



FURG

Tese de Doutorado

Desenvolvimento de filmes e blendas produzidas a partir de biomateriais para aplicação em embalagens ativas

Jaqueline Motta de Moura

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2018

DESENVOLVIMENTO DE FILMES E BLENDS PRODUZIDAS A PARTIR DE BIOMATERIAIS PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS ATIVAS

por

Jaqueline Motta de Moura

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Central da FURG, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

DESENVOLVIMENTO DE FILMES E BLENDS PRODUZIDAS A PARTIR DE BIOMATERIAIS PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS ATIVAS

elaborada por

JAQUELINE MOTTA DE MOURA

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto (FURG – RS)
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Gabriela Silveira da Rosa (UNIPAMPA – RS)

Prof^a. Dr^a. Vanessa Mendonça Esquerdo (UNIVATES– RS)

Prof. Dr. Guilherme Luiz Dotto (UFSM – RS)

Prof. Dr. Tito Roberto Cadaval Jr. (FURG – RS)

Rio Grande, 20 de julho de 2018.

*Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu marido e companheiro
Matheus e as nossas filhas, Luiza e Julia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Pela saúde e pelas oportunidades.

Aos meus pais Ilce e Luiz Álvaro (*in memoriam*)

Os primeiros mestres. Deram-me a vida e ensinaram-me que o conhecimento é a única coisa que ninguém pode nos tirar. Ensinaram-me o respeito, responsabilidade, humildade, honestidade e determinação. Pai, exemplo de homem, amigo, pai e herói (saudades). Mãe, Mulher lutadora e decidida. Obrigado pelo apoio, carinho e atenção.

Devo tudo a vocês.

As minhas filhas Luiza e Julia

Pessoas que dão sentido a todo esforço, que fazem eu acreditar que o mundo pode ser melhor.

Ao Matheus, meu grande companheiro

Sempre perto, sempre presente. Obrigada por tudo!

A minha irmã Catarina e meu cunhado Andy

Minha irmã meu exemplo, companheira, amiga, tem toda minha admiração por suas conquistas e seu esforço. A vocês devo a paciência e o companheirismo, a compreensão e o auxílio nos momentos difíceis.

Ao meu Orientador, professor Pinto

Agradeço por tudo que vem me ensinando, como professor e muitas vezes como pai. Agradeço imensamente pelas intermináveis horas que gastou conversando comigo e corrigindo meus trabalhos e principalmente por ter me ensinado ao longo desses anos o significado do que é ética profissional e me fazer entender que o coletivo é mais importante, pois só assim vamos fazer diferença nesse mundo.

Ao meu co-orientador, Guilherme Dotto

Pelo exemplo, por me ajudar a compreender que ninguém é igual a ninguém, e que sendo um ponto fora da curva, você serve de inspiração. Obrigada!

Ao meu amigo Jaques Rizzi (*in memoriam*)

Saudade e inconformismo. Amigo pra sempre. Primeiro a me receber, a me mostrar o que é ser um pesquisador. Nossas infindáveis discussões me fizeram crescer muito, suas ideias em relação à pesquisa e educação com toda certeza contribuíram muito para minha formação.

As bolsistas e Amigas Bruna Farias e Dara Djenifer

Pela colaboração na realização deste trabalho, pelo apoio, pelas boas risadas, e principalmente, por terem me dado à oportunidade de compartilhar o pouco que aprendi.

Aos colegas do Laboratório de Operações Unitárias

Pela ajuda, amizade, parceria, companheirismo, aprendizado e convivência. Tudo isso foi de essencial importância para a realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação

Pelos conhecimentos e aprendizados compartilhados, sejam eles positivos ou não, enfim tudo serve como aprendizado.

À Universidade Federal do Rio Grande e a CAPES

Pela Formação Profissional e auxílio financeiro.

“Os idiotas vão tomar conta do mundo; não pela capacidade, mas pela quantidade. Eles são muitos”.

“Outrora, os melhores pensavam pelos idiotas; hoje, os idiotas pensam pelos melhores. Criou-se uma situação realmente trágica: ou o sujeito se submete ao idiota ou o idiota o extermina”.

“Invejo a burrice, porque é eterna”.

Nelson Rodrigues

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | XIX |
| LISTA DE TABELAS | XXI |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | XXII |
| RESUMO..... | XXV |
| ABSTRACT..... | XXVI |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1. OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 24 |
| 2.1. EMBALAGENS DE ALIMENTOS | 24 |
| 2.2. EMBALAGENS ATIVAS | 26 |
| 2.2.1. <i>Filmes ativos antimicrobianos</i> | 27 |
| 2.2.2. <i>Filmes ativos à base de biomateriais</i> | 28 |
| 2.2.2.1. Filmes à base de gelatina de pescado | 31 |
| 2.2.2.2. Filmes à base de gelatina de pescado com adição de quitosana | 42 |
| 2.2.2.3. Blendas à base de gelatina de pescado/quitosana/lipídio | 51 |
| 2.3. ELABORAÇÃO DE FILMES E BLENDA PELA TÉCNICA <i>CASTING</i> | 59 |
| 2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES..... | 60 |
| 2.4.1. Espessura (e) | 60 |
| 2.4.2. <i>Propriedades mecânicas</i> | 60 |
| 2.4.2.1. Resistência a tração (RT)..... | 61 |
| 2.4.2.2. Alongamento na ruptura..... | 62 |
| 2.4.3. <i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i> | 62 |
| 2.4.4. <i>Cor</i> | 63 |
| 2.4.5. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> | 64 |
| 2.4.6. <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i> | 64 |
| 2.4.7. <i>Difração de raio-X (DRX)</i> | 65 |
| 2.4.8. <i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i> | 66 |
| 2.5. AVALIAÇÃO DE EMBALAGENS ATIVAS NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE PESCADO..... | 66 |
| 2.5.1. <i>Merluza (Merluccius hubbsi)</i> | 68 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5.2. | <i>Avaliação Microbiológica</i> | 69 |
| 2.5.2.1. | <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> | 69 |
| 2.5.2.2. | <i>Salmonella sp.</i> | 70 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 71 |
| 3.1. | OBTENÇÃO DOS BIOMATERIAIS | 71 |
| 3.1.1. | <i>Gelatina</i> | 71 |
| 3.1.1.1. | Extração da gelatina de pescado | 71 |
| 3.1.1.2. | Caracterização da gelatina de peles de corvina | 72 |
| 3.1.2. | <i>Quitina e Quitosana</i> | 74 |
| 3.1.2.1. | Extração da quitina | 74 |
| 3.1.2.2. | Produção de quitosana | 76 |
| 3.1.2.3. | Caracterização da quitosana | 78 |
| 3.1.3. | <i>Concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs)</i> | 81 |
| 3.1.3.1. | Extração do óleo bruto de carpa | 81 |
| 3.1.3.2. | Obtenção do óleo branqueado..... | 82 |
| 3.1.3.3. | Obtenção dos ácidos graxos livres (hidrólise química) | 83 |
| 3.1.3.4. | Obtenção dos concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs) | 84 |
| 3.1.3.5. | Perfil de ácidos graxos dos concentrados de AGIs..... | 85 |
| 3.2. | FILMES E BLENDS BASEADAS EM BIOMATERIAIS | 86 |
| 3.2.1. | <i>Elaboração dos filmes e das blends</i> | 86 |
| 3.2.1.1. | <i>Filmes à base de gelatina de pescado</i> | 86 |
| 3.2.2. | <i>Blends à base de gelatina de pescado com a adição de quitosana</i> | 87 |
| 3.2.3. | <i>Blends à base de gelatina com adição de quitosana e ácidos graxos insaturados</i> | 88 |
| 3.3. | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES E DAS BLENDS | 89 |
| 3.3.1. | <i>Espessura</i> | 89 |
| 3.3.2. | <i>Propriedades Mecânicas (RT e AR)</i> | 90 |
| 3.3.3. | <i>Permeabilidade ao vapor de água</i> | 90 |
| 3.3.4. | <i>Cor</i> | 91 |
| 3.3.5. | <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> | 92 |
| 3.3.6. | <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i> | 92 |
| 3.3.7. | <i>Difração de raio-X (DRX)</i> | 92 |
| 3.3.8. | <i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i> | 92 |

| | |
|--|------------|
| 3.4. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS FILMES E DAS BLENDA À BASE DE GELATINA NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE MERLUZA..... | 93 |
| 3.4.1. <i>Aplicação dos filmes nos filés de merluza</i> | 93 |
| 3.4.2. <i>Análises Microbiológicas</i> | 93 |
| 3.4.2.1. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva | 93 |
| 3.4.2.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp | 94 |
| 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS | 95 |
| 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS..... | 95 |
| 4.1.1. <i>Gelatina de pescado</i> | 95 |
| 4.1.2. <i>Quitina e Quitosana</i> | 98 |
| 4.1.3. <i>Concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs)</i> | 99 |
| 4.2. FILMES E BLENDA BASEADAS EM BIOMATERIAIS..... | 101 |
| 4.2.1. <i>Caracterização dos filmes e blendas</i> | 101 |
| 4.2.1.1. Espessura | 101 |
| 4.2.1.2. Propriedades Mecânicas (RT e AR) e Permeabilidade ao vapor de água (PVA)..... | 101 |
| 4.2.1.3. Cor..... | 109 |
| 4.2.1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 110 |
| 4.2.1.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)..... | 113 |
| 4.2.1.6. Difração de raio-X (DRX)..... | 114 |
| 4.2.1.7. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)..... | 115 |
| 4.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS FILMES E DAS BLENDA À BASE DE GELATINA NA CONSERVAÇÃO DE FILÉS DE MERLUZA..... | 117 |
| 5. CONCLUSÕES | 122 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 124 |
| APÊNDICES | 156 |
| APÊNDICE 1: PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA VINCULADA A TESE | 157 |
| APÊNDICE 2: PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DESENVOLVIDA DURANTE A TESE | 158 |
| ANEXOS | 160 |
| ANEXO 1..... | 161 |

| | |
|---|------------|
| FIGURA A1: REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NO COLÁGENO..... | 161 |
| FIGURA B1: ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DO COLÁGENO | 161 |
| ANEXO 2 | 162 |
| FIGURA A2: ESTRUTURAS QUÍMICAS (A) CELULOSE E (B) QUITINA | 162 |
| FIGURA B2: ESQUEMA DO COMPORTAMENTO DA QUITOSANA EM MEIO ÁCIDO..... | 162 |
| FIGURA C2: ESQUEMA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE ALCALINA DA QUITINA | 163 |
| ANEXO 3 | 164 |
| FIGURA A3: REAÇÃO DE DEGOMAGEM..... | 164 |
| FIGURA B3: EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO OU ALCOÓLISE | 164 |
| FIGURA C3: EQUAÇÕES DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO | 165 |
| FIGURA D3: COMPLEXAÇÃO COM UREIA: (A) CRISTALIZAÇÃO DA UREIA E (B) CRISTALIZAÇÃO DA UREIA NA PRESENÇA DE ÁCIDOS GRAXOS..... | 166 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura química do glicerol | 32 |
| Figura 2. Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>) | 33 |
| Figura 3. Principais aminoácidos constituintes do colágeno | 35 |
| Figura 4. Métodos de extração de gelatina dos tipos A e B | 38 |
| Figura 5. Camarão (<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>)..... | 45 |
| Figura 6. Estruturas químicas (a) quitina e (b) quitosana | 48 |
| Figura 7. Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>) | 53 |
| Figura 8. Moléculas de ácidos graxos mais importantes nos óleos de pescado | 55 |
| Figura 9. Representação do diagrama tridimensional de cores do sistema CIELAB.... | 64 |
| Figura 10. Fluxograma da extração de gelatina de peles de corvina | 72 |
| Figura 11. Fluxograma de extração da quitina a partir de resíduos de camarão..... | 75 |
| Figura 12. Esquema do reator utilizado nas reações de desacetilação..... | 76 |
| Figura 13. Fluxograma de obtenção das quitosanas de diferentes M _v e GD | 78 |
| Figura 14. Fluxograma de extração do óleo bruto | 81 |
| Figura 15. Fluxograma de obtenção do óleo de pescado refinado..... | 83 |
| Figura 16. Fluxograma de obtenção dos ácidos graxos livre do óleo de pescado | 84 |
| Figura 17. Fluxograma de obtenção dos concentrados dos ácidos graxos insaturados. | 85 |
| Figura 18. Representação esquemática da elaboração do filme de gelatina de pescado | 87 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19. Representação esquemática da elaboração do filme a base de gelatina de peixe com adição de quitosana..... | 88 |
| Figura 20. Representação esquemática da elaboração da blenda gelatina/quitosana/AGI | 89 |
| Figura 21. Micrômetro digital para medida das espessuras dos filmes | 90 |
| Figura 22. Imagem do filme sendo submetido ao teste de RT e AR..... | 90 |
| Figura 23. Esquema da célula de difusão para determinação da PVA | 91 |
| Figura 24. Etapas de análise microbiológica para contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva | 94 |
| Figura 25. Etapas de análise microbiológica para pesquisa de <i>Salmonella</i> sp..... | 94 |
| Figura 26. Interações intermoleculares no filme de gelatina e gelatina e quitosana. (a) gelatina, (b) gelatina/glicerol e (c) gelatina/glicerol/quitosana..... | 103 |
| Figura 27. Blendas a base de gelatina de peixe, (a) gelatina/AGIs e (b) gelatina/quitosana/AGIs | 104 |
| Figura 28. MEV dos filmes e das blendas (a) G, (b) G-Q1, (c) G-Q2, (d) G-Q3, (e) G-Q4, (f) GA, (g) GA-Q1, (h) GA-Q2, (i) GA-Q3 e (j) GA-Q4..... | 111 |
| Figura 29. FTIR dos filmes e das blendas..... | 113 |
| Figura 30. DRX dos filmes e das blendas | 115 |
| Figura 31. DSC dos filmes e das blendas | 116 |
| Figura 32. Imagem dos filés de merluza embalados com os filmes à base de gelatina (a) G, (b) G-Q2, (c) GA e (d) GA-Q2..... | 117 |
| Figura 33. Filés embalados com os filmes G e G-Q2, e os respectivos resultados para <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e <i>Salmonella</i> sp. | 118 |
| Figura 34. Filés embalados com os filmes GA e GA-Q2, e os respectivos resultados para <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e <i>Salmonella</i> sp. | 120 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Filmes e blendas a partir de biomateriais para aplicação na indústria de alimentos..... | 29 |
| Tabela 2. Condições de hidrólise alcalina utilizadas na produção de quitosanas com diferentes características (M _v e GD) | 77 |
| Tabela 3. Valores de Bloom, viscosidade e temperaturas de fusão e gelificação da gelatina de peles de corvina e de outras espécies de pescado | 96 |
| Tabela 4. Composição de aminoácidos (mg/100 g proteína) de gelatinas extraídas de diferentes espécies de pescado | 97 |
| Tabela 5. Valores de M _v e GD das quitosanas produzidas | 98 |
| Tabela 6. Perfil de ácidos graxos da fração não complexada de óleos de carpa em comparação com outros autores | 100 |
| Tabela 7. Valores RT, AR e PVA de filmes de gelatina de pescado, gelatina de pescado/quitosana e gelatina de pescado/quitosana/AGI..... | 102 |
| Tabela 8. Comparação dos valores de RT, AR e PVA de filmes e blendas a base de biomateriais citados na literatura..... | 107 |
| Tabela 9. Parâmetros de cor do filme de gelatina de pescado e blendas de gelatina/quitosana/AGI | 110 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| Sigla | Definição |
|-------------------|---|
| [AR] | Alongamento na ruptura |
| [AGIs] | Ácidos graxos insaturados |
| [DRX] | Difração de raio-X |
| [DSC] | Calorimetria de varredura diferencial |
| [FTIR] | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier |
| [G] | Filme de gelatina de pescado |
| [G-Q1] | Filme de gelatina/Quitosana 1 |
| [G-Q2] | Filme de gelatina/Quitosana 2 |
| [G-Q3] | Filme de gelatina/Quitosana 3 |
| [G-Q4] | Filme de gelatina/Quitosana 4 |
| [GA] | Blenda de gelatina/AGI |
| [GA-Q1] | Blenda gelatina/AGI/Quitosana 1 |
| [GA-Q2] | Blenda gelatina/AGI/Quitosana 2 |
| [GA-Q3] | Blenda gelatina/AGI/Quitosana 3 |
| [GA-Q4] | Blenda gelatina/AGI/Quitosana 4 |
| [GD] | Grau de desacetilação |
| [GlcN] | 2-amino-2-desoxi- β -glucopiranosose |
| [GlcNAc] | 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose |
| [M _v] | Massa molar viscosimétrica média |
| [MEV] | Microscopia eletrônica de varredura |
| [PVA] | Permeabilidade ao vapor de água |
| [Q1] | Quitosana (M _v =196 kDa e GD=66,2%) |
| [Q2] | Quitosana (M _v =194 kDa e GD=79,2%) |
| [Q3] | Quitosana (M _v =100 kDa e GD=95,7%) |
| [Q4] | Quitosana (M _v =143 kDa e GD=93,5%) |
| [RT] | Resistência a tração |
| [T _g] | Transição vítrea |
| [T _F] | Temperatura de fusão |

| Símbolo | Definição | Unidade |
|--------------------------------|--|---|
| [A] | Área | [m ²] |
| [AR] | Alongamento na ruptura | [%] |
| [a ₀ [*]] | Cromaticidade da cor padrão | [adimensional] |
| [b ₀ [*]] | Cromaticidade da cor padrão | [adimensional] |
| [c] | Concentração | [mol L ⁻¹] |
| [e] | Espessura | [m] |
| [F] | Força | [N] |
| [H ⁺] | Concentração de H ⁺ | [m _{eq} L ⁻¹] |
| [H _{ab}] | Ângulo Hue | [°] |
| [k] | Constante válida para cada polímero | [adimensional] |
| [L] | Largura | [m] |
| [L ₀ [*]] | Luminosidade inicial da cor padrão | [adimensional] |
| [L ₀] | Largura inicial | [m] |
| [m _{ab}] | Massa de água absorvida | [g] |
| [N _A] | Concentração de ácido | [N] |
| [N _B] | Concentração de base | [N] |
| [OH ⁻] | Concentração de OH ⁻ | [m _{eq} L ⁻¹] |
| [PVA] | Permeabilidade ao vapor de água | [g Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻¹] |
| [RT] | Resistência a tração | [MPa] |
| [t] | Tempo | [s] |
| [V] | Volume | [L] |
| [V ₀] | Volume inicial | [L] |
| [V _A] | Volume do ácido | [L] |
| [V _e] | Volume de base no ponto de equivalência | [L] |
| [w] | Massa de quitosana | [g] |
| [Δ _a [*]] | a [*] – a ₀ [*] | [adimensional] |
| [Δ _b [*]] | b [*] –b ₀ [*] | [adimensional] |
| [ΔE _{ab}] | Variação de cor | [adimensional] |
| [ΔL [*]] | L [*] –L ₀ [*] | [adimensional] |
| [ΔL] | Variação de comprimento | [m] |
| [ΔP] | Variação de pressão parcial | [kPa] |
| [η _{sp}] | Viscosidade reduzida | [mL g ⁻¹] |

| Letras gregas | Definição | Unidade |
|----------------------|--|-----------------------|
| [ν] | Viscosidade cinemática | [Stoke] |
| [η] | Viscosidade intrínseca | [mL g ⁻¹] |
| [η_{sp}] | Viscosidade reduzida | [mL g ⁻¹] |
| [ρ] | Massa específica | [g cm ³] |
| [α] | constante que depende do sistema solvente– polímero | [adimensional] |
| [μ] | Viscosidade dinâmica | [Poise] |

RESUMO

Título. Desenvolvimento de filmes e blendas produzidas a partir de biomateriais para aplicação em embalagens ativas.

Autor. Jaqueline Motta de Moura

Orientador. Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto

Co-orientador. Prof. Dr. Guilherme Luiz Dotto

Os materiais obtidos de polímeros biodegradáveis podem ser uma alternativa para a redução do impacto ambiental provocado pelos polímeros derivados do petróleo. Materiais de diferentes origens têm sido considerados como uma matéria-prima com viabilidade técnica e econômica para o desenvolvimento de filmes. Buscando fornecer uma maneira alternativa de utilizar alguns subprodutos da pesca, filmes biodegradáveis à base de gelatina de pescado, adicionado de quitosana, com diferentes características químicas (massa molar (M_v) e grau de desacetilação (GD)), incorporadas com ácidos graxos insaturados (AGIs), foram preparados e caracterizados. Estes foram caracterizados quanto suas propriedades mecânicas (resistência a tração (RT) e alongamento na ruptura (AR)), de permeação (PVA), óticas, superfície (MEV), grupos funcionais (FTIR), térmicas (DSC) e antimicrobianas na conservação de filés de merluza (*Merluccius hubbsi*). Em relação a RT e AR, todos os filmes em que foi adicionado quitosana na matriz apresentaram valores superiores aos filmes de gelatina e de gelatina/AGIs, destacando-se que quando utilizada quitosana de mais elevada M_v , esses resultados foram mais significativos. A adição de AGIs nas soluções filmogênicas promoveu uma diminuição nos valores de PVA e RT, e um aumento bastante significativo nos valores de AR. A análise de superfície mostrou que os filmes com quitosana de maior M_v apresentavam estruturas fibrosas, no entanto quando foi incorporado os AGIs estas foram amortizadas. Os filmes que apresentaram melhores resultados quanto as propriedades mecânicas e de permeação foram submetidos a testes microbiológicos na conservação de filés de merluza. Todos os filmes apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* sp. na conservação dos filés de merluza. Estes resultados mostram que os filmes à base de gelatina de pescado com adição de quitosana e ácidos graxos insaturados são promissores como embalagens ativas na conservação de filés de pescado.

ABSTRACT

Title. Development of films and blends produced from biomaterials for application in active packaging.

Author. Jaqueline Motta de Moura

Advisor. Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto

Co-Advisor. Prof. Dr. Guilherme Luiz Dotto

The materials obtained from biodegradable polymers can be an alternative for the reduction of the environmental impact caused by the polymers derived from petroleum. Materials from different sources, have been considered as a raw material with technical and economic feasibility of the development of these films. Seeking to provide an alternative and profitable way to use some fishery products, biodegradable films fish gelatin base with the addition of chitosan with different chemical characteristics (molecular weight (M_w) and deacetylation degree (DD)), incorporated with polyunsaturated fatty acids (PUFA) were prepared and characterized for their mechanical properties (tensile strength (TS) and elongation at break (EB)), permeation (WVP), optical surface (SEM), functional groups (FTIR), thermal (DSC), and in antimicrobial preservation fillets hake (*Merluccius hubbsi*). In relation to TS and E, in all films in which chitosan was added in the film-forming matrix, these values presented higher values than the gelatin and gelatin/PUFA films, highlighting that when used chitosan higher M_w , the results were even more significant. The addition of PUFA in the filmogenic solutions promoted a decrease in the values of WVP and TS, and a very significant increase in the values of EB. The surface analysis showed that the films with chitosan of greater M_w had fibrous structures, however, when it was incorporated the PUFA these were minimized. The films showed better results as the mechanical and permeation properties, were subjected to microbiological tests in the conservation of hake fillets. All films presented antimicrobial activity against *Staphylococcus* coagulase positive and *Salmonella* sp. in the preservation of hake fillets. These results show that fish gelatin-based films with addition of chitosan and unsaturated fatty acids are promising as active packaging in the preservation of fish fillets.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, tem havido um interesse expressivo em relação aos polímeros biodegradáveis, principalmente devido às preocupações ambientais sobre o descarte dos materiais não renováveis, e as oportunidades para criar novos mercados para as matérias-primas formadoras de embalagens ativas.¹ As indústrias de alimentos produzem uma grande quantidade de resíduos, o que representa um grande problema tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.² Todavia, estes resíduos possuem macromoléculas que podem ser extraídas e reaproveitadas na formulação de novos produtos, sendo possível agregar valor a esses resíduos, melhorando o faturamento das empresas e evitando que estes retornem ao meio ambiente, provocando danos ambientais.³

No Brasil, as indústrias de pescado descartam aproximadamente 50% da biomassa capturada durante o processamento.⁴ No entanto, esses resíduos podem ser reaproveitados na obtenção de proteínas, polissacarídeos e lipídios.⁵ Estas macromoléculas (proteínas e polissacarídeos) apresentam boa capacidade de formação de filmes e blendas. Além disso, a variedade de grupos funcionais que apresentam em suas estruturas moleculares, possibilita interações com diversos aditivos, o que amplia ainda mais suas aplicações, principalmente nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

6-9

Neste contexto, destaca-se a gelatina que é uma proteína com diferentes propriedades funcionais e aplicações, incluindo a capacidade de formação de filme e aplicação como cobertura na proteção de alimentos.¹⁰ As peles de pescado são uma valiosa fonte de obtenção de gelatina. Os filmes produzidos a partir da gelatina possuem algumas limitações, como fracas propriedades mecânicas e alta solubilidade em água, o que limita sua faixa de aplicação. Todavia, o desempenho físico e microbiológico de filmes à base de gelatina de pescado podem ser melhorados através da combinação, em sua matriz, de outros materiais renováveis de resíduos marinhos, como quitosana e ácidos graxos.^{5,11-12}

A quitosana é um polissacarídeo amplamente utilizado devido à sua capacidade de formação de filme e propriedades antimicrobianas e antibactericidas, sendo um biopolímero funcional, renovável, atóxico e biodegradável,¹³ o que a torna um bom aditivo na fabricação de materiais para embalagens ativas.¹⁴ A quitosana, quando combinada

com a gelatina, pode proporcionar atividade antibactericida aos filmes e uma melhora nas propriedades mecânicas. Entretanto, a presença de seus grupos funcionais pode favorecer a atração de moléculas de água, causando um aumento na permeabilidade ao vapor de água,¹⁵⁻¹⁶ o que tornaria necessário a utilização de um componente hidrofóbico para reduzir a difusão de vapores através do filme e reduzir a interação entre o alimento e o ambiente externo. Sendo assim, o uso de sistemas multicomponentes é uma alternativa para produzir filmes biopoliméricos, onde proteínas e/ou polissacarídeos formam uma rede contínua e coesa, e o lipídio fornece as propriedades de barreira, adequadas para o controle do teor de umidade.¹⁷

O óleo de pescado é rico em ácidos graxos essenciais, como o ômega-3 e o ômega-6, o que o torna um produto valioso como matéria-prima para a produção de concentrados de ácidos graxos insaturados.¹⁸⁻¹⁹ O uso destes concentrados obtidos de óleo de pescado tem potencial de melhorar as propriedades de barreira ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofóbica, além de contribuir para a conservação de produtos alimentícios, principalmente produtos altamente perecíveis, como é o caso de filés de pescado.²⁰

Alimentos como filés de pescado, são altamente perecíveis por apresentarem algumas características, tais como, alto teor de água, menor proporção de tecido conjuntivo, alto teor de enzimas autolíticas, menor queda do pH após a morte e elevada microbiota. Essas peculiaridades propiciam uma rápida deterioração do pescado, sendo esta a responsável por grandes perdas durante o armazenamento *postmortem*. Diante disso, uma das maneiras de prolongar a vida útil de pescado é aplicar métodos de conservação adequados. Nesse sentido, os filmes biodegradáveis combinados com refrigeração vêm se destacando por promoverem melhorias na qualidade de alimentos, uma vez que os protege da deterioração biológica, física e química, resultando em uma vida útil prolongada e segura. Também por minimizarem o impacto ambiental, decorrente da utilização de embalagens derivadas de petróleo.²¹

Neste trabalho os biomateriais foram extraídos a partir de resíduos da indústria pesqueira, sendo a gelatina de peles de corvina, a quitosana de resíduos de camarão e os concentrados de ácidos graxos insaturados de vísceras de carpa. As blendas à base de gelatina de pescado, foram produzidas com a adição de quitosana com diferentes características de massa molar (M_v) e grau de desacetilação (GD) e posterior incorporação de ácidos graxos insaturados (AGIs), a fim de avaliar o efeito provocado pelas diferentes quitosanas, bem como a influência da adição de AGIs, na espessura (e),

resistência à tração (RT), alongamento na ruptura (AR), permeabilidade ao vapor de água (PVA), cor, superfície (MEV), grupos funcionais (FTIR), cristalinidade (DRX) e propriedades térmicas (DSC). Posteriormente, os filmes à base de gelatina de peixe, que apresentaram melhores resultados quanto às suas propriedades mecânicas e de permeação, foram avaliados quanto à inibição de bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus coagulase positiva*) e Gram-negativa (*Salmonella* sp.) na conservação de filés de merluza (*Merluccius hubbsi*).

1.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi a produção de filmes e blendas, produzidas a partir de biomateriais extraídos de resíduos da indústria pesqueira (gelatina, quitosana e concentrados de ácidos graxos insaturados), para aplicação como embalagens ativas na conservação de filés de peixe.

1.2. Objetivos específicos

- Extrair a gelatina de peles de corvina (*Micropogonias furnieri*);
- Extrair quitina a partir de resíduos de camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*), e produzir quitosana com diferentes características químicas (M_v e GD);
- Obter concentrados de ácidos graxos insaturados a partir do óleo extraído de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*);
- Produzir blendas à base de gelatina de peixe com e sem a adição de quitosana com diferentes características (M_v e GD), e avaliar o efeito destas nas propriedades físicas, químicas e antibactericidas dos filmes e das blendas produzidas;
- Incorporar concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs) nos filmes de gelatina e nas blendas de gelatina/quitosana e verificar o efeito da adição destes nas características dos filmes e das blendas;
- Avaliar os filmes e as blendas que apresentaram melhores propriedades mecânicas e de permeação, quanto às suas propriedades microbiológicas para as bactérias gram-positiva (*Staphylococcus coagulase positiva*) e gram-negativa (*Salmonella* sp.) na conservação de filés de merluza (*Merluccius hubbsi*).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Embalagens de alimentos

A necessidade de explorar o meio ambiente para obter recursos para produção de bens e serviços associada à disponibilidade de espaço para o descarte destes, é um dos principais problemas ambientais provocados pela sociedade. Devido ao considerável aumento no consumo de alimentos e bens duráveis pela população mundial, a geração de resíduos vem aumentando em ritmo acelerado. Segundo dados da Associação Brasileira de Embalagens (ABRE)²², no ano de 2016, o valor bruto da produção da indústria de embalagens no Brasil atingiu R\$ 64,34 bilhões, um aumento de 6,6% em relação a 2015. Os plásticos representam a maior participação no valor bruto da produção, correspondendo a 39,05% do total, seguido pelo setor de embalagens celulósicas com 36,51%, metálicas com 16,70% e vidro com 5,07%. O crescente volume de embalagens plásticas sintéticas, descartadas após consumo são cada vez maiores, deste modo faz-se necessário a integração de estudos na busca de novos materiais de fontes renováveis, metodologias e processos de fabricação de embalagens que, aliadas à sua funcionalidade na conservação do produto, possam contribuir com a não degradação do meio ambiente.²³

O uso de materiais plásticos vem aumentando cada vez mais devido às suas boas propriedades, acessibilidade, facilidade de processamento, leveza e baixo custo. Classicamente, os materiais plásticos são preparados por processo de polimerização por condensação ou polimerização de monômeros de diferentes hidrocarbonetos. No entanto, todos têm origem na indústria petroquímica, o que os torna não biodegradáveis e não renováveis.²⁴ Assim, há uma demanda crescente de matérias-primas baseadas em biomateriais, a fim de reduzir os problemas de eliminação de resíduos.²³ Contudo, novas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver embalagens que interajam com o produto e que possam também ser biodegradáveis, trazendo, portanto, uma vantagem adicional.²⁴

Muitas dessas embalagens tem sido desenvolvida a partir de matérias-primas naturais e renováveis, que se liguem a matriz polimérica como os aditivos funcionais incorporados. O uso de filmes e revestimentos biodegradáveis tem gerado um grande volume de pesquisas dentro da indústria de alimentos, devido ao potencial destes em fornecer ao ambiente, proteção, pelo aumento da biodegradação de embalagens, além

de evitar a deterioração dos alimentos. Desta forma, as pesquisas sobre embalagens estão tendo grande foco na elaboração de filmes e revestimentos principalmente à base de polímeros, como proteínas, polissacarídeos e lipídios derivados de fontes renováveis.²⁵

De acordo com Villadiego et al.,²⁶ os revestimentos biodegradáveis, podem ser classificados em três categorias de acordo com a sua composição:

- a) Hidrocoloidais. que são filmes à base de polissacarídeos ou proteínas, que apresentam baixa permeabilidade ao oxigênio, dióxido de carbono e lipídios e tem baixa barreira ao vapor de água;
- b) Lipídicos. São compostos de lipídios, os quais por sua natureza hidrofóbica, apresentam baixa permeabilidade ao vapor de água;
- c) Compostos. São à base de proteínas mais lipídios, ou polissacarídeos mais lipídios, ou proteínas, polissacarídeos e lipídios. Podem existir como camadas separadas, ou associados, em que os componentes são adicionados ao filme.

Na atualidade as pesquisas têm sido focadas nas embalagens compostas, porque combinam as vantagens de cada um dos componentes, reduzindo assim suas desvantagens frente aos filmes sintéticos.²⁶ Neste contexto, os biopolímeros, particularmente aqueles de recursos orgânicos renováveis, são considerados como substitutos promissores dos materiais plásticos não biodegradáveis. Todavia, o processo de produção desses filmes, apresenta custo elevado frente aos materiais sintéticos. Além disso, dependendo das condições ambientais a que são submetidos (temperatura e umidade relativa), filmes e/ou recobrimentos apresentam altas taxas de degradação, que podem resultar em mudanças consideráveis nas suas propriedades funcionais. O desafio para o uso bem-sucedido de filmes comestíveis e embalagens produzidas a partir de polímeros biodegradáveis é alcançar filmes com maior estabilidade químicas e físicas, adequada resistência à ruptura e à abrasão permitindo uma boa proteção do alimento sem perder qualidade por manuseio, devem ser flexíveis o suficiente para se adaptar às eventuais deformações sem danos mecânicos e servir de barreira ao transporte de água, oxigênio e soluto para os alimentos.²⁷

Contudo, embora muitos estudos tenham foco na melhoria dos aspectos de formação de filmes de biopolímeros e estes estarem apresentando um bom progresso, algumas propriedades físicas, estruturais, térmicas, mecânicas e atividade antimicrobiana, não foram superadas até o momento.²³

2.2. Embalagens ativas

O atual estilo de vida do consumidor requer um aumento progressivo da vida útil de alimentos, sem prejuízo ou perda das suas propriedades e com garantia de segurança e qualidade.²⁸ Por esta razão, o desenvolvimento de novos sistemas de conservação de alimentos que contribuam para esse fim é cada vez mais importante. Várias técnicas são utilizadas para retardar a deterioração de alimentos, tais como atmosfera modificada, embalagem a vácuo, processos de esterilização e congelamento. No entanto, tecnologias emergentes, a exemplo das embalagens ativas, constituem uma alternativa promissora de extensão da vida útil do produto embalado. Essas embalagens aumentam a possibilidade de produção de alimentos parcial ou totalmente livres de conservantes e microbiologicamente seguros.²⁹

As inovações tecnológicas buscam transpor o conceito tradicional de embalagem – uma barreira inerte que contém, mantém e conserva alimentos. Ao longo dos anos, vários estudos foram conduzidos para o desenvolvimento de embalagens ativas que, além de protegerem, interagem com o produto.³⁰ O termo embalagem ativa foi utilizado pela primeira vez por Labuza,³¹ e é definido como uma categoria de embalagem que exerce um papel adicional na preservação de alimentos, que não somente o de barreira inerte contra influências externas.³² Segundo a Comissão Reguladora (EC) n. 450/2009 (*European Commission*),³³ as substâncias responsáveis pela função ativa incluídas em uma embalagem são associadas para estender a vida útil ou para manter ou melhorar as condições de embalagem de alimentos. Esse novo conceito foi introduzido em resposta às mudanças contínuas nas demandas dos consumidores e nas tendências de mercado.³⁴ As embalagens ativas incluem os absorvedores de oxigênio e etileno; eliminadores e emissores de CO₂; enzimas; controladores de umidade, sabor e odor; agentes antimicrobianos e antioxidantes, entre outros.³⁰ Contudo, o desafio na busca de formas inovadoras de inibição do crescimento microbiano nos alimentos, mantendo sua qualidade, frescor e segurança, apontou para o desenvolvimento de uma embalagem que incluísse materiais com propriedades antimicrobianas na sua constituição.³⁵

Na embalagem antimicrobiana, o produto e o ambiente interagem para prolongar a “fase *lag*”, que se caracteriza por não ocorrer crescimento ou mesmo um declínio da cultura, e/ou reduzir a taxa de crescimento dos microrganismos. Essa categoria de embalagem ativa representa uma alternativa à incorporação direta de aditivos no produto e os problemas associados a essa prática.³⁶

2.2.1. Filmes ativos antimicrobianos

A aplicação direta de substâncias antimicrobianas na superfície de alimentos tem benefícios limitados, uma vez que os ativos podem ser neutralizados no contato e/ou difundir-se rapidamente da superfície para o interior dos alimentos.³⁷ A incorporação de agentes antimicrobianos durante a preparação de alimentos pode resultar na sua interação, com conseqüente redução da atividade desses agentes e efeito limitado sobre a microflora presente.³⁸ A utilização de filmes poliméricos incorporados de aditivos, por sua vez, permite uma migração mais lenta dos agentes a partir do material da embalagem para a superfície do produto, auxiliando na manutenção das concentrações do agente antimicrobiano por mais tempo.³⁹ Os filmes ativos antimicrobianos podem ser preparados a partir de macromoléculas obtidas a partir de subprodutos e resíduos que apresentem boas propriedades de formação de filme, como é o caso de proteínas e polissacarídeos.³⁴ Filmes preparados a partir de proteínas, polissacarídeos, e lipídios apresentam potencial para incorporação de ativos antimicrobianos.

