



# CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE PECTINA RETICULADOS COM ÍONS CÁLCIO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PLASTIFICANTE

Andréa C. K. Bierhalz<sup>1</sup>, Theo G. Kieckbusch<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas – SP-  
theo@feq.unicamp.br

O desenvolvimento e a caracterização de biofilmes têm sido investigados devido à possibilidade de aplicação como embalagem para alimentos, representando uma alternativa aos filmes poliméricos não biodegradáveis. No presente trabalho foram avaliados os efeitos da concentração do plastificante (glicerol, 1-7% p/v) no conteúdo de umidade, solubilidade em água, propriedades mecânicas, grau de intumescimento e permeabilidade ao vapor de água em filmes de pectina BTM reticulados com íons cálcio. Os resultados indicaram que aumentando a concentração de glicerol na solução reticuladora ocorre o aumento no conteúdo de umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água e flexibilidade, porém diminui a tensão de ruptura e o grau de intumescimento. Filmes de pectina transparentes e com propriedades funcionais aceitáveis foram obtidos com 3% de glicerol na solução reticuladora.

**Palavras-chave:** *biofilmes, pectina, reticulação, plastificante.*

*Characterization of pectin composite films crosslinked with calcium ions: Effect of the plasticizer concentration.*

The development and characterization of edible films have been studied due to its potential for use as food packaging, representing an alternative to non-biodegradable polymeric films. The present work evaluated the effects of plasticizer (glycerol) concentration (1-7% w/v) on the moisture content, water solubility, mechanical properties, degree of swelling and water vapor permeability of LMD -pectin films crosslinked with calcium ions. Increasing the glycerol concentration of the crosslinking solution increased film solubility in water, moisture content, water vapor permeability and flexibility, but decreased the tensile strength and the degree of swelling. Transparent pectin films, with acceptable functional properties were obtained with 3% glycerol in the crosslinking solution.

**Keywords:** *biofilms, pectin, crosslinking, plasticizer.*

## Introdução

A crescente preocupação com as questões ambientais, sobretudo com o acúmulo de lixo e o uso irracional de recursos não renováveis, vem impulsionando nos últimos anos o desenvolvimento de novas tecnologias como a de filmes biodegradáveis. Esses materiais são produzidos a partir de polímeros naturais como polissacarídeos, proteínas e lipídeos e apresentam uma alternativa viável para a redução do emprego de embalagens sintéticas tradicionais [1].

Em sistemas alimentícios, os biofilmes podem atuar no controle da migração de água, da permeabilidade a gases, da migração lipídica e ainda, podem conter aditivos alimentícios como antioxidantes e antimicrobianos, os quais visam retardar a taxa de deterioração e prolongar a vida de prateleira [2,3].

Por serem utilizados tanto como embalagens como componentes do alimento, os filmes devem permanecer estáveis e manter suas propriedades funcionais durante o tempo de uso desejado. Também devem cumprir alguns requisitos específicos, como boas propriedades de barreira (baixas permeabilidades ao vapor de água, ao O<sub>2</sub> e ao CO<sub>2</sub>), eficiência mecânica (resistência e

flexibilidade), propriedades ópticas e sensoriais adequadas, além de possuir baixo custo de matéria-prima e de fabricação [1]. As características e as propriedades funcionais do filme são influenciadas por uma série de fatores, como o tipo de biopolímero, método e condições empregadas durante a confecção (pH, concentração, temperatura) e também pelo tipo e concentração de aditivos (plastificante, reticulante) [4,5].

Um polímero natural com grande potencial formador de filme é a pectina. As pectinas são polissacarídeos aniônicos solúveis em água encontrados na parede celular primária de diversas espécies de vegetais. Suas principais fontes para extração comercial são as cascas de frutas cítricas e o bagaço seco da maçã [6]. Quimicamente, apresenta-se como um polissacarídeo complexo composto de unidades repetidas do ácido D-galacturônico, unidos por ligações  $\alpha$ -(1-4) cujos grupos carboxílicos podem estar parcialmente esterificados por metoxilas. As cadeias de resíduos galacturonato são, porém, interrompidas por unidades de L-ramnose, às quais estão ligadas cadeias laterais, formadas por açúcares neutros. Quanto ao teor de metoxilação (TM), as pectinas são classificadas em pectinas de alto teor de metoxilação (ATM) (TM>50%) e baixo teor de metoxilação (BTM) (TM<50%), que pode também possuir grupos amida [7]. Nas pectinas BTM, cátions divalentes como o cálcio, formam associações do tipo cadeia-cadeia, que resultam em filmes fortes e insolúveis, superando a baixa resistência à água dos filmes hidrofílicos.

