

Quitosana, um polissacarídeo quimicamente peculiar para produção de filmes para aplicações alimentares

Cláudia Nunes^{1,2,*}, Paula Ferreira¹ e Manuel A. Coimbra²

¹CICECO & ²QOPNA, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

*claudianunes@ua.pt

Chitosan, a chemically peculiar polysaccharide for production of films for food applications

— Chitosan is a linear polysaccharide, obtained from the partial deacetylation of chitin, consisted mainly of (β1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose (D-glucosamine) units. The presence of amine groups, which may be positively charged, is a characteristic of this polysaccharide giving it unique physical, chemical and biological properties. Thus, chitosan has been studied as a renewable, non-toxic, biocompatible and biodegradable polymer to form films with antimicrobial and antioxidant properties. However, the use of chitosan films for food applications has been limited due to their solubility in aqueous acidic media and limited mechanical properties (low resistance and flexibility). Chemical modification of chitosan, namely by crosslinking or grafting of bioactive molecules, is a strategy to prepare chitosan films with enhanced properties in order to enlarge the food applications, namely the development of materials for active and intelligent packaging for food preservation.

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, constituído maioritariamente por unidades de (β1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucose (D-glucosamina). A presença de grupos amino, que podem estar carregados positivamente, é uma característica deste polissacarídeo que lhe confere propriedades físicas, químicas e biológicas singulares. Assim, a quitosana, um polímero renovável, não-tóxico, biocompatível e biodegradável, tem sido estudada para formar filmes com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. No entanto, o uso de filmes de quitosana para aplicações alimentares tem sido reduzido devido à sua solubilidade em meios ácidos aquosos e propriedades mecânicas limitadas (baixa resistência e flexibilidade). A modificação química da quitosana, nomeadamente por reticulação e/ou ligação de moléculas bioativas, tem sido usada para aumentar a sua funcionalidade de forma a ampliar as aplicações na indústria alimentar, nomeadamente no desenvolvimento de materiais para embalagens alimentares ativas e inteligentes para conservação de alimentos.

Propriedades da quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiónico linear constituído maioritariamente por resíduos de 2-amino-2-desoxi-β-D-glucose em ligação (β1,4). Este polímero é o derivado desacetilado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, podendo ser obtido do exoesqueleto de artrópodes como crustáceos (caranguejos, lagostas e camarões) e insetos, conchas internas de cefalópodes, incluindo lulas, e das paredes celulares de fungos. A particularidade química da quitosana enquanto polissacarídeo é a presença de grupos amino, uma característica que se reflete nas suas propriedades físicas (solubilidade e viscosidade), químicas (reatividade com outros grupos funcionais) e biológicas (atividades antimicrobiana e antioxidante). Estas propriedades dependem também de outras características estruturais, como o peso molecular, o grau e padrão de desacetilação, a polidispersividade e a pureza. Estas características estruturais levam a que a quitina e/ou quitosana sejam moléculas presentes nos fósseis mais antigos devido à resistência à degradação química e enzimática.

A quitosana está aprovada pela FDA (U. S. Food and Drug Administration) como um aditivo alimentar seguro (GRAS, *Generally Recognized As Safe*) e o seu uso é reconhecido pela EFSA (European Food Safety Agency) como não tendo implicações para a saúde humana. Devido à sua não-toxicidade, assim como biodegradabilidade e

biocompatibilidade, a quitosana tem um grande potencial para o desenvolvimento de materiais funcionais para a área alimentar. Para além destas propriedades, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da quitosana podem evitar a oxidação dos alimentos e a contaminação microbiológica por fungos e bactérias, seja Gram-positivas ou Gram-negativas [1]. No entanto, o uso da quitosana para aplicações alimentares tem sido reduzido devido à sua elevada solubilidade em meios ácidos aquosos e propriedades mecânicas limitadas, como a baixa resistência e flexibilidade.

Estabilização da quitosana por reticulação

Como a quitosana é solúvel em soluções com pH abaixo de 6,0 devido à protonação do grupo -NH₂ dos resíduos de D-glucosamina (pK_a = 6,3), a aplicação em produtos alimentares requer a sua modificação para se tornar estável. Uma das estratégias possíveis é a reticulação do polímero por uma molécula que ligue duas ou mais moléculas de quitosana originando a formação de uma rede covalente tridimensional. A utilização de um agente reticulante permite obter materiais com maior estabilidade em meios ácidos, aumentando a sua resistência mecânica e química.