Em todo o mundo o desperdício e os resíduos de pescado chegam a totalizar cerca de 70% da produção. Sendo assim, devido as grandes possibilidades que estes biomateriais apresentam, é de grande importância que a estes seja dada a sua devida atenção, visto que seus reaproveitamentos, além de reduzirem o desperdício, agregam valor, aumentam os lucros, e reduzem os danos ambientais, sem que haja a necessidade de altos investimentos, no desenvolvimento de novas rotas sintéticas, como novos processos de polimerização quando comparados a polímeros derivados de petróleo. Dessa maneira, as blendas biopoliméricas são uma versátil solução tecnológica para se obter materiais com as mais diversas especificações a um custo relativamente baixo por meio de combinações de materiais com propriedades de interesse.⁴⁰

Neste contexto, podemos utilizar como exemplo as proteínas, que são heteropolímeros que geralmente contêm mais de 20 aminoácidos, que permitem um número enorme de arranjos sequenciais com uma ampla gama de interações.⁴¹ Em contraste, os polissacarídeos contêm apenas alguns monômeros que são capazes de participar destas interações, mas que apresentam excelente capacidade de formação de filme.⁴² Nos polissacarídeos, a hidroxila e a amina são os grupos mais reativos, enquanto que nas proteínas estão presentes uma grande variedade de grupos funcionais que podem participar de interações e reações químicas através de ligações covalentes (peptídicas e dissulfureto) e interações não covalentes (ligações iônicas, hidrogênio e

van der Waals).⁴³ Considerando todas essas possibilidades, além de proteínas e polissacarídeos, ainda podem ser adicionados outros aditivos, como ácidos graxos.

2.2.2. Filmes ativos à base de biomateriais

O interesse no desenvolvimento de filmes ou blendas a partir de polímeros biodegradáveis está associado tanto à possibilidade da redução do uso de materiais sintéticos que degradam lentamente no meio ambiente, como a oportunidade para utilizar matérias-primas renováveis, principalmente as derivadas de resíduos, na produção de filmes.⁴⁴ Neste sentido, a produção de blendas, formadas a partir da combinação de biomateriais, tem a finalidade de melhorar propriedades físicas, químicas e mecânicas; aumentar a taxa de biodegradação, e reduzir o custo total do material.⁴⁵ Desta maneira, os componentes das blendas devem ser selecionados de tal maneira que o componente principal compense o custo e sobretudo as deficiências dos demais, e que estes satisfaçam as propriedades de interesse para as futuras aplicações.

No entanto, em alguns casos, os fracos atributos físicos, bem como propriedades impróprias de barreira ao vapor de água, em comparação com materiais plásticos derivados de petróleo, restringem seu uso comercial.⁴⁶ Sendo assim, várias pesquisas estão sendo realizadas para impulsionar novos procedimentos destinados a melhorar as propriedades de filmes baseadas em biopolímeros, incluindo modificações químicas, adição de plastificantes, mistura de diferentes polímeros biodegradáveis, inclusão de nano partículas e adição de emulsificantes para melhorar a miscibilidade de alguns polímeros incompatíveis.⁴⁷ A Tabela 1 apresenta alguns filmes produzidos a partir de diferentes biomateriais e sua aplicação na indústria de alimentos.

Conforme a Tabela 1 nota-se que é intensa a busca por novos compósitos de materiais para aplicações na indústria de alimentos, principalmente no que se refere a embalagens ativas contra microrganismos e que evitem ou diminuam a transferência de gases como o vapor de água da atmosfera para o alimento. Além das propriedades de conservação dos produtos embalados, estes filmes possibilitam a liberação e o transporte de substâncias que melhorem as propriedades nutricionais dos alimentos. Como os filmes biodegradáveis são produzidos a partir de materiais que são biocompatíveis e atóxicos, estes além de protegerem os alimentos contra os agentes externos, ainda podem ser ingeridos juntamente com estes, diminuindo a geração de resíduos. Além disso, observa-se também, que no campo específico da pesquisa de

proteínas, o interesse pelos materiais à base de gelatina aumentou nos últimos anos,⁶⁰ principalmente devido a abundância, disponibilidade e baixo custo.

Tabela 1. Filmes e blendas a partir de biomateriais para aplicação na indústria de alimentos

| Material | Aplicação | Referência |
|---|---------------------------------|------------|
| Gelatina/amido de milho | Conservação de filés de salmão | 48 |
| Gelatina/óleo essencial de canela | Embalagem ativa | 49 |
| Gelatina/Aloe Vera | Embalagem ativa | 50 |
| Gelatina/quitosana/óleo essencial de <i>Ziziphora</i> | Embalagem ativa | 8 |
| Gelatina/quitosana | Conservação de camarão | 51 |
| Quitosana/extrato de semente de uva/carvacrol | Embalagem ativa | 7 |
| Quitosana/óleo essencial/antioxidante | Embalagem ativa | 9 |
| Quitosana/fibra de milho | Conservação de morango | 52 |
| Gelatina/quitosana/antioxidante | Embalagem ativa | 53 |
| Gelatina/nano quitina/óleo de milho | Embalagem ativa | 54 |
| Gelatina/óleo de oliva | Conservação de filés de salmão | 55 |
| Gelatina/extrato de boldo-do-chile | Embalagem ativa | 56 |
| Gelatina/óleo de côco | Embalagem ativa | 57 |
| Gelatina/curcumina | Embalagem inteligente | 58 |
| Gelatina/óleo essencial de pau rosa | Conservação de uva pós-colheita | 59 |

As gelatinas são insumos de qualidade alimentar com excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade,⁶¹ por isso possuem um grande

potencial como filmes comestíveis.⁶²⁻⁶³ Além disso, estes podem ser usados como portadores de componentes bioativos. Os filmes à base de gelatina oferecem características valiosas para a produção de embalagens de alimentos devido à sua transparência e excelentes propriedades de barreira contra o O₂, CO₂ e lipídios.⁶⁴ Além disso, as proteínas são heteropolímeros que contêm uma grande variedade de grupos funcionais, que podem funcionar como excelentes veículos para incorporar uma ampla variedade de aditivos, como nutrientes, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos e sabores.⁶⁵ Uma das principais reações de deterioração nos alimentos ocorrem durante os diferentes estágios da cadeia alimentar, como embalagem e armazenamento, e contribuem para o desenvolvimento da rancidez. Além disso, o crescimento microbiano leva à deterioração da qualidade dos alimentos, incluindo textura, aparência e mudanças de cor, odores desagradáveis, sabores estranhos, perdas nutricionais e formação de polímeros oxidados e compostos potencialmente tóxicos que podem ser amenizados com a utilização de embalagens funcionais como é o caso dos filmes à base de gelatina.⁶⁶

Uma das tendências atuais na indústria de alimentos consiste na substituição de aditivos químicos e materiais de embalagem por compostos naturais, especialmente na área de segurança e preservação de alimentos. Em resposta a essa exigência do consumidor, o conceito inovador de embalagem ativa parece ser uma estratégia interessante. A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, o segundo biopolímero mais abundante (após a celulose) que é encontrado no exoesqueleto de crustáceos e paredes celulares de fungos. É um material bastante interessante porque possui propriedades antimicrobianas em conjunção com seu caráter catiônico e suas propriedades formadoras de filmes. A combinação de quitosana e gelatina de pescado para produzir filmes é propícia de ser estudada, pois combina o uso de matérias-primas, em que uma delas apresenta propriedades interessantes além da capacidade de formação de filmes.⁶

Já a adição de uma fração lipídica, esta vem sendo bastante explorada em filmes multicomponentes para embalagens ativas, pois além de reduzirem o transporte ao vapor de água, estes apresentam propriedades antibactericidas. No entanto, pode-se observar na Tabela 1, que na maioria dos estudos, são utilizados óleos essenciais como fração lipídica. Todavia, uma característica importante que deve ser considerada é que esses óleos são liberados gradativamente ao longo do tempo, e esse é um parâmetro chave para permitir uma inibição microbiana boa e adequada. Além disso, trabalhos

recentes têm relatado o uso de técnicas alternativas para a incorporação desses aditivos em gelatina utilizando micro ou nano-encapsulamentos com o objetivo de melhorar e controlar sua taxa de liberação.⁶ Dessa maneira, uma alternativa aos óleos essenciais, são os ácidos graxos insaturados, que além de melhorar as propriedades de permeação e propriedades antibactericida, este pode ser transportado para o alimento, promovendo uma melhora também nas propriedades nutricionais do produto embalado.

2.2.2.1. Filmes à base de gelatina de peixe

A gelatina possui propriedades funcionais distintas que podem ser divididas em dois grupos. (i) propriedades associadas ao comportamento da superfície, como função protetora, formação de emulsão e espuma, aderência e coesão, e capacidade de formação de filme; e (ii) propriedades relacionadas ao comportamento de gelificação, como a formação de gel, espessamento, texturização e capacidade de ligação à água.⁶ Portanto, um grande número de aplicações pode ser obtido, como; nas indústrias de alimentos, embalagens, farmacêuticas e cosméticas.⁶⁷

No entanto, quando são produzidos filmes para embalagens de alimentos, estes apresentam estabilidade térmica limitada e fracas propriedades mecânicas, que acabam limitando suas potenciais aplicações nesta área.⁶ Além disso, a gelatina é altamente higroscópica, o que limitaria também a sua utilização em alimentos com elevado teor de umidade.

Os fatores que devem ser considerados ao projetar esse tipo de sistema incluem a natureza química dos alimentos a serem embalados, mecanismos de liberação controlada, revestimentos organolépticos alimentares, incluindo agentes antimicrobianos, antioxidantes e outros que podem melhorar as características biológicas e toxicidade, armazenamento e distribuição de aditivos, físicos e mecânicos.⁶⁸ Conseqüentemente, diferentes tipos de polímeros e/ou aditivos podem ser adicionados para melhorar ou modificar as propriedades finais, a fim de obter filmes ou revestimentos adequados à base de gelatina para embalagens de alimentos.

Estes componentes são geralmente combinações de diferentes polímeros, como é o caso da gelatina e da quitosana e a adição de lipídios que apresentem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Essas modificações tem a finalidade de reduzir o uso de aditivos químicos sintéticos na indústria de alimentos e substituí-los por aditivos alimentares naturais, sem efeitos negativos sobre a saúde humana. Estes aditivos

naturais são capazes de prevenir ou reduzir a deterioração dos alimentos causados pela oxidação ou efeitos microbiológicos, ajudando assim a preservar e prolongar a vida útil.²⁸

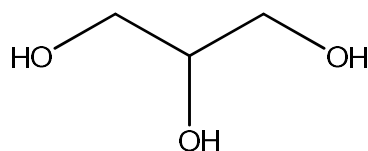
2.2.2.1.1. Agentes plastificantes

Os plastificantes são uma classe importante de compostos não voláteis de baixa massa molar que são amplamente utilizados em indústrias de polímeros como aditivos.⁶⁹ O principal papel dessas substâncias é melhorar a flexibilidade e a capacidade de processamento dos polímeros, através do aumento do espaço entre as cadeias, porque provocam a diminuição das forças intermoleculares e aumentam a flexibilidade e extensibilidade do material.⁷⁰ O conselho da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) define um plastificante como "uma substância ou material incorporado em um material (geralmente um plástico ou elastômero) para aumentar sua flexibilidade, trabalhabilidade ou distensibilidade".

A concentração de plastificante usado na elaboração de filmes geralmente varia de 10 a 60 g/100 g de matéria seca de polímero, dependendo da flexibilidade desejável no filme, pois quando adicionados à solução de gelatina, estes competem com as ligações de hidrogênio existentes ao longo das cadeias dos polímeros, causando um afastamento entre estas estruturas.⁷¹

O plastificante mais amplamente utilizado em filmes para embalagens alimentícias é o glicerol, devido ao baixo custo e por normalmente apresentar boa miscibilidade com os polímeros e os solventes, comumente utilizados no preparo de filmes e blends, devido a quantidade de hidroxilas presentes na sua estrutura.⁷² A Figura 1 apresenta a estrutura química da molécula de glicerol.

Figura 1. Estrutura química do glicerol



2.2.2.1.2. Gelatina

2.2.2.1.2.1. A corvina (*Micropogonias furnieri*)

A corvina, *Micropogonias furnieri*, é uma espécie de ampla distribuição geográfica, característica das regiões tropical e subtropical. Ocorre desde a Península de Yucatán no México, ao longo das Antilhas, na costa meridional do Caribe e América do Sul até o

Golfo de San Matias, na Argentina.⁷³ No Brasil a corvina é encontrada em toda a costa, sendo abundante nas Regiões Sudeste e Sul e constitui a parcela comercial mais importante entre os peixes demersais desembarcados.⁷⁴ Em volume, a corvina ocupa o 2º lugar entre os peixes costeiros de valor comercial e devido à sua abundância, é considerada uma das espécies mais tradicionais e importantes da pesca brasileira. Segundo o boletim estatístico de 2011 do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a pesca extrativa marinha no país foi de 43.191 toneladas, já no Rio Grande do Sul foi de 28.455 toneladas, deste total 6.968 toneladas foi de corvina.⁷⁵

A corvina atinge a maturidade com 30 cm, atingindo um comprimento máximo de 60 cm e um peso de 6 kg. O destino principal da corvina é o mercado interno, sendo vendida inteira ou em postas, enquanto para o mercado externo como Estados Unidos e Europa é vendida somente inteira. A Figura 2, apresenta a imagem fotográfica da corvina da boca branca (*Micropogonias furnieri*).

Figura 2. Corvina (*Micropogonias furnieri*)



Fonte. (FAO)¹⁴⁴

De acordo com Stevanato et al.,⁴ da captura mundial de pescado, aproximadamente 72% é utilizado no mercado de peixe fresco, congelado, empanado, enlatado, etc. Os 28% restantes ou são utilizados no preparo de rações ou são desperdiçados como resíduos. No Brasil, aproximadamente 50% da biomassa capturada é descartada durante o processamento. O descarte inadequado do resíduo em corpos hídricos torna disponível no ambiente, grande quantidade de material orgânico oxidável que favorece o crescimento e desenvolvimento de bactérias aeróbias. Estas utilizam o oxigênio disponível no meio aquático, provocando a diminuição da concentração de oxigênio disponível na água, o que leva à morte por asfixia, dos animais desse ambiente aquático. A poluição ambiental e a gestão inadequada dos resíduos agroindustriais são fatores a serem considerados como indicativos de ineficiência produtiva, pois para o alcance da máxima eficiência é imprescindível explorar os recursos de todo o processo produtivo.⁷⁶

2.2.2.1.2.2. Descarte de resíduos e problemas ambientais

Definidos como sobras do processamento de alimentos, de baixo valor comercial, os resíduos não são aproveitados ao final do processamento do pescado. Desse modo, aproximadamente 120 milhões t/ano de resíduos de pescado (ossos, pele, nadadeira, vísceras e cabeça) são descartados indevidamente no ambiente.⁷⁷ O aproveitamento de resíduos traz vantagens econômicas e de conservação de energia nos processos industriais. Estes resíduos sólidos, diferentemente do lixo, possuem valor econômico agregável, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo, pois podem conter muitas substâncias de valor significativo.⁷⁸

Uma estratégia interessante para a indústria pesqueira na redução de resíduos é a recuperação de determinados nutrientes, comercializáveis na forma de subprodutos a partir destes resíduos. Atualmente, parte de resíduos de pescados são utilizados para alimentação de peixes ou porcos, para produção de fertilizantes orgânicos e fabricação de farinha.⁷⁹ Entretanto, é possível otimizar as receitas ao se utilizar os resíduos de pescados para extração de colágeno,⁸⁰ gelatina,⁸¹ óleo⁸² e filmes biodegradáveis⁸³ para agregar maior valor comercial a estes subprodutos.

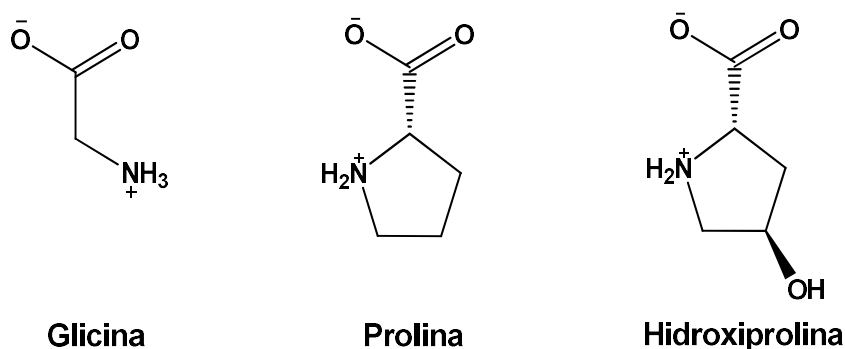
2.2.2.1.2.3. Colágeno: características químicas e extração

Precursor da gelatina, o colágeno é a maior proteína estrutural, e constitui aproximadamente 30% das proteínas totais de organismos multicelulares, contribuindo para as funções fisiológicas de tecidos conjuntivos em peles, tendões, ossos e cartilagens, além de estar associada à tenacidade muscular. É a única proteína fibrosa e insolúvel em água, com elevada resistência à tração e grande estabilidade.⁸⁴ O colágeno é uma proteína estrutural abundante em todos os animais. Nos seres humanos, o colágeno compreende cerca de uma quinta parte da proteína total, é responsável por três partes do peso seco da pele e é o componente mais prevalente da matriz extracelular.

O nome colágeno é usado como um termo genérico para proteínas que formam uma hélice tripla de três cadeias. Há pelo menos 29 tipos de colágeno identificados, cada um diferindo consideravelmente na sua sequência, estrutura e função. Os tipos I, II e III são os mais abundantes do organismo, sendo o tipo I predominante, com massa molar em torno de 195 kDa, e composto por duas cadeias idênticas denominadas α_1 e uma terceira cadeia α_2 de estrutura primária diferentes.⁸⁵

Independente dos diferentes tipos, cada fibra de colágeno consiste em três cadeias polipeptídicas envoltas umas nas outras, que apresenta elementos estruturais nas formas primária, secundária e terciária. Também apresenta estrutura quaternária, similar a outras proteínas oligoméricas que se caracterizam por terem múltiplas cadeias ou subunidades polipeptídicas. A estrutura primária do colágeno animal é constituída por cerca de 1050 aminoácidos ligados na forma de cadeias onde cada uma delas, contém cerca de 330 unidades da sequência geral glicina–X–Y.⁸⁶ A glicina sozinha constitui aproximadamente 33% do conteúdo de aminoácidos do colágeno, enquanto a prolina e hidroxiprolina juntas constituem cerca de 22%. A prolina assume a posição X, na sequência geral, e a hidroxiprolina quase sempre ocorre na posição Y. Os 45% restantes da composição de aminoácidos são distribuídos nas posições X e Y, com certas combinações sendo favorecidas por efeitos estéricos e eletrostáticos.⁸⁷ A Figura 3 apresenta a estrutura química dos principais aminoácidos constituintes do colágeno.

Figura 3. Principais aminoácidos constituintes do colágeno



Fonte. (Campbell & Farrell).⁸⁶

A tripla hélice é organizada para que cada terceiro resíduo da cadeia α seja a glicina, e que em cada cadeia, esta esteja no interior da hélice, pois apenas ela é pequena o suficiente para acomodar-se no espaço disponível e promover o efeito espiralado. Já a prolina e a hidroxiprolina são responsáveis pela estrutura secundária única do colágeno, pois limitam a rotação da cadeia polipeptídica e, assim, contribuem para a estabilidade da tripla hélice.⁸⁸ Essas 3 cadeias α (duas cadeias α_1 e uma α_2) formam uma molécula trifilamentar, denominada tripla-hélice e a superposição de várias tripla-hélices produz as fibras de colágeno, estabilizadas por ligações cruzadas, formando assim uma estrutura de rede tridimensional.

Na tripla-hélice as ligações de hidrogênio estão ausentes e, em vez disso, cada uma das três hélices é estabilizada pela repulsão estérica dos anéis pirrolidona das

cadeias laterais de prolina e hidroxiprolina. Os anéis pirrolidona se mantêm longe um do outro quando a cadeia peptídica assume essa forma helicoidal, que é muito mais aberta que a α -hélice firmemente enrolada. As três fitas se enrolam em torno da outra, formando um cabo helicoidal. A distância axial por aminoácido nessa superfície é de 2,9 Å e há aproximadamente três aminoácidos por giro. Os três filamentos formam ligações de hidrogênio um com o outro. Os doadores de hidrogênio são os grupamentos –NH peptídicos das glicinas e os aceptores são os grupamentos –CO peptídicos das outras cadeias. As hidroxilas da hidroxiprolina também participam das ligações de hidrogênio.⁶³

Como essas ligações entre as α -hélices são fracas, um pré-tratamento químico razoavelmente leve é suficiente para quebrar as ligações não covalentes de modo a desorganizar a estrutura da proteína, produzindo assim um inchaço adequado e consequente solubilização do colágeno.⁸⁹ O tratamento térmico subsequente cliva o hidrogênio e as ligações covalentes para desestabilizar a tripla hélice, resultando em transição hélice–bobina e conversão em gelatina.⁹⁰

2.2.2.1.2.4. Gelatina: características químicas e obtenção

A gelatina é o produto de desnaturação térmica ou desintegração do colágeno insolúvel.⁹¹ Dependendo da fonte de colágeno e do processo de obtenção, a gelatina apresenta diferentes massas molares e diferentes pontos isoelétricos. O colágeno existe em muitas formas diferentes, mas a gelatina só é derivada de fontes ricas em colágeno do Tipo I. As matérias-primas mais utilizadas para a extração de colágeno e produção de gelatina são peles suínas e bovinas, no entanto fontes alternativas como peles de pescado, ossos e barbatanas vêm sendo bastante explorada nas últimas décadas, principalmente devido às restrições religiosas e culturais.⁹² Além disso, há a preocupação com a contração da encefalopatia espongiiforme bovina, comumente conhecida como doença da vaca louca, que é uma enfermidade degenerativa fatal e transmissível do sistema nervoso central de bovinos, com longos períodos de incubação.⁹³

Dependendo da fonte do colágeno, a composição de aminoácidos da gelatina é ligeiramente diferente, como por exemplo, os aminoácidos de gelatina obtida de pele de suíno não contêm cisteína, e as gelatinas de pele de pescado tem menor teor de glicina em comparação com fontes proveniente de mamíferos.⁹⁴

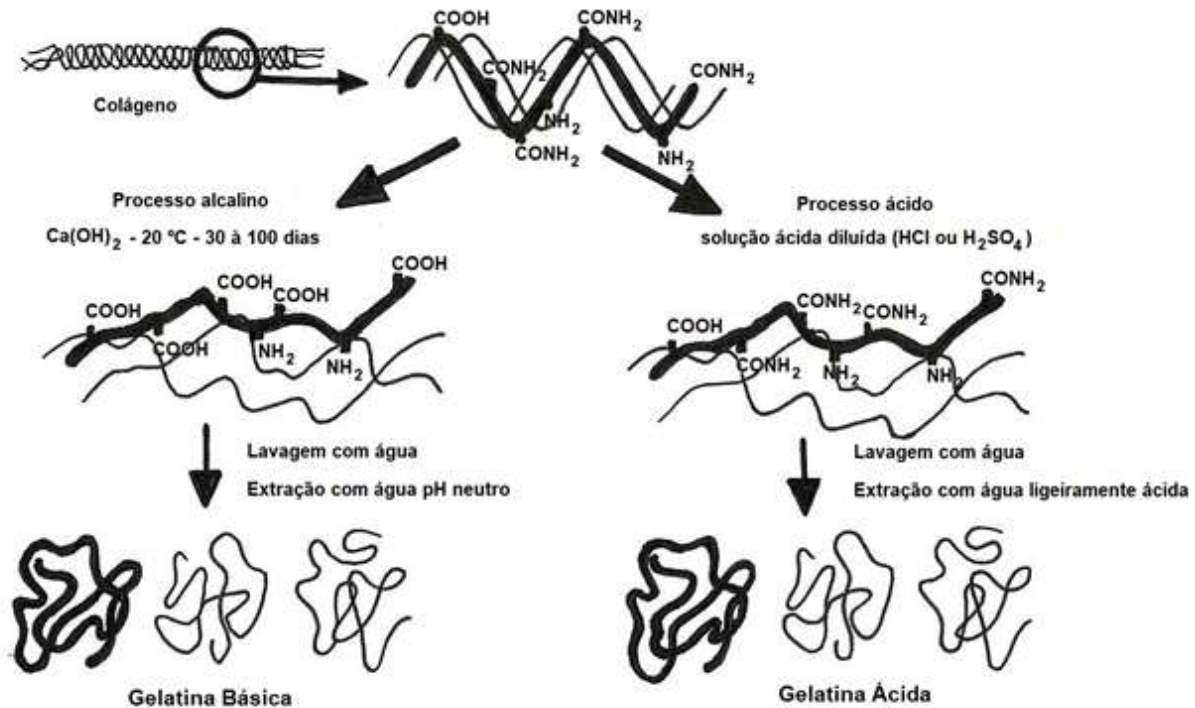
Na obtenção de gelatina, o pré-tratamento ácido e/ou alcalino da matéria-prima é utilizado para remover componentes não colagenosos e intumescer o colágeno,

desnaturando assim a molécula, e a extração é realizada com elevação da temperatura da água.⁶³ Quando se alcança a temperatura crítica, ou seja, a temperatura de encolhimento ou retração, as fibrilas do colágeno encolhem pelo menos um terço do seu comprimento original, sendo esta temperatura característica da espécie da qual se deriva o colágeno. Este encolhimento desorganiza as fibras e ocorre o colapso da arquitetura helicoidal das subunidades polipeptídicas da molécula de colágeno.⁸⁵ Sendo assim, a desnaturação é caracterizada pelo desenrolamento da estrutura em tripla-hélice em cadeias individuais solúveis, ou pequenos polímeros ou fragmentos.⁹⁵ O tratamento térmico cliva as ligações de hidrogênio e ligações covalentes, desestabilizando a tripla-hélice, resultando na conversão em gelatina solúvel.⁹⁶⁻⁹⁷

As etapas do processo de obtenção da gelatina são determinadas em função da matéria-prima e do tipo de gelatina, por estes motivos, podem sofrer variações. O processo simplificado, no entanto, consiste em três etapas. pré-tratamento da matéria-prima, extração da gelatina e purificação/secagem.⁶³ Após o processo de obtenção é possível distinguir dois tipos de gelatina. Gelatinas obtidas por hidrólise em pH ácido são classificadas como gelatina tipo A (ponto isoelétrico variando de 6,0–9,5), e gelatinas obtidas por hidrólise em pH básico (ponto isoelétrico variando de 4,5–5,6) são classificadas como gelatinas tipo B.⁹⁸ A Figura 4 apresenta os dois principais tipos de extração de gelatina.

Durante o processo de desnaturação, a organização de hélice tripla do colágeno é hidrolisada nos locais em que as ligações cruzadas covalentes se juntam aos três peptídeos, que no caso da gelatina do tipo B, leva à polidispersão, pois a base quebra uma das ligações cruzadas iniciais (piridinolina) e, como resultado, ao aquecer as cadeias α do colágeno estas são desnaturadas em solução. Durante o processo ácido, a desnaturação de colágeno é limitada à hidrólise térmica de ligações peptídicas, com uma pequena quantidade de material de cadeia α de colágeno solúvel em ácido.¹⁰⁰

Figura 4. Métodos de extração de gelatina dos tipos A e B



Fonte. Adaptado de (Gorgieva & Kokol).⁹⁹

Ao resfriar, as cadeias de gelatina podem rebobinar, mas não dentro do registro correto, e os pequenos segmentos triplos formados podem agregar-se ainda mais durante a formação do gel.¹⁰¹ A formação de hidrogel, acompanhada de um rearranjo de ordem desordenada em que as cadeias de gelatina recuperam parcialmente a estrutura de colágeno de tripla hélice, leva à formação de gelatina renaturada com regiões principais amorfas de cadeias de gelatina aleatoriamente enroladas interligadas com domínios de microcristalitos ordenados espacialmente, estabilizados por hidrogênio nas ligações entre N-H da glicina e C=O da prolina. A estabilização da conformação molecular e das interações entre hélices são uma consequência da existência de um reservatório de hidratação altamente ordenado com pontes de água que ligam dois grupos dentro das mesmas ou diferentes cadeias de gelatina. Assim, devido a essa estrutura particular, a gelatina apresenta excelente estabilidade, capacidade de ligação à água, emulsificação, formação de espuma, formação de gel e propriedades filmogênicas.^{97, 102}

2.2.2.1.2.5. Gelatina de peixe

Cerca de 45% da produção mundial de gelatina é obtida a partir de pele de suínos, seguida de peles bovinas com quase 30%⁶³ e 23% de gelatina é obtida a partir de ossos

bovinos e suínos. Outras fontes incluem frango e peixe, mas estas representam apenas 1,5% da produção anual de gelatina no mundo.

Estudos recentes mostraram que as peles de pescado, especialmente, pode ser uma fonte alternativa para produção de gelatina, pois os subprodutos valiosos provenientes da indústria da pesca e a redução dos resíduos tornaram-no um tema de pesquisa atraente. À medida que as questões de sustentabilidade e o melhor uso dos recursos colhidos tornam-se mais críticos, a necessidade de usar os resíduos de pescado de forma mais produtiva vem só aumentando. Os resultados globais sugerem que a pele de pescado pode ser uma matéria-prima alternativa para a produção de gelatina de alta qualidade, eliminando as preocupações religiosas compartilhadas pelas comunidades judaica e muçulmana, e também fornecendo uma maneira alternativa e lucrativa de usar alguns subprodutos da pesca,¹⁰³ melhorando assim a sustentabilidade geral do setor pesqueiro.

Entretanto, muitas vezes as gelatinas extraídas de peles de pescado apresentam coloração mais escura e odor característico da matéria-prima em relação a gelatina tradicional de mamíferos.¹⁰⁴ Além disso, uma das principais características que definem a qualidade da gelatina são os teores de prolina e hidroxiprolina encontrados no colágeno, que nos mamíferos apresenta valores próximos a 24% e no pescado encontra-se em torno de 16–18%.⁹¹ Os percentuais mais elevados são encontrados no colágeno de pescados de águas quentes, que normalmente, apresentam maior teor de prolina e hidroxiprolina que o de espécies de águas frias.¹⁰⁵ Sendo assim as propriedades das gelatinas obtidas a partir de peles de pescado de águas quentes são consideradas mais próximas das de mamíferos do que as de pescados de águas frias.¹⁰⁶

Quanto ao grau de reticulação, este é quem determina o método de pré-tratamento do colágeno na matéria-prima, e devido à instabilidade da reticulação em colágenos imaturos, tais como os encontrados nas peles de pescados, o tratamento ácido ou alcalino suaves são suficientes para efetivar a conversão do colágeno em gelatina.⁹⁷ Os procedimentos utilizados para o preparo de gelatina de pescados envolvem, tipicamente, um pré-tratamento químico suave da matéria-prima e as condições de temperatura durante o processo de extração são mais brandas que as utilizadas na extração de gelatina de mamíferos.⁶³

2.2.2.1.2.6. Caracterização da Gelatina

As propriedades funcionais da gelatina podem ser divididas em duas categorias. A primeira categoria abrange aqueles que estão associados às propriedades de gelificação (força do gel, viscosidade e pontos de gelificação e fusão), enquanto a segunda categoria inclui as propriedades relacionadas ao comportamento superficial da gelatina (formação de espuma, emulsão, formação de filme, etc.).⁸⁸ Embora ambas as categorias sejam consideradas importantes na avaliação das propriedades funcionais da gelatina, o foco na avaliação dos diferentes métodos para a extração de gelatina considera principalmente a avaliação da primeira categoria, justamente por definirem suas aplicações.

2.2.2.1.2.6.1. Força do gel

A principal propriedade gelificante que determina a qualidade das gelatinas comerciais é a força do gel.¹⁰⁷ De acordo com Schrieber & Gareis,⁸⁸ a força do gel é altamente dependente da proporção de frações com massa molar de aproximadamente 100 kDa, e proporcional ao tamanho das cadeias α .¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ A força de gel, também conhecida como valor Bloom na indústria de gelatina, é definida como o peso em gramas necessários para um êmbolo cilíndrico de 12,7 mm de diâmetro, penetrar 4 mm em um gel de gelatina previamente preparado (concentração final de 6,67% m/m) maturada a 10°C por 16–18 h.⁸⁸ Os valores de Bloom da maioria das gelatinas comerciais variam de 80–320 g. Geralmente, as gelatinas com um valor Bloom <150 g são caracterizadas como Bloom baixo, enquanto que aqueles com um valor de Bloom variando de 150–220 g e > 220 g são caracterizados como Bloom médio e alto, respectivamente.¹⁰⁷

Em geral, gelatinas com valores de Bloom de 250–260 g são os produtos mais desejáveis. Foram relatados valores elevados de resistência ao gel para a gelatina a partir de peles de espécies de peixes quentes, como a tilápia¹¹⁰ e a carpa¹¹¹. A gelatina de espécies de água fria não forma um gel à temperatura ambiente ou produzem géis muito macios e instáveis¹¹² e podem permanecer líquidos a 10°C (condições de teste de Bloom), o que poderia restringir seu uso no setor de alimentos. Os valores de Bloom de 70 a 110 g foram obtidos a partir de gelatina extraída de bacalhau, salmão e pescada.^{90, 105, 110}

As diferenças acima mencionadas na força do gel foram atribuídas à variabilidade do conteúdo de prolina e hidroxiprolina no colágeno de várias espécies e à temperatura variável do *habitat* do animal vivo.¹¹³ Vale ressaltar que, devido às limitações da amostra

e à falta de gelificação à 10°C, parte da pesquisa é feita usando condições não padrão e, portanto, é obtida uma força de gel específica para a condição, ao invés de uma força de Bloom.

