove the excess water from the surface and reweighed. The swelling degree (SD) was measured in terms of the amount of absorbed water (Equation 2).

$$SD = \frac{(m_u - m_i)}{m_i} \quad (2)$$

where m_u is the swollen film mass (g)

Morphology characterization

The surface and cross-section morphology of the multilayer films were observed by scanning electron microscopy (SEM). Samples of films were mounted onto stubs, sputter coated with gold in a vacuum chamber and photographed using a scanning electron microscope (LEICA, model DMLM Q500IW, USA).

Statistical Analysis

Analysis of Variance and Tukey Test were used to determine statistically significant difference ($p < 0.05$) among averages, using the software *Software Statistica* V.1.1.5.

RESULTS AND DISCUSSION:

Alginate and chitosan multilayer films were produced by varying the volume of solution used in each layer. The moisture content, the solubility in water and swelling degree of these films are shown in Table 2.

Table 2: Moisture content, solubility in water and swelling degree of alginate and chitosan multilayer films

Film	Moisture content (ω , g H ₂ O/g film)	Solubility in water (SM)	Swelling degree (SD)
A	0.171 (0.004) ^a	0.115 (0.006) ^a	0.79 (0.03) ^a
B	0.171 (0.002) ^a	0.129 (0.005) ^{a,b}	0.78 (0.01) ^a
C	0.170 (0.001) ^a	0.152 (0.020) ^b	0.81 (0.04) ^a

Average (standard deviation) of three experimental determinations

Average with the same letter indicate no significant difference ($p < 0.05$)

The equilibrium moisture contents at 52% RH were not significantly different for all the studied films. The water solubility varied from 0.11 to 0.15 g/g dry matter. These values are close to the ones found for pure alginate films (RHIM, 2004). This indicates an efficient crosslinking of alginate chains by Ca⁺⁺ ions during the second stage.

The SEM micrographs of the surface and cross-section of the multilayer films are shown in Figure 1. Uniform formation of the three layers can be observed (Figure 1 a, b and c). The film surface (Figure 1 d and e) was smooth similar to pure alginate films. When the films were kept in a closed chamber over anhydrous calcium chloride (close to 0% RH), during sample preparation for morphology observations, it was possible to detect the detachment of the film layers. This fact could restrict the uses of these multilayer films. However, at normal ambient conditions (approximately 25°C and 50% RH) this was not observed.

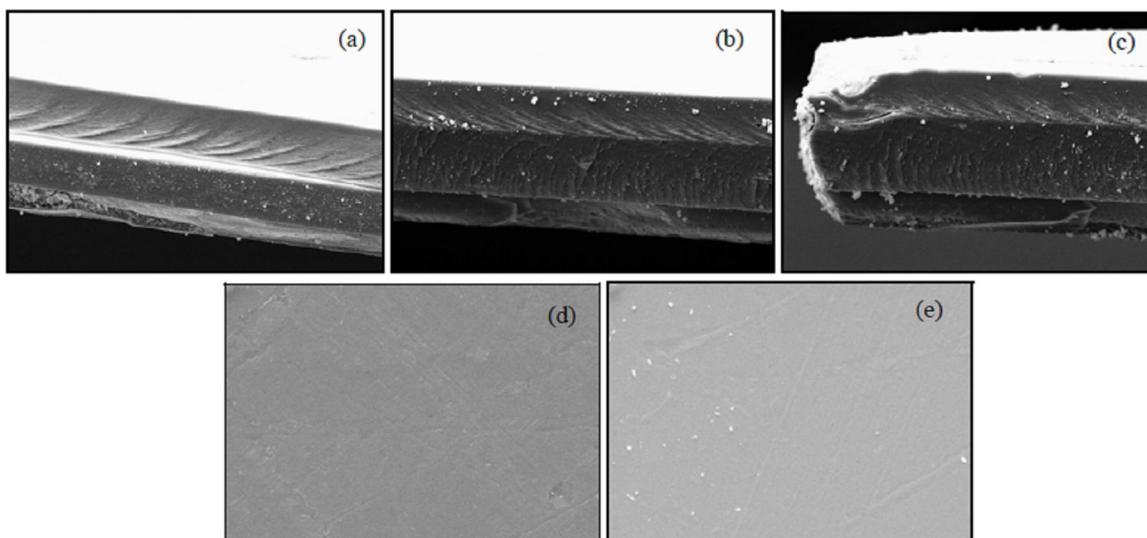


Figure 1: SEM micrographs of multilayer film cross-section: (a) Film A, (b) Film B, (c) Film B (edge detail); and surface: (d) Film A, (e) Film B.

ACKNOWLEDGMENT:

The authors thank The State of São Paulo Research Foundation – FAPESP for financial support (Proc. N°. 2005/55499-3).

REFERENCES:

- 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*, vol. 57, p. 221-229, 1974.
- DOS SANTOS Jr., D.S., BASSI, A., RODRIGUES Jr., J.J., MISOGUTI, L., OLIVEIRA Jr., O.N., MENDONÇA, C.R. Light-Induced Storage in Layer-by-Layer Films of Chitosan and an Azo Dye. *Biomacromolecules*, vol. 4, p. 1502-150, 2003.
- ERTESVÁG, H., VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, p. 85-91, 1998.
- FLORES, J., NIELSEN, P., FARKAS, J. Advances in modified atmosphere and active packaging with applications in the dairy industries. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 346, 22– 28.
- HAN, J. H. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, vol. 54, p. 56 – 65, 2000.
- IRISSIN-MANGATA, J., BAUDUIN, G., BOUTEVIN, B., GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, vol. 37, p. 1533-1541, 2001.
- KROCHTA, J.M., DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, vol. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.
- RHIM, J-W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, vol. 37, p. 323-330, 2004.
- WANG, X., DU, Y., LUO, J., LIN, B., KENNEDY, J.F. Chitosan/organic rectorite nanocomposite films: Structure, characteristic and drug delivery behaviour. *Carbohydrate Polymers*, vol. 69, n. 1, p. 41- 49, 2007.
- 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*, vol. 218, p. 131-146, 2003.