A formação de um filme polimérico envolve forças coesivas que podem resultar em filmes muito quebradiços. No entanto, esta limitação pode ser superada através da adição de um plastificante à formulação de forma a diminuir as forças intermoleculares, aumentando a mobilidade das cadeias e melhorando a flexibilidade e o alongamento do filme. Isto evita quebra e enrugamento do filme durante o manuseio e armazenamento, o que poderia prejudicar suas propriedades de barreira. Por outro lado, plastificantes geralmente tendem a aumentar a permeabilidade à gases, à solutos e ao vapor de água dos filmes e podem também diminuir a sua coesividade [8].

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do aumento da concentração do plastificante (glicerol) na solubilidade em água, grau de intumescimento, permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas de biofilmes a base de pectina de baixo teor de metoxilação reticulados por íons cálcio.

## Experimental

### *Materiais*

Para a confecção dos filmes foram utilizados pectina cítrica de baixo grau de metoxilação, amidada do tipo GENU LM-101 (BTM) (Cpkelco, Dinamarca), cloreto de cálcio dihidratado como agente reticulante (Merck, Alemanha), e glicerol como plastificante (Synth, Brasil).

### *Confecção dos filmes*

Os filmes a base de pectina BTM foram obtidos segundo a técnica de *casting*, que consiste na preparação da solução filmogênica e aplicação da mesma em um molde. A reticulação dos filmes foi realizada em um processo envolvendo dois estágios.

No primeiro estágio, glicerol na quantidade de 3,6 g foi solubilizado em 400 mL de água destilada por 15 minutos com agitação mecânica de 900 rpm. Em seguida, adicionou-se 6 g de biopolímero, mantendo-se a agitação por 1 hora para completa dissolução. A solução foi aquecida a 70°C e mantida a essa temperatura por uma manta aquecedora (Fisaton, modelo 67, Brasil) e pré-reticulada com a adição de 30 mL de solução de 1% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a uma vazão de 1 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo 77120-70, EUA). A solução pré-reticulada ainda quente foi então transferida em alíquotas de 50 g para placas de polipropileno (15 cm x 15 cm x 1 cm) totalizando uma carga de solução de  $0,18 \text{ cm}^3/\text{cm}^2$ . Estes filmes foram mantidos em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 099EV, Brasil) a 40°C durante um período de 20 horas. Após este período os filmes foram retirados dos suportes e armazenados durante 48 horas em ambiente a 25°C e 52% de umidade relativa.

No segundo estágio, os filmes obtidos na primeira etapa foram imersos em 50 mL de solução 5% de cloreto de cálcio com glicerol (1, 3, 5 e 7%) durante 20 minutos. Os filmes foram colocados em suportes e secos em um túnel com recirculação de ar a temperatura ambiente. Os filmes foram então acondicionados em dessecador à temperatura ambiente e umidade relativa de 52% durante 3 dias, antes da realização dos ensaios de caracterização.

### *Espessura dos filmes*

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

### *Solubilidade em água (MS)*

A solubilidade em água dos filmes foi determinada em triplicata segundo método proposto por Irissin-Mangata *et al.* [9]. Inicialmente, o conteúdo de umidade ( $\omega$ ) de uma amostra de filme foi determinada por gravimetria em uma estufa a vácuo (Lab-Line, Squaroid, USA) a 105°C por 24 horas. Outra amostra do mesmo filme com massa  $m_0$  foi então imersa em 50 mL de água destilada e o sistema mantido sob agitação lenta e periódica (175 rpm) à 25 °C por 24 h, utilizando-se um banho agitado (*Shaker Bath Orbit*, Lab-Line, EUA). Esse segundo filme foi seco em estufa a vácuo para determinação da massa não solubilizada ( $m_f$ ). A matéria solubilizada (*MS*) foi expressa em função da massa seca inicial conforme a Equação (1).