2.2.2.1.2.6.2. Viscosidade

A viscosidade é a segunda propriedade física comercialmente importante da gelatina, e as medidas de viscosidade são geralmente conduzidas acima das temperaturas de gelificação das preparações de gelatina. Avena–Bustillos et al.¹¹⁴, estudaram a viscosidade das preparações de gelatina a partir de mamíferos e peixes às temperaturas de teste iniciais de 35 e 25°C, respectivamente, considerando suas diferenças na temperatura de gelificação. A viscosidade de uma solução de gelatina concentrada depende das interações hidrodinâmicas entre moléculas de gelatina. Os comportamentos de fluxo de soluções de gelatina do *Acipenser schrenckii* em função da concentração (1,3 e 5% m/v) e temperatura (10, 30, 45 e 60°C) indicaram um comportamento pseudoplástico não–newtoniano, a 10°C e solução de gelatina a 5% (m/v).¹¹⁵ No entanto, Wulansari et al.¹¹⁶, relataram, usando gelatina de pele de pescado com Bloom 225 g em diferentes concentrações (0,5–3,5% m/v), que as soluções de gelatina resultantes mostraram um comportamento newtoniano a 50°C.

As viscosidades para gelatinas comerciais variam de 2 a 7 cP. Segundo, Karayannakidis & Zotos,¹⁰⁷ as soluções de gelatina de baixa viscosidade produzem géis frágeis, enquanto que as soluções de gelatina de alta viscosidade produzem géis rígidos e extensíveis. Haug et al.,¹⁰⁸ relataram que a viscosidade intrínseca de gelatinas do tipo A, produzidas a partir de peles de espécies de peixes de água fria, como bacalhau, arinca e juliana, determinadas a 30°C foi comparável à das gelatinas de mamíferos, o que implica que as gelatinas de pescado se comportam como as gelatinas de mamíferos em relação a sua massa molar e volume hidrodinâmico.

2.2.2.1.2.6.3. Ponto de fusão e temperatura de gelificação das gelatinas

Os pontos de fusão e de gelificação também são considerados índices importantes da qualidade das gelatinas. Em relação às gelatinas de pescado, as temperaturas de fusão estão na faixa de 8–25°C, enquanto a temperatura de gelificação é de 11–28°C. Embora haja um procedimento padronizado para a determinação do ponto de fusão da gelatina, este método raramente é empregado¹¹⁷ devido a vários fatores que afetam sua precisão (tempo de maturação, pH e concentração).

O método baseia-se na determinação da temperatura em que os géis de gelatina suavizam o suficiente para permitir que gotas de tetracloreto de carbono com um corante solúvel em óleo vermelho afundem através deles.¹⁰⁷ Além disso, parece não haver um procedimento padronizado para a determinação do ponto de fusão da gelatina. Os métodos que atualmente são empregados para a determinação dos pontos de fusão e de gelificação das gelatinas são a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise dinâmico mecânica. No primeiro, os pontos de fusão e de gelificação são obtidos a partir do termograma DSC como a temperatura máxima onde ocorre a transição após aquecimento (fusão) ou refrigeração (gelificação); enquanto que em análise dinâmico mecânica, os pontos de fusão são determinados como a temperatura de cruzamento em que o módulo de elasticidade é igual ao módulo viscoso durante o aquecimento e o resfriamento, respectivamente.¹¹⁵ Vale a pena mencionar que os diferentes métodos utilizados para a determinação dos pontos de fusão e de gelificação das gelatinas podem fornecer valores diferentes. Isto é claramente demonstrado nos estudos de Norziah et al.¹¹⁸, e Cheow et al.¹¹⁹, onde as gelatinas de peixe de mesmas espécies de peixes apresentaram diferentes pontos de fusão e gelificação quando determinados usando DSC e análise dinâmico mecânica.

2.2.2.1.2.6.4. Composição de aminoácidos

Chiou et al.,¹⁰² mostraram que as diferenças na composição de aminoácidos têm efeitos significativos nas temperaturas de fusão e gelificação de gelatina obtidas de diferentes fontes. De acordo com seus resultados, o maior teor de prolina e hidroxiprolina da gelatina está diretamente relacionado com géis mais fortes e com maiores temperaturas de gelificação. A prolina e a hidroxiprolina não são, contudo, os únicos aminoácidos que apresentam efeitos significativos na estrutura da gelatina. O conteúdo de ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, hidroxilisina, arginina e histidina também são importantes na formação de ligações cruzadas e nas interações eletrostáticas. Como o colágeno geralmente não possui cistina, não há ligações dissulfureto na estrutura do colágeno. O colágeno é principalmente estabilizado por ligações de hidrogênio formadas entre cadeias laterais dos aminoácidos e água, além da estrutura torcida imposta pelo alto teor de prolina e hidroxiprolina, juntamente com ligações cruzadas intra e intermoleculares.¹²⁰

2.2.2.2. Filmes à base de gelatina de peixe com adição de quitosana

Devido à natureza altamente higroscópica da gelatina, esta tende a inchar ou dissolver facilmente em contato com alimentos. Além disso, os filmes de gelatina

apresentam menor resistência mecânica em comparação com os sintéticos.¹²¹ Para evitar essas desvantagens, a gelatina pode ser misturada com diferentes substâncias e/ou polímeros para obter filmes e revestimentos que combinam as vantagens de cada componente.¹²² O principal mecanismo de formação de filmes à base de gelatina inclui a desnaturação da proteína iniciada por calor, solventes ou mudança de pH, seguida da associação de cadeias peptídicas através de novas interações intermoleculares.¹²³ Já os polissacarídeos devido à presença dos grupamentos amina e hidroxila tem a função crucial na formação do filme e, dependendo do pH, tendem a apresentar boas propriedades antimicrobianas.¹²⁴

A quitosana é um polissacarídeo não tóxico, biodegradável, biofuncional e biocompatível com fortes propriedades antimicrobianas e antifúngicas.¹²⁵ Quando aplicada em filmes, a quitosana apresenta boa resistência mecânica. Entretanto, as propriedades de permeação e transferência de água geralmente são inferiores aos filmes de gelatina pura. Sendo assim uma combinação de gelatina de peixe com quitosana pode produzir filmes com melhores propriedades mecânicas e de permeabilidade em relação aos filmes dos polímeros (gelatina e quitosana) separadamente.¹⁰

Ademais, a quitosana apresenta efeito antimicrobiano, e este difere consideravelmente dependendo das características da quitosana; particularmente o grau de desacetilação, a massa molar, o organismo alvo e as condições do meio em que é aplicado, especialmente o pH e a presença de solutos que podem reagir com quitosana através de interação eletrostática e/ou ligação covalente que venham a limitar a reatividade dos grupos amínicos ativos, que são os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana e antifúngica.¹²⁶ Alguns pesquisadores tem demonstrado que a quitosana é capaz de provocar a inibição do crescimento de vários microrganismos como *Staphylococcus aureus*,¹²⁷ *Staphylococcus epidermidis*,¹²⁷ *Escherichia coli*,¹²⁸ *Salmonella typhimurium*,¹²⁸ *Streptococcus faecalis*,⁶⁵ *Salmonella entérica*,¹²⁹ *Salmonella paratyphi*,⁶⁵ *Pseudomonas aeruginosa*,¹³⁰ *Klebsiella pneumoniae*,¹³⁰ *Listeria monocytogene*,¹³¹ *Bacillus cerus*,⁶⁵ *Shigella dysenteriae*,¹³² *Aeromonas hydrophila*,⁶⁵ *Fusarium*,¹³³ *Alternaria alternata*,¹³⁴ *Sacharomyces cerevisiae*,⁶⁵ *Candida spp.*,¹³⁵ e no entanto, seu mecanismo de ação sobre os microrganismos não está completamente elucidado, alguns pesquisadores correlacionam essa atividade antimicrobiana da quitosana pela formação de complexos polieletrólitos que provavelmente se ligam seletivamente à superfície dos microrganismos inativando-os.¹³⁶

Além disso, existem alguns estudos na literatura sobre filmes compostos de gelatina e quitosana, entretanto, pouco há sobre a influência das características químicas da quitosana (Mv e GD) nas propriedades físico-químicas em filmes à base de gelatina de peixe, com adição de diferentes quitosanas,¹³⁷ bem como, nas propriedades antibactericidas. Sendo assim, ao considerar as boas características da gelatina de peixe e da quitosana separadamente, pode-se especular que a combinação de ambos possa levar a filmes com melhores propriedades mecânicas e propriedades microbiológicas do que aqueles formados por cada polímero individualmente.

Todavia alguns estudos, indicam que a adição de quitosana a filmes à base de gelatina promovem uma melhoria na tensão de ruptura dos filmes, entretanto, como consequência, ocorre o aumento da permeação ao vapor de água dos filmes.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Sendo assim, a adição de compostos lipídicos a matriz filmogênica, pode ser uma alternativa interessante, a fim de suprir deficiências no que se refere a transferência de vapor de água através do filme.

2.2.2.2.1. Quitina e Quitosana

2.2.2.2.1.1. O camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*)

A quitina, é o principal componente do exoesqueleto duro de aproximadamente um milhão de artrópodes (insetos, siris, lagostas e caranguejos), e é comumente encontrada em cutículas de muitos invertebrados e nas paredes celulares da maioria dos fungos, leveduras e microrganismos.¹⁴¹ A principal matéria-prima para produção industrial de quitina são as carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar. O Japão, os EUA e a China são os maiores produtores mundiais de quitina, mas o polímero também é produzido, ainda que em menor escala, na Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil, entre outros. Em 1990 a produção mundial de quitina e quitosana foi estimada em 10.000 t, e já se aproximava de 30.000 t em 2004, correspondente ao processamento de aproximadamente 1.440.000 t de resíduos ricos em quitina gerados naquele ano, em nível mundial, pela indústria pesqueira.¹⁴²

Os camarões peneídeos são um dos principais recursos pesqueiros explorados na costa brasileira, o *Farfantepenaeus brasiliensis* distribui-se desde a Carolina do Norte (EUA) até a costa do Rio Grande do Sul (Brasil). As espécies nativas do Brasil, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis*, são conjuntamente chamados de camarão-rosa (Figura 5) e apresentam uma sobreposição em sua

distribuição na costa brasileira e, em geral, não ocorre diferenciação entre estas espécies em avaliações de estoques pesqueiros a partir de desembarques.¹⁴³

Figura 5. Camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*)



Fonte. (FAO).¹⁴⁴

Segundo dados do IBAMA,¹⁴⁵ a captura de camarão-rosa no ano de 2011 no Rio Grande do Sul, foi de 1.112.918 kg. Deste total, aproximadamente 70% é perdido durante o processamento, na etapa de descasque, o que gera uma quantidade considerável de resíduos (cabeças e casca).

2.2.2.2.1.2. Descarte de resíduos e problemas ambientais

Os resíduos do processamento de camarão requerem condições especiais de tratamento e disposição, pois apresentam características especiais, como alta salinidade, elevado teor de nitrogênio e um elevado conteúdo mineral. Assim, alternativas econômicas adequadas e ambientalmente aceitáveis vem sendo buscadas por pesquisadores para a eliminação desses resíduos e/ou a utilização destes como matéria-prima para produtos com maior valor agregado.¹⁴⁶

Entretanto estes resíduos consistem principalmente de cabeças, cascas e carne residual, o que os torna inadequados para a produção de alimentos humanos. Além disso, uma grande parte destes resíduos é quitina (5 a 7%), que não é facilmente digerível, pois é inerte no trato gastrointestinal de mamíferos, devido à não presença de quitinases.¹⁴⁷ Porém esta quitina pode ser convertida em quitosana, seu principal derivado, que devido as suas características apresenta diversas aplicações em nas mais variadas áreas.

2.2.2.2.1.3. Quitina: características químicas e extração

A quitina é um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-dioxi-D-glicopirranose, que são interligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera sendo superada apenas pela celulose, mas supera esta última em termos de taxa de reposição, que chega a ser

duas vezes maior que a da celulose.¹⁴⁸ A diferença estrutural entre as duas fibras se deve aos grupos hidroxila localizados no carbono 2 da estrutura da celulose, que na quitina são substituídos por grupos acetamida.

Ambas, quitina e celulose, possuem características estruturais semelhantes e atuam como invólucros protetores e materiais de suporte e defesa nos organismos em que ocorrem. A quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas, e também está presente nas paredes celulares de alguns fungos, como ascomicetos, zigomicetes, basidiomicetes e deuteromicetos.¹⁴² Em função do organismo que é encontrada e do papel que desempenha, a quitina adota diferentes estruturas polimórficas denominadas α -, β - e γ -quitina. As diferentes estruturas polimórficas de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos. A α -quitina é encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes e nesses casos ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos. As formas β - e γ -quitina ocorrem em estruturas flexíveis embora também resistentes.¹⁴⁷ A α -quitina é a forma mais abundante e é também considerada a mais estável, visto que a conversão das duas últimas formas na primeira é irreversível.¹⁴²

Por se tratar de um produto natural e de origem taxonômica variada, a quitina possui variações de sua composição nas matérias-primas e raramente é encontrada em sua forma pura, necessitando de processos tecnológicos para a sua extração. A extração de quitina a partir da biomassa, a exemplo do que acontece com a extração de celulose de fibras vegetais, envolve a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham (carbonatos, proteínas e pigmentos).

Nos crustáceos ou mais especificamente nos resíduos de camarão, a quitina é encontrada como constituinte de uma rede complexa com proteínas e carbonato de cálcio. Assim, o isolamento da quitina requer a remoção dos dois constituintes principais da casca, proteínas por desproteinização e carbonato de cálcio inorgânico por desmineralização, juntamente com pequenas quantidades de pigmentos e lipídios geralmente removidos durante as duas etapas anteriores. Em alguns casos, um passo adicional de descoloração é aplicado para remover pigmentos residuais. Muitos métodos foram propostos e utilizados ao longo dos anos para preparar a quitina pura, no entanto,

o mais frequentemente utilizado consiste nas etapas de desmineralização, desproteinização e desodorização.

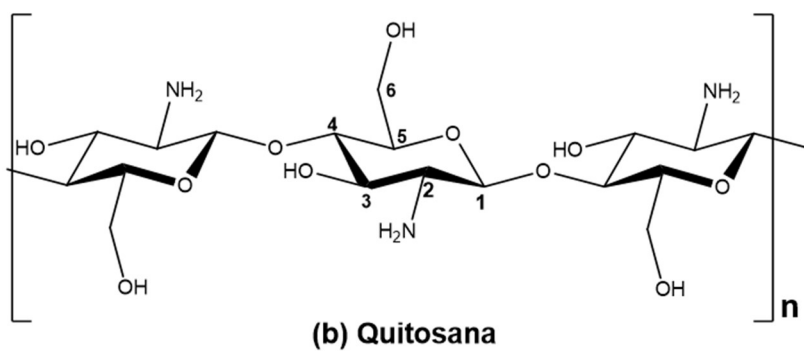
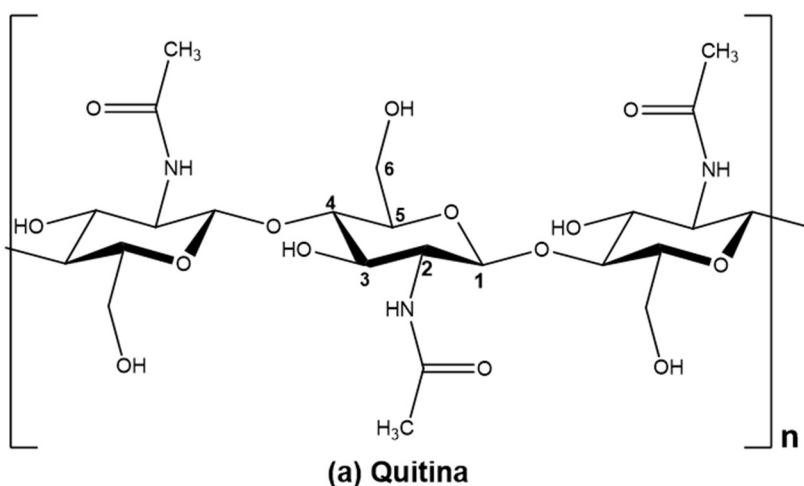
A desmineralização consiste na remoção de minerais, principalmente carbonato de cálcio. A desmineralização é geralmente realizada por tratamento ácido usando HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH e HCOOH.¹⁴⁹ Entre estes ácidos, o reagente preferencial é o ácido clorídrico diluído.¹⁵⁰⁻¹⁵¹ Os métodos químicos foram a primeira abordagem utilizada na desproteinização. Uma grande variedade de substâncias químicas foi testada como reagente incluindo NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄ e Na₂S. As condições de reação variam consideravelmente em cada estudo. O NaOH é o reagente preferencial.¹⁴² Já a remoção dos pigmentos, quando presentes, pode ser realizada por extração com solventes, sendo que etanol e acetona os mais empregados, ou por branqueamento, com KMnO₄, NaOCl ou H₂O₂.

As condições empregadas nos tratamentos sequenciais de extração de α -quitina e a natureza da matéria-prima, afetam o rendimento do processo, a qualidade do produto, e também a quitosana oriunda desta quitina. Devido a toda essa variabilidade de processo, problemas de reprodutibilidade das características das quitinas e quitosanas comerciais têm sido relatados, os quais aparentemente podem ser explicados com base nos fatores acima mencionados.^{142, 149, 152}

2.2.2.2.1.4. Quitosana: características químicas e produção

A quitosana é geralmente preparada por desacetilação alcalina de α -quitina. A quitina e a quitosana são uma família importante de polissacarídeos lineares, que consistem em quantidades variáveis de unidades de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi- β -glucopiranosose (GlcN) ligadas por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$.¹⁵² Na Figura 6 estão apresentadas as estruturas moleculares da (a) quitina e (b) quitosana.

As amostras de quitina contêm um alto teor de unidades de GlcNAc, portanto, são insolúveis em água e solventes orgânicos comuns. Quando o grau de N-acetilação (definido como o número médio de unidades de N-acetil-D-glucosamina por 100 monômeros expressos em percentagem) é inferior a 50%, a quitina torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas (pH <6,0) e é chamada de quitosana.¹⁵³ Isto significa que o termo "quitosana" representa um grupo de quitinas total e/ou parcialmente desacetiladas.¹⁵⁴

Figura 6. Estruturas químicas (a) quitina e (b) quitosana

A solubilização acontece devido à protonação do $-\text{NH}_2$ funcional no C-2 das unidades repetidas de D-glucosamina, e a conversão para um polieletrólito em meio ácido. O caráter policatiónico da quitosana em meio ácido é consequência da sua característica de base fraca, desta forma, seus amino grupos são facilmente protonados. Além disso, os grupamentos hidroxila dos carbonos 3 e 6 também podem ser protonados,¹⁵⁵ o que torna a quitosana mais reativa.

A quitina e a quitosana têm um grande valor econômico por causa de suas atividades biológicas versáteis, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade.¹⁵⁴ As propriedades biológicas destes compostos dependem muito de seus parâmetros físico-químicos, especialmente sua solubilidade em água e outros solventes comumente usados. A maioria das propriedades características da quitosana estão estritamente relacionadas a sua massa molar média e ao alto teor de resíduos de glucosamina contendo grupos amino primários.¹⁵⁶ Como a quitina é um material altamente insolúvel e quimicamente não-reativo, apresenta muito menos aplicações que a quitosana.¹⁵⁷ Sendo assim a reação de conversão de quitina em quitosana e derivados, ampliam consideravelmente suas áreas de aplicação.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸

Na literatura vários métodos são utilizados para realizar a conversão de quitina em quitosana, que pode ser realizada de forma heterogênea¹⁵⁸ ou homogênea¹⁵⁹, sendo a forma heterogênea (processo químico) o mais comumente utilizado. No método heterogêneo, a quitina é tratada com uma solução concentrada quente de NaOH durante algumas horas, e a quitosana é produzida como um resíduo insolúvel desacetilado de 55–99%. No entanto Rinaudo & Domard,¹⁶⁰ relataram que a solubilidade da quitosana pode ser caracterizada não apenas pela fração de unidades de GlcNAc na molécula, mas também pela distribuição do grupo N-acetil. Aiba¹⁶¹ mostrou que a reação de desacetilação realizada em condições heterogêneas gera uma distribuição irregular de resíduos de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina com alguma distribuição de grupos acetil em blocos ao longo de cadeias poliméricas. Assim, a solubilidade da quitosana pode variar em soluções aquosas levando a mudanças nas suas características de viscosidade.

Muitos parâmetros na reação de desacetilação podem afetar as características da quitosana final. Por exemplo, Rege & Block¹⁶² investigaram o efeito da temperatura, do tempo de processamento sobre as características de quitosana, e descobriram que a temperatura e o tempo de processo têm um efeito significativo no grau de desacetilação (GD) e na massa molar viscosimétrica média (M_v) da quitosana. Tolaimate et al.¹⁵⁰ relataram que o GD da quitosana é muito afetada pela temperatura e pela repetição de etapas alcalinas. Weska et al.¹⁶³, otimizaram a desacetilação de quitina por metodologia de superfície de resposta (respostas M_v e GD) usando variáveis de temperatura e tempo de reação. Estes trabalhos indicam que M_v e o GD da quitosana são principalmente afetados pela concentração de NaOH e tempo de reação. Todavia, outros parâmetros, tais como. o uso de tratamentos sucessivos alcalinos, condições atmosféricas e presença de diferentes aditivos podem influenciar a desacetilação.

No entanto, o método mais tradicionalmente utilizado por grande parte dos pesquisadores é o processo termoquímico, é bastante eficiente e amplamente utilizado, porém apresenta desvantagens como a maioria de processos químicos muito severos. é relativamente inseguro, não é facilmente controlável, e conduz a uma ampla gama de produtos heterogêneos,¹⁵⁸ fato esse observado, devido à variedade de resultados obtidos em diferentes estudos considerando as mesmas condições reacionais. As variações nos métodos de preparação da quitosana resultam em diferenças no GD, na distribuição dos grupamentos acetil, na viscosidade e na M_v ou grau de polimerização.¹⁶⁴

2.2.2.2.1.5. Caracterização da quitosana

2.2.2.2.1.5.1. Grau de desacetilação (GD)

As propriedades da quitosana dependem fortemente da proporção relativa das unidades GlcNAc e GlcN. Denomina-se grau de desacetilação (GD) a fração de grupos amino na cadeia polimérica, e o grau de acetilação (GA) é a fração de grupos acetamido. Essa relação é um dos fatores mais relevantes para especificação da quitosana e tem efeito marcante na sua solubilidade, além de exercer grande influência nas propriedades físicas, químicas e biológicas.¹⁶⁵

O grau de desacetilação é um parâmetro muito estudado pelos pesquisadores, principalmente, o seu efeito nas propriedades físico-químicas da quitosana em solução, uma vez que se faz necessário preparar soluções do polímero antes da obtenção de qualquer tipo de material como gel, filme, esponja, fibra, etc, assim como, para as aplicações da quitosana em solução.¹⁶⁶ Sendo assim, várias técnicas tem sido utilizadas para a determinação do grau médio de desacetilação da quitosana (GD), tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), carbono (RMN ¹³C) e nitrogênio (RMN ¹⁵N); espectroscopia na região do infravermelho (IV) e do ultravioleta (UV); titulação condutimétrica e potenciométrica; difração de raios-X; análise elementar; cromatografia líquida de alta eficiência e termogravimetria.¹⁶⁷ Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens. Porém a titulação potenciométrica tem sido amplamente utilizada devido a facilidade, eficiência e baixo custo, frente as demais.

2.2.2.2.1.5.2. Massa molar viscosimétrica média (Mv)

Outra característica bastante importante do ponto de vista da caracterização de um polímero é a sua massa molar. A distribuição de massas molares e a estrutura do polímero condicionam muitas das suas propriedades. As técnicas mais habituais para determinar a massa molar de um polímero são a viscosimetria, a osmometria, a dispersão de luz laser (*laser light scattering*), a cromatografia de permeação gel (*gel permeation chromatography*, GPC) e a espectrometria de massa em matriz com ionização laser (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time offlight detection*, MALDI-TOF).

A viscosimetria é uma técnica utilizada na determinação de massa molar média de polímeros dada a sua simplicidade experimental e o baixo custo do equipamento. A viscosidade, η , de uma solução aumenta com a concentração de polímero em solução. Devido à natureza carregada da quitosana em solventes ácidos e propensão da

quitosana em criar complexos é preciso avaliar com atenção as constantes utilizadas. Além disso, transformar a quitina em quitosana diminui consideravelmente a massa molar do polímero, altera a extensão da desacetilação e, por meio disso, a distribuição da carga muda, o que tem efeitos importantes na aglomeração. A massa molar média da quitina é de 1×10^6 a $2,5 \times 10^6$, e após a reação de desacetilação está inevitavelmente diminuída para 1×10^5 a 5×10^5 Dalton.

Quando a massa molar média é determinada por viscosimetria utilizando a relação de Mark–Houwink–Sakurada, o tipo de solvente é crucial. Pois o valor do parâmetro K e α dependem da natureza do solvente e do polímero. Um sistema solvente sugerido para a caracterização da M_v da quitosana é uma solução composta por CH_3COOH 0,1 M e NaCl 0,2 M, onde $K=1,81 \times 10^{-3}$ e $\alpha=0,93$, sendo este o sistema mais comumente utilizado.^{163, 168-173}

2.2.2.3. Blendas à base de gelatina de pescado/quitosana/lipídio

Os filmes e revestimentos comestíveis biodegradáveis podem ser categorizados de acordo com o tipo de material a partir do qual eles são derivados. Cada classe química tem suas vantagens e limitações inerentes quando usadas para blendas. Proteínas, polissacarídeos e lipídios são os três principais materiais utilizados para esse fim. A incorporação de lipídios em filmes e revestimentos podem melhorar a coesão, a hidrofobicidade e a flexibilidade da embalagem, ajudando a ampliar o tempo de vida útil, frescor, aroma, cor, textura e a estabilidade microbiológica dos frutos do mar frescos e processados.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Porém, ao contrário dos polissacarídeos e proteínas, os lipídios não são biopolímeros e não têm a capacidade de formar filmes independentes e coesos. Portanto, eles são usados incorporados em outros biopolímeros para produzir filmes compostos. Dependendo de suas características específicas, filmes e revestimentos comestíveis contendo lipídios têm comportamentos diferentes em relação à transferência de umidade, distribuição de grupos químicos, comprimento das cadeias alifáticas e a presença e grau de instauração que impactam a polaridade lipídica.¹⁷⁷

A maioria dos compósitos que incluem lipídios, são elaborados utilizando óleos essenciais. Porém, a utilização de ácidos graxos insaturados, ainda não foi explorada até o momento. Sendo assim, há um interesse no impacto físico-químicos e antimicrobiano que os AGIs podem causar quando são adicionados à blendas a base de gelatina e quitosana. Além disso, devido a importância do consumo de ácidos graxos

insaturados por seres humanos e da possibilidade dos filmes biopoliméricos serem ingeridos juntamente com o alimento, estes ainda poderiam contribuir com as necessidades nutricionais.

2.2.2.3.1. Concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs)

2.2.2.3.1.1. A carpa (*Cyprinus carpio*)

A pesca baseia-se na retirada de recursos pesqueiros do ambiente natural. Já a aquicultura é baseada no cultivo de organismos aquáticos geralmente em um espaço confinado e controlado. A grande diferença entre as duas atividades é que a primeira, por ser extrativista, não atende as premissas de um mercado competitivo. Já a aquicultura possibilita produtos mais homogêneos, rastreabilidade durante toda a cadeia e outras vantagens que contribuem para a segurança alimentar, no sentido de gerar alimento de qualidade, com planejamento e regularidade.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO)¹⁴⁴, a aquicultura é a mais rápida das atividades agropecuárias em termos de resultados produtivos e uma das poucas capazes de responder com folga ao crescimento populacional, o que pode contribuir para o combate à fome em todo o mundo (EMBRAPA)¹⁷⁸. De acordo com dados do Ministério da Pesca e Agricultura, entre 2007 e 2010, a produção aquícola de espécies exóticas representou 65% do total produzido pela piscicultura brasileira. Esse predomínio se deve muito ao fato de espécies, como a carpa, já possuírem uma cadeia produtiva estruturada e um vasto desenvolvimento tecnológico, resultando assim, em menor custo de produção, oferta de peixes com qualidade e preços mais baixos.

No Brasil, a introdução da carpa ocorreu em 1904, pela Secretaria da Agricultura do estado de São Paulo. A carpa comum foi a terceira espécie de peixe com maior distribuição nacional, sendo que seu cultivo foi registrado oficialmente em 14 estados. O principal produtor nacional é o Rio Grande do Sul, responsável por 51,6% da produção nacional (23 mil toneladas).

Dentre as espécies exóticas já introduzidas na piscicultura brasileira, a carpa-comum (*Cyprinus carpio*) apresenta grandes vantagens competitivas em relação às espécies nativas. Em grande parte, isso se deve a grande tolerância da espécie à baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e ampla variações de temperatura, desde 4°C até 35°C,¹⁷⁹ são rústicas, possuem rápido crescimento (em um ano de cultivo atinge peso

médio de 1,0 kg), facilidade de manejo e os custos para sua criação não são muito elevados.¹⁸⁰ Além disso já existem informações bem detalhadas sobre suas principais características biológicas e zootécnicas, que podem ser aproveitadas no melhoramento das condições de cultivo e na diminuição dos custos de produção. A Figura 7 apresenta a imagem fotográfica da carpa-comum.

Figura 7. Carpa (*Cyprinus carpio*)



Fonte. (FAO).¹⁴⁴

2.2.2.3.1.2. Descarte de resíduos e problemas ambientais

Os resíduos gerados durante o processamento da carpa (peles, cabeças, espinhaços, nadadeiras e vísceras) podem totalizar 60% da matéria-prima utilizada, dependendo da espécie e da forma de processamento empregada.¹⁸⁰ Estes resíduos são ricos em compostos orgânicos e inorgânicos, o que gera preocupação relativa aos potenciais impactos ambientais negativos decorrentes da disposição desse material diretamente no ambiente.³⁹ Em busca de alternativas viáveis para aproveitar resíduos de pescados, vários produtos podem ser obtidos, como por exemplo a extração de gelatina e óleo de pescado, que podem promover um aumentando no faturamento das empresas e reduzir problemas ambientais.⁸¹

2.2.2.3.1.3. Óleo de pescado

A composição do óleo de pescado é determinada pelo perfil de ácidos graxos, que é a identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes. O principal aporte nutricional do óleo de pescado são os ácidos graxos insaturados da família dos ácidos graxos n-3 derivados do ácido α -linolênico, os quais desenvolvem funções biológicas de grande importância nos animais superiores (EFSA)¹⁸¹. O óleo de pescado constitui um conjunto de lipídios de reserva energética, e a principal função dos seus ácidos graxos é a produção de energia metabólica na forma de ATP via β -oxidação mitocondrial para os processos de crescimento e reprodução, atuando também como componentes dos fosfolipídios da membrana celular.⁸⁷

2.2.2.3.1.3.1. Ácidos graxos

Os ácidos graxos ocorrem na natureza como substâncias livres e esterificadas. A sua maior parte encontra-se esterificada com o glicerol (1,2,3-triidroxiopropano) formando triacilgliceróis, principal componente dos óleos e gorduras comestíveis e representam 95% dos lipídios da dieta humana.¹⁸² Os ácidos graxos diferem-se em relação ao número de carbonos e ao número de insaturações presentes nas cadeias.⁸⁶

Os ácidos graxos livres ou esterificados nos lipídios, são considerados ácidos monocarboxílico com número par de carbonos dispostos em cadeia linear, representados pela forma de RCO_2H onde na maioria das vezes o R é uma cadeia longa, sem ramificação, insaturada ou com uma ou mais insaturações que poderá ser configurada como *cis* ou *trans*.¹⁸³ Já nos ácidos graxos saturados os átomos de carbonos estão ligados entre si por ligações simples (ligação σ) e simples e duplas (ligações π) nos ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos insaturados, de ocorrência natural, normalmente possuem configuração *cis* sendo que a maioria dos ácidos graxos de configuração *trans* não são encontrados na natureza e sim em gorduras que passaram por processos artificiais. Já na configuração *trans*, como não há dobramento na cadeia, sua conformação é muito semelhante à de um ácido graxo saturado.

Alguns ácidos graxos são considerados especiais por possuírem uma ou mais insaturação na molécula, pois a presença de dupla ligação não permite o empacotamento eficiente no triacilglicerol o que reduz a interação entre as moléculas. Essa configuração acaba facilitando a quebra dos triacilgliceróis pelas lipases e, conseqüente, liberação dos ácidos graxos que são transportados pelo sangue ligados à albumina, para serem utilizados pelos tecidos como fonte energética.¹⁸⁴

2.2.2.3.1.3.2. Ácidos graxos insaturados (AGIs)

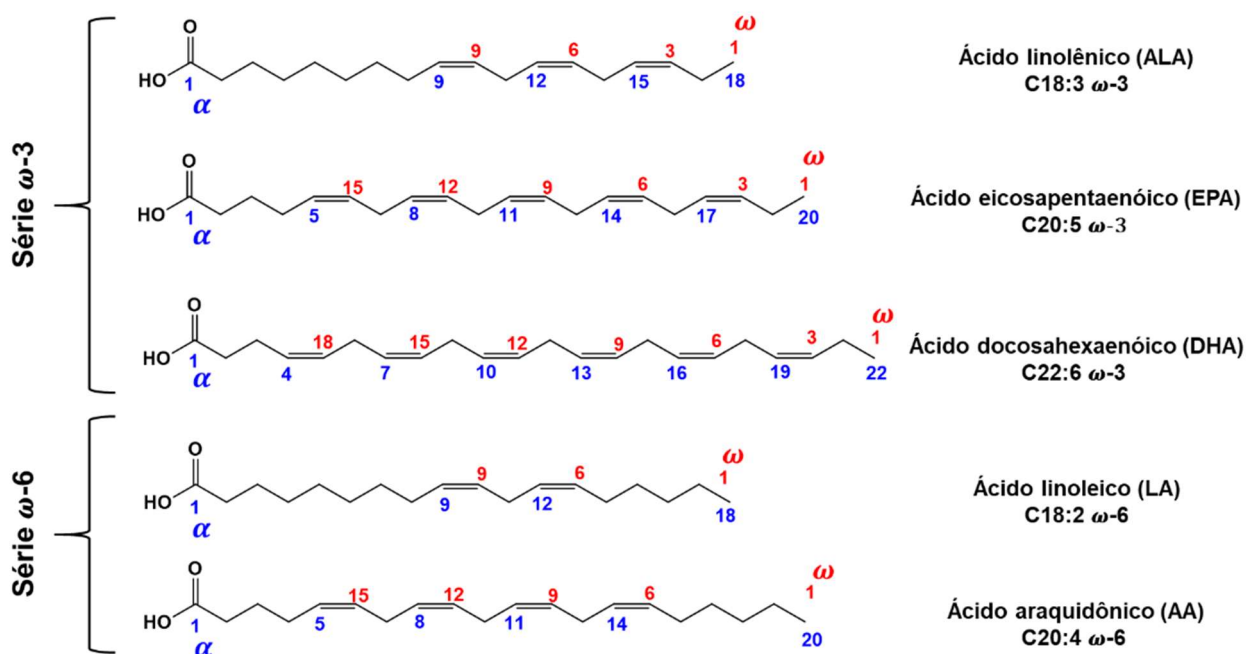
Os ácidos graxos insaturados seguem o mesmo padrão dos ácidos graxos saturados, exceto pela existência de uma ou mais duplas ligações ao longo da cadeia. A dupla ligação ocorre entre carbonos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) e de forma alternada, isto é, um único átomo de carbono só forma uma dupla ligação (do tipo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ e nunca $-\text{CH}=\text{C}=\text{CH}-$).¹⁸⁵

Os ácidos graxos insaturados (AGIs), assim denominados pela presença de duas ou mais insaturações, são caracterizados pela localização das duplas ligações. São representados por símbolos numéricos a exemplo do ácido α -linolênico, sendo que o

número justaposto ao símbolo C indica o número de átomo de carbono, e o segundo número a quantidade de duplas ligações. A posição da ligação dupla na cadeia hidrocarbonada é indicada entre parênteses. Os ácidos graxos também podem ser representados por letras gregas minúsculas, referindo à posição do carbono no ácido graxo. A letra α (alfa) se refere ao primeiro carbono adjacente ao grupo carboxila, β (beta) ao segundo carbono e ω (ômega) ao último carbono.¹⁸⁶ Os ácidos graxos comumente consumidos na dieta são classificados em quatro famílias/séries. ômega 9 (ω -9), ômega 7 (ω -7), ômega 6 (ω -6) e ômega 3 (ω -3) sendo que são considerados essenciais apenas as séries ômega 6 e ômega 3, pois são os mais importantes no balanço dietético.¹⁸⁷

Os principais ácidos graxos da série ômega 3 são os ácidos α -linolênico (ALA C18.3) e o ácido eicosapentaenóico (EPA C20.5) e o docosahexaenóico (DHA – C22.6), enquanto os principais ácidos da série ômega 6 são os ácidos linoleico (LA C18.2) e o ácido araquidônico (AA C20.4).¹⁸⁸ A Figura 8 apresenta a estrutura química dos ácidos graxos mais importantes presentes no óleo de pescada com as respectivas insaturações.