A genipina, a aglicona do genipósido presente no fruto de *gardenia*, é um composto natural com capacidade para reticular a quitosana. Este composto tem a vantagem de reagir espontaneamente com os grupos amino e, além disso, é menos citotóxico (5 mil a 10 mil vezes menos) do que

o glutaraldeído [2], o agente reticulante mais utilizado para a quitosana. Apesar do mecanismo de reticulação não estar completamente elucidado, como a genipina reage espontaneamente com os grupos amino da quitosana, formando um composto heterocíclico, é possível ocorrer a reticulação devido à polimerização entre duas moléculas de genipina que estão ligadas à quitosana [3–5]. Os filmes de quitosana com ligação covalente à genipina apresentam baixa solubilidade em meio ácido (< 20% de perda de massa, por solubilização de glicerol, utilizado como plastificante), cerca de 60% inferior em relação aos filmes produzidos com quitosana sem modificação química, não alterando significativamente a atividade antioxidante e antimicrobiana dos filmes [3,6].

Os filmes de quitosana reticulados com genipina foram testados na produção de vinho branco em substituição da adição de anidrido sulfuroso (SO_2), permitindo manter a segurança microbiológica do produto final, favorecendo a sua longevidade com uma boa qualidade organolética [6–8]. As características antioxidante e antimicrobiana dos filmes de quitosana–genipina nos vinhos parece estar relacionada com a sua capacidade para complexar os íons ferro(II) do meio (teor em ferro cerca de 50% inferior no vinho tratado com os filmes). A diminuição no conteúdo em íons ferro(II) origina a inibição das reações de oxidação que são catalisadas por estes íons (reação de Fenton). A inibição da atividade microbiana está também relacionada com a complexação de íons ferro, pois estes são elementos essenciais para o crescimento dos microrganismos. No entanto, em meio ácido (a pH abaixo de 6,0 os grupos amino estão maioritariamente protonados) a quitosana apenas tem capacidade de complexar os íons ferro na presença de ácidos policarboxílicos (como o ácido tartárico presente no vinho) ou α -cetoácidos como o ácido oxaloacético (ácido 2-oxobutanodióico) ou o ácido pirúvico (ácido 2-oxopropoico) [7]. Estes ácidos complexam com os íons ferro(III) formando estruturas carregadas negativamente que por sua vez vão interagir com os grupos amino da quitosana carregados positivamente.

Incorporação de compostos naturais na matriz de quitosana

A incorporação em filmes de quitosana de compostos de origem natural, presentes nos alimentos, é uma maneira viável de melhorar as suas propriedades funcionais, alargando as suas potenciais aplicações [9]. Uma vez que a oxidação é um problema que afeta a qualidade dos alimentos, a atividade antioxidante pode ser potenciada por ligação de compostos antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos ou extratos ricos nestes compostos. Como a produção de uvas é uma das culturas mais importantes em Portugal e também no mundo, em que cerca de 80% da colheita é utilizada na vinificação, e o bagaço de uva é o subproduto resultante da vinificação, representando aproximadamente 20% do peso das uvas processadas, sendo constituído pelas películas, grainhas e engaço, o bagaço é uma fonte rica em compostos fenólicos, lípidos, ceras e polissacarídeos que podem ser valorizados através desta aplicação [9,10].

A presença de grupos amino, além dos grupos hidroxilo, proporciona reatividade à molécula de quitosana po-

dendo participar em diversas reações, tais como acetilação, quaternização, reação com aldeídos e cetonas (que originam bases de Schiff) ou alquilação. A ligação covalente de moléculas à cadeia da quitosana pode ser realizada com recurso a diferentes métodos, nomeadamente por um mecanismo radicalar recorrendo a um agente oxidante. De entre os agentes oxidantes mais usados encontram-se o persulfato de potássio e o hexanitrocerato(IV) de amónio (CAN). Este método permite ligar de uma forma eficiente diferentes tipos de compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e/ou antocianinas, de acordo com a estrutura proposta na Figura 1 [10,11]. Estes compostos podem ser extraídos e purificados do bagaço de uva. Os filmes produzidos com esta quitosana modificada têm uma atividade antioxidante cerca de 50% superior em relação a filmes de quitosana não modificada (Figura 2). Além disso, o uso simultâneo de genipina permite a obtenção de filmes estáveis numa ampla gama de pH (Figura 2) [10,11].