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

### *Permeabilidade ao vapor de água (PVA)*

A PVA foi determinada gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método E95-96 da ASTM [10] utilizando uma célula de acrílico com um volume interno de 30mL e que dispõe de uma tampa rosqueável com abertura central de 46,24 cm<sup>2</sup> na qual o filme é fixado. Cloreto de cálcio granulado (Ecibra, Brasil) foi utilizado para preencher o fundo da célula que foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado. O fundo desse recipiente continha uma solução saturada de NaCl (Synth, Brasil) para manter o ambiente a 75% UR. A partir da variação da massa da célula, medido em intervalos periódicos, foi possível determinar a taxa de água que permeou pelo filme, expressa em gmm/m<sup>2</sup>.dia.kPa.

### *Grau de intumescimento (GI)*

O GI foi determinado segundo a metodologia proposta por Xu *et al.* [11]. A massa inicial de uma amostra de filme de 2,5 cm de diâmetro foi quantificada e imersa em 100 mL água destilada por 20 minutos. O filme foi cuidadosamente enxugado entre papéis de filtro antes de cada pesagem para a remoção do excesso de água. O grau de intumescimento (GI) foi calculado em função da massa total inicial da amostra. Também foi determinado o aumento da espessura dos através da razão entre a média das medidas de espessura final ( $\delta_f$ ) e inicial ( $\delta_i$ ). A análise foi realizada triplicata.

### *Propriedades mecânicas*

As análises de tensão na ruptura e alongamento na ruptura foram realizadas com o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System SMD, Inglaterra), seguindo o método padrão D-882 da ASTM [12], com separação inicial das garras de 50 cm e com velocidade de 1cm/s. No mínimo dez

amostras de filmes com dimensões de 10 x 2,5 cm, tiveram a espessura pré-determinada pela média aritmética de cinco medidas em pontos aleatórios nos filmes. Um microcomputador foi utilizado para registrar as curvas de tensão-deformação. A tensão de ruptura do filme foi calculada dividindo a força máxima no rompimento pela área da seção transversal (espessura x comprimento). O alongamento na ruptura foi determinado dividindo a distância final da separação das garras pela distância inicial da separação e multiplicada por 100.

#### *Análises estatísticas*

As análises de variância foram realizadas utilizando o *Software Statistica V.1.1.5* e as diferenças significativas entre as médias foram identificadas através do Teste de Turkey ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados e Discussão**

Todas as formulações resultaram em filmes com boa aparência, transparentes, homogêneos, sem zonas de opacidade e de fácil desprendimento dos moldes. Observou-se que os filmes elaborados com maior concentração de glicerol ( $> 3\%$ ) apresentaram maior maleabilidade e, portanto, maior facilidade de manuseio do que os filmes de baixa concentração.

Os resultados para a espessura, umidade, solubilidade em água dos filmes de pectina confeccionados com diferentes concentrações de glicerol estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Propriedades de filmes de pectina reticulados por imersão de 20 minutos em solução contendo 5% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e diferentes concentrações de glicerol.

<b>Concentração de glicerol</b> (%)	<b>Espessura</b> (mm)	<b>Umidade</b> (%)	<b>Solubilidade</b> (%)
1	0,027 (0,0025) <sup>a</sup>	22,91 (0,022) <sup>a</sup>	29,41 (0,024) <sup>a</sup>
3	0,031 (0,0045) <sup>a</sup>	15,36 (0,0037) <sup>b</sup>	30,68 (0,036) <sup>a</sup>
5	0,034 (0,0018) <sup>a</sup>	21,55 (0,018) <sup>a</sup>	34,74 (0,012) <sup>b</sup>
7	0,035 (0,0033) <sup>a</sup>	28,42 (0,044) <sup>c</sup>	45,96 (0,045) <sup>c</sup>

Média e desvio padrão das repetições.