Figura 8. Moléculas de ácidos graxos mais importantes nos óleos de pescada



Os ácidos graxos mostrados na Figura 8, são considerados essenciais sendo fornecidos pela ingestão de óleos vegetais e óleos de pescada. São considerados assim em virtude da impossibilidade do nosso organismo sintetizá-los e pelas propriedades funcionais que apresentam para a saúde humana.¹⁸⁹ Visto que o depósito de energia assim como a conformação das membranas celulares são as principais funções que os

ácidos graxos insaturados, executam no organismo humano, a complementação através da alimentação desses ácidos graxos, principalmente de EPA e DHA, diminui o risco de morte por problemas cardiovasculares além de possuírem ações benéficas contra a hipertensão, arteriosclerose, arritmia e artrite, além de melhorar o desenvolvimento neural.

Considerando todos os benefícios indicados da ingestão de ω -3 e ω -6, estes vem causando interesse na comunidade científica, principalmente na busca de óleos de pescado de alta qualidade com altos níveis de ácidos graxos insaturados essenciais.

2.2.2.3.1.3.3. Extração do óleo de pescado

A produção da farinha de pescado é um dos principais processos de aproveitamento de resíduos do beneficiamento de pescado.¹⁹⁰ O processo termomecânico de produção de farinha de pescado consiste basicamente na separação parcial de três componentes principais: sólido, óleo e água. Nesta separação os rejeitos de pescado passam por um processo industrial, onde a matéria-prima segue as etapas de moagem, cocção, prensagem, secagem e moagem.¹⁹¹

A etapa de moagem é realizada a fim de reduzir o tamanho dos rejeitos.¹⁹² A etapa seguinte é a cocção, e é responsável pela extração do óleo advindo dos rejeitos, uma vez que o aquecimento desta matéria-prima é de aproximadamente 100°C, o que favorece a coagulação das proteínas, e conseqüentemente a ruptura da membrana celular, gerando a liberação de óleo e água que fisiologicamente ficam ligados. Esta etapa normalmente é realizada a 100°C e tempo de 20 à 30 min.¹⁸⁵ Após a cocção é realizada a prensagem do material com a finalidade de separar os compostos sólidos e o licor de prensa. Os sólidos então são utilizados para a fabricação de farinha e a fração líquida resultante é o licor de prensa, normalmente composto por 78% de água (chamada água de cola), 6% de sólidos e 16% de óleo. O óleo bruto é então separado da água de cola por centrifugação.

Para melhorar as características de consumo deste óleo bruto, é necessário que este passe por um processo de purificação e é através deste processo, que impurezas como fosfolipídios, ácidos graxos livres, pigmentos e produtos de oxidação lipídica são removidos, fazendo com que o produto alcance um nível de pureza aceitável.¹⁹³ O refino do óleo bruto é composto principalmente pelas etapas de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização.

A degomagem é a etapa responsável pela remoção de fosfolipídios (também chamados de gomas), onde através da hidratação de fosfolipídios hidratáveis ocorre a separação dos não hidratáveis, pois estes se tornam solúveis no óleo e se decompõem.¹⁹⁴ Esta etapa normalmente é realizada com a adição de água e soluções ácidas, como por exemplo H_3PO_4 e $C_6H_8O_7$. Devido a adição de ácido na degomagem e este óleo degomado possuir ácidos graxos livres, é necessário realizar a neutralização destes compostos. A quantidade de solução álcali a ser adicionada tem que ser estequiometricamente maior que a quantidade de ácidos graxos livres, pois estes combinados com solução álcali formam sabões.¹⁹⁵ Para remoção desses sabões, do excesso de solução álcali e de alguns possíveis resíduos de fosfolipídios é realizada então a lavagem do óleo.

Para remoção dessa água de lavagem é necessário realizar a secagem deste (1% de água para o óleo ser considerado seco) a fim de melhorar o desempenho da etapa de branqueamento. Esta secagem pode ser realizada elevando a temperatura do óleo a $90^\circ C$ sob vácuo de 710 mmHg por aproximadamente 10 min.⁸² Para remover ou promover a destruição dos pigmentos que dão cor ao óleo é feito o branqueamento, utilizando uma mistura de adsorventes contendo terra ativada e carvão ativado, que além de pigmentos, removem traços de fosfolipídios, carotenoides, traços de metais, sabões residuais e promovem mudanças no estado de oxidação do óleo.^{82, 196}

2.2.2.3.1.3.4. Concentração dos AGIs

O óleo de pescado, por constituir uma importante fonte de ácidos graxos insaturados, é usado preferencialmente como matéria-prima para preparar concentrados de $\omega-3$ e $\omega-6$.¹⁹⁷ Existem vários métodos, físicos, químicos e enzimáticos que visam a obtenção de ácidos graxos insaturados a partir de óleos de pescado.¹⁹⁸ Dentre estes métodos estão, a cristalização por resfriamento, destilação molecular, extração supercrítica e concentração por lipase. Entretanto, a forma mais eficiente de obtenção destes é através da cristalização pela complexação com ureia.¹⁹⁸⁻¹⁹⁹

Todavia, antes da complexação com ureia é realizada a alcoólise, também chamada de alcoólise (cisão por intermédio de um álcool) que é um termo geral usado para descrever a reação orgânica onde um éster é transformado em outro éster através da troca do grupo alcóxila.²⁰⁰ Na transesterificação de uma gordura ou óleo, um triglicerídeo reage com um álcool na presença de um catalisador para formar uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol. O processo geral é uma sequência de

três reações consecutivas, na qual monoglicerídeos e diglicerídeos são formados como intermediários. Para uma transesterificação estequiometricamente completa, uma proporção molar 3.1 de álcool por triglicerídeo é necessária. Entretanto, devido ao caráter reversível da reação, o agente transesterificante (álcool) geralmente é adicionado em excesso deslocando o equilíbrio da reação em direção aos produtos e assim aumentando o rendimento do éster, bem como permitindo a sua separação do glicerol formado (subproduto).²⁰¹

Vários fatores influenciam a reação de transesterificação, tais como. tipo de catalisador, tipo de álcool, razão molar álcool/óleo, temperatura, pureza dos reagentes (principalmente a presença de água) e quantidade de ácidos graxos livres.²⁰² Segundo Ferrari, Oliveira, & Scabio,¹⁹³, com relação ao agente transesterificante (álcool), o processo reacional ocorre preferencialmente com álcoois de baixa massa molar, como por exemplo, metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico, mas metanol e etanol são os mais frequentemente empregados. Metanol é o mais utilizado no mundo devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage rapidamente com o triglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico). A reação de transesterificação pode ser catalisada por ácidos ou bases, utilizando processo catalítico homogêneo ou heterogêneo. A transesterificação por catálise básica é rápida e de elevadas conversões. Além disso, catalisadores alcalinos são menos corrosivos do que os ácidos.¹⁹ Segundo Freedman, Butterfield, & Pryde,²⁰³ a maior parte dos trabalhos descritos na literatura emprega catalisadores básicos, tais como KOH e NaOH, onde foram observados maiores rendimentos e seletividade, além de apresentarem um baixo preço no mercado. Devido a reação de alcoólise ser responsável pela formação de ésteres metílicos (que após acidificação, são chamados de ácidos graxos livres), esta etapa se torna bastante importante na elaboração de concentrados de ácidos graxos insaturados, através do método de complexação com ureia.^{19, 198}

Depois da reação de alcoólise, o processo segue as seguintes etapas. extração, acidificação, separação e evaporação. Assim, após o término da reação de transesterificação os ácidos graxos (mistura saponificada) são extraídos da matéria insaponificável com a adição de hexano. A matéria saponificável é então acidificada. A separação é realizada novamente com a adição de hexano, que é removido com sulfato de sódio anidro para recuperar os ácidos graxos livres.

A complexação com ureia é o método químico de obtenção de concentrados de AGIs mais utilizado devido seu baixo custo operacional, e principalmente devido a sua eficiência. A fundamentação deste método é baseada na separação pelo grau de insaturação dos ácidos graxos, onde os mais saturados complexam com a ureia devido a estrutura de cristalização da ureia quando resfriada, pois esta, quando resfriada cristaliza-se, e forma canais com diâmetros de aproximadamente 5,6 Å. Porém na presença de longas moléculas de cadeia linear, esta cristaliza-se na forma de canais hexagonais com diâmetros que variam de 8–12 Å, e é nestes canais que os ácidos graxos saturados se incorporam, promovendo então a separação destes dos ácidos graxos insaturados. Isso ocorre porque os ácidos graxos insaturados possuem um volume (diâmetro) superior aos canais do cristal de ureia, impedindo o seu aprisionamento.¹⁹⁸ Como neste método de separação, os ácidos graxos saturados adentram na estrutura formada pela ureia, o método também é denominado método de inclusão.²⁰⁴

Essa técnica apresenta uma grande vantagem frente as demais porque os cristais complexados são extremamente estáveis, e a filtração não tem que necessariamente ser realizada em temperaturas muito baixas como é requerido na cristalização de ácidos graxos com solvente.

2.3. Elaboração de filmes e blendas pela técnica *casting*

Conceitualmente, os filmes biopoliméricos, são produzidos com a utilização de apenas uma macromolécula, já a blenda, caracteriza-se por ser uma mistura física de dois ou mais biomateriais, sem que haja reação química entre eles.²⁰⁵ Sendo assim, a técnica *casting*, tem sido o processo mais utilizado na produção de filmes biodegradáveis, devido a sua simplicidade.

A técnica consiste de uma solução disposta sobre um suporte de área conhecida e deixada em repouso até que haja evaporação do solvente, ocorrendo à formação do filme. Primeiramente, há a solubilização da macromolécula em um solvente (água, etanol, solução de ácido acético, entre outros), ao qual podem ser incorporados diversos aditivos (plastificantes, agentes reticulantes, etc). Logo a solução filme formadora é vertida em um suporte e levada a estufa para evaporação do solvente. A massa de sólidos secos da macromolécula utilizada assim como seu aditivo deve ser constante, e para isso padroniza-se o volume de solução filmogênica vertido nos suportes, com a

finalidade de se obter uma espessura constante dos filmes biopoliméricos após sua secagem.²⁰⁶

Independentemente da técnica utilizada para a elaboração dos filmes biodegradáveis sempre se busca que eles sejam flexíveis, resistentes e apresentem boas propriedades de barreira ao vapor de água. No caso de utilização para alimentos a propriedade de barreira ao vapor de água é considerada uma das mais importantes, pois dependendo da taxa de transferência do vapor de água, podem ser iniciados processos de deterioração nos alimentos embalados.

2.4. Caracterização dos filmes

Os filmes e blendas baseados em biomateriais são, geralmente, caracterizados quanto suas, espessura (e), resistência à tração (RT), alongamento na ruptura (AR), permeabilidade ao vapor de água (PVA), cor, superfície (MEV), grupos funcionais (FTIR), cristalinidade (DRX) e propriedades térmicas (DSC).

2.4.1. Espessura (e)

A espessura é definida como a distância entre as duas principais superfícies do material, e é considerada um parâmetro importante para filmes plásticos, tanto mono quanto multicamadas. De acordo com Sobral,⁷⁰ nos filmes elaborados através da técnica *casting*, o controle da espessura se torna mais difícil quando se trabalha com solução filmogênica viscosa, devido à dificuldade de espalhar esse material. Devido a este fato é de extrema importância o controle e o conhecimento preciso da espessura do filme elaborado, pois é desta caracterização que dependem as informações sobre a resistência mecânica e as propriedades de barreira a gases e ao vapor de água do material, visto que, variações na espessura acarretam problemas no seu desempenho mecânico e flutuações nas propriedades de barreira. Além disso, o controle da espessura é necessário para que se possa garantir a repetitividade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre os filmes.²⁰⁷

2.4.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas compreendem as propriedades que determinam a resposta dos materiais às influências mecânicas externas; são obtidas pela capacidade desses materiais de desenvolverem deformações reversíveis e irreversíveis, e resistirem a fraturas. Essas características fundamentais dos materiais são geralmente avaliadas por meio de ensaios que indicam diversas dependências tensão–deformação, e esta caracterização pode ser feita atingindo–se ou não a ruptura do material. Por exemplo,

módulos elásticos, tensão e deformação no escoamento, são parâmetros caracterizados sem atingir a ruptura do polímero. Por outro lado, tensão e deformação na ruptura e resistência ao impacto, são propriedades mecânicas determinadas no limite da resistência destrutiva do polímero.²⁰⁸

Estas propriedades mecânicas de filmes e blendas, estão relacionadas diretamente com a rigidez dos segmentos das cadeias dos polímeros envolvidos, de sua natureza química, da massa molar, das forças intermoleculares entre as cadeias dos biomateriais e da estrutura macromolecular como um todo. Esta estrutura, bem como a morfologia de empacotamento das cadeias dos materiais são fatores fundamentais na determinação das propriedades mecânicas de filmes finos e blendas poliméricas.²⁰⁹ Dentre os principais parâmetros estruturais que afetam o desempenho mecânico dos filmes e das blendas, pode-se citar a cristalinidade, a presença de grupos polares, massa molar, copolimerização, ligações cruzadas e a miscibilidade, pois estes afetam diretamente a estrutura coesiva do material, ou seja, a habilidade do material em formar fortes e numerosas ligações moleculares entre as cadeias, a fim de impedir o rompimento.²¹⁰ Sendo assim, os testes mais relevantes realizados em filmes biopoliméricos são a tensão de ruptura que é a resistência oferecida pelo material no ponto de ruptura perante o teste de tração, e o alongamento na ruptura que indica a flexibilidade e a capacidade de estiramento dos filmes com determinação feita no ponto em que o filme se rompe perante a tração e expressa em porcentagem da mudança do comprimento original da amostra.

2.4.2.1. Resistência a tração (RT)

O ensaio de resistência a tração é amplamente utilizado para o levantamento de informações básicas sobre filmes e blendas poliméricas. Este ensaio consiste na aplicação de uma carga uniaxial crescente a um corpo de prova específico, ao mesmo tempo em que são medidas as variações de comprimento do material. As especificações quanto à forma, dimensões dos corpos de prova, velocidade de tensionamento, base de medida, etc., são ditadas pela norma técnica correspondente, que no caso de filmes finos é a *American Society for Testing and Material (ASTM)*.²¹¹

No ensaio de RT, uma amostra do material (corpo de prova) é submetida a um esforço longitudinal, onde as extremidades da amostra do filme são presas a garras acopladas ao equipamento de medição. A RT, é calculada, através da relação entre a

força máxima medida e a área inicial do corpo de prova, a qual é obtida com os valores de largura e espessura do corpo de prova, conforme a Equação (1).

$$RT = \frac{F}{L \times e} \quad (1)$$

sendo RT a resistência a tração (MPa), F a força máxima aplicada (N), L a largura (m) e “e” a espessura do filme (m).

2.4.2.2. Alongamento na ruptura

O alongamento na ruptura (AR) é a relação percentual entre o alongamento do corpo de prova na ruptura e o seu comprimento inicial, que corresponde à distância inicial entre as garras como mostrado na Equação (2).

$$AR = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100 \quad (2)$$

sendo AR o alongamento na ruptura (%), ΔL a variação de comprimento (m) e L_0 o comprimento inicial (m).

2.4.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade de um soluto através de filmes e blendas, indica a facilidade com que este migra de uma face a outra. Fisicamente, portanto, a permeabilidade é o produto da difusividade pela solubilidade de soluto no filme, e esta difusão, depende de vários fatores, tais como. espessura do filme, a relação entre as zonas cristalinas e amorfas, a quantidade de material hidrofílico/hidrofóbico e a mobilidade das cadeias poliméricas.²¹² Os filmes baseados em biopolímeros geralmente apresentam alta permeabilidade ao vapor de água (PVA). Sendo assim, o preparo de filmes e blendas com diferentes componentes permitem criar novos arranjos de redes tridimensionais estreitamente ligadas que podem ser estabelecidas para obstruir a migração de água nos materiais de embalagem de alimentos.²¹³

A PVA é baseada na lei de Fick de difusão de massa, por analogia à lei de Fourier para condução de calor e à lei de Ohm para a condução elétrica. Sarantopoulos & Teixeira,²¹⁴ mostraram que a solubilidade dos gases em polímeros obedece a lei de Henry, que combinada com a lei de Fick, chega-se à expressão atual que relaciona o fluxo com a permeabilidade com o gradiente de pressão parcial de água entre os dois

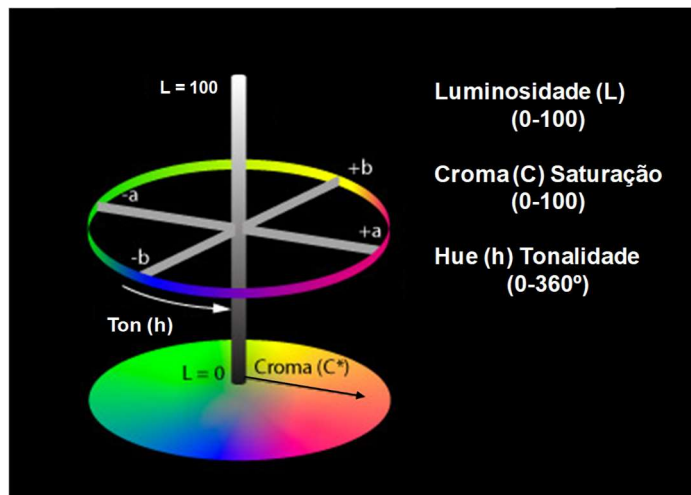
lados do filme. Pode-se considerar que o processo de permeação de gases e vapores através dos espaços intermoleculares acontece em três etapas. sorção e solubilização do permeante na superfície do material, difusão do permeante através do material devido a ação de um gradiente de concentração e dessorção e/ou evaporação do permeante na outra face do material. Sendo assim, a PVA de filmes pode ser determinada pelo método gravimétrico, segundo as normas técnicas da *American Society for Testing and Material* (ASTM)²¹⁵.

2.4.4. Cor

A cor é uma determinação bastante relevante dentre as propriedades ópticas de filmes e blendas, visto que para a aplicação em embalagem de alimentos muitas vezes é desejável uma embalagem transparente que permita a visualização do produto acondicionado.²¹⁶ Já em filmes e blendas aplicados em processos de adsorção, a cor ganha importância, pois sua variação ao longo do processo, é um indicativo de que ocorreram interações entre adsorvente e adsorbato.

As alterações de cor podem ser medidas por diferentes métodos, como por exemplo, pela aplicação das coordenadas do sistema espacial CIELAB. Este sistema consiste em um diagrama tridimensional de cores (L^* , a^* , b^*), apresentado na Figura 9, onde L^* indica a luminosidade, a^* a cromaticidade tendendo do verde (-) ao vermelho (+) e b^* a cromaticidade que varia do azul (-) ao amarelo (+). A partir dos valores de a^* e b^* pode ser calculado a tonalidade (h_{ab}), também conhecida como ângulo hue que é o valor em graus correspondente ao diagrama tridimensional de cores. 0° (vermelho), 90° (amarelo), 180° (verde) e 270° (azul), parâmetro este que corresponde a tonalidade tal como é vista a olho nu²¹⁷ e a variação de cor (ΔE). Já a transparência é observada, quando a luz incidente atravessa o material com um mínimo de absorção ou reflexão e pode ser indicada pelo valor de luminosidade (L^*).

Figura 9. Representação do diagrama tridimensional de cores do sistema CIELAB



2.4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da amostra. Esta imagem possibilita a visualização de possíveis imperfeições, porosidades, separação dos componentes dos filmes em camadas, estrutura da superfície e visão da estrutura da seção transversal. O equipamento utilizado na MEV produz imagens de alta resolução com ampliação de até 300.000 vezes. O equipamento funciona, aplicando-se uma diferença de potencial (de 0,5 a 30 kV) e faz emissão de feixes finos de elétrons, que varrem a amostra em uma área muito pequena, por um filamento capilar de tungstênio, denominado eletrodo negativo. Essa diferença de potencial atrai os elétrons que foram gerados, o que resulta em uma aceleração em direção ao eletrodo positivo. Essa interação entre um feixe de elétrons e a amostra em estudo, forma a imagem que temos como resultado da análise, o qual é dada em tempo real, simultaneamente com a varredura da amostra.

Sendo assim, o princípio da MEV, baseia-se fundamentalmente, na quantificação dos elétrons secundários emitidos pela amostra, como resposta a uma excitação eletrônica incidente. Quando os elétrons primários alcançam a amostra, a interação destes com os átomos do material, dão origem a elétrons secundários. O número de elétrons secundários emitidos, varia de acordo com a geometria e outras propriedades da amostra. Os elétrons secundários são coletados por um detector, produzindo a imagem.²¹⁸

2.4.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier tem o objetivo de investigar compostos, suas composições e grupos funcionais a partir da absorção de

energia na região do infravermelho pelo material. A interação da radiação com a matéria ocorre com a junção do campo elétrico oscilante da vibração molecular e, o da radiação incidente. As ligações químicas das substâncias apresentam frequências de vibração específicas e correspondentes aos diferentes níveis de energia da molécula, que por sua vez, são resultantes da superfície de energia potencial da molécula, bem como de sua geometria molecular e massa dos átomos constituintes.²¹⁹ Para que uma determinada molécula apresente absorção na faixa do infravermelho, há necessidade que suas vibrações moleculares resultem em uma alteração do momento dipolar da molécula e consequentemente, que haja a absorção de determinada quantidade de energia.²²⁰

As análises dos espectros são feitas a partir das bandas de absorção resultantes da análise do material pelo espectrômetro de infravermelho. As bandas vibracionais reconhecidas pelo aparelho geralmente indicam os picos de absorção de acordo com o grupo funcional ou tipo de ligação ali existente, e apresentam também, valores relacionados a essas propriedades.²¹⁹ A espectroscopia de infravermelho apresenta uma ampla faixa de aplicações, sendo capaz de analisar desde moléculas pequenas até sistemas complexos, como tecidos celulares, permitindo verificar mudanças tanto na sua superfície quanto no seu interior.²²¹ A faixa de radiação de maior interesse para a espectroscopia se encontra na região de 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio). Nos espectros de infravermelho (IV) a intensidade das bandas de absorção permite coletar dados em termos de transmitância ou absorbância, e a posição em números de onda (cm^{-1}), sendo o inverso do comprimento de onda.²²⁰

2.4.7. Difração de raio-X (DRX)

Sólidos e líquidos podem apresentar-se estruturados, espacialmente organizados, sendo capazes de difratar um feixe de raio X. A esta regularidade estrutural denominamos cristais, comum em substâncias/produtos sólidos. Líquidos cristalinos também apresentam esta característica, como os cristais líquidos e, mesmo substâncias não cristalinas, podem apresentar algum grau de estruturação, dando origem a bandas de difração não tão bem definidas.²⁰⁸

A radiação X é uma espécie de radiação eletromagnética, que possui comprimentos de ondas da ordem de 10^{-1} m a 10^{-7} m. Sua espectroscopia atômica está baseada nas medidas de emissão, absorção, espalhamento, fluorescência e difração da radiação eletromagnética.²²² Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais, a difratometria de raios X é a mais indicada na determinação das fases cristalinas

presentes em materiais poliméricos. Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos se ordenam em planos cristalinos, separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração.²⁰⁸ As vantagens da técnica de difratometria de raios X para a caracterização de fases, destacam-se pela simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos, a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases.²²³

2.4.8. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica de análise térmica na qual a temperatura de uma amostra, comparada com a temperatura de um material termicamente inerte, é gravada como uma função da amostra, material inerte, ou fornecimento de temperatura à medida que a amostra é aquecida ou resfriada a uma razão constante.²²⁴

É uma técnica que possibilita determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) de um material, isto é, o valor médio da faixa de temperatura que durante o aquecimento de um material polimérico, de uma temperatura muito baixa para valores mais altos, permite que as cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade, isto é, possibilite a mudança de conformação. Acima da temperatura T_g , o material se encontra no domínio gomoso (*like-liquid rubbery*); abaixo da T_g , o mesmo está no estado vítreo. Neste estado, os movimentos moleculares estão restritos a movimentos rotacionais e movimentos de extremidades de fraca amplitude. Com o aumento da temperatura, ao se ultrapassar a T_g , as cadeias de macromoléculas aumentam sua mobilidade. Neste ponto, as propriedades físicas e mecânicas sofrem uma forte mudança de comportamento.²⁰⁸

2.5. Avaliação de embalagens ativas na conservação de filés de pescado

O consumo de frutos do mar aumentou nos últimos anos, uma vez que os consumidores se tornaram mais conscientes dos seus benefícios nutricionais e das preocupações com a saúde, associadas a outros produtos à base de carne, como frango e carne bovina. No entanto, a composição da carne de peixe torna favorável o rápido crescimento e propagação de microrganismos patogênicos que aceleram a deterioração dos alimentos.²²⁵

Sendo assim, o peixe é um produto mais perecível do que outros alimentos musculares e seu frescor se degrada após a morte devido a várias reações bioquímicas (por exemplo, alterações nos teores de proteínas e lipídios e formação de aminas biogênicas e hipoxantina) e deterioração microbiológica. Isso resulta na deterioração da qualidade sensorial e valor nutricional dos peixes. Sendo assim, a preservação do peixe é importante para evitar a perda desse recurso natural nutricionalmente rico.¹⁷⁷ Neste contexto, os filmes e revestimentos podem ser utilizados para fornecer proteção física²²⁶ para proteger filés de pescado de danos mecânicos e de atividades físicas, químicas e microbiológicas. Além de sua função como barreiras inertes para estender a estabilidade alimentar, os revestimentos comestíveis também podem interagir com o alimento revestido e/ou o ambiente envolvente de forma desejável, tornando-se assim um revestimento ativo.

Devido a reações químicas, resposta enzimática e deterioração microbiana, o peixe apresenta um tempo curto de prateleira.⁶ Sendo assim, como consequência da redução do prazo de validade, a frescura e a qualidade dos peixes sempre ganharam a atenção das Agências Reguladoras Alimentares e das Indústrias Alimentares. A manipulação adequada, pré-tratamento e técnicas de preservação podem melhorar a qualidade dos produtos da pesca. Muita pesquisa neste campo tem sido focada no desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis para aumentar o prazo de validade desses produtos, mantendo seus parâmetros de qualidade. Revestimentos e filmes à base de gelatina de pele de pescado com adição de quitosana foram relatados para embalagens de filé de truta arco-íris, mostrando propriedades antioxidantes. No entanto, maior efeito protetor contra a oxidação lipídica foi obtido para revestimentos em comparação com filmes, devido à maior migração de quitosana em solução como um aditivo ativo.²²⁷ Misturas de gelatina e quitosana também foram usadas para obter filmes antimicrobianos para o empacotamento de filés de bacalhau adicionando óleo essencial de cravo à matriz, resultando em uma drástica redução no crescimento de microrganismos para bactérias gram-negativas.²²⁸

Assim, destaca-se a importância do desenvolvimento de embalagens ativas antimicrobianas, para conservação de filés de pescado. Pois estas, além de serem provenientes de recursos renováveis e ambientalmente amigáveis, apresentam vantagem adicional prolongando o tempo de vida útil do alimento.

2.5.1. Merluza (*Merluccius hubbsi*)

A merluza (*Merluccius hubbsi*) é uma espécie demerso–pelágica que se distribui entre o sul do Espírito Santo e o sul da Argentina. Na Argentina e no Uruguai ela vem sendo explorada a longo tempo e por isso, vem sendo intensamente estudada desde 1958,²²⁹ havendo um grande volume de informações disponíveis. Em contrapartida, no Brasil, apenas recentemente sua biologia foi estudada em toda a área de distribuição, sendo que, resultados preliminares indicam que há dois estoques, sendo o da costa Sul compartilhado com o Uruguai e a Argentina.²³⁰ Parte deste estoque, se reproduz durante o outono–inverno na costa do Rio Grande do Sul. Sendo assim a merluza caracteriza-se como um recurso compartilhado transfronteiriço. De acordo com o Instituto Nacional de Estadística y Censos da República Argentina (INDEC)²³¹, o Brasil foi o maior importador de merluza (*Merluccius hubbsi*) do mundo no ano de 2017, consumindo o dobro do segundo colocado, a Espanha. Este desempenho é majoritariamente impulsionado pela compra de filés da merluza argentina, que até julho deste ano representaram 15.464 toneladas.

De acordo com o Ministério da Agricultura, o consumo de pescado no Brasil – de 14,4 kg por habitante/ano – já superou o recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que é 12 kg, por habitante, a cada ano. O pescado, bem como a carne de pescado mecanicamente separada, contém baixo teor de colesterol LHL, são ricos em ácidos graxos insaturados (tipo Ômega 3), e importantes na prevenção de doenças cardiovasculares e para o desenvolvimento de células cerebrais no feto e nos recém-nascidos.²³¹ O pescado ainda oferece minerais, principalmente cálcio e fósforo, vitaminas A, D e do complexo B, o que o torna um produto de alto valor nutricional.

Dentre os produtos de origem animal, os peixes são os mais suscetíveis a processos de deterioração, o que pode ser explicado pela sua composição química, pela elevada insaturação de seus lipídios, pela menor quantidade de tecido conjuntivo, em consequência da ação de enzimas autolíticas, e pela relação menos ácida de sua carne, o que favorece o crescimento microbiano.²³² A alta perecibilidade do pescado tem estimulado a aplicação de tecnologias alternativas de conservação muito importantes.²³³ Neste sentido os filmes antimicrobianos vêm a contribuir para aumentar o tempo de vida útil e a qualidade dos filés de pescado.

2.5.2. Avaliação Microbiológica

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2016, cerca de 90% dos casos de surtos alimentares foram causados por bactérias, sendo a *E. coli* e *Salmonella*, responsáveis por aproximadamente 7,3% dos casos, seguidas de *S. aureus* (5,7%). Entretanto, cerca de 70,5% dos casos de contaminação e intoxicação causados por microrganismos não foi identificado (Ministério da Saúde).²³⁴

Neste contexto, o pescado é um dos alimentos que degradam com mais facilidade, principalmente devido à composição química (que varia em função da espécie), às condições em que ocorre, o seu consumo, à época do ano em que é capturado, os elevados teores de gorduras insaturadas (que são facilmente oxidáveis), e principalmente, do pH próximo da neutralidade, que favorecem o desenvolvimento microbiano.²³⁵ Sendo assim, o pescado pode atuar como potencial veiculador de microrganismos patogênicos para o homem, como as bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Costridium perfringens*, entre outros.²³⁶ A presença desses microrganismos evidencia deficiências em algumas etapas do processamento ou na conservação do produto final, que comprometem a qualidade e o grau de frescor, podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, que vão desde uma simples intoxicação até a morte (FDA)²³⁷. Devido a isso, torna-se importante a avaliação microbiológica em filés de pescado, visando a eliminação e/ou diminuição destas doenças causadas por microrganismos patogênicos e aumentando o tempo de vida útil desses alimentos.

2.5.2.1. *Staphylococcus* coagulase positiva

Os *Staphylococcus* apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, podem ocorrer sozinhos ou agrupados em pares ou cadeias irregulares, aeróbios facultativos, coagulase positiva, catalase positiva, oxidase negativa, redutores de nitratos, não formadores de esporos, com temperatura ótima de crescimento na faixa de 30 a 37°C, porém desenvolvem-se em temperaturas de 10 a 48°C e são capazes de multiplicar-se em concentrações de 7,5% a 20% de cloreto de sódio.²³⁸ Por provocar frequentes intoxicações de origem alimentar é uma das espécies de maior interesse na microbiologia de alimentos. Algumas cepas tem a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis em condições de temperatura de 10 a 48°C, pH de 4,5 a 9,6. As enterotoxinas estafilocócicas são altamente estáveis ao calor assim como são resistentes à ação de proteases gastrointestinais como a pepsina e a tripsina, o que

garante sua integridade durante a passagem pelo sistema gastrointestinal.²³⁹ Os principais sintomas da intoxicação são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, dores de cabeça e queda de pressão e, em casos mais graves, a hipotermia e a síndrome do choque tóxico. Esses sintomas surgem cerca de 6 h após o consumo do alimento contaminado e podem durar de 24 a 48 h.²⁴⁰

2.5.2.2. *Salmonella* sp.

São bastonetes Gram–negativos, exibem motilidade, não esporulados, não encapsulados, não fermentam a lactose, crescem em temperatura ótima de 37°C e pH em torno de 7,0, são aeróbias facultativas e produzem gás durante a fermentação da glicose. Esse microrganismo é um dos principais causadores de enfermidades causadas por alimentos que são contaminados durante o processamento da matéria–prima ou por más condições higiênico–sanitárias do ambiente ou ainda por contaminações cruzadas através de equipamentos ou manipuladores.²⁴¹ Normalmente, a forma de disseminação da infecção é interpessoal e os sintomas são muito graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. Após a infecção, os indivíduos podem se tornar portadores por meses ou anos, constituindo então uma fonte contínua de infecção. A legislação brasileira estabelece a necessidade de ausência de colônias de *Salmonella* nos alimentos, justamente para evitar o prolongamento dos surtos de infecção (ANVISA)²⁴².

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos biomateriais

3.1.1. Gelatina

3.1.1.1. Extração da gelatina de pescado

As peles de corvina (*Micropogonias furnieri*) foram obtidas em uma indústria de processamento de pescado localizada na cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul (Brasil). As amostras foram armazenadas em sacos de polietileno a -20°C para uso posterior na extração de gelatina.