Os compostos fenólicos potenciam a atividade antioxidante pois atuam como captadores de radicais livres, um mecanismo diferente do que se verifica para a atividade antioxidante da quitosana, que atua devido à capacidade de complexação dos íons metálicos envolvidos nas reações de oxidação. Assim, a introdução de compostos fenólicos na estrutura da quitosana permite a obtenção de um material com os dois tipos de propriedades antioxidantes.

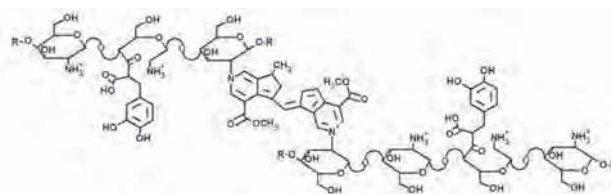


Figura 1 – Proposta de estrutura da quitosana reticulada com genipina e com ligação covalente ao ácido cafeico (adaptada da ref. [11]).

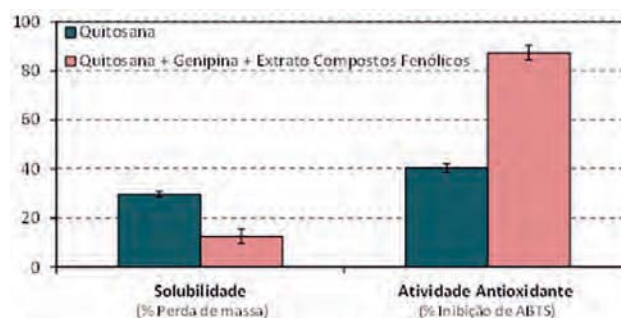


Figura 2 – Solubilidade (sete dias em solução aquosa a pH 3,5 com agitação) e atividade antioxidante (reação com ABTS, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)) de filmes de quitosana e quitosana reticulada com genipina e com ligação covalente de compostos fenólicos.

Para além da atividade antioxidante, existem outras propriedades dos filmes de quitosana que podem ser melhoradas por incorporação de diferentes extratos do bagaço de uva, nomeadamente, óleo (tem 70% de ácido linoleico, $\text{C18:2}\Delta^{9,12}$, e 18% de ácido oleico, $\text{C18:1}\Delta^9$) e ceras (ácidos gordos hidroxilados e polimerizados por esterificação). A análise morfológica da superfície dos filmes demonstra que, apesar de existirem zonas onde ocorre uma agregação dos compostos devido ao seu carácter hidrofóbico, os com-

postos incorporados tendem a envolver as fibras de quitosana levando a um aumento do diâmetro da fibra contribuindo para um alisamento da superfície dos filmes (Figura 3) [12]. As propriedades mecânicas dos filmes de quitosana são alteradas por incorporação destes extratos, designadamente os filmes enriquecidos em ceras apresentam maior flexibilidade, enquanto que os óleos aumentam a sua fase elástica. Adicionalmente, os filmes de quitosana enriquecidos com estes extratos têm maior hidrofobicidade e uma atividade antioxidante que pode ser até 200% superior relativamente aos filmes apenas constituídos por quitosana [9]. Portanto, todos estes filmes de quitosana produzidos com incorporação dos diferentes extratos obtidos do bagaço da uva são materiais promissores para futuras aplicações alimentares, nomeadamente na conservação de alimentos.