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

Observa-se que as variações nas concentrações de glicerol não promoveram diferenças significativas nas espessuras dos filmes. A uniformidade da espessura é importante, pois funciona como base de cálculo de várias propriedades funcionais dos filmes e é fundamental para a análise da repetibilidade. O conteúdo de umidade e a solubilidade dos filmes aumentaram significativamente, principalmente ao aumentar a concentração de glicerol de 5 para 7%. O plastificante pode ser o responsável pelos altos valores de solubilidade obtidos, pois além de diminuir as forças coesivas afastando as cadeias poliméricas, é muito higroscópico e altamente solúvel em água.

Esta tendência do aumento do conteúdo de umidade com o aumento da concentração de glicerol, também foi verificada em filmes de caseinato de sódio, onde os autores constataram que com o aumento da relação entre glicerol:proteína de 0,16 para 0,32, o conteúdo de umidade tinha o seu valor praticamente duplicado [13]. Em filmes compostos de alginato e pectina na proporção 1:1, a solubilidade em água aumentou significativamente com a concentração do plastificante. A mudança de nível de 5 para 7% de glicerol elevou a solubilidade de 20 para 24%, e a presença de 15% de plastificante resultou em filmes com 37% de solubilidade [14]. Kang *et al.* [15] obtiveram uma solubilidade de 59,82% para filmes de pectina contendo glicerol (2,5%) reticulados por imersão em solução de CaCl<sub>2</sub> (5%).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos para as propriedades mecânicas dos filmes.

**Tabela 2** – Propriedades mecânicas de filmes de pectina reticulados por imersão de 20 minutos em solução contendo 5% de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e diferentes concentrações de glicerol.

<b>Concentração de glicerol</b> (%)	<b>Tensão de ruptura</b> (%)	<b>Alongamento</b> (%)
1	44,77 (2,72) <sup>b</sup>	4,36 (0,94) <sup>b</sup>
3	70,79 (7,04) <sup>d</sup>	4,86 (0,59) <sup>b</sup>
5	48,35 (5,15) <sup>b</sup>	6,02 (1,25) <sup>c</sup>
7	20,45 (0,58) <sup>a</sup>	14,14 (1,51) <sup>a</sup>

Média e desvio padrão das repetições.

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

A elasticidade melhorou significativamente com o aumento dos níveis de glicerol e foi observada uma relação inversa entre a tensão de ruptura e o alongamento, pois os filmes contendo 7% de glicerol apresentaram a maior elasticidade e também, a menor tensão de ruptura. Este comportamento é comum, pois a incorporação do plastificante modifica a organização tridimensional das cadeias com o intuito de melhorar a mobilidade das moléculas. Entretanto, há a redução das forças coesivas fazendo com que os filmes mais elásticos sejam menos resistentes [8].

Para a mesma concentração de cálcio utilizada neste trabalho, porém com 2,5% de glicerol, Kang *et al.* [15] obtiveram filmes de pectina com tensão de ruptura de 193 MPa e alongamento de 2,6%. Da Silva *et al.* [14] confeccionaram filmes de pectina reticulados com 3% de cálcio e 5% de glicerol na solução reticuladora e estes apresentaram tensão de ruptura em torno de 60 MPa e alongamento de 6%.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados para o grau de intumescimento (GI), a relação entre as espessuras final e inicial após o intumescimento ( $\delta_f / \delta_i$ ) e a permeabilidade ao vapor de água (PVA).

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

A natureza hidrofílica da pectina faz com esta presente, geralmente, altos valores para o grau de intumescimento. Filmes de pectina BTM reticulados de forma diferente por Sriamornsak e Kennedy [16] apresentaram um GI em água de aproximadamente 4,0. Filmes de pectina reticulados com a mesma concentração de glicerol (5%), porém com menor quantidade de cálcio (3%) apresentaram GI de 3, indicando que um maior grau de reticulação forma uma rede tridimensional efetiva que dificulta a difusão das moléculas do solvente através do filme [15].

**Tabela 3** – Grau de intumescimento (GI) e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes de pectina reticulados por imersão de 20 minutos em solução contendo 5% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e diferentes concentrações de glicerol.