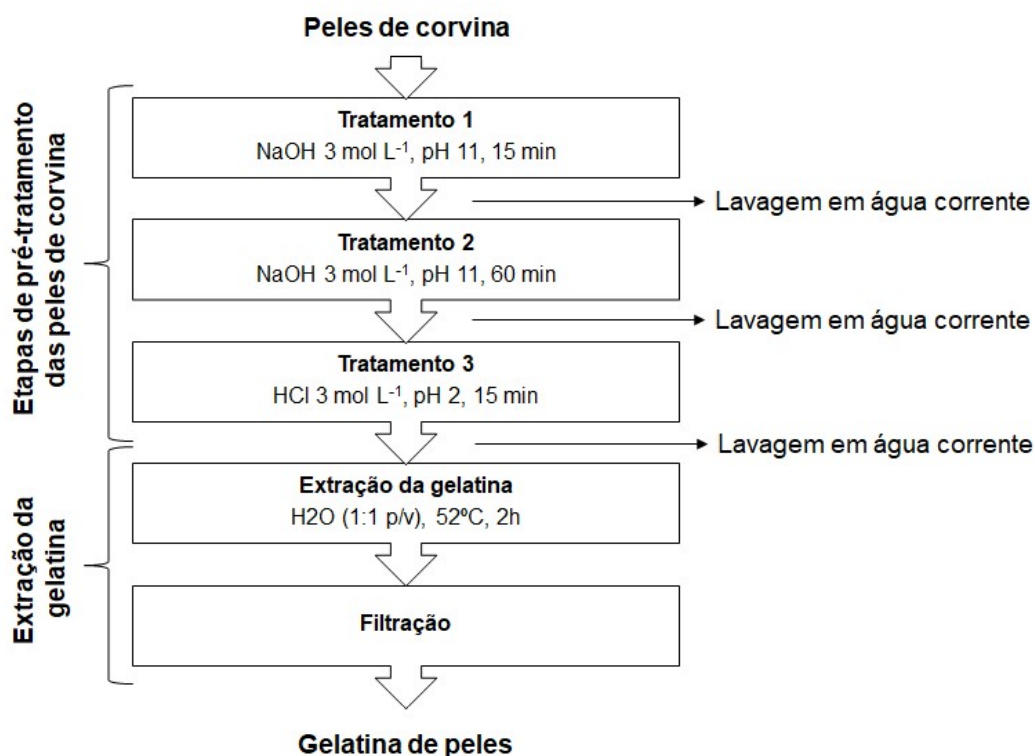
As peles de corvina, sem escamas, foram cortadas em pedaços quadrados (1 cm^2) utilizando uma faca. Após as peles foram lavadas em água destilada (1:6 m/v) a 4°C durante 5 min para remover a contaminação da superfície, seguido pela drenagem das peles através de peneiras para remoção do excesso de água.

Os pré-tratamentos das peles foram realizados segundo procedimento descrito por Bandeira et al.¹⁴⁰. As peles cortadas foram submetidas a três etapas sucessivas.

- a) Primeiramente foi realizado o intumescimento alcalino, onde foi adicionada água destilada em uma proporção 1:1 m/v, e o pH ajustado para 11 com solução de NaOH 3 mol L^{-1} . O controle do pH foi realizado com o auxílio de um pHmetro (Marte, MB-10P, Brasil). O material permaneceu em solução por 15 min sob agitação constante. Após foi realizada a drenagem do material com peneira, para em seguida ser feito o segundo tratamento alcalino.
- b) Na segunda etapa, para o segundo tratamento alcalino a solução foi renovada, novamente com a adição de água destilada (1:1 m/v), ajustando-se novamente o pH em 11, com solução de NaOH 3 mol L^{-1} , onde sob agitação constante, o material permaneceu em solução por 60 min. Em seguida, as peles foram retiradas da solução alcalina e drenadas em peneira, com posterior lavagem com água corrente, até atingir pH 7,0.
- c) Na terceira etapa, foi realizado o tratamento ácido, onde foi adicionada novamente água destilada, na relação de 1:1 (m/v), e o pH da solução ajustado para 2, com solução de HCl 3 mol L^{-1} por 15 min e após foi realizada uma lavagem final com água destilada (1:1 m/v).

Já para extração da gelatina, nas peles intumescidas foi adicionada água destilada na proporção 1:1 (m/v) à 52°C, em banho termostático (Quimis 214 D 2, Brasil), por período de 2 h. Foi realizada a drenagem das peles com peneira, recolhendo-se a solução de gelatina em becker. A solução de gelatina foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro Whatman nº 4 à vácuo. A Figura 10 apresenta o resumo em fluxograma das etapas de obtenção da gelatina de peles de corvina.

Figura 10. Fluxograma da extração de gelatina de peles de corvina



As soluções de gelatina de peles de corvina foram então armazenadas em refrigerador a -4°C, para posterior análises e para produção dos filmes biopoliméricos.

3.1.1.2. Caracterização da gelatina de peles de corvina

3.1.1.2.1. Força do gel

A força do gel foi determinada baseando-se na metodologia aplicada por Arnesen & Gildberg.¹⁰⁵ A gelatina liofilizada foi diluída até a concentração de 6,67% (7,5 g de gelatina em 105 g de água destilada), aquecidas a 45°C em banho termostático (Quimis, 214 D2, Brasil) por 30 min em recipientes padronizados de vidro com volume de 150 mL. Os frascos com as diluições foram levados ao refrigerador (Eletrolux, R 250, Brasil) para que as soluções fossem maturadas à 10°C por 17±1 h. A força do gel das gelatinas foi medida em analisador de textura (TA.XTplus, Stable Micro Systems,

Inglaterra), usando sonda de teflon com 12,5 mm de diâmetro pressionando 4 mm na gelatina à velocidade de 1 mm/s. A determinação foi realizada com três repetições.

3.1.1.2.2. Viscosidade

A determinação da viscosidade das soluções de gelatinas foi baseada na metodologia descrita por Silva et al.,²⁴³. A solução de gelatina (10 mL), com concentração de 6,67% (m/v) foi transferida para o viscosímetro Cannon–Fenske (Cannon Instrument Co., nº 100, EUA), que foi mantido em banho termostático à 25°C até que a solução de gelatina se encontrasse em equilíbrio com a temperatura do banho. Com um cronômetro, os tempos necessários para escoamento da solução foi anotado e a viscosidade calculada através da Equação (3).

$$\mu = K \times t \times \rho \quad (3)$$

sendo μ a viscosidade (Poise), K a constante do viscosímetro determinada experimentalmente com um fluido de viscosidade cinemática conhecida, t o tempo (s) e ρ a massa específica da solução na temperatura do teste (g cm^{-3}) e que foi determinada por picnometria.

3.1.1.2.3. Ponto de fusão e temperatura de gelificação

O ponto de fusão das gelatinas foi determinado pelo método BS 755 (BSI).²⁴⁴ Alíquotas de 10 mL das soluções de gelatinas (6,67%) foram transferidas para tubos de ensaio, onde permaneceram por 17 h a 7°C. Um volume de cinco gotas de solução de clorofórmio e corante azul de metileno (3:1, mL/mL) foi adicionado ao gel como indicador do ponto de fusão. A medição foi realizada a uma taxa de aquecimento de $0,1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A média entre a temperatura em que foi possível visualizar o momento da penetração das gotas do indicador nos géis, e a temperatura em que as soluções se encontraram completamente coradas foi registada, sendo a temperatura referente ao ponto de fusão.

A determinação da temperatura de gelificação foi realizada seguindo a metodologia descrita por Muyonga et al.,⁹⁸. Frascos contendo 100 mL das amostras de gelatinas (6,67%) foram acondicionados em banho termostático a 40°C, após foi adicionado em cada frasco um capilar, o qual foi mantido manualmente na vertical e o banho então resfriado lentamente de $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ a cada 2 min. A temperatura de gelificação foi definida quando o capilar se manteve na vertical sem o apoio manual.

3.1.1.2.4. Composição de aminoácidos

As amostras de gelatina (10 mg) foram hidrolisadas em 600 μ L de solução HCl 6 mol L⁻¹ a 110°C durante 24 h. Após as amostras foram dissolvidas em água mili-Q (\pm 7 mL), filtradas e liofilizadas. A determinação dos aminoácidos presentes na amostra foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (UFLC Shimadzu, Japão), conforme descrito por Silva et al.,²⁴³.

3.1.2. Quitina e Quitosana

3.1.2.1. Extração da quitina

A quitina utilizada nos experimentos foi extraída a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*), obtidos nas indústrias de pescado da cidade de Rio Grande-RS. Estes foram armazenados em freezer a -17°C até que fosse realizada a extração.

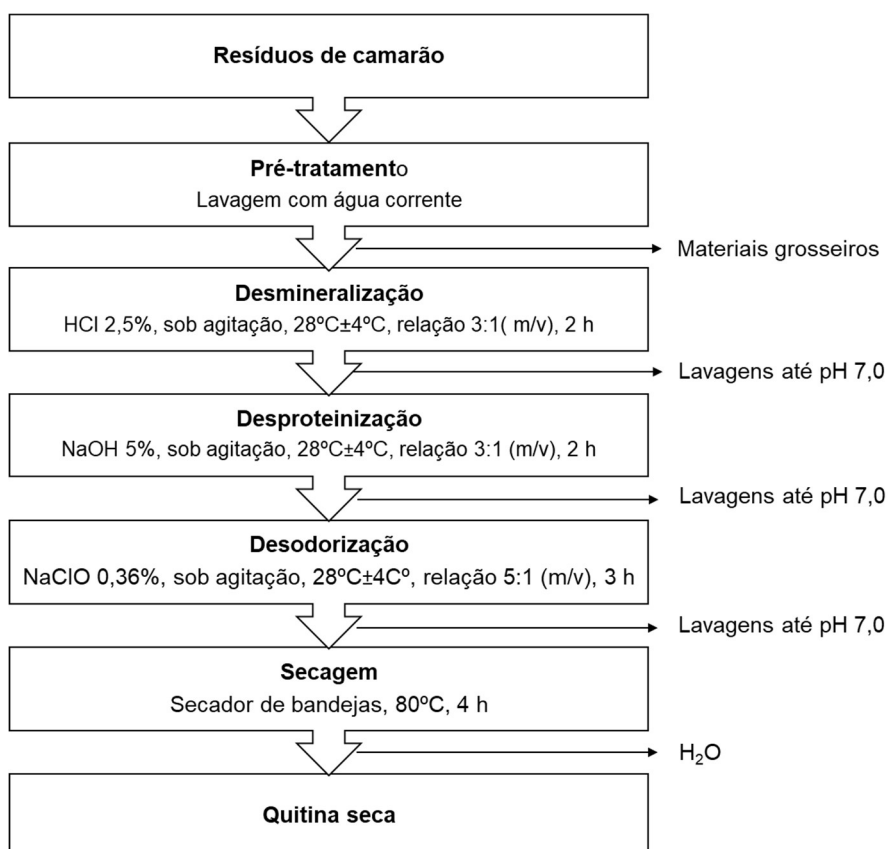
Foi realizado um pré-tratamento dos resíduos com água corrente, sendo este uma das operações preliminares à extração da quitina e tendo como objetivo a separação do material grosseiro, entre eles material vegetal, porções de tecido e outros materiais que eventualmente possam acompanhar o resíduo. A extração foi então realizada com a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar carbonatos, proteínas e pigmentos, através das etapas de desmineralização, desproteínização, desodorização e secagem,²⁴⁵ conforme segue.

- a) Desmineralização. Esta etapa teve por objetivo reduzir o teor de cinzas da matéria-prima. Após a lavagem dos resíduos, esta foi desmineralizada com ácido clorídrico 2,5% (v/v), em tanque agitado, a temperatura ambiente (28 \pm 4°C), com proporção de solução ácida/resíduo de 3:1 (m/v) por 2 h. Após, seguiu-se novas lavagens até pH neutro, o que experimentalmente se conseguiu com 8 lavagens. Esta etapa foi responsável pela eliminação de minerais e contaminantes que ainda poderiam estar presentes nos resíduos.
- b) Desproteínização. Esta etapa teve a função de reduzir o teor de nitrogênio proteico, e consistiu em adicionar à matéria-prima desmineralizada que se encontrava no tanque agitado, solução de hidróxido de sódio 5% (m/v), a temperatura ambiente (28 \pm 4°C), com proporção de solução álcali/resíduo de 3:1 (m/v) por 2 h. Em seguida foi realizada a lavagem deste material, até pH neutro, o que experimentalmente se conseguiu com 8 lavagens.

- c) Desodorização/despigmentação. Nesta etapa, ao material, ainda dentro do tanque, foi adicionado solução de hipoclorito de sódio 0,36% (v/v), a temperatura ambiente ($28\pm 4^\circ\text{C}$), com proporção de solução NaClO/resíduo de 5:1 (m/v) por 3 h. O objetivo desta operação foi acentuar a redução de odor proveniente do material e a retirada de pigmentos. Fez-se então, a lavagem com água para retirar os resíduos do reagente, até pH neutro, o que experimentalmente conseguiu-se com 6 lavagens.
- d) Secagem. Após obter a quitina úmida foi realizada a secagem do produto, que foi realizada em secador de bandejas, a uma temperatura de 80°C por 4 h. A operação de secagem é necessária, pois além aumentar o tempo de conservação da quitina, promove maior facilidade no manuseio principalmente no processo de conversão em quitosana, pois possibilita que a massa de matéria-prima no reator de desacetilação seja maior, e garante que a umidade de quitina não altere a concentração de solução de NaOH.

A Figura 11 apresenta o fluxograma das etapas de extração de quitina de resíduos de camarão.

Figura 11. Fluxograma de extração da quitina a partir de resíduos de camarão

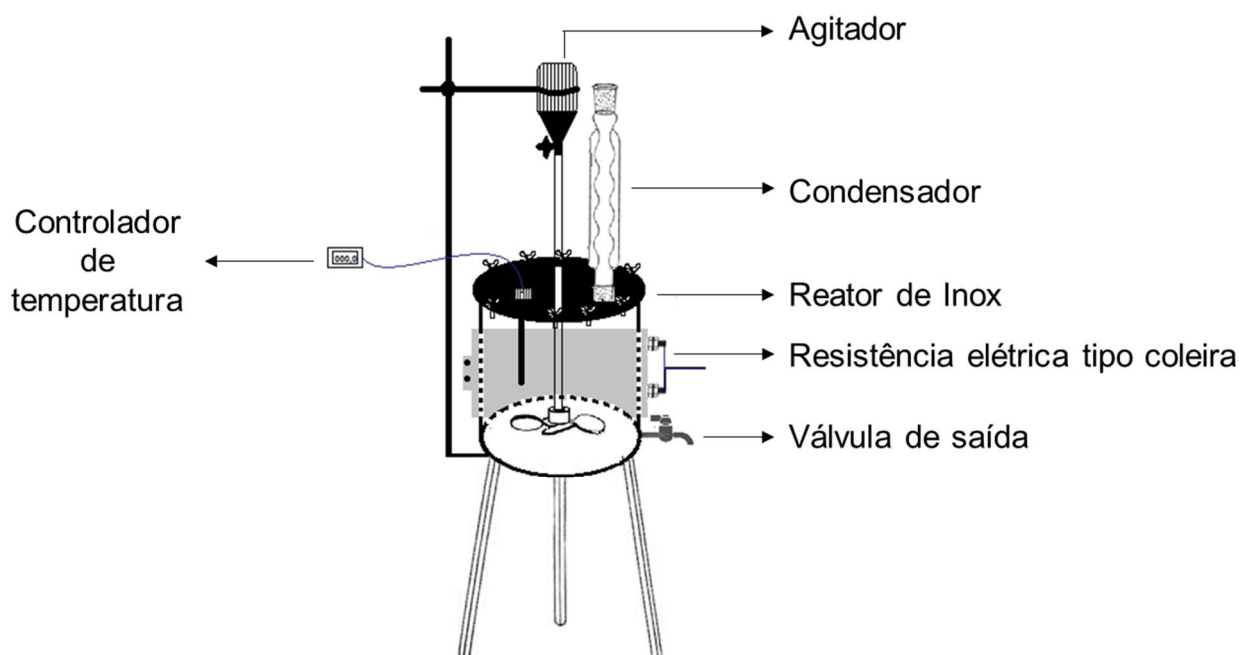


Após a quitina seca foi armazenada em sacos de polietileno, à temperatura ambiente e protegidos da luz, até sua utilização para a reação desacetilação e conversão em quitosana.

3.1.2.2. Produção de quitosana

Para a produção de quitosana, a quitina seca foi moída em tamanho de aproximadamente 1 mm, em moinho de facas (Wiley Mill Standard modelo nº 3, Swedesboro, EUA). A reação de desacetilação foi realizada em um reator de aço inoxidável com capacidade para 4 L de solução, com agitação e aquecimento elétrico (o reator foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Industrial/FURG). A Figura 12 apresenta o desenho esquemático do reator.

Figura 12. Esquema do reator utilizado nas reações de desacetilação



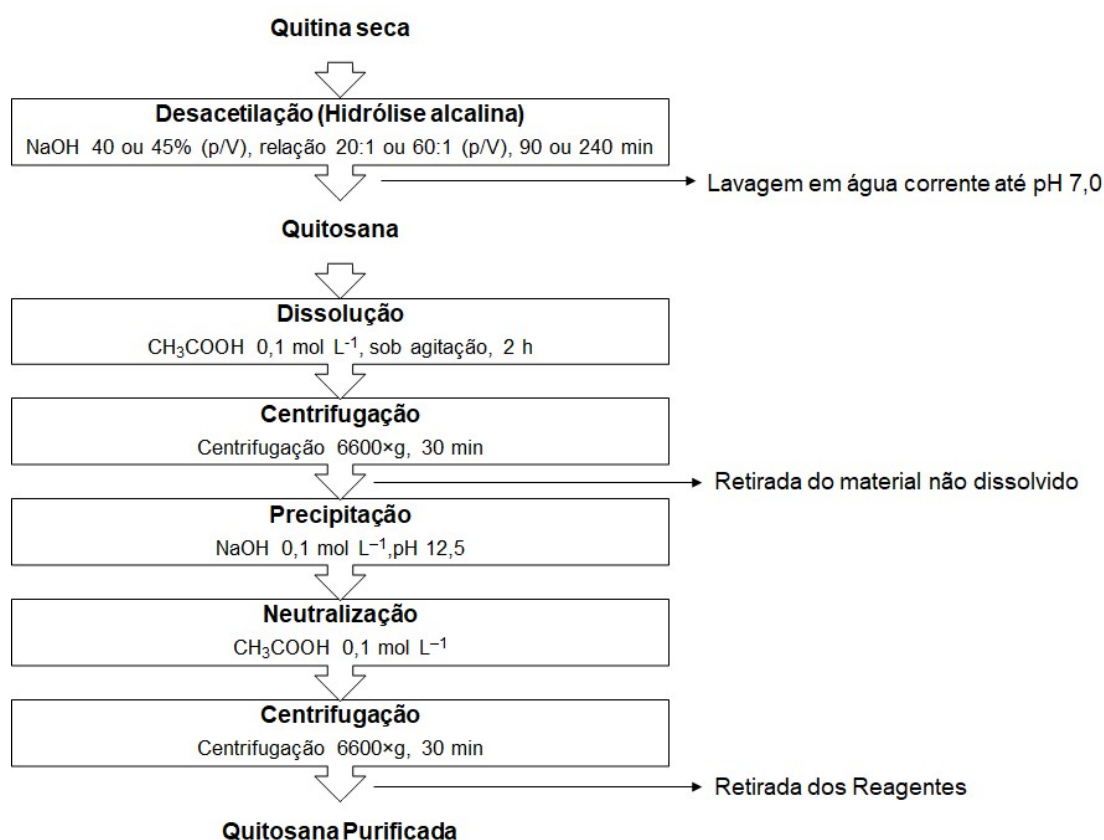
Para obtenção das quitosanas com diferentes características de M_v e GD , foram realizadas diferentes condições de reação que foram otimizadas em estudo anterior, descrito em Moura et al.,⁴². No presente estudo, as condições utilizadas, foram relação de NaOH/quitina (20:1 e 60:1 mL g⁻¹), concentração de NaOH (40 e 45%) e tempo de reação (90 e 240 min). As variações nas condições de hidrólise alcalina, utilizadas nos experimentos, possibilitaram a obtenção de quitosanas com diferentes características químicas de M_v e GD , o que tornou possível avaliar estas características separadamente na formação dos filmes e das blendas. A Tabela 2, apresenta as condições de reação, para cada experimento de obtenção das diferentes quitosanas.

Tabela 2. Condições de hidrólise alcalina utilizadas na produção de quitosanas com diferentes características (M_v e GD)

| Quitosana | Relação NaOH/quitina (mL g ⁻¹) | Concentração de NaOH (%) | Tempo de reação (min) |
|-----------|---|-----------------------------|--------------------------|
| Q1 | 20:1 | 40 | 90 |
| Q2 | 20:1 | 40 | 240 |
| Q3 | 60:1 | 45 | 240 |
| Q4 | 60:1 | 40 | 240 |

Após a reação de conversão, cada uma das amostras foi purificada. A purificação foi realizada através da dissolução da quitosana em solução de CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹, por 2 h sob agitação constante. Após o sal de quitosana foi centrifugado (Sigma 6–15, D–37520, Alemanha) a 6600 × g por 30 min, para separação de material não dissolvido. A solução resultante foi então precipitada com NaOH 0,1 mol L⁻¹ até pH 12,5 e, em seguida foi realizada a neutralização com solução de CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹. Por fim foi realizada uma nova centrifugação para separar os reagentes da pasta de quitosana. A Figura 13 apresenta o resumo em fluxograma das etapas de obtenção das diferentes quitosanas.

Para fins de conservação, a pasta de quitosana purificada foi seca em secador tipo leito de jorro, onde as condições de operação utilizadas foram realizadas de acordo com Dotto et al.,²⁴⁶ com a temperatura de entrada do ar de secagem de 90°C, a concentração de pasta de 4% (b.u.) e a taxa de alimentação da pasta de 0,18 kg_{pasta} kg_{inerte}⁻¹ h⁻¹.

Figura 13. Fluxograma de obtenção das quitosanas de diferentes M_v e GD

3.1.2.3. Caracterização da quitosana

3.1.2.3.1. Grau de desacetilação (GD)

Para a determinação do grau de desacetilação foi utilizado o método de titulação potenciométrica linear.^{167, 247} Esta análise foi feita dissolvendo 0,25 g de quitosana em 20 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹ e avolumada até 100 mL com água destilada. O pH das soluções foi ajustado em aproximadamente 2,0 com solução padrão de NaOH 0,1 mol L⁻¹, utilizando um pHmetro (MB10–Marte–Brasil) sob agitação constante à 600 rpm com um agitador magnético (FISATOM 752A, Brasil), sendo considerado este, o ponto inicial da titulação. A titulação foi prosseguida até a solução de quitosana alcançar o pH de aproximadamente 6,0 (faixa de não protonação da quitosana). Um valor de $f(x)$ correspondente ao volume de NaOH utilizado foi calculado utilizando a Equação (4).

$$f_{(x)} = \left(\frac{V_0 + V}{N_B} \right) \times ([H^+] - [OH^-]) \quad (4)$$

sendo, V_0 o volume de solução de quitosana (mL), V o volume de NaOH utilizado na titulação (mL), N_B a concentração do NaOH (mol L^{-1}); $[H^+]$ a concentração de H^+ (meq L^{-1}); e $[OH^-]$ a concentração de OH^- (meq L^{-1}).

A curva de titulação linear foi obtida plotando um gráfico de $f(x)$ em função do volume correspondente de NaOH.

O volume de NaOH ao fim da titulação, V_e , foi calculado extrapolando a curva de titulação linear em função volume de NaOH adicionado. O grau de desacetilação da amostra de quitosana foi calculado utilizando a Equação (5) e (6).

$$GD(\%) = \frac{\emptyset}{[(W - 161\emptyset)/(204 + \emptyset)]} \times 100 \quad (5)$$

sendo,

$$\emptyset = \frac{(N_A V_A - N_B V_e)}{1000} \quad (6)$$

onde, N_A a concentração de HCl (mol L^{-1}), V_A o volume de HCl (mL), N_B a concentração de NaOH (mol L^{-1}), V_e o volume de NaOH ao fim da titulação (mL) e W a massa de quitosana (g).

3.1.2.3.2. Massa molar viscosimétrica média (M_v)

As amostras de quitosana foram dissolvidas em um sistema solvente constituído do ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, do cloreto de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e água. A viscosidade das amostras foi medida em um viscosímetro capilar Cannon–Fenske (Schott Geraete, modelo GMBH–D65719, Alemanha), em cinco diferentes concentrações (entre $0,1$ e $1,2 \text{ g L}^{-1}$), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

No capilar foram colocados 10 mL de amostra, que passaram através dele, medindo-se o tempo de escoamento em segundos. O tempo de escoamento da solução e do solvente através do capilar foi utilizado para calcular a viscosidade cinemática. A relação entre a viscosidade cinemática e dinâmica é mostrada na Equação (7).

$$v = \frac{\mu}{\rho} \quad (7)$$

sendo v a viscosidade cinemática (Stoke); μ a viscosidade dinâmica (Poise); ρ a massa específica da amostra (g mL^{-1}).

A viscosidade específica (η_{sp}), como uma relação entre as viscosidades dinâmicas da solução e do solvente, foi determinada utilizando-se a Equação (8).

$$\eta_{sp} = \frac{\mu_{\text{solução}} - \mu_{\text{solvente}}}{\mu_{\text{solvente}}} \quad (8)$$

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi estimada por ajuste da equação de Huggins de acordo com Weska et al.,¹⁶³, (Equação (9)).

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k \times [\eta]^2 \times c \quad (9)$$

sendo (η_{sp}/c) a viscosidade reduzida em mL g^{-1} , c a concentração das soluções (g mL^{-1}), k a constante válida para cada polímero (g mL^{-1}), e $[\eta]$ a viscosidade intrínseca (mL g^{-1}).

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ da solução foi determinada através de um gráfico da viscosidade reduzida (η_{sp}/c) em função da concentração (c) das soluções das amostras, por extrapolação da reta obtida por regressão linear para $c=0$, conforme apresentado por Alsarra et al.²⁴⁸.

A massa molar viscosimétrica média (M_v) da quitosana foi calculada a partir do valor da viscosidade intrínseca usando-se a equação empírica de Mark-Houwink-Sakurada (Equação (10)), citada por Roberts & Domszy,²⁴⁹.

$$[\eta] = k \times M_v^\alpha \quad (10)$$

sendo que $k = 1,81 \times 10^{-3}$ e $\alpha = 0,93$ são constantes que dependem do sistema solvente-polímero.

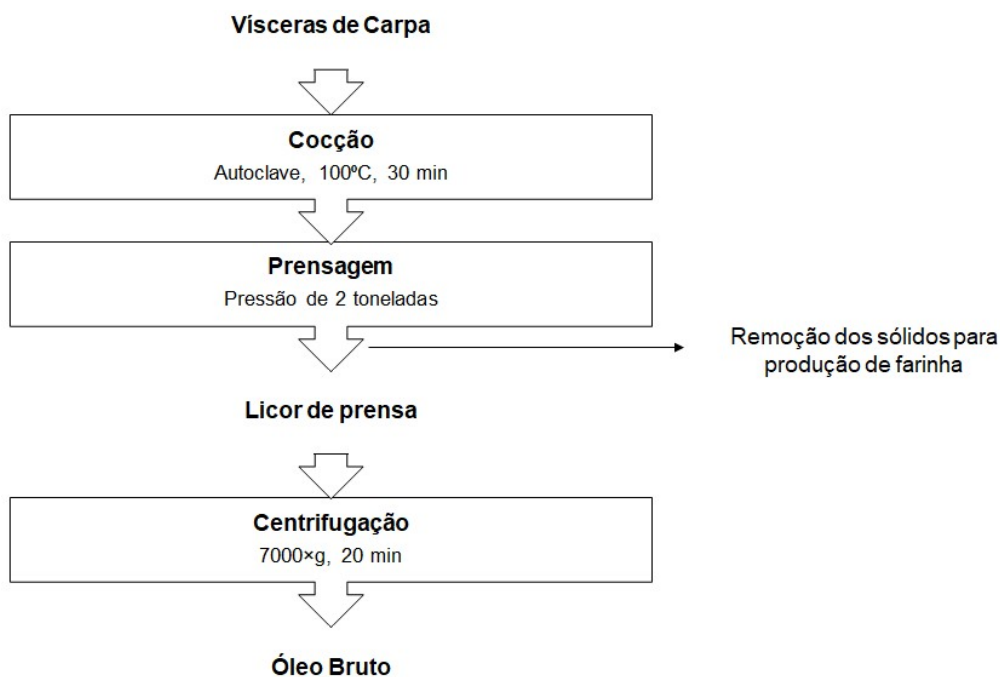
3.1.3. Concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs)

3.1.3.1. Extração do óleo bruto de carpa

As vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*) foram obtidas de piscicultores do município de Roca Sales/RS, logo após o abate do peixe. Estes foram imediatamente refrigerados e estocados em embalagens plásticas em freezer à -18°C . O processo termomecânicos de elaboração de farinha de pescado para obtenção de óleo bruto de carpa foi realizado segundo procedimento descrito por Crexi, Souza–Soares, & Pinto,¹⁹⁴ através das etapas de cocção, prensagem e centrifugação.

Primeiramente as vísceras de carpa foram descongeladas durante 12 h à temperatura ambiente. Para a extração foram utilizados 10 kg de vísceras, sendo estas submetidas a cocção em autoclave (Rochedo – modelo Idealclave, Brasil), durante 30 min e temperatura 100°C . Após o material foi prensado para separação do licor de prensa dos sólidos. Para a separação do óleo bruto de carpa da água de cola resultante do processo foi realizada uma centrifugação do licor de prensa, em centrífuga (Sigma modelo 6–15, D–37250, Alemanha), com rotação de $7000 \times g$ durante 20 min. A Figura 14 apresenta o resumo em fluxograma das etapas de obtenção do óleo bruto.

Figura 14. Fluxograma de extração do óleo bruto



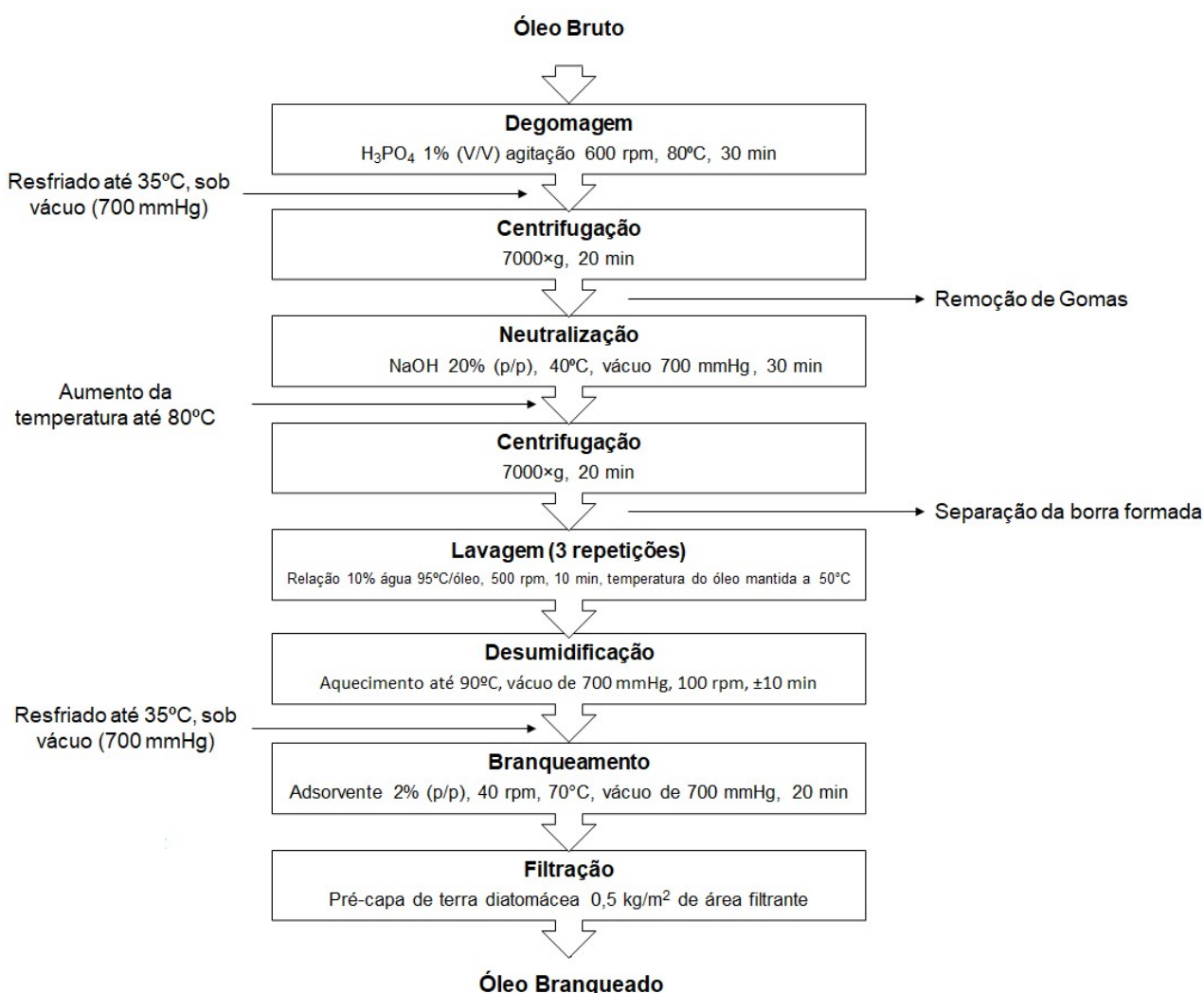
3.1.3.2. Obtenção do óleo branqueado

O óleo branqueado foi obtido a partir do refino do óleo bruto, segundo metodologia descrita por Crexi et al.,⁸². O refino seguiu as seguintes etapas: degomagem, neutralização, lavagem e branqueamento.

A etapa de degomagem foi realizada durante 30 min, a uma temperatura de 80°C e agitação de 500 rpm, com adição de solução de ácido fosfórico 1%, 85% (v/v) em relação à massa do óleo. Após o óleo foi resfriado até a temperatura de 35°C sob vácuo (710 mmHg), e a separação das gomas foi realizada por centrifugação à 7000 × g por 20 min. Logo após o óleo foi aquecido à 40°C, sob vácuo (710 mmHg). Foi adicionado solução de NaOH 20% (m/m) em excesso para elevar o pH do óleo e evitar a reversão da reação. Após essa neutralização do óleo, a temperatura foi elevada à 80°C para facilitar a separação da borra formada. Assim que a temperatura de 80°C foi atingida, resfriou-se o óleo até 35°C, sob vácuo. Após esse procedimento o óleo foi centrifugado, para separação da borra, por 20 min e 7000 × g.

Na etapa de lavagem, foi adicionado 10% de água em relação a massa de óleo à 95°C, durante um tempo de contato de 10 min, com agitação de 500 rpm e temperatura do óleo sendo mantida a 50°C. Esta etapa foi repetida três vezes. A etapa de desumidificação foi realizada pelo aquecimento do óleo neutralizado até 90°C, sob vácuo de 710 mmHg e agitação de 500 rpm, até que não ocorresse mais evaporação (aproximadamente 20 min). Após o procedimento, desligou-se o aquecimento e esperou-se até a temperatura atingir 35°C, sob vácuo.

O branqueamento é realizado em duas etapas. Inicialmente, a clarificação foi realizada à temperatura de 70°C, sob agitação de 40 rpm e vácuo de 710 mmHg, com adição de 5% de adsorvente (mistura de terra ativada e carvão ativado na relação de 9:1), sendo o tempo de contato de 20 min.²⁵⁰ Após, foi feita a filtração do óleo em funil de Buchner com uma pré-capa de terra diatomácea. Para a pré-capa foi utilizada a quantidade de terra diatomácea 0,5 kg/m² de área filtrante. A Figura 15 apresenta o resumo em fluxograma das etapas de obtenção do óleo de pescado branqueado.