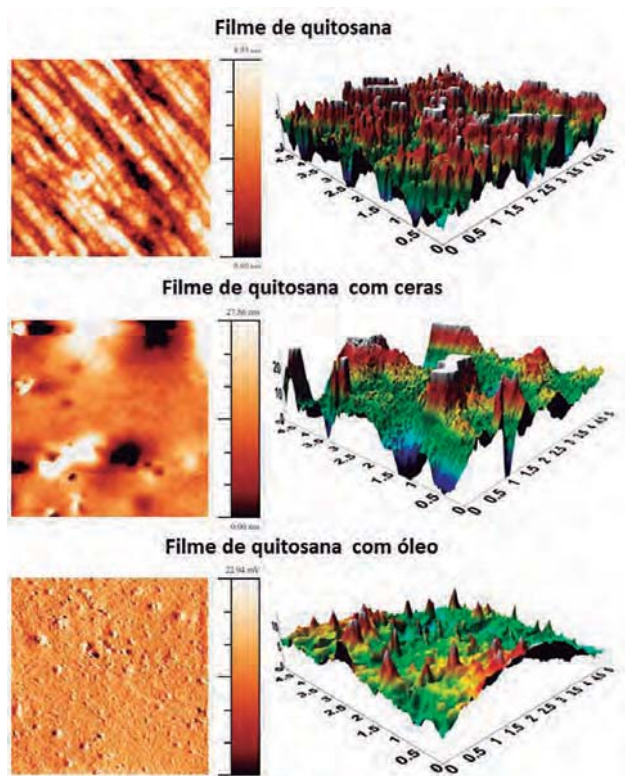


Figura 3 – Imagens de topografia por microscopia de força atômica (AFM) dos filmes de quitosana e quitosana com incorporação de ceras e óleos extraídos do bagaço de uva. Imagem reproduzida com permissão da Elsevier [9].

Bionanocompósitos para embalagens alimentares ativas e inteligentes

O desenvolvimento de embalagens alimentares que sejam simultaneamente ativas e inteligentes é um grande desafio. As embalagens ativas pressupõem a interação da embalagem com o alimento e a atmosfera circundante de forma a serem funcionais na conservação e expansão do tempo de vida do alimento. O conceito de embalagem inteligente engloba a capacidade de adquirir informação sobre o alimento desde a sua origem, monitorizando as condições a que o alimento esteve sujeito, avaliando o seu estado num dado momento de forma qualitativa ou semiquantitativa e possibilitando o acesso fácil a esses dados [13].

O desenvolvimento de bionanocompósitos pode ser uma solução viável para a obtenção de filmes à base de

quitosana com características que permitam a sua utilização como embalagens alimentares ativas e inteligentes. As nanopartículas, devido ao seu tamanho, têm proporcionalmente uma superfície maior de interação/reacção com o meio envolvente. Filmes de quitosana com nanopartículas podem apresentar melhores propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas. Por exemplo, nanopartículas de argilas (tipo montmorillonite, um silicato de alumínio, magnésio e cálcio hidratado, $(\text{Na,Ca})_{0,3}(\text{Al,Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) podem ser utilizadas para melhorar a permeabilidade ao oxigénio bem como as propriedades mecânicas de biofilmes [14]. O controlo da atmosfera dentro da embalagem alimentar, para impedir a entrada de oxigénio em embalagens sob vácuo ou evitar a libertação do dióxido de carbono em embalagens com condições anaeróbicas é fundamental para a conservação dos alimentos.

O óxido de grafeno reduzido, os nanotubos de carbono e a magnetite podem ser utilizados como aditivos numa matriz polimérica, como a quitosana, provocando um aumento da resistência mecânica, diminuição da solubilidade em meios aquosos e na atribuição de propriedades magnéticas e condutividade elétrica (Figura 4) [15]. Estas propriedades aumentam a funcionalidade destes materiais. Por exemplo, a introdução de condutividade elétrica nestes materiais pode permitir a sua utilização para embalagens alimentares, em que a esterilização dos alimentos embalados pode ser feita por campos elétricos pulsados. Esta é uma tecnologia inovadora de tratamento não térmico que permite a conservação do alimento com alterações mínimas nas suas propriedades nutricionais e características sensoriais.



Figura 4 – Filme de quitosana com incorporação de óxido de grafeno reduzido e magnetite com propriedades magnéticas e condutividade elétrica.

As embalagens podem também ser dotadas de “inteligência” por inserção de partículas sensíveis à presença de compostos formados durante a degradação do alimento, tais como alteração de acidez do meio ou mudanças de temperatura, modificando as suas características e permitindo a determinação do seu estado de conservação. Sistemas de identificação por rádio frequência (RFID) têm sido desenvolvidos e, apesar de ainda dispendiosos, podem permitir fazer registos das temperaturas a que o alimento está sujeito, bem como monitorizar a cadeia de distribuição [13].