Concentração de glicerol (%)	GI	$\delta_f / \delta_i$	PVA (g.mm/m <sup>2</sup> .d.KPa)
1	2,62 (0,23) <sup>a</sup>	3,44 (0,086) <sup>b</sup>	4,23 (0,42) <sup>a</sup>
3	2,70 (0,17) <sup>a</sup>	4,06 (0,41) <sup>c</sup>	4,38 (0,34) <sup>a</sup>
5	1,91 (0,37) <sup>b</sup>	3,84 (0,40) <sup>b</sup>	5,05 (0,26) <sup>b</sup>
7	1,64 (0,21) <sup>b</sup>	2,19 (0,19) <sup>a</sup>	8,99 (0,36) <sup>c</sup>

Média e desvio padrão das repetições.

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

É possível verificar que há um aumento significativo da PVA com o aumento da concentração de glicerol, principalmente de 5 para 7%. Os filmes de natureza hidrofílica, como os de pectina, costumam apresentar pobre barreira à transferência de água, o que é amenizado pela formação de fortes redes tridimensionais com os íons cálcio. Entretanto, o plastificante utilizado para melhorar a flexibilidade dos filmes, exerce grande influência negativa sobre as propriedades de barreira, pois há uma redução das forças intermoleculares com o conseqüente aumento do volume livre e dos movimentos das cadeias, facilitando a permeabilidade [8].

## Conclusões

A escolha da concentração do plastificante utilizada na confecção dos filmes é um parâmetro de extrema importância, visto que afeta as propriedades físico-químicas dos mesmos. O plastificante tem como função principal melhorar a flexibilidade dos filmes e torná-los menos quebradiços sem que as demais propriedades, como a permeabilidade ao vapor de água, sejam prejudicadas. No presente trabalho todos os filmes apresentaram-se transparentes e homogêneos nas concentrações de glicerol testadas, porém a crescente incorporação de plastificante aos filmes só

foi capaz de melhorar a elasticidade dos filmes as custas de uma significativa redução da ruptura e aumento da solubilidade e da permeabilidade ao vapor de água. O grau de intumescimento foi reduzido com o aumento do plastificante devido a uma provável lixiviação do mesmo durante o experimento.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo suporte financeiro (Processo nº. 2008/52830-9).

### Referências Bibliográficas

1. F. Debeaufort; J-A Quezada-Gallo, A. Voilley. *Critical Reviews in Food Science*, 1998, 38, 299-312, 1998.
2. T.H. McHuhg; J.M. Krochta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42, 841-845.
3. J. Kester; O.R. Fennema. *Food Technology*. 1986, 40, 47-59.
4. B. Cuq; N. Gontard; J.L. Cuq; S. Guilbert. *Journal of Food Science*. 1996, 61, 580-584.
5. S. Guilbert; N. Gontard; L.G.M. Gorris. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1996, 29, 10-17.
6. M. Hiorth; I. Tho; S.A. Sande. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 56, 175-182.
7. P. Walkeström; S. Kidman; A.M. Hermanson; P.B. Rasmussen; L. Hoegh. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 593-603.
8. R. Sothornvit; J.M. Krochta in *Innovations and Food Packaging*, Han J.H, Ed.; Elsevier, Oxford, 2005.
9. J. Irissin-Mangata; G. Banduin; B. Boutevin; N. Gontard. *European Polymer Journal*. 2001, 37, 1533-1541.
10. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM E 96-95 Standard test methods of water vapor transmission of material in Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, 1995a.
11. J.B. Xu; J.P. Bartley; R.A Johnson. *Journal of Membrane Science*. 2003, 218, 131-146.
12. American Society for Testing and Materials (ASTM). *ASTM D-882 - Tensile properties of thin plastic sheeting*. Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, 1995b.
13. M. Schou; A. Longares; C. Montesinos-Herrero; F.J. Monahan; D. O’Riordan; M. O’Sullivan. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 2005, 38, 605-610.
14. M.A. da Silva; A.C.K. Bierhalz; T.G. Kieckbusch. *Carbohydrate Polymers*. 2009, 77, 736-742.
15. H.J. Kank; C. Jo; N. Y. Lee; J.H. Kwon; M.W. Byon. *Carbohydrate Polymers*. 2005, 60, 547-551.
16. P. Sriamornsak; R.A. Kennedy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 358, 205-213.