Figura 15. Fluxograma de obtenção do óleo de pescada refinado

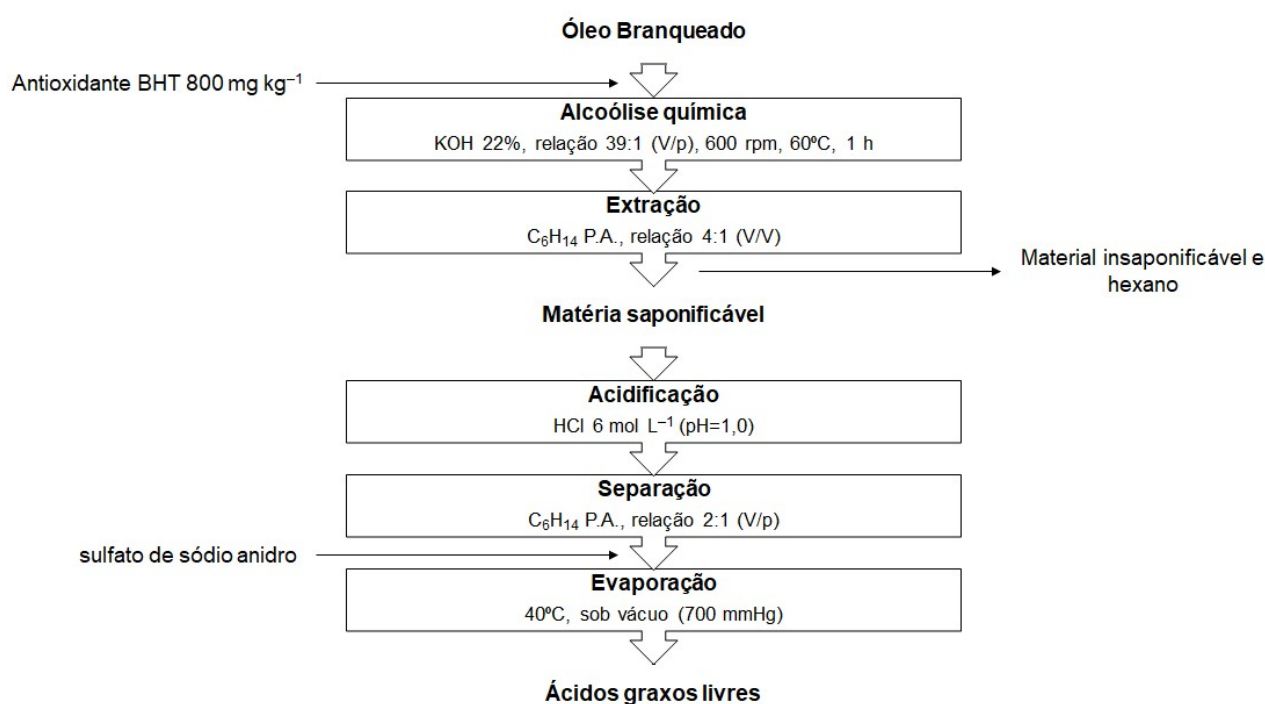
3.1.3.3. Obtenção dos ácidos graxos livres (hidrólise química)

O óleo branqueado foi submetido à reação de hidrólise química para a obtenção dos ácidos graxos livres. Esta foi realizada utilizando um reator, sob agitação constante, aquecimento e vácuo. Foi adicionado ao óleo branqueado de carpa, antioxidante di-terc-butil metil fenol (BHT) (800 mg kg^{-1}), e uma solução alcoólica de KOH em álcool etílico anidro, a reação ocorreu sob agitação de 600 rpm. As condições utilizadas na reação de alcoólise foram realizadas segundo metodologia descritas por Crexi et al.,¹⁹, como sendo melhores para maiores rendimentos na obtenção de ácidos graxos livres. concentração do catalisador (22%), proporção álcool etílico/óleo (39:1), temperatura (60°C) e tempo (1 h).

Após o término da reação, a separação foi realizada adicionando à mistura saponificada, água destilada na relação de 2:1 (v/v) em função da massa inicial de óleo. Para a extração da matéria insaponificável foi adicionado hexano 4:1 (v/v) em relação a

massa de óleo inicial. Este procedimento foi realizado duas vezes. A matéria insaponificável que continha hexano foi rejeitada. A matéria saponificável foi então acidificada com solução de HCl 3 mol L⁻¹ (pH=1,0). Após a mistura foi transferida para um funil de separação, e os ácidos graxos foram extraídos com adição de hexano (duas vezes o volume em relação à quantidade inicial de óleo). A camada de hexano, contendo os ácidos graxos livres, foi seca com sulfato de sódio anidro e o excedente foi removido a 40°C, sob vácuo (700 mmHg), para recuperar os ácidos graxos livres. A Figura 16 apresenta o resumo em fluxograma das etapas de obtenção dos ácidos graxos livres.

Figura 16. Fluxograma de obtenção dos ácidos graxos livre do óleo de pescada



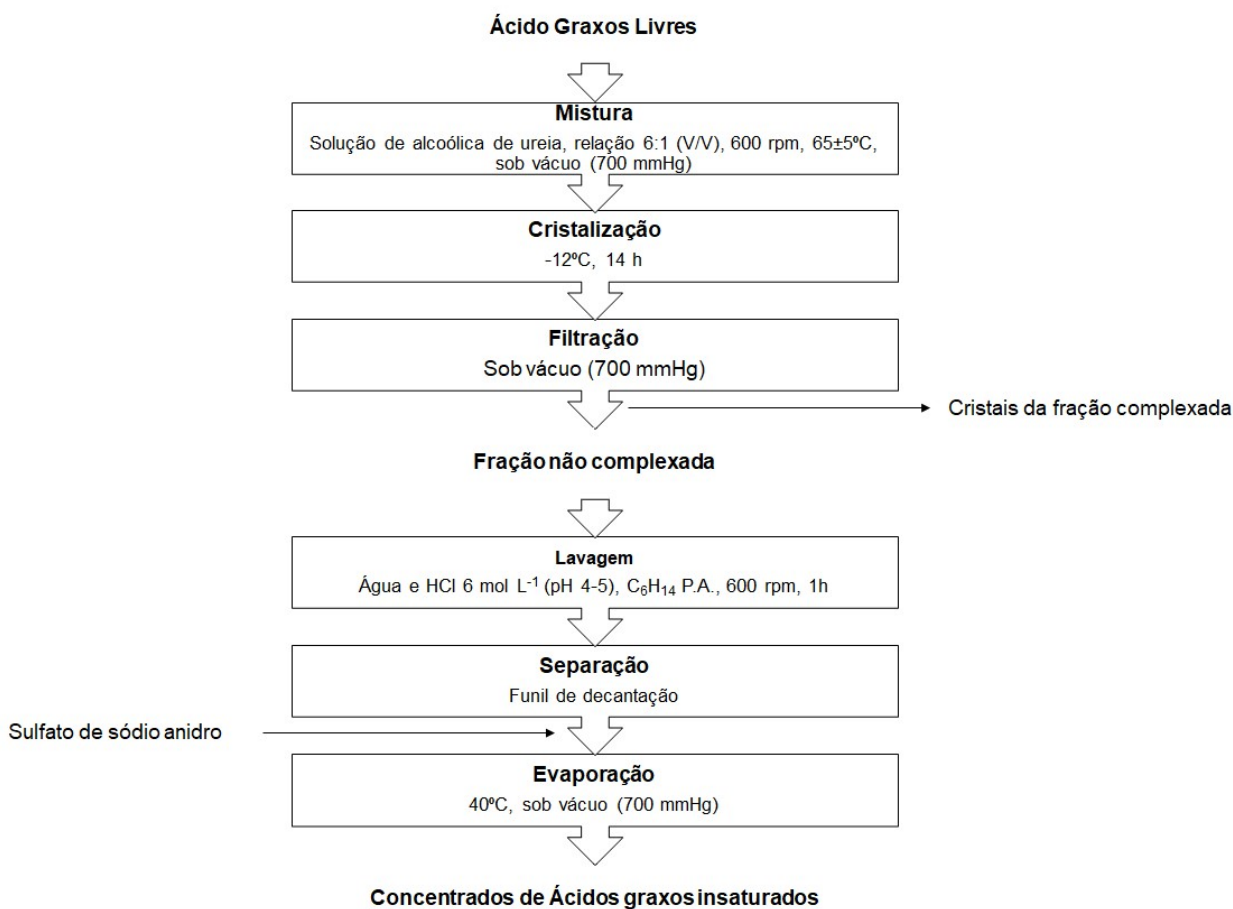
3.1.3.4. Obtenção dos concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs)

Os AGIs, foram obtidos segundo metodologia descrita por Paim et al.,¹⁹⁹, pelo processo de cristalização por complexação com ureia. Os ácidos graxos livres obtidos através da reação de hidrólise foram complexados utilizando solução alcoólica de ureia (20% p/v em álcool etílico 95%), relação de mistura ácido graxo.ureia de 6:1 (m/m), realizada à -12 °C, durante 14 h.

Após a formação dos cristais (contendo ácidos graxos saturados), estes foram separados da fração líquida (contendo AGIs) por filtração à vácuo em lã de vidro. A fração líquida foi diluída com volume igual de água destilada e acidificada a pH 4–5 com solução de HCl 6 mol L⁻¹, após adicionou-se volume igual de hexano e a mistura foi

agitada por 1 h e transferida para um funil de separação. A camada de hexano foi lavada com água destilada (igual volume), e em seguida a água de lavagem foi separada e descartada. Após foi adicionado sulfato de sódio anidro e o solvente restante removido a 40°C, sob vácuo, obtendo-se então a fração de concentrados de ácidos graxos insaturados. A Figura 17 apresenta o fluxograma das etapas de obtenção dos concentrados de ácidos graxos insaturados.

Figura 17. Fluxograma de obtenção dos concentrados dos ácidos graxos insaturados



3.1.3.5. Perfil de ácidos graxos dos concentrados de AGIs

Para determinar os percentuais de ácidos graxos da fração não complexada com ureia, foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico (Shimadzu, GCMSQP2010Plus, EUA), equipado com injetor *split/splitless* acoplado com detector de massas. Temperaturas de operação do detector, interface, 280°C; e fonte a 230°C. Detecção no modo *full scan* com varredura m/z 30 até m/z 500, em um tempo de varredura de 0,2 s. O modo de ionização utilizado foi o impacto de elétrons a 70 eV. As condições de operação do cromatógrafo foram. injetor, 250°C; coluna, 80°C (temperatura inicial, 0 min); seguido de gradiente de 10 °C min⁻¹ até 180°C, e depois 7 °C min⁻¹ até a

temperatura final de 330°C; fluxo de gás He, 1,3 mL min⁻¹; pressão, 88,5 kPa; velocidade linear média, 42 cm s⁻¹; volume de injeção de 1 µL com razão de split de 1.100. A coluna utilizada foi *Crossbond* 5% difenil/95% dimetil polisiloxano (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Restek). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção.

O preparo das amostras, para a cromatografia gasosa, foi realizado conforme o método de derivatização para amostras contendo alto percentual de ácidos graxos livres. Neste método é retirada uma alíquota de 0,3 g de óleo e é adicionado 3mL de trifluoreto de boro (BF₃). A amostra então foi mantida à 70°C durante 20 min, após esta foi lavada em solução de água/hexano grau HPLC na relação (1.1). A água de lavagem foi descartada e a solução de hexano contendo os ácidos graxos foi então evaporada em rotaevaporador (Heidolph – modelo Laborota 4000) sob vácuo de 700 mmHg e submersa em banho de glicerina à 40°C. Após este procedimento, 10 µL das amostras derivatizadas foram diluídas com 2 mL de hexano grau HPLC, e logo após injetadas no GC–MS em triplicata (n=3).

3.2. Filmes e blendas baseadas em biomateriais

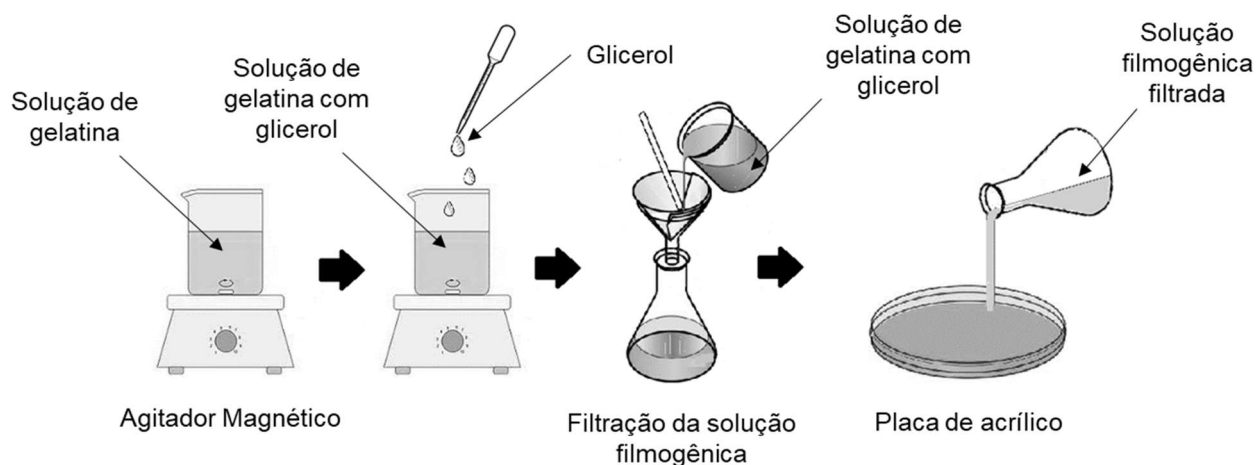
3.2.1. Elaboração dos filmes e das blendas

Todos os filmes e as blendas foram elaborados pela técnica *casting*. Todas as soluções filmogênicas foram preparadas com uma massa de sólidos de 2 g (b.s.), para que estes pudessem ser comparados entre si, já que foram elaborados com diferentes formulações, dependendo das biomoléculas utilizadas.

3.2.1.1. Filmes à base de gelatina de peixe

Os filmes à base de gelatina, foram elaborados de acordo com Bandeira et al.¹⁴⁰. A solução de gelatina de peixe, contendo 1,8 g (m/v) de gelatina, foi agitada durante 30 min em agitador magnético (FISATOM 752A, Brasil) a 300 rpm e temperatura de 30±2°C. Após foi adicionado 0,2 g de glicerol (como plastificante), e o pH foi ajustado para 4,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução filmogênica foi então agitada por mais 2 h e filtrada em funil com papel filtro Whatman nº 4. Em seguida, 50 mL da solução formadora do filme foi vertida em placas de acrílico. A representação esquemática do processo de elaboração do filme de peixe com glicerol está apresentada na Figura 18.

Figura 18. Representação esquemática da elaboração do filme de gelatina de peixe

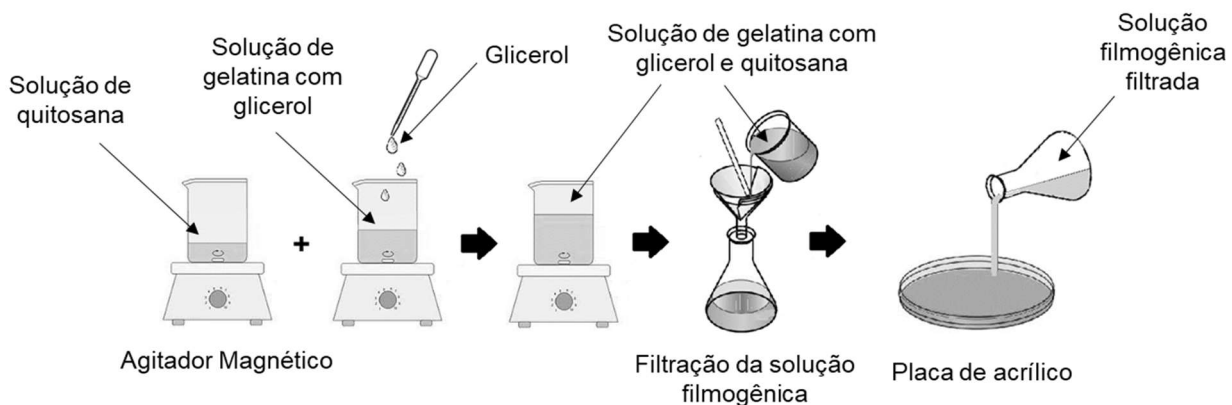


As placas contendo a solução filmogênica, foram colocadas em estufa, com circulação forçada do ar, por 24 h a 40°C. Logo, os filmes foram removidos das placas e colocados em dessecador a 25±1°C por 48 h antes da caracterização.

3.2.2. Blendas à base de gelatina de peixe com a adição de quitosana

Inicialmente, 0,2 g de cada amostra de quitosana Q1, Q2, Q3 e Q4, foram dissolvidas em 20 mL de solução de ácido acético (0,1 mol L⁻¹) sob agitação constante de 300 rpm em um agitador magnético (Marte, MAG-01H, Brazil) por 2 h. Posteriormente, 30 mL de solução de gelatina de peixe (5,3% m/v) e 0,2 g de glicerol (como plastificante) foram adicionados a cada solução, e o pH foi ajustado para 4,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.¹⁴⁰ Assim, o peso total do sólido seco em cada filme foi de 2 g. As soluções foram agitadas a 300 rpm durante 2 h para formar a mistura, e filtrada em funil com papel filtro Whatman nº 4. Em seguida, as soluções (50 mL) foram vertidas nas placas de acrílico. A representação esquemática do processo de elaboração do filme de gelatina de peixe com glicerol e adição de quitosana está apresentada na Figura 19.

Figura 19. Representação esquemática da elaboração do filme a base de gelatina de peixe com adição de quitosana



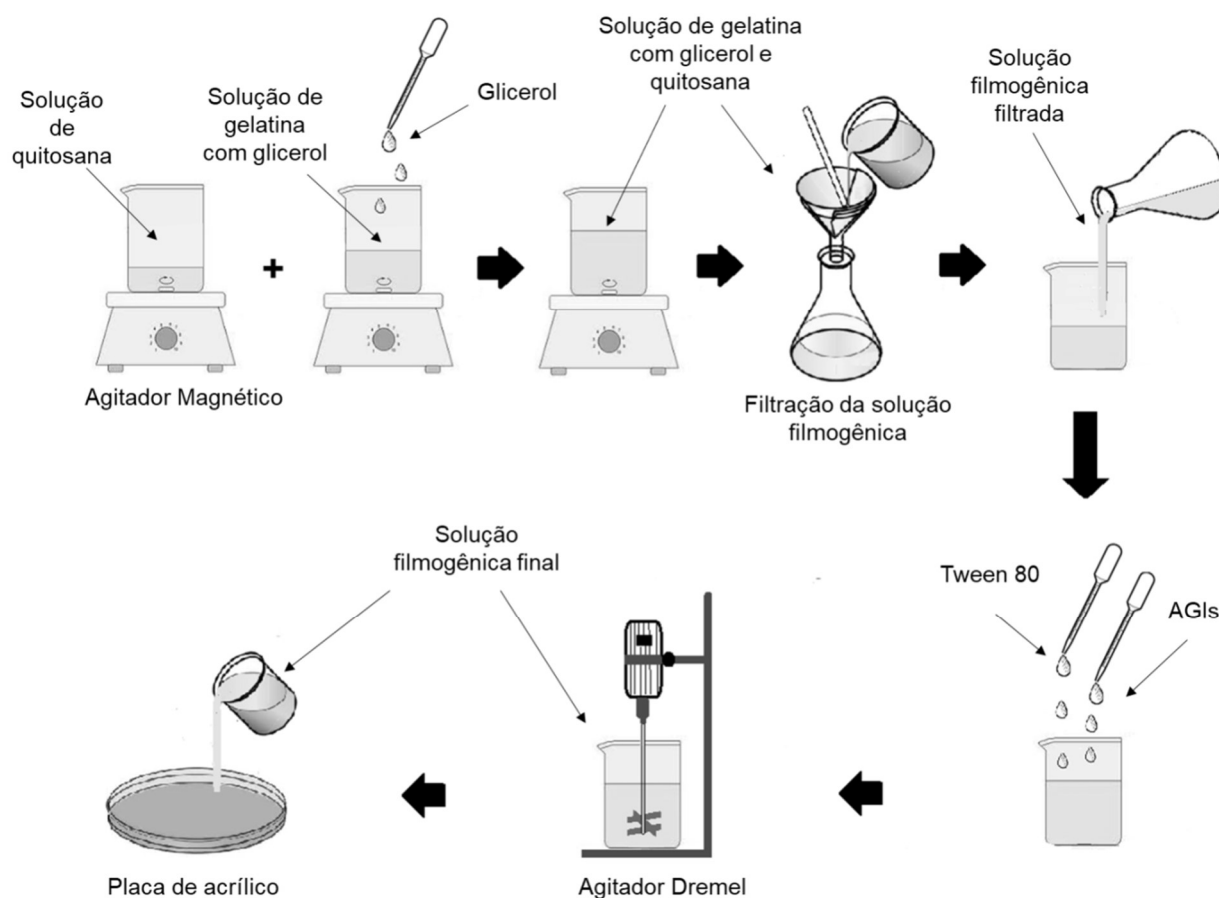
As placas contendo a solução filmogênica à base de gelatina de peixe, com adição das diferentes quitosanas, foram colocadas em estufa, com circulação forçada do ar, por 24 h a 40°C. Logo, os filmes foram removidos das placas e colocados em dessecador a 25±1°C por 48 h antes da caracterização.

As soluções filmogênicas foram nomeadas como. G [Gelatina], G-Q1 [Gelatina/Quitosana-1], G-Q2 [Gelatina/Quitosana-2], G-Q3 [Gelatina/Quitosana-3] e G-Q4 [Gelatina/Quitosana-4]

3.2.3. Blendas à base de gelatina com adição de quitosana e ácidos graxos insaturados

As blendas de gelatina de peixe/quitosana incorporados com concentrados de ácidos graxos insaturados foram preparados dissolvendo-se 0,20 g de quitosana em 20 mL de solução de ácido acético (0,1 mol L⁻¹), sob agitação constante de 300 rpm em agitador magnético por 2 h. Em seguida, 30 mL de solução de gelatina de peixe (4,7% m/v) contendo 0,2 g de glicerol foram adicionados, e agitados (300 rpm) por 2 h. A solução foi filtrada em funil com papel filtro Whatman nº 4. Depois, a esta solução filtrada, foram adicionados 0,1 g de Tween 80 e 10% (m/v) de AGIs (em relação a massa total de sólido seco de 2 g). O pH foi ajustado para 4,0, com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em cada emulsão. As soluções filmogênicas, foram então formadas por agitação a 25.000 rpm (Dremel Stylus, 1100-01; EUA) por 10 min. A representação esquemática do processo de elaboração do filme de peixe com glicerol, adicionando quitosana, ácidos graxos insaturados e Tween 80, está apresentada na Figura 20.

Figura 20. Representação esquemática da elaboração da blenda gelatina/quitosana/AGI



Essas soluções foram vertidas em placas de acrílico e inseridas em um secador com circulação forçada de ar (40°C por 24 h). Os filmes foram removidos das placas e colocados em dessecadores à 25°C, por 48 h, antes da caracterização.

As soluções filmogênicas foram denominadas como. GA [Gelatina/AGI], GA-Q1 [Gelatina/AGI/Quitosana-1], GA-Q2 [Gelatina/AGI/Quitosana-2], GA-Q3 [Gelatina/AGI/Quitosana-3] e GA-Q4 [Gelatina/AGI/Quitosana-4].

3.3. Caracterização dos filmes e das blends

3.3.1. Espessura

As espessuras dos filmes foram determinadas, com a utilização de um micrômetro digital (MitutoyaCorp, MDC-25S, Japão), e foi calculada a partir de dez medidas aleatórias na superfície da amostra, de acordo com Moura et al.,⁴². A Figura 21 apresenta a imagem do micrômetro digital utilizado.

Figura 21. Micrômetro digital para medida das espessuras dos filmes



3.3.2. Propriedades Mecânicas (RT e AR)

As propriedades mecânicas (RT e AR) foram medidas por um analisador de textura (Stable Microsystems SMD, TA.XP2i, Reino Unido) de acordo com o padrão ASTM D-882-02 (ASTM)²¹¹, auxiliados pelo programa Texture Expert Exceed 2.61 (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra). A imagem do equipamento está apresentada na Figura 22.

Figura 22. Imagem do filme sendo submetido ao teste de RT e AR

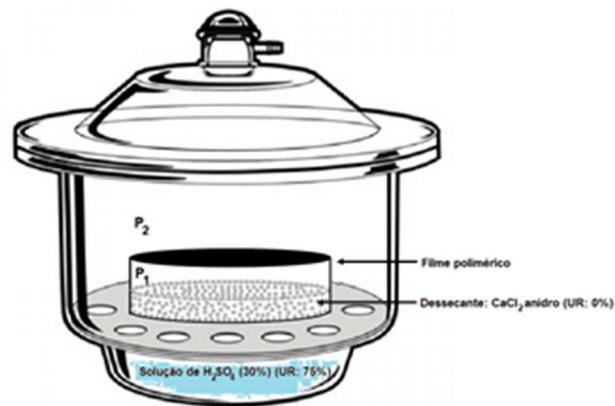


As amostras de filmes foram cortadas em tamanhos de 25 mm de largura e 100 mm de comprimento. Após foram fixados no equipamento com uma célula de carga de 50 N, com distância de separação inicial entre as garras de 50 mm e velocidade de tração de 2 mm s^{-1} , conforme apresentado na Figura 22.

3.3.3. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes biopoliméricos foi determinada pelo método gravimétrico a 25°C , usando o método padrão E0096-00 (ASTM).²¹⁵ As amostras de cada filme, em forma de discos ($D=50 \text{ mm}$), foram fixadas em células de permeação, contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) granulado, e estas foram acondicionadas em dessecadores a 25°C e 75% de umidade relativa (UR), conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23. Esquema da célula de difusão para determinação da PVA



A partir do ganho de massa do CaCl₂ granulado, mensurado em intervalos de 24 h durante 7 dias, foi possível determinar o vapor de água transferido através do filme, de acordo com a Equação (11).

$$PVA = \frac{m_{ab}}{t} \times \frac{e}{A \times \Delta P} \quad (11)$$

sendo, PVA a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$), m_{ab} a massa de umidade absorvida (g), t o tempo de duração dos testes (s), “e” a espessura média dos filmes (m), “A” a área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP a diferença de pressão parcial através do filme (kPa).

3.3.4. Cor

Os parâmetros de cor foram determinados utilizando o sistema Minolta (CR-300, Minolta Corporation, EUA) através da medida do diagrama tridimensional de cor ($L^* - a^* - b^*$), sendo os parâmetros L^* (luminosidade), a^* (cromaticidade que varia de verde – vermelho) e b^* (cromaticidade que varia do azul – amarelo). Para avaliar o ângulo Hue (H_{ab}), foi utilizada a Equação (12) (0° (vermelho), 90° (amarelo), 180° (verde) e 270° (azul)) e a variação de cor (ΔE_{ab}), foi calculada de acordo com a Equação.²⁵¹⁻²⁵²

$$h_{ab} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (12)$$

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (13)$$

sendo, $\Delta L^* = (L^* - L_0^*)$, $\Delta a^* = (a^* - a_0^*)$, $\Delta b^* = (b^* - b_0^*)$. L_0^* , a_0^* e b_0^* são os valores de cor padrão, e L^* , a^* e b^* são os parâmetros de cor das amostras.

Aplicou-se o teste de Tukey com uma análise de variância de comparações múltiplas para determinar diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$), utilizando o software Estatística 7.0 (Statsoft, EUA).

3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As avaliações das superfícies dos filmes e das blendas foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio eletrônico (Jeol, JSM 6060, Japão). As amostras foram colocadas em suportes de aço inoxidável (*stubs*) e metalizadas com ouro. A análise foi realizada na tensão de aceleração de 5 e 10 kV e ampliação de 30 a 10.000 vezes.²⁵³

3.3.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais foram identificados através da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrômetro (Shimadzu, prestigio 21 model the – 210045, Japão), pela técnica de refletância total atenuada horizontal (RTAH). A análise foi realizada em temperatura ambiente (25°C) usando varredura na faixa de frequência de 4.000 a 400 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1} com 45 varreduras.²⁵⁴

3.3.7. Difração de raio-X (DRX)

As difrações de raios-X dos filmes e das blendas foram realizadas usando um difratômetro de raios-X (Brunker, D8 Advance, Alemanha), com radiações $\text{Cu K}\alpha$. O tubo de raios-X foi operado a 40 kV e 40 mA. Os resultados de difração foram obtidos ao longo de um intervalo (2θ) de 5° a 120°, a 2° min^{-1} de 0,02°.²⁵⁵

3.3.8. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As propriedades térmicas foram analisadas por DSC (Shimadzu, DSC-60, Japão). As amostras de filmes (3,0 mg) foram hermeticamente seladas em painéis de alumínio e aquecidas de 30 a 200°C, a 10 °C min^{-1} , e fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} .²⁵⁶

3.4. Avaliação microbiológica dos filmes e das blendas à base de gelatina na conservação de filés de merluza

3.4.1. Aplicação dos filmes nos filés de merluza

As amostras de filés de merluza (*Merluccius hubbsi*), foram obtidas no comércio da cidade de Bagé/RS e mantidas devidamente embaladas, sob refrigeração a -17°C , no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Unipampa, Campus Bagé.

Para realização dos experimentos, os filés foram previamente descongelados sob refrigeração à $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h, e análises microbiológicas dos filés antes de embalados foram realizadas. Após os filés foram embalados com os diferentes filmes (G, G-Q2, GA e GA-Q2), e armazenados em refrigerador por 48 h a $6\pm 1^{\circ}\text{C}$. Decorrido este tempo, procedeu-se as análises contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella sp.*

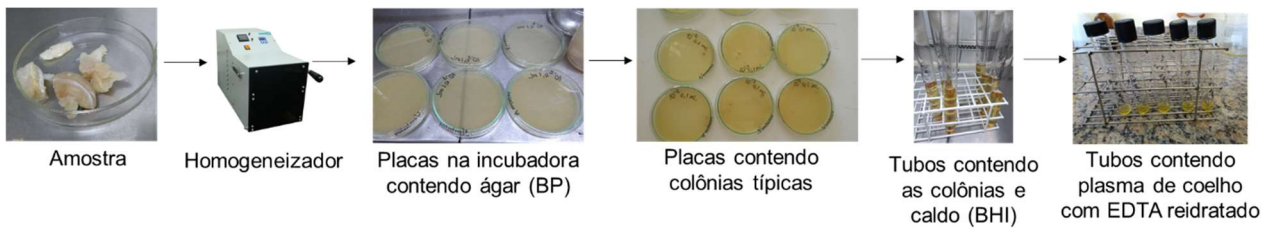
3.4.2. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas dos filés de merluza foram baseadas na RDC 12/2001 da ANVISA²⁴² que descreve as análises necessárias e os limites máximos de microrganismo para produtos como pescados. De acordo com essa resolução, os microrganismos que devem ser analisados para os produtos derivados de pescado, são a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella sp.*

3.4.2.1. Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Primeiramente homogeneizou-se a amostra em *stomarc* (MARCONI – MA440, Brasil) com caldo lactosado (25 g da amostra e 225 mL de caldo) e incubou-se a 35°C por 48 h. Após o preparo e diluição das amostras, alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas na pelo método *spread plate* em placas contendo ágar *Baird-Parker* (BP) e incubadas a $35^{\circ}\text{C}/48$ h. As placas com colônias típicas e atípicas foram contadas, e de cada placa foram selecionadas em média três a cinco, sendo elas transferidas para tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Estes tubos foram incubados a $37^{\circ}\text{C}/6$ h para a realização da prova da coagulase. Após o período de incubação e turvação dos caldos, 0,5 mL foram transferidas para tubos contendo 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA reidratado, sendo a incubação realizada em temperatura de 37°C . A reação da coagulase é considerada positiva quando os tubos apresentam formação de um coágulo firme após 6 h de incubação. A Figura 24, apresenta um esquema passo a passo do método de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva.

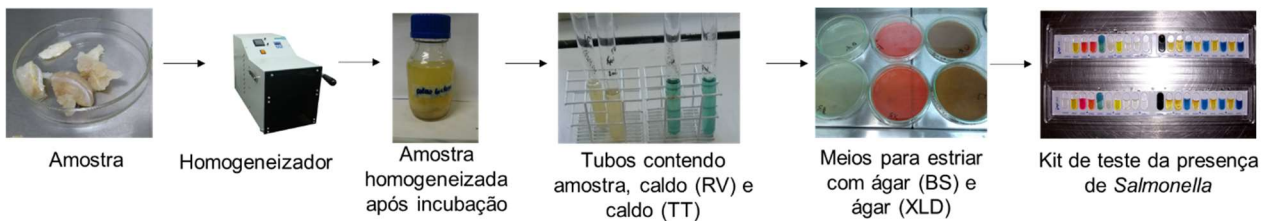
Figura 24. Etapas de análise microbiológica para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva



3.4.2.2. Pesquisa de *Salmonella* sp

Após a pesagem de 25 g de amostra em sacos estéreis, foram adicionados 225 mL de água peptonada tamponada a 1% (APT), homogeneizados por 2 min em *stomacher* (MARCONI – MA440, Brasil) e incubados a 35°C/24 h. Da mistura pré-enriquecida, foram transferidos 0,1 mL e 1 mL para tubos contendo 10 mL do caldo *Rappaport–Vassiliadis* (RV) e 10 mL de caldo *Tetrathionato* (TT), respectivamente. Os caldos RV e TT foram incubados por 24 h a 42°C, ambos em banho-maria. A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, foram realizadas estrias em placas com ágar Sulfito de Bismuto (BS) e ágar XiloseLisina–Desoxicolato (XLD) sendo as mesmas incubadas a 35°C/24 h. A partir das placas, é observado se há o crescimento de colônias típicas, testes bioquímicos e sorológicos foram realizados para a confirmação da presença de *Salmonella* sp. A Figura 25, apresenta um esquema passo a passo do método de pesquisa para *Salmonella* sp.

Figura 25. Etapas de análise microbiológica para pesquisa de *Salmonella* sp.



4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Caracterização dos biomateriais

4.1.1. Gelatina de peixe

Os valores, das propriedades reológicas (força do gel e viscosidade) e físico-químicas (temperaturas de fusão e gelificação) da gelatina obtida de peles de corvina estão apresentadas na Tabela 3, juntamente com gelatinas de outras espécies de peixe encontrados na literatura.

Pode-se observar na Tabela 3 que em relação ao valor de força do gel, este apresentou valor de Bloom de médio a alto, segundo classificação da literatura, pois conforme Karayannakidis & Zotos,¹⁰⁷ valores de Bloom variando de 150–220 g e >220g são caracterizados como Bloom médio a alto, respectivamente. Observa-se também que este valor foi mais alto do que a maioria das gelatinas extraídas de peles de diferentes espécies de peixe encontrados na literatura.

Já em relação a viscosidade, ponto de fusão e de gelificação, todos ficaram dentro da faixa de valores esperados, pois segundo Karayannakidis & Zotos,¹⁰⁷, a viscosidade de gelatinas comerciais provenientes de peles de peixe variam de 2 a 7 cP, as temperaturas de fusão variam de 8 a 25°C e as temperaturas de gelificação apresentam variação de 11 a 28°C.

A Tabela 4 apresenta a composição de aminoácidos da gelatina extraída de peles de corvina, expressa como resíduos por 1000 resíduos de aminoácidos totais, juntamente com o perfil de aminoácidos de gelatinas extraídas de peles de peixe encontrados na literatura.

Pode-se observar na Tabela 4 que a glicina foi o aminoácido predominante na gelatina. De acordo com Duan et al.,²⁵⁷, a glicina é o aminoácido mais dominante na gelatina e consiste em um terço da molécula. Os teores de prolina e hidroxiprolina ficaram próximos aos valores citados na literatura para gelatinas de peixe. Além disso, a composição de aminoácidos na gelatina apresentou baixo teor de resíduos de histidina, tirosina e cisteína.