Conclusões

A aplicação da quitosana como matéria-prima base no fabrico de embalagens alimentares está ainda no início mas, dada a sua composição química peculiar, é promissora desde que associada a outras moléculas ou partículas. A modificação da sua estrutura pode melhorar as suas propriedades gerais, tais como mecânica, resistência a meios aquosos e permeabilidade aos gases, e potenciar a sua atividade antioxidante e antimicrobiana que permite um aumento da longevidade do alimento. Além disso, os novos desenvolvimentos dos materiais podem permitir a ligação de grupos funcionais que funcionem como sensores moleculares para deteção de indicadores do estado de conservação dos alimentos e monitorizar o seu estado durante a distribuição e armazenamento. Assim, a quitosana tem potencial para ser usada em embalagens alimentares sustentáveis, que podem ser simultaneamente ativas e inteligentes. Esta é uma molécula do passado, encontrada nos fósseis mais antigos devido à sua resistência à degradação química e enzimática, e à qual se perspetiva um grande futuro como biomaterial inovador e sustentável.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FCT, União Europeia, QREN, FEDER e COMPETE pelo financiamento da Unidade de Investigação QOPNA (FCOMP-01-0124-FEDER-037296, PEst-C/QUI/UI0062/2013) e do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro (POCI-01-0145-FEDER-007679; FCT UID/CTM/50011/2013). Cláudia Nunes (SFRH/BPD/100627/2014) e Paula Ferreira (IF/00300/2015) agradecem à FCT a bolsa de pós-doutoramento e a posição de Investigador, respetivamente.

Referências

- [1] M. Aider, *LWT - Food Science and Technology* **43** (2010) 837–842.
- [2] F.L. Mi, C.T. Huang, H.F. Liang, M.C. Chen, Y.L. Chiu, C.H. Chen, H.W. Sung, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 3290–3296.
- [3] C. Nunes, E. Maricato, A. Cunha, A. Nunes, J.A. Lopes da Silva, M.A. Coimbra, *Carbohydr. Polym.* **91** (2013) 236–243.
- [4] M.F. Butler, Y.F. Ng, P.D.A. Pudney, *J. Polym. Sci. A* **41** (2003) 3941–3953.
- [5] P.-H. Chen, T.-Y. Kuo, J.-Y. Kuo, Y.-P. Tseng, D.-M. Wang, J.-Y. Lai, H.-J. Hsieh, *Carbohydr. Polym.* **82** (2010) 1236–1242.
- [6] C. Nunes, A. Cunha, E. Maricato, M.C. Santos, J.A.L. da Silva, S. Mendo, S.M. Rocha, J.A. Saraiva, M.A. Coimbra, *Química - Boletim da SPQ* n.º 127 (2012) 39–44.
- [7] C. Nunes, E. Maricato, A. Cunha, M.A.M. Rocha, S. Santos, P. Ferreira, M.A. Silva, A. Rodrigues, O. Amado, J. Coimbra, D. Silva, A. Moreira, S. Mendo, J.A.L. da Silva, E. Pereira, S.M. Rocha, M.A. Coimbra, *Green Chem.* **18** (2016) 5331–5341.
- [8] M.A. Coimbra, C. Nunes, E. Maricato, A. Cunha, J.A.L. da Silva, S. Mendo. *Winemaking method without the admixture of sulphur dioxide using chitosan-based films*. (2012) PCT/PT2012/000043, US 2014/0328974 A1.
- [9] A.S. Ferreira, C. Nunes, A. Castro, P. Ferreira, M.A. Coimbra, *Carbohydr. Polym.* **113** (2014) 490–499.
- [10] C. Nunes, E. Maricato, A. Cunha, A. Nunes, J.A.L. da Silva, M.A. Coimbra, *Carbohydr. Polym.* **91** (2013) 236–243.
- [11] C. Nunes, E. Maricato, F.J. Gonçalves, J.A.L. da Silva, S. Rocha, M. Coimbra, *Trends Carbohydr. Res.* **7** (2015) 25–32.
- [12] C. Nunes, A. Castro, A. Ferreira, P. Ferreira, M. Coimbra, *Microsc. Microanal.* **21** (2015) 35–36.
- [13] A.L. Brody, B. Bugusu, J.H. Han, C.K. Sand, T.H. McHugh, *J. Food Sci.* **73** (2008) R107–R116.
- [14] M. Priolo, D. Gamboa, J. Grunlan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2** (2010) 312–320.
- [15] X. Wang, H. Bai, Z. Yao, A. Liu, G. Shi, *J. Mater. Chem.* **20** (2010) 9032–9036.