Tabela 3. Valores de Bloom, viscosidade e temperaturas de fusão e gelificação da gelatina de peles de corvina e de outras espécies de pescado

| Espécie de Pescado | Bloom (g) | Viscosidade (cP) | Temperatura de Gelificação (°C) | Temperatura de Fusão (°C) | Referência |
|--|-----------|------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------|
| Corvina | 217 ± 6 | 3,5 ± 0,3 | 17,3 ± 0,3 | 24,8 ± 0,2 | Neste trabalho |
| Corvina (<i>Johnius dussumieri</i>) | 124,94 | NI | 7,10 | 24,57 | 119 |
| Cavalinha (<i>Decapterus macrosoma</i>) | 176,92 | NI | 9,90 | 18,51 | 119 |
| Carpa (<i>Labeo rohita</i>) | 188,63 | 6,06 | 18,52 | 29,27 | 117 |
| Carpa-comum (<i>Cyprinus carpio</i>) | 181,31 | 5,96 | 17,96 | 28,13 | 117 |
| Peixe-porco (<i>Aluterus monoceros</i>) | 139,54 | NI | NI | 22,61 | 258 |
| Pink perch (<i>Nemipterus japonicus</i>) | 140,00 | 7,47 | NI | 19,23 | 259 |
| Tilápia-de-moçambique (<i>Oreochromis mossambicus</i>) | 180,76 | 7,12 | NI | 28,90 | 104 |
| Tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis nilotica</i>) | 128,11 | 3,20 | NI | 22,45 | 104 |
| Carpa (<i>Catenopharyngodon idella</i>) | 267,00 | NI | 19,50 | 26,80 | 111 |
| Cod (<i>Gadus morhua</i>) | 90,00 | NI | 12,00 | 13,80 | 90 |

NI=não informado; Médias ± erro padrão (três repetições)

Tabela 4. Composição de aminoácidos (mg/100 g proteína) de gelatinas extraídas de diferentes espécies de pescado

| Aminoácidos | Fonte de gelatina | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Peles de corvina ^a | Tubarão–bambu ²⁶⁰ | Tubarão–galha–preta ¹¹² | Linguado ²⁶¹ | Areiro–quatro–manchas ²⁴³ | Cobia |
| Ácido aspártico | 51 | 40 | 40 | 48 | 49 | 49 |
| Ácido glutâmico | 72 | 76 | 76 | 74 | 70 | 72 |
| Serina | 44 | 41 | 29 | 40 | 47 | 40 |
| Glicina | 324 | 322 | 321 | 345 | 353 | 307 |
| Histidina | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 5 |
| Arginina | 56 | 51 | 54 | 53 | 47 | 57 |
| Treonina | 28 | 22 | 20 | 20 | 22 | 22 |
| Alanina | 102 | 106 | 120 | 119 | 119 | 106 |
| Prolina* | 104 | 113 | 110 | 129 | 117 | 111 |
| Tirosina | 6 | 2 | 2 | 3 | 3 | 6 |
| Valina | 22 | 24 | 25 | 21 | 16 | 20 |
| Metionina | 13 | 12 | 15 | 14 | 14 | 8 |
| Cisteína | 1 | 1 | 1 | – | – | 1 |
| Isoleucina | 15 | 17 | 18 | 8 | 7 | 16 |
| Leucina | 25 | 22 | 23 | 22 | 21 | 26 |
| Fenilalanina | 15 | 13 | 13 | 16 | 14 | 13 |
| Lisina | 24 | 28 | 27 | 27 | 26 | 29 |
| Hidroxiprolina* | 86 | 95 | 52 | 52 | 60 | 94 |
| Hidroxilisina | 12 | 6 | 1 | 1 | 6 | 18 |
| *Iminoácidos | 190 | 208 | 162 | 181 | 177 | 205 |

^a Neste trabalho

Segundo Gomez–Guillén et al.,⁹⁷ quanto mais elevados os teores de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) na gelatina, melhores serão suas propriedades reológicas. Isso ocorre devido a restrições que são impostas por ambos os anéis de pirrolidina da hidroxiprolina, além das ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos.⁶³ Estas restrições estéricas, por sua vez, estabilizam a estrutura de super-hélice do gel de gelatina. Assim, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com

os valores de força do gel, viscosidade e as temperaturas de fusão e gelificação, bem como a composição de aminoácido, com outras espécies de pescado citadas por outros autores, conforme Tabelas (3) e (4), respectivamente.

4.1.2. Quitina e Quitosana

As amostras de quitina, após as etapas de desmineralização, desproteínização, desodorização e secagem, apresentaram a seguinte composição centesimal (%m/m, em base úmida). $1,1 \pm 0,2\%$ de cinzas, $0,2 \pm 0,1\%$ de proteína, $6,0 \pm 1,0\%$ de teor de umidade e $82,4 \pm 0,4\%$ de quitina. Esses resultados são semelhantes ao encontrado por Weska et al.,¹⁶³. Os resultados de massa molar (M_v) e grau de desacetilação (GD), bem como as respectivas condições de hidrólise alcalina das quitosanas produzidas, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de M_v e GD das quitosanas produzidas

| Quitosana | Relação NaOH/quitina (mL g ⁻¹) | Concentração de NaOH (%) | Tempo de reação (min) | Massa Molar (kDa) | Grau de desacetilação (%) |
|-----------|--|--------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| Q1 | 20:1 | 40 | 90 | 195,7±0,3 ^a | 66,2±0,5 ^a |
| Q2 | 20:1 | 40 | 240 | 193,7±1,8 ^a | 79,2±2,0 ^b |
| Q3 | 60:1 | 45 | 240 | 100,0±1,4 ^b | 95,7±1,1 ^c |
| Q4 | 60:1 | 40 | 240 | 143,1±2,2 ^c | 93,5±1,5 ^c |

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente ($p > 0,05$) diferentes de acordo com o teste de Tukey.

Pode-se observar na Tabela 5, que para as quitosanas Q1 e Q2 os valores de M_v não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), porém os valores de GD foram diferentes ($p < 0,05$), mostrando que o tempo de reação influenciou de maneira significativa o valor do grau de desacetilação. Chang et al.,¹⁵⁸ e Moura et al.,²⁶², estudando a desacetilação heterogênea da quitina em solução alcalina também relataram que o tempo de reação afeta drasticamente a velocidade da reação, levando a um aumento da desacetilação do polímero.

Já os tratamentos Q3 e Q4 apresentaram diferentes valores de M_v e mesmos valores de GD, mostrando que um aumento na concentração de NaOH causou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) na massa molar da quitosana, resultando em uma maior despolimerização. Isso ocorreu, porque a exposição do polissacarídeo em soluções muito concentradas de NaOH promove não apenas a remoção dos grupos

acetil do grupamento amida da quitina, mas também a quebra das ligações glicosídicas, causando a diminuição da quantidade de monômeros que compõem a cadeia do polímero. Estes resultados indicam que a quebra das ligações glicosídicas entre os monômeros, é a etapa mais rápida da reação e ocorre principalmente no primeiro estágio de hidrólise alcalina da quitina, visto que em tempos maiores de desacetilação, foi possível manter o mesmo valor de M_v . Em contrapartida, pode-se inferir que a remoção do grupo acetil da amina, ocorre de maneira mais lenta, visto que estes se mantiveram quando utilizada a mesma concentração de solução alcalina.

Ambos os resultados corroboram com os resultados encontrados em estudos anteriores, realizados por Moura et al.,⁴². O que significa que os tratamentos escolhidos foram apropriados para que se possa avaliar separadamente a influência da M_v e do GD da quitosana, nas características físico-químicas e antibactericidas de filmes e blendas à base de gelatina de peixe com incorporação de quitosana e ácidos graxos insaturados.

4.1.3. Concentrados de ácidos graxos insaturados (AGIs)

A Tabela 6 apresenta o perfil de ácidos graxos da fração não complexada com ureia, juntamente com o somatório dos ácidos graxos saturados, insaturados e ácidos graxos essenciais (EPA e DHA), bem como o perfil de concentrados de ácidos graxos insaturados de óleo de carpa, obtidos por diferentes autores.

Pode-se observar na Tabela 6, que os ácidos graxos obtidos nos concentrados em maior quantidade foram C 16:1 ω -7 Palmitoleico, C18:1 ω -9 Oleico, C18:2 ω -6 Linoleico, C18:3 ω -3 α -linolenico, C20:5 ω -3 Eicosapentaenoico (EPA) e C22:6 ω -3 Docosaheptaenoico (DHA). Isso mostra que a complexação com ureia foi satisfatória na concentração dos AGIs. Além disso pode-se inferir que o óleo extraído de vísceras de carpa é uma boa fonte de ácidos graxos insaturados.

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos da fração não complexada de óleos de carpa em comparação com outros autores

| Ácidos Graxos | Fração não complexada (%) | | |
|---|---------------------------|----------------------|---------------------|
| | Carpa ^a | Carpa ¹⁹⁹ | Carpa ¹⁹ |
| C12:0 Láurico | 0,20 ± 0,02 | 0,27 | 0,19 |
| C14:0 Mirístico | 2,71 ± 0,02 | 3,06 | 0,89 |
| C15:0 Decapentanóico | 0,43 ± 0,01 | 0,64 | 0,28 |
| C16:0 Palmítico | 4,00 ± 0,02 | 4,10 | 4,38 |
| C17:0 Margárico | 0,25 ± 0,01 | 0,24 | 0,26 |
| C18:0 Esteárico | 0,33 ± 0,02 | 0,31 | 0,46 |
| C16:1 ω -7 Palmitoleico | 9,02 ± 0,01 | 9,40 | 7,02 |
| C18:1 ω -9 Oleico | 31,01 ± 0,01 | 31,28 | 30,80 |
| C20:1 ω -9 9-eicosenoico | 1,16 ± 0,01 | 1,88 | 0,66 |
| C18:2 ω -6 Linoleico | 24,12 ± 0,02 | 15,21 | 25,90 |
| C18:3 ω -3 α -linolenico | 9,82 ± 0,01 | 10,00 | 9,71 |
| C20:2 ω -6 Eicosadienoico | 0,95 ± 0,01 | 1,73 | 0,81 |
| C20:3 ω -3 di-homo- α -linolenico | 0,94 ± 0,01 | 1,43 | 0,98 |
| C20:4 ω -6 Aracdônico | 2,14 ± 0,01 | 2,61 | 2,12 |
| C20:5 ω -3 Eicosapentaenoico (EPA) | 4,42 ± 0,02 | 4,57 | 4,59 |
| C22:6 ω -3 Docosahexaenoico (DHA) | 4,96 ± 0,01 | 4,86 | 4,90 |
| Não identificados | 3,54 | 8,41 | 6,95 |
| Σ AGMI (monoinsaturados) | 41,19 | 42,56 | 38,48 |
| Σ AGPI (insaturados) | 47,35 | 40,41 | 49,01 |
| Σ EPA+DHA (insaturados essenciais) | 9,38 | 9,43 | 9,49 |
| Σ AGS (saturados) | 7,92 | 8,62 | 6,46 |
| Σ AGI (insaturados) | 88,54 | 82,87 | 87,49 |

^aNeste trabalho

4.2. Filmes e blendas baseadas em biomateriais

4.2.1. Caracterização dos filmes e blendas

4.2.1.1. Espessura

As espessuras de todos os filmes não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), apresentando valores médios de $74,7 \pm 5,0 \mu\text{m}$. Esse resultado foi devido a que foram utilizados 2 g (b.s.) em todos os filmes, e apenas as porcentagens dos componentes foram alteradas.

4.2.1.2. Propriedades Mecânicas (RT e AR) e Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Filmes e/ou blendas produzidos para aplicação em embalagens de alimentos, necessitam apresentar boas propriedades mecânicas e de extensibilidade principalmente devido ao estresse externo. Os valores das propriedades mecânicas (RT e AR) e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de gelatina de pescado, dos filmes de gelatina de pescado com adição de quitosana e das blendas à base de gelatina de pescado/quitosana/ácidos graxos insaturados estão apresentados na Tabela 7.

Observa-se na Tabela 7, que o filme elaborado com gelatina de pescado (G), apresentou valores inferiores de RT e de AR, e valores superiores de PVA, quando comparado com os filmes em que foram adicionadas quitosanas. Estes resultados foram mais acentuados quando foram utilizadas quitosanas de mais elevada massa molar (Q1 e Q2). Esse comportamento se deve principalmente aos tipos de ligações e interações que ocorrem entre a gelatina/glicerol, e a gelatina/glicerol/quitosana. Para melhor compreensão, um esquema das interações entre os componentes dos filmes, está apresentado na Figura 26 (a, b e c).

Pode-se observar na Figura 26 (b), que as interações existentes no filme de gelatina e glicerol, são basicamente ligações de hidrogênio, e que a adição do poliálcool promove um afastamento das cadeias proteicas em relação a filmes sem glicerol como mostra a Figura 26 (a), pois estes formam ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do poliálcool e os ácidos carboxílicos presentes na cadeia proteica. Já, quando foi adicionado quitosana, a RT e o AR aumentaram e a PVA diminuiu (Tabela 7), e isso pode ter ocorrido porque além das ligações de hidrogênio, foram promovidas interações eletrostáticas entre os grupamentos amino protonados e os ácidos carboxílicos da quitosana, além de ligações de hidrogênio com o glicerol. Essas novas ligações e

interações promoveram maior aproximação entre as cadeias dos polímeros, provocando um aumento na RT, um leve aumento no AR e uma diminuição na PVA, devido à dificuldade da formação de dutos de permeação.

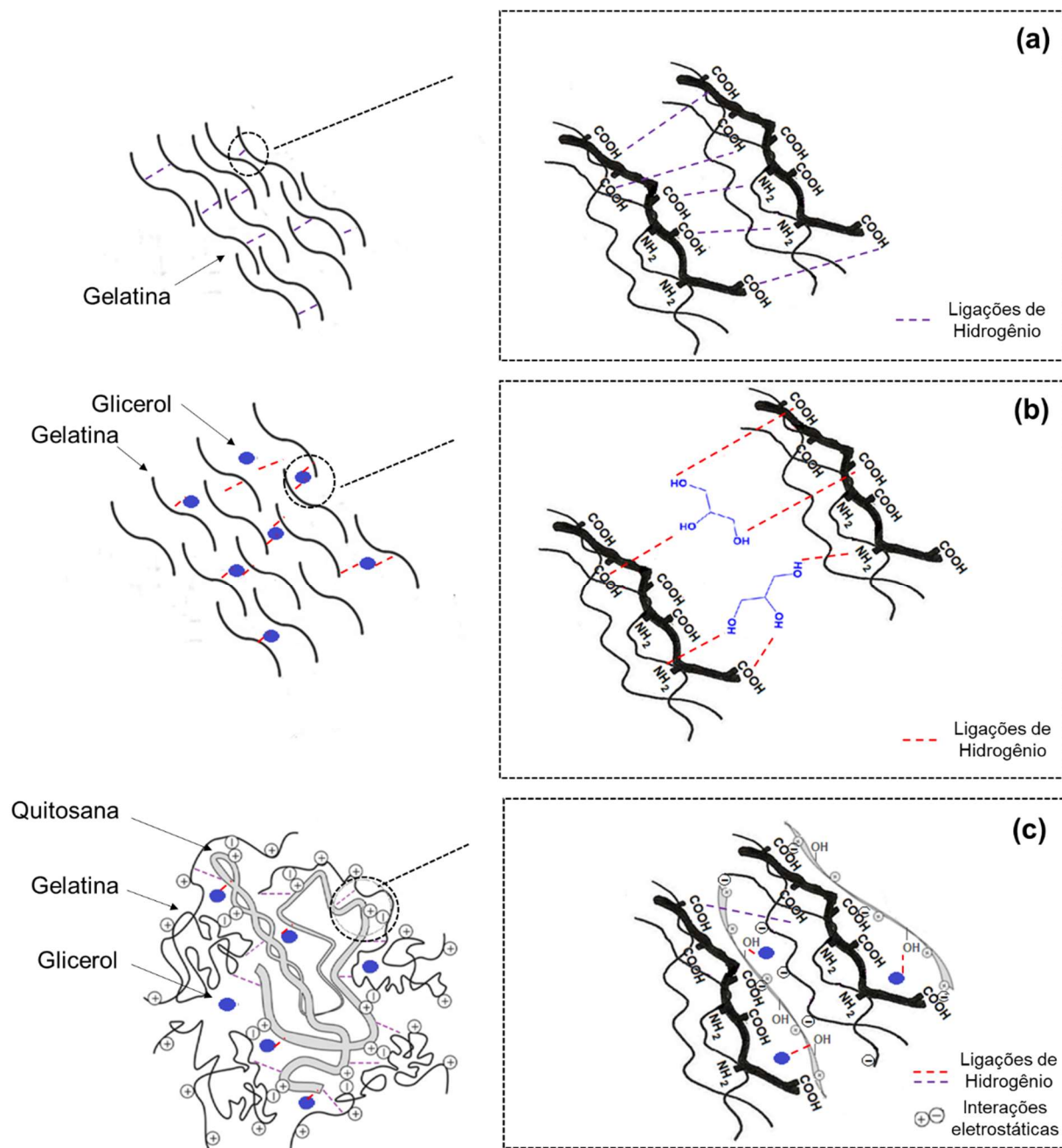
Tabela 7. Valores RT, AR e PVA de filmes de gelatina de pescado, gelatina de pescado/quitosana e gelatina de pescado/quitosana/AGI

| Filme | RT* (MPa) | AR* (%) | PVA* (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹) × 10 ¹¹ |
|-------|---------------------------|--------------------------|--|
| G | 13,8 ± 1,5 ^b | 6,0 ± 1,2 ^g | 1,60 ± 0,02 ^a |
| G–Q1 | 17,5 ± 0,8 ^a | 8,9 ± 0,7 ^f | 1,36 ± 0,01 ^c |
| G–Q2 | 18,5 ± 0,6 ^a | 8,6 ± 0,9 ^f | 1,35 ± 0,02 ^c |
| G–Q3 | 14,1 ± 0,7 ^b | 7,7 ± 0,6 ^{f,g} | 1,44 ± 0,02 ^b |
| G–Q4 | 16,2 ± 1,0 ^{a,b} | 7,5 ± 0,7 ^{f,g} | 1,39 ± 0,02 ^b |
| GA | 2,2 ± 0,2 ^e | 399,8 ± 2,6 ^a | 1,31 ± 0,01 ^d |
| GA–Q1 | 4,5 ± 0,2 ^c | 289,7 ± 2,1 ^b | 1,09 ± 0,01 ^f |
| GA–Q2 | 5,0 ± 0,1 ^c | 306,8 ± 1,2 ^d | 1,08 ± 0,01 ^f |
| GA–Q3 | 2,3 ± 0,1 ^e | 242,2 ± 3,1 ^d | 1,15 ± 0,03 ^{e,f} |
| GA–Q4 | 3,3 ± 0,2 ^d | 231,3 ± 2,8 ^e | 1,11 ± 0,02 ^{e,f} |

*Valores para cada amostra são médias ± desvio padrão (n = 2). Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05). G [Gelatina], G–Q1 [Gelatina/Quitosana–1], G–Q2 [Gelatina/Quitosana–2], G–Q3 [Gelatina/Quitosana–3], G–Q4 [Gelatina/Quitosana–4], GA [Gelatina/AGI], GA–Q1 [Gelatina/AGI/Quitosana–1], GA–Q2 [Gelatina/AGI/Quitosana–2], GA–Q3 [Gelatina/AGI/Quitosana–3] e GA–Q4 [Gelatina/AGI/Quitosana–4].

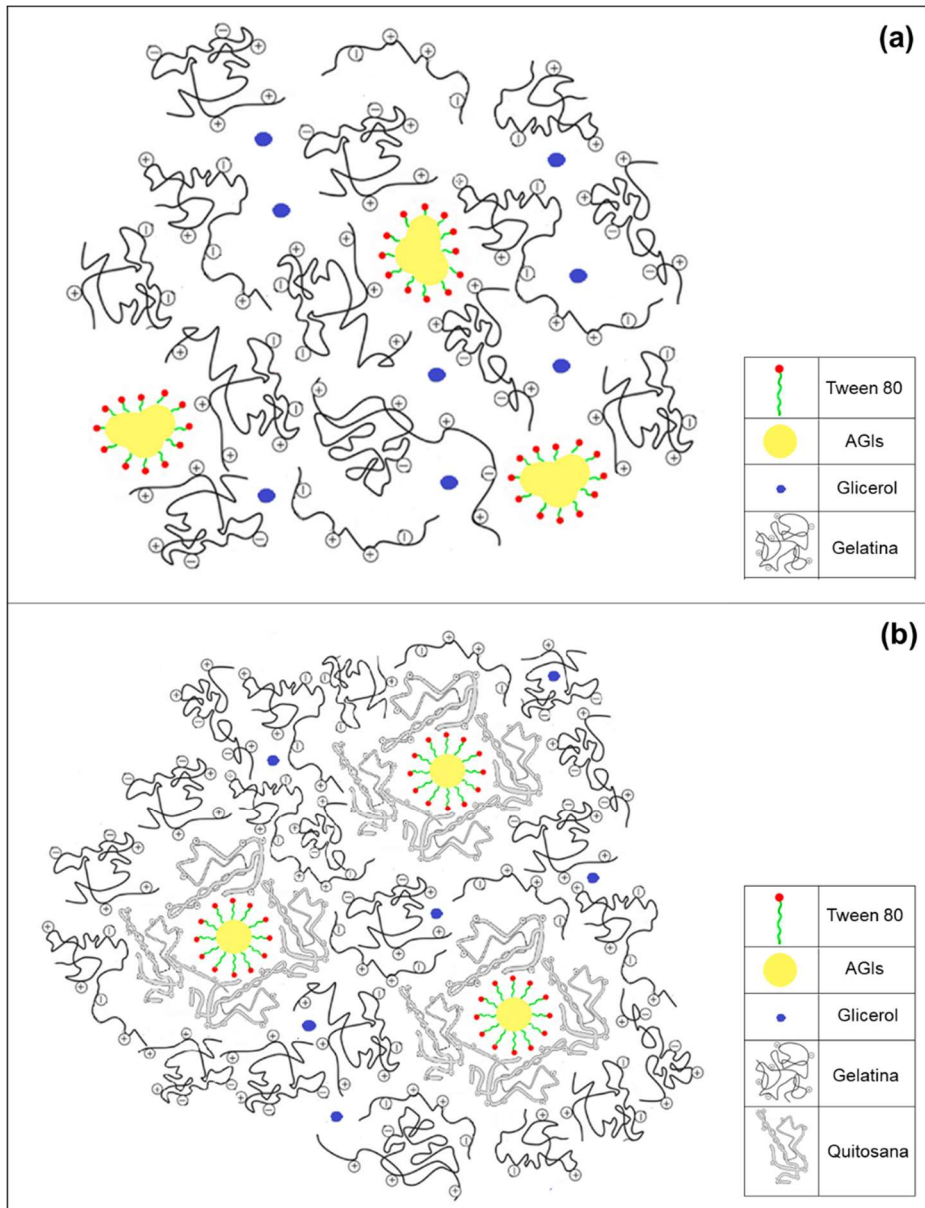
Já no que se refere as características da quitosana observa-se que entre as quitosanas com mesma M_v e diferente GD (Q1 e Q2), estas promoveram diferenças significativas (ao nível de 95%) nas características físico-químicas dos filmes, já quando foi adicionado quitosana de diferentes M_v e mesmo GD (Q3 e Q4), estes não apresentaram diferença significativa, em relação ao filme de gelatina com glicerol (G). Devido a estes resultados, pode-se inferir que o tamanho das cadeias dos polímeros (proteína e polissacarídeo), influência mais nas propriedades mecânicas e de permeação dos filmes do que a presença dos grupos amida na quitosana.

Figura 26. Interações intermoleculares no filme de gelatina e gelatina e quitosana. (a) gelatina, (b) gelatina/glicerol e (c) gelatina/glicerol/quitosana



Nos filmes em que foram adicionados os AGIs (blendas (GA, GA-Q1, GA-Q2, GA-Q3 e GA-Q4)), observa-se que estes promoveram uma diminuição da RT, um aumento bastante significativo no AR e uma diminuição na PVA (Tabela 7). Esse comportamento sugere que ocorreu uma reorganização nas estruturas poliméricas que formam as blendas na presença de uma fração lipídica, neste caso, os ácidos graxos insaturados. A Figura 27 (a e b), apresenta o esquema de uma possível reorganização das macromoléculas em função da adição dos AGIs e do emulsificante Tween 80.

Figura 27. Blendas a base de gelatina de peixe, (a) gelatina/AGIs e (b) gelatina/quitosana/AGIs



Considerando as reorganizações das macromoléculas, propostas na Figura 27 (a) e (b), pode-se explicar as alterações nas propriedades mecânicas e de permeação das blendas. Na Figura 27 (a), observa-se que a adição de AGIs provocou um afastamento entre as cadeias da gelatina, causando uma diminuição nas interações dessas macromoléculas. Esse fato pode ser comprovado, com a análise dos resultados das propriedades mecânicas apresentados na Tabela 7. Observa-se que a blenda de gelatina/AGIs (GA), apresentou uma redução na RT de 85% e um AR 70 vezes maior que o filme de gelatina sem adição de AGIs. Segundo Cagri, Ustunol & Ryser²⁶³, o aumento da quantidade de aditivos e/ou agentes de reticulação, geralmente, diminuem o valor de RT e aumenta o AR, pois outras moléculas, quando inseridas em cadeias

proteicas, provoca uma diminuição nas interações naturais do polímero, causando um aumentando na flexibilidade e movimentação do filme. Além disso, os óleos insaturados são geralmente líquidos à temperatura ambiente e sua presença na estrutura do filme como gotículas de óleo podem se deformar, levando ao aumento da flexibilidade.²⁶⁴

Já em relação as blendas de gelatina/quitosana (G-Q1, G-Q2, G-Q3 e G-Q4) e gelatina/quitosana/AGIs (GA-Q1, GA-Q2, GA-Q3 e GA-Q4), pode-se observar na Tabela 7, que a adição de AGI, provocou uma redução na RT e um aumento expressivo no AR. Nas blendas onde a quitosana possui maiores valores de M_v e menor GD (Q1 e Q2), pode-se observar uma redução de aproximadamente 73% na RT e um AR em torno de 35 vezes maior, em relação aos filmes sem AGIs. Já quando foi utilizada quitosana com baixa e média M_v e alto GD (Q3 e Q4), observou-se que a RT reduziu aproximadamente 83% e o AR aumentou em torno de 30 vezes. Considerando estes resultados, acredita-se que a adição de AGIs, provoca uma reorganização molecular dos polímeros, onde a quitosana, migra para a superfície da gotícula de óleo, formando uma película protetora ao redor deste. Como consequência, esta nova reorganização diminui as interações com a proteína, causando a diminuição na RT e o aumento no AR. Seguindo o proposto na Figura 27 (b), pode-se explicar também, a influência da M_v e do GD da quitosana, visto que, dependendo do tamanho da cadeia e da quantidade de aminos presentes na estrutura, estas empacotam de formas diferentes ao redor do óleo. As blendas com quitosanas de maior M_v e menor GD (Q1 e Q2), apresentaram maiores valores RT e AR, em relação aos de menor M_v e maior GD (Q3 e Q4). Isso pode ter ocorrido porque o empacotamento das cadeias, tanto da Q1 quanto da Q2 pode ter sido dificultado pelo impedimento estérico provocado pelo tamanho e volume das cadeias do polissacarídeo, reduzindo as interações polissacarídeo/polissacarídeo ao redor do óleo e possibilitando o aumento das interações polissacarídeo/proteína.

Essa mesma proposta de interação a partir da mistura de proteína/polissacarídeo/lipídio, foi proposta por Paula et al.,²⁶⁵, que estudaram o nano-encapsulamento de óleo essencial de *Lippia sidoides* em blendas compostas por goma do Angico e quitosana. Os autores concluíram que a adição de quitosana na formação das nano-cápsulas provocou uma diminuição na liberação do óleo essencial encapsulado, e que quanto maior a proporção desta na blenda, mais lenta é a liberação do lipídio. Sendo assim, os autores concluíram que o polissacarídeo é o principal responsável pela formação da cápsula.

Além das propriedades mecânicas, filmes com baixa permeabilidade ao vapor de água (PVA) são necessários, porque uma das principais funções da embalagem de alimentos é prevenir/reduzir a transferência de umidade entre o alimento e o meio ambiente.¹⁰ Os filmes de gelatina de peixe possuem alta PVA, devido à presença de uma ampla gama de aminoácidos hidrofílicos nas cadeias proteicas, que tendem a absorver a água da atmosfera. A adição de quitosana reduziu a PVA dos filmes, independentemente das diferentes características de M_v e GD (Tabela 7). Já quando foi adicionado os AGIs, a PVA dos filmes reduziu (Tabela 7). Entretanto, muitos autores atribuem que essa diminuição ocorre, apenas devido ao aumento da hidrofobicidade do filme, que conseqüentemente provoca redução na absorção e na transferência de vapor de água através deste.^{57, 266-269} Entretanto, pode-se observar na Tabela 7, que em todos os filmes, a redução de PVA, em relação a blenda com AGI, foi de 20%, o que pode sugerir, que a diminuição na transferência de vapor de água, depende mais da proporção de lipídios do que propriamente da interação destes com os polímeros. Isso pode ser sugerido, visto que em todas as blendas foi utilizada a mesma massa de AGIs, e obteve-se o mesmo percentual de redução. Sendo assim, e considerando que o cálculo da análise de PVA está diretamente relacionado a área permeação, pode-se atribuir que a redução na transferência de vapor de água, está mais relacionada a diminuição da área de permeação devido a presença das cápsulas de AGI do que propriamente a sua hidrofobicidade.

Os valores obtidos para RT , AR e PVA dos filmes e das blendas do presente trabalho foram comparados à filmes e blendas à base de proteína/polissacarídeo/lipídio, produzidos por outros pesquisadores, a fim de verificar os resultados obtidos frente a outros biomateriais. Estes dados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação dos valores de RT, AR e PVA de filmes e blendas a base de biomateriais citados na literatura

| Biomaterial | RT (MPa) | AR (%) | PVA (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹) | Referência |
|---|-------------|-------------|--|----------------|
| Gelatina de pe­scado (<i>Micropogonias furnieri</i>) | 13,8 ± 1,5 | 6,0 ± 1,2 | 1,60 ± 0,02 × 10 ⁻¹¹ | Neste trabalho |
| Gelatina de pe­scado (<i>Sepia pharaonis</i>) | 6,1 ± 0,2 | 26,2 ± 3,8 | 1,07 ± 0,06 × 10 ⁻¹⁰ | 270 |
| Gelatina de pe­scado (<i>Salmo trutta</i>) | 23,0 ± 3,5 | 25,4 ± 3,3 | 2,60 ± 0,35 × 10 ⁻¹⁰ | 271 |
| Gelatina de pe­scado (<i>Trachurus japonicus</i>) | 35,6 ± 2,4 | 43,0 ± 6,8 | 1,01 ± 0,02 × 10 ⁻¹⁰ | 272 |
| Gelatina de pe­scado/quitosana | 18,5 ± 0,6 | 8,6 ± 0,9 | 1,35 ± 0,02 × 10 ⁻¹¹ | Neste trabalho |
| Gelatina bovina/quitosana | 8,5 ± 1,4 | 41,0 ± 14,4 | 1,11 ± 0,20 × 10 ⁻¹¹ | 137 |
| Gelatina de pe­scado/quitosana | 11,3 ± 1,0 | 32,7 ± 7,4 | 0,88 ± 0,13 × 10 ⁻¹¹ | 213 |
| Gelatina (bovina)/quitosana | 28,0 ± 6,8 | 41,0 ± 7,7 | 1,68 ± 0,23 × 10 ⁻¹¹ | 138 |
| Gelatina de pe­scado/ácidos graxos insaturados | 2,2 ± 0,2 | 399,8 ± 2,6 | 1,51 ± 0,01 × 10 ⁻¹¹ | Neste trabalho |
| Gelatina de pe­scado/óleo de coco | 2,1 ± 0,1 | 189,1 ± 5,8 | 0,22 ± 0,06 × 10 ⁻¹¹ | 57 |

| | | | | |
|---|-------------|--------------|---------------------------------|----------------|
| Gelatina de pescado/óleo de palma | 21,4 ± 2,0 | 108,4 ± 4,3 | 1,63 ± 0,12 × 10 ⁻¹¹ | 267 |
| Gelatina de pescado/óleo essencial de limão | 27,3 ± 1,7 | 52,2 ± 5,6 | 2,91 ± 0,11 × 10 ⁻¹¹ | 273 |
| Gelatina de pescado/óleo essencial de bergamota | 30,8 ± 6,4 | 7,3 ± 2,1 | 1,88 ± 0,03 × 10 ⁻¹⁰ | 274 |
| Gelatina de pescado/quitosana/ácidos graxos insaturados | 5,4 ± 0,1 | 306,8 ± 1,2 | 1,08 ± 0,01 × 10 ⁻¹¹ | Neste trabalho |
| Gelatina de pescado/quitosana/óleo de orégano | 3,3 ± 0,4 | 87,2 ± 17,1 | 0,68 ± 0,05 × 10 ⁻¹⁰ | 268 |
| Gelatina de pescado/quitosana/D-limoneno | 21,5 ± 1,37 | 5,6 ± 2,9 | 2,56 ± 0,05 × 10 ⁻¹¹ | 269 |
| Material sintético | | | | |
| Polietileno de baixa densidade | 5,2–11,5 | 100–800 | NI | 275 |
| Polietileno de baixa densidade | 11,0 | 110,0 | NI | 276 |
| Polietileno de baixa densidade | NI | 212,5 ± 12,6 | 1,78 ± 0,29 × 10 ⁻¹¹ | 277 |

Pode-se observar na Tabela 8, que os filmes apresentaram valores satisfatórios de RT, AR e PVA frente aos filmes produzidos de biomateriais. Analisando a Tabela 8, pode-se destacar que os filmes de gelatina obtida de resíduos de corvina, apresentou valor de AR bastante inferior aos filmes produzidos a partir de gelatinas obtidas de outras espécies, entretanto o valor de PVA deste, foi inferior. Em relação a filmes compósitos de gelatina de pescado/quitosana, estes também apresentaram valores de AR, inferiores a outros estudos, entretanto RT e PVA encontram-se dentro dos valores citados na literatura. Já os filmes de gelatina de pescado/AGIs apresentaram valores bastantes superiores de A em relação a outros lipídios, sugerindo que óleos com grande quantidade insaturações resultam em filmes mais elásticos e maleáveis. No que diz respeito às blendas de gelatina/AGI/quitosana, pode-se observar que estas também apresentaram valores de AR bastante superiores a outros biomateriais. Além disso os valores de RT, AR e PVA, mostraram-se dentro da faixa de valores encontrados para filmes sintéticos de polietileno de baixa densidade. Estes resultados, confirmam que quanto as propriedades mecânicas e de permeação à vapor de água, as blendas de gelatina de pescado/quitosana/ácidos graxos insaturados são bastante promissoras no que diz respeito a substituição (ainda que em parte) de materiais derivados de petróleo.

4.2.1.3. Cor

As propriedades ópticas podem afetar a aparência do produto revestido, portanto, a sua medição é essencial para definir a capacidade de filmes a serem aplicados na superfície de alimentos.¹² Os parâmetros de cor, ângulo Hue e diferença de cor dos filmes compostos em comparação com o filme de gelatina de pescado (G) são apresentados na Tabela 9.

A adição de quitosana provocou um leve aumento na opacidade dos filmes (menores valores de L^*), devido à presença de 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopiranosose.¹³⁷ No entanto, as características do polissacarídeo (M_v e GD) da quitosana não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas blendas. No entanto, quando foram adicionados AGI, a opacidade foi aumentada (valores mais baixos para a luminosidade, L^*). O mesmo comportamento foi encontrado por Bertan et al.,²⁷⁸ na adição de ácidos graxos e *Brazilian elemi* nos filmes à base de gelatina. Na Tabela 9, todos os filmes apresentaram valores de ângulo Hue em torno de 90° , o que indica coloração amarelada. Em relação à diferença de cor (ΔE_{ab}), observou-se uma pequena variação quando comparados o filme de gelatina de pescado com os filmes de

gelatina/quitosana, indicando que o polímero apresentou boa miscibilidade.¹⁴⁰ Quando os AGIs foram adicionados, esta variação de cor duplicou em comparação com o filme de gelatina.

Tabela 9. Parâmetros de cor do filme de gelatina de pescado e blendas de gelatina/quitosana/AGI

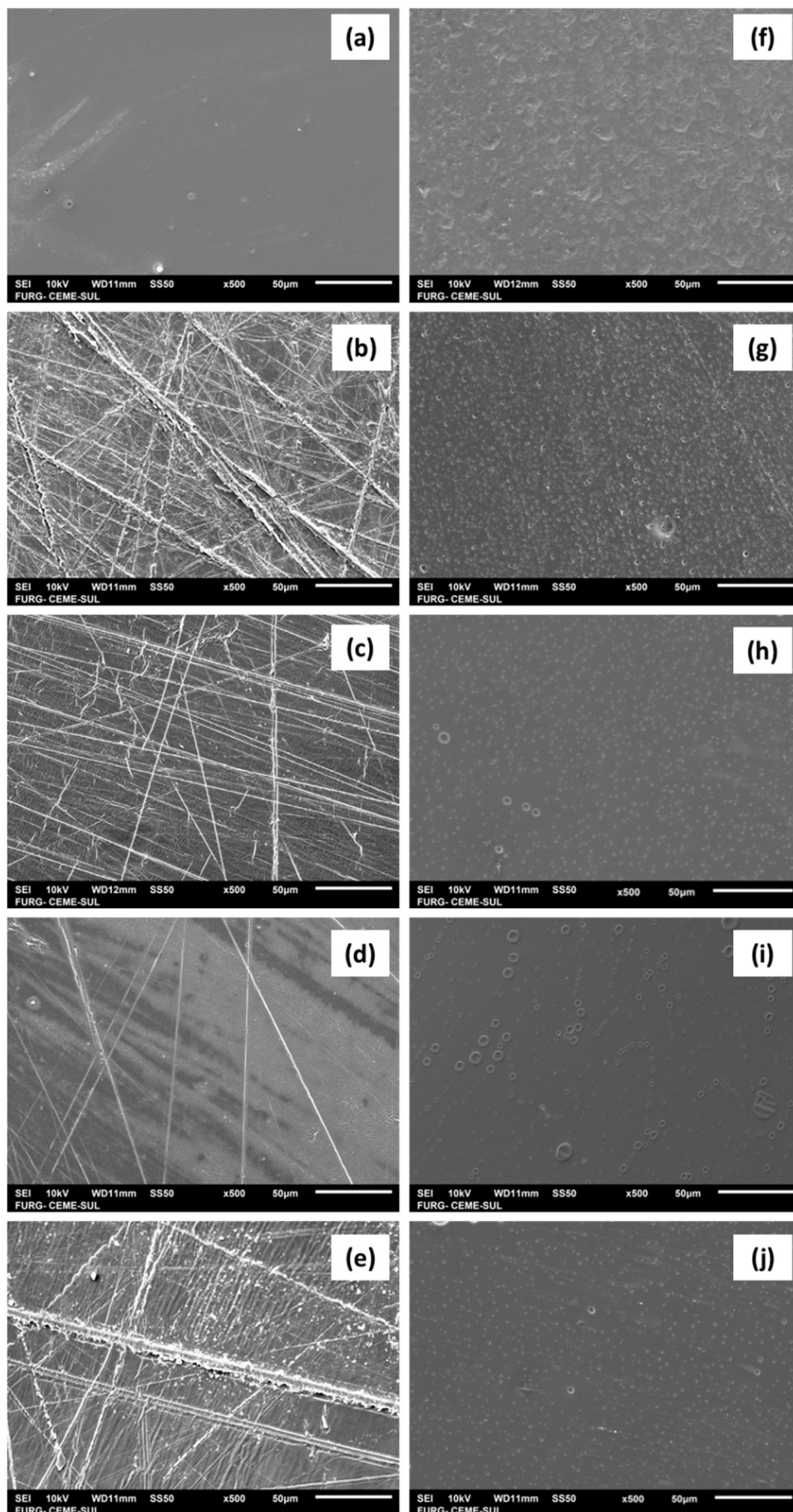
| Filme | Parâmetros de cor | | | | |
|-------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | L* | a* | b* | Hab* | ΔE^* |
| G | 95,74±0,10 ^a | -0,61±0,04 ^b | 6,03±0,05 ^f | 95,77±0,29 ^a | — |
| G-Q1 | 94,75±0,12 ^b | -0,71±0,03 ^b | 9,29±0,38 ^e | 94,39±0,14 ^b | 3,41±0,39 ^c |
| G-Q2 | 94,76±0,09 ^b | -0,63±0,04 ^b | 9,76±0,07 ^{d,e} | 93,71±0,22 ^b | 3,86±0,01 ^{d,e} |
| G-Q3 | 94,72±0,11 ^b | -0,67±0,08 ^b | 9,96±0,25 ^{d,e} | 93,84±0,58 ^b | 4,06±0,27 ^{d,e} |
| G-Q4 | 94,72±0,12 ^b | -0,70±0,03 ^b | 10,13±0,26 ^d | 93,93±0,08 ^b | 4,23±0,24 ^d |
| GA | 94,76±0,15 ^b | 0,65±0,08 ^a | 11,10±0,02 ^c | 86,65±0,42 ^d | 5,32±0,03 ^c |
| GA-Q1 | 93,20±0,09 ^c | 0,52±0,08 ^a | 12,37±0,41 ^b | 87,60±0,32 ^{c,d} | 6,92±0,36 ^b |
| GA-Q2 | 93,12±0,12 ^c | 0,59±0,08 ^a | 12,52±0,10 ^{a,b} | 87,29±0,39 ^{c,d} | 7,11±0,04 ^b |
| GA-Q3 | 93,08±0,07 ^c | 0,51±0,09 ^a | 12,85±0,52 ^{a,b} | 87,72±0,49 ^c | 7,41±0,47 ^{a,b} |
| GA-Q4 | 93,06±0,17 ^c | 0,54±0,07 ^a | 13,20±0,11 ^a | 87,80±0,14 ^c | 7,74±0,16 ^a |

*Valores para cada amostra são médias \pm desvio padrão (n = 2). Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$). G [Gelatina], G-Q1 [Gelatina/Quitosa-1], G-Q2 [Gelatina/Quitosa-2], G-Q3 [Gelatina/Quitosa-3], G-Q4 [Gelatina/Quitosa-4], GA [Gelatina/AGI], GA-Q1 [Gelatina/AGI/Quitosa-1], GA-Q2 [Gelatina/AGI/Quitosa-2], GA-Q3 [Gelatina/AGI/Quitosa-3] e GA-Q4 [Gelatina/AGI/Quitosa-4].

4.2.1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 28 apresenta as imagens de microscopia da superfície dos filmes e das blendas.

Figura 28. MEV dos filmes e das blendas (a) G, (b) G-Q1, (c) G-Q2, (d) G-Q3, (e) G-Q4, (f) GA, (g) GA-Q1, (h) GA-Q2, (i) GA-Q3 e (j) GA-Q4.



Analisando as imagens de MEV (Figura 28), algumas considerações podem ser feitas:

- a) Comparando o filme de gelatina (a) e o filme de gelatina/AGI (f), pode-se observar que quando foi adicionado o AGI, as gotículas de lipídios apresentaram formas irregulares e de tamanhos superiores aos filmes contendo quitosana;
- b) Quando foi adicionado quitosana nos filmes de gelatina, estes apresentaram estruturas fibrosas na superfície (b), (c), (d) e (e), que foram mais evidentes quando foi utilizada quitosana de maior M_v e menor GD (b) e (c);
- c) Nas blendas gelatina/quitosana/AGI (g), (h), (i) e (j), pode-se observar que as estruturas fibrosas desapareceram, sugerindo que ocorreu uma reorganização da proteína e do polissacarídeo quando a fração lipídica foi adicionada. Além disso, sem a presença da quitosana (f), nota-se que as gotículas de lipídio foram irregulares e quando o polissacarídeo foi adicionado estas tornaram-se esféricas. Esses resultados corroboram com as estruturas propostas na Figura 27 (a) e (b);
- d) As blendas (g), (h) e (j), foram produzidas adicionando as quitosanas Q1 ($M_v=196$ kDa e $GD=66,2\%$), Q2 ($M_v=194$ kDa e $GD=79,2\%$) e Q4 ($M_v=143$ kDa e $GD=93,5\%$), e apresentaram gotículas mais homogêneas em relação ao tamanho, mostrando que em M_v mais elevadas estas são menos irregulares;
- e) Já a imagem da blenda apresentada na Figura 28 (i), elaborada com a adição da quitosana Q3 ($M_v=100$ kDa e $GD=95,7\%$), apresentou gotículas de tamanhos irregulares e distribuição heterogênea ao longo do filme, sugerindo que polímeros menores em tamanho e volume, este não forma uma película suficientemente resistente para manter o AGI encapsulado.

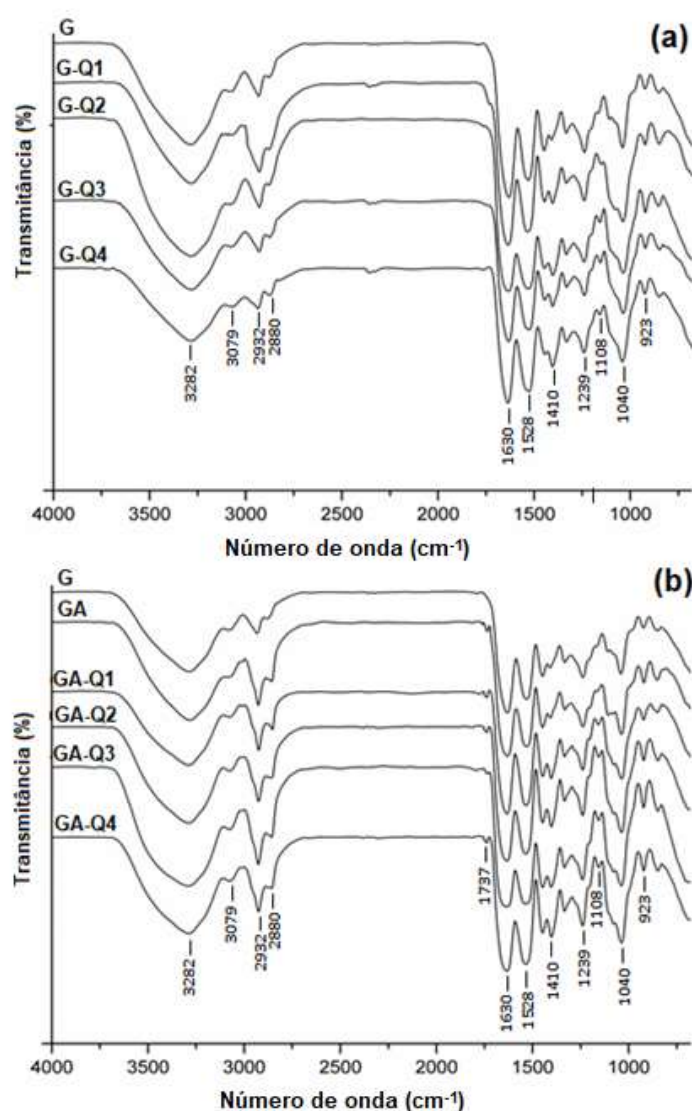
Todas essas observações sugerem que o polissacarídeo é o que mais contribui para a formação das gotículas do lipídio dentro da matriz proteica, pois as diferentes características da quitosana resultaram em formas e comportamentos diferentes destas gotículas. Estes resultados estão em concordância com o comportamento das propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água.

Imagens semelhantes foram encontradas por Tongnuanchan et al.,²⁶⁷, avaliando a incorporação de óleo de palma em filmes de gelatina de peixe, entretanto os autores não sugerem nenhum comportamento quanto as estruturas que compõem a blenda.

4.2.1.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para compreender os efeitos da quitosana e AGI na matriz dos filmes à base de gelatina de peixe. Os resultados são mostrados na Figura 29 (a) Espectros dos filmes de G, G-Q1, G-Q2, G-Q3, G-Q4, e (b) G, GA, GA-Q1, GA-Q2, GA-Q3, GA-Q4.

Figura 29. FTIR dos filmes e das blendas



A Figura 29 (a) apresenta o espectro de FTIR do filme de gelatina de peixe (G) e das blendas de gelatina/quitosana (G-Q1, G-Q2, G-Q3 e G-Q4). Pode-se observar que os espectros do filme de gelatina de peixe e das blendas de gelatina/quitosana

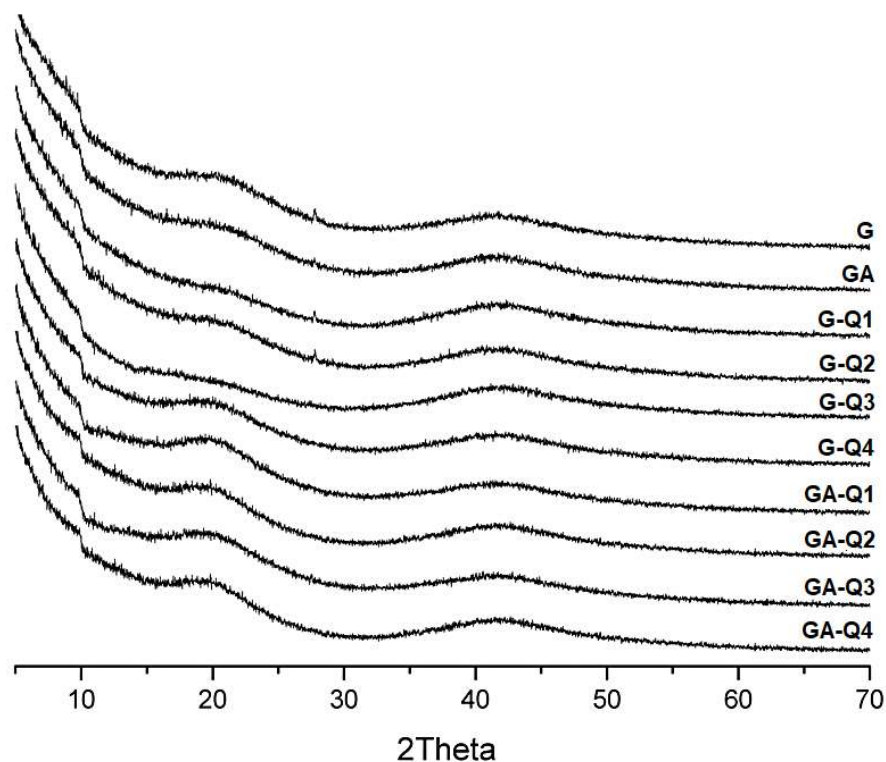
apresentaram as mesmas características. As bandas foram observadas em 3282, 3079, 2932, 1630, 1528 e 1239 cm^{-1} , o que corresponde à amida A (alongamento da ligação NH- acoplado à ligação de hidrogênio), amida B (vibração de alongamento assimétrico de C-H (sp^3) e NH_3^+), amida-I (alongamento de C=O, ligação de hidrogênio acoplada a COO), amida-II (decorrentes da vibração de grupos N-H e alongamento de vibrações de grupos C-N) e amida-III (vibrações no plano de ligações C-N e N-H de vibrações da amina ligada ou glicina CH_2), respectivamente.¹² Observa-se na Figura 29 (a) que a adição de quitosana causou uma diminuição na banda amida-I. Esta diminuição deve-se às alterações estruturais nas cadeias polipeptídicas da gelatina, levando a uma redução na quantidade de estruturas em α hélice e da amida III.

A Figura 29 (b) apresenta o espectro de FTIR do filme de gelatina de pescada (G), gelatina/AGI (GA) e das blendas de gelatina/AGI/quitosana (GA-Q1, GA-Q2, GA-Q3 e GA-Q4). Pode-se observar que nas blendas gelatina/quitosana/AGI, houve um aumento na intensidade das bandas amida-I, II, III, A e B, quando comparado aos filmes sem AGI (Figura 29 (a)). Esse comportamento, pode ser atribuído a reorganização molecular, ou seja, as estruturas da quitosana migram para o redor das gotículas de AGIs, diminuindo as interações com as estruturas proteicas, o que resultaria no surgimento de maiores quantidades de aminas secundárias e terciárias provenientes da gelatina.

O aumento da banda a 2932 cm^{-1} representa a vibração de estiramento assimétrica e simétrica do metileno do C-H alifático, respectivamente, bem como o CH fornecido pelas ligações de CH_2 e CH_3 localizados no lipídio. Ambas, faixas de estiramento assimétricas do metileno em aproximadamente 2880 cm^{-1} e faixa de estiramento simétrico de metileno próxima a 2932 cm^{-1} estão presentes na maioria dos lipídios.²⁷⁹ As bandas em 1737, 1410 e 923 cm^{-1} representam -C=O (para o éster dos triglicerídeos), =C-H (cis, flexão) e -HC=CH- (cis e trans, fora do plano), respectivamente, relacionadas a adição de AGI.²⁸⁰ A banda a 1040 cm^{-1} foi observada em todos os espectros e corresponde à ligação -OH, proveniente principalmente do glicerol adicionado como plastificante em todos os filmes. Quando foi adicionado o AGI, ocorreu uma diminuição na amplitude da banda, provavelmente devido à diluição do AGI no glicerol.⁶²

4.2.1.6. Difração de raio-X (DRX)

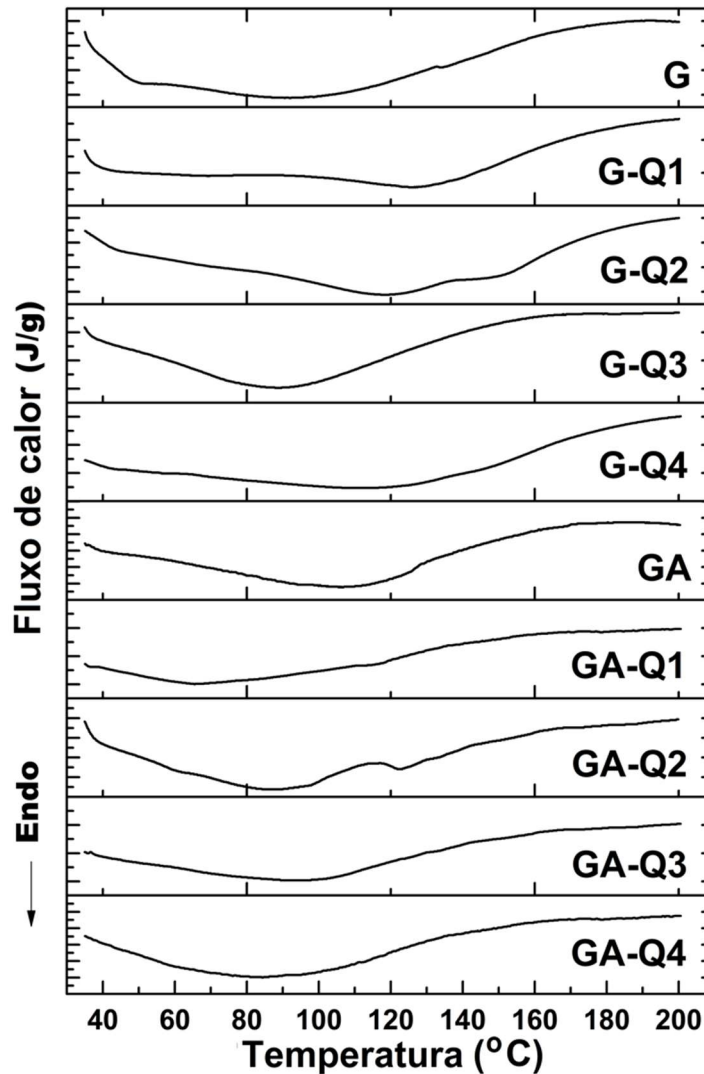
Os padrões de DRX dos filmes de gelatina de pescada, dos compostos gelatina/quitosana e das blendas gelatina/AGI/quitosana, são mostrados na Figura 30.

Figura 30. DRX dos filmes e das blendas

Pode ser observado na Figura 30 que, todos os filmes e blendas apresentaram características semelhantes aos filmes de gelatina de peixe. O pico característico em $2\theta=8$, atribuído à presença de pequena quantidade de uma estrutura helicoidal tripla, tripla hélice do colágeno em forma de bastonete, acompanhada por uma banda larga centrada em $2\theta=21$, representa a região amorfa dos filmes. Não foram observadas alterações na cristalinidade do material, após a adição de quitosana e AGI. Cheng et al.²⁵⁵, estudaram a influência da proporção gelatina/quitosana em filmes compostos e concluíram que filmes produzidos com mais de 80% de gelatina na composição, não sofrem alterações na cristalinidade com a adição de outros componentes.

4.2.1.7. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os termogramas dos filmes de gelatina de peixe, dos compostos gelatina/quitosana e das blendas gelatina/AGI/quitosana, estão apresentados na Figura 31.

Figura 31. DSC dos filmes e das blendas

A temperatura de transição do filme de gelatina de peixe (G) foi de 92,1°C. Esta transição térmica está associada à desnaturação das proteínas, e pode ser considerada como a temperatura de fusão (T_F) do material, devido à perda do arranjo dimensional das cadeias polipeptídicas. Antes de fundir, o material amorfo amolece e perde seu estado vítreo, que é chamado transição vítrea (T_g). A adição de quitosana nos filmes aumentou a T_F , demonstrando que o polímero de quitosana é mais estável termicamente que as proteínas. Nos filmes onde foi adicionado a quitosana, G-Q1, G-Q2, G-Q3 e G-Q4, estes apresentaram temperaturas de fusão de 126,0°C, 117,9°C, 84,3°C e 108,7°C, respectivamente (Figura 31). Assim, o aumento da M_v da quitosana levou a um aumento na T_F dos filmes compostos. Segundo Liu et al.¹⁶, as interações entre gelatina e quitosana na formação dos filmes dependem das propriedades físico-químicas de ambos os materiais e que variações na temperatura de transição na faixa de 80 a 180°C indicam que os filmes de gelatina/quitosana possuem boa miscibilidade. A adição de AGI em filmes de gelatina de peixe (sem quitosana) promoveu um aumento na T_F de

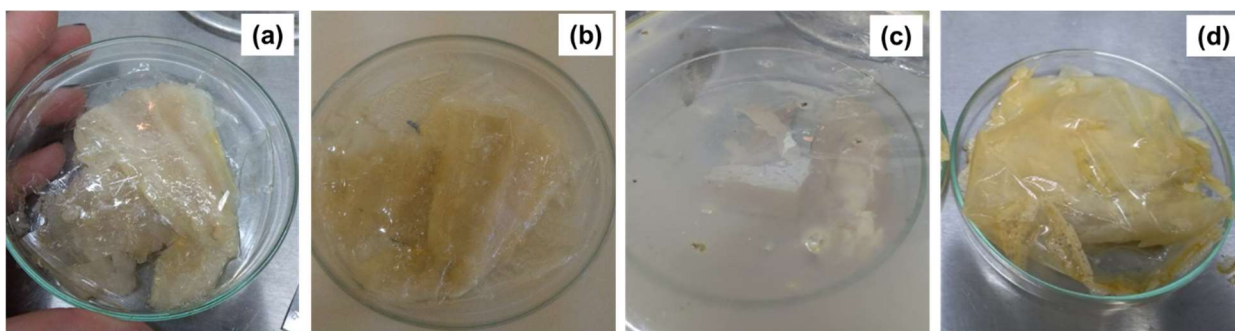
92,1°C para 104,4°C. Comportamento semelhante foi observado por Ma et al.,²⁸¹ na adição de azeite em filmes de gelatina. Aparentemente, a quitosana com maior GD levou a um aumento na T_F dos filmes compostos gelatina/AGI/quitosana. A adição de AGI nos filmes de gelatina/quitosana (95% DD) aumentou a T_F de 84,4°C para 93,8°C.

4.3. Análise microbiológica dos filmes e das blendas à base de gelatina na conservação de filés de merluza

Os filmes foram testados como embalagem ativa contra *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp., na conservação de filés de merluza. Os filmes escolhidos para realização destes testes foram os filmes de gelatina (G), gelatina/quitosana-2 (G-Q2), gelatina/AGIs (GA) e gelatina/quitosana-2/AGIs (GA-Q2). Os filmes em que foram adicionados quitosana-2 ($M_v=194$ kDa e $GD=79,2$ %), foram escolhidos por terem apresentados melhores valores de RT, AR e PVA.

A Figura 32 apresenta os filmes que foram utilizados como embalagens ativas na conservação de filés de merluza.

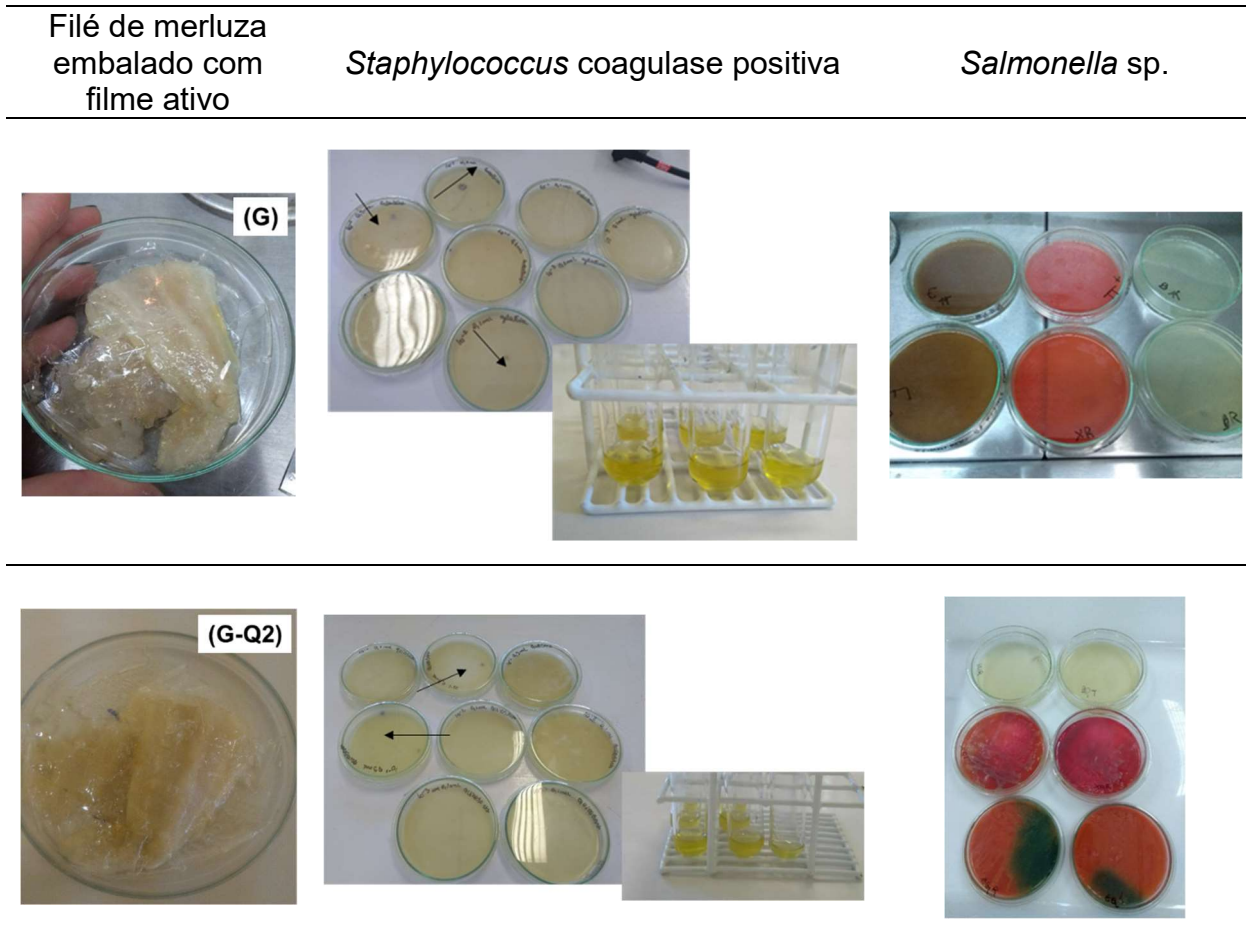
Figura 32. Imagem dos filés de merluza embalados com os filmes à base de gelatina (a) G, (b) G-Q2, (c) GA e (d) GA-Q2



Legenda. (G) filmes de gelatina, (G-Q2) gelatina/quitosana-2, (GA) gelatina/AGIs, e (GA-Q2) gelatina/quitosana-2/AGIs.

Na Figura 33 estão apresentadas as imagens fotográficas dos filmes de gelatina (G) e Gelatina/quitosana-2 (G-Q2) dos filés de merluza embalados, e as respectivas imagens das placas contendo colônias típicas e atípicas para *Staphylococcus* coagulase positiva e os tubos de ensaio contendo as amostras das colônias, juntamente com as imagens das placas para contagem de *Salmonella* sp.

Figura 33. Filés embalados com os filmes G e G-Q2, e os respectivos resultados para *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* sp.



Observa-se nas imagens da Figura 33 que, tanto o filme de gelatina quanto o filme de gelatina/quitosana, apresentaram resultados negativos para os dois microrganismos investigados. No entanto, o filme G-Q2 nas análises para *Salmonella* sp., os meios sofreram alterações, todavia os testes com o kit mostraram que o microrganismo investigado não estava presente.

Estes resultados corroboram com os resultados de Matiacevich et al.,²⁸², que estudaram as propriedades termofísicas e antimicrobianas de filmes à base de gelatina de diferentes origens (bovina e de peles de salmão) e verificaram o impacto da incorporação de quitosana nestes filmes. Os autores concluíram que a quitosana nas proporções de 0,5 e 1,0%, melhoraram o desempenho físico dos filmes de gelatina, especialmente quando utilizada gelatina de pescado. Os autores verificaram que ambos os filmes de gelatina pura, quanto de gelatina com quitosana, apresentaram efeito antimicrobiano contra *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella thyphimurium*, sendo que

os filmes produzidos a partir de peles de salmão foram mais efetivos que os origem bovina na atividade antimicrobiana. Os autores ainda sugerem que este resultado (principalmente a atividade antimicrobiana da gelatina pura) poderia estar relacionada à presença de oligopeptídeos com propriedades antimicrobianas (semelhantes aos grupos amino presentes na cadeia polimérica do polissacarídeo), como resultado da hidrólise parcial da gelatina.

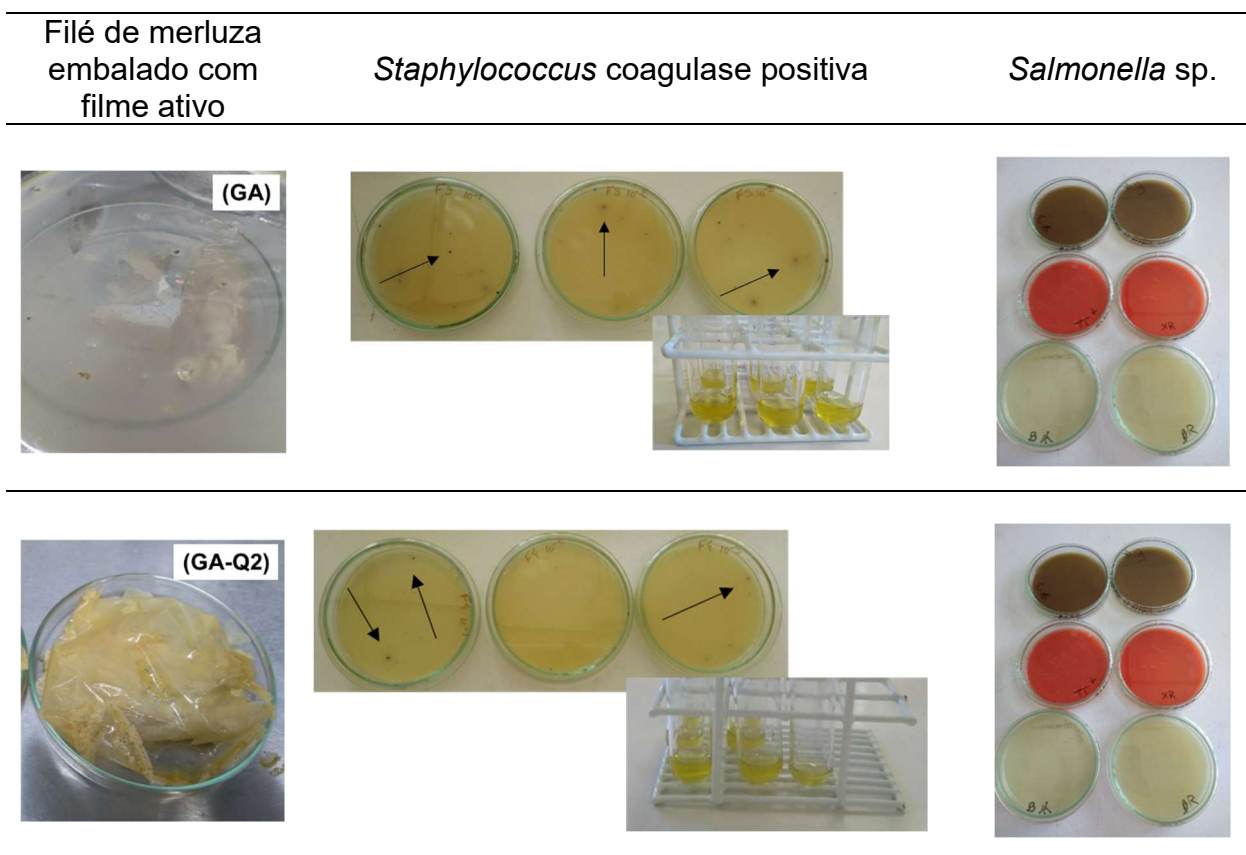
De acordo com Pereda et al.¹³⁷, filmes compostos de gelatina/quitosana têm melhorado as propriedades mecânicas e de transporte em comparação com os filmes de um único componente. No entanto, a atividade antimicrobiana da quitosana depende de diferentes fatores, como pH, interação com outros componentes e massa molar, e é necessário considerar que as propriedades antibacterianas são uma combinação do efeito da quitosana e do ácido acético. Segundo Liu et al.¹⁹⁸, o ácido acético utilizado como solvente da quitosana com concentrações acima de 200 ppm (0,02% m/m) apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli* em pH 5,4. Portanto, os autores concluíram que o efeito antimicrobiano observado nos filmes é atribuído à combinação de quitosana e ácido acético adicionado.

A fim de avaliar a influência de ácidos graxos insaturados nos filmes quanto as propriedades antimicrobianas, estes também foram testados. A Figura 34 apresentam as imagens fotográficas dos filmes de gelatina/AGIs (GA) e gelatina/quitosana-2/AGI (GA-Q2) dos filés de merluza embalados, e as respectivas imagens das placas contendo colônias típicas e atípicas para *Staphylococcus* coagulase positiva e os tubos de ensaio contendo as amostras das colônias, juntamente com as imagens das placas para contagem de *Salmonella* sp.

Observa-se nas imagens da Figura 34, que tanto o filme de gelatina/AGIs, quanto o filme de gelatina/quitosana/AGIs, também apresentaram resultados negativos para os dois microrganismos investigados. Segundo estudos reportados na literatura, dependendo das características da fração lipídica adicionada, esta apresenta comportamento diferente, quanto a ação antimicrobiana. Ahmad et al.,²⁷⁴, estudaram filmes de gelatina, incorporados com óleo de bergamota (OB) e óleo de capim-limão (OL) em diversas concentrações. A incorporação de OB (5 e 25%) resultou na diminuição tanto da resistência à tração (RT) como no alongamento na ruptura (AR) dos filmes. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) diminuiu nos filmes incorporados com OL, enquanto que na adição de OB esta aumentou. Os filmes com incorporação de OL

apresentaram efeito inibitório contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, mas o filme com OB inibiu apenas *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Filmes contendo OB e OL não inibiram *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo os autores, a incorporação de uma fração lipídica é promissora na elaboração de filmes antimicrobianos, entretanto, dependendo da natureza do óleo e de suas características, estes influenciam e se comportam de maneiras diferentes quanto a inibição de microrganismos.

Figura 34. Filés embalados com os filmes GA e GA-Q2, e os respectivos resultados para *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp.



Já, Gómez–Estaca et al.²²⁸, avaliaram a adição de diferentes óleos essenciais quanto a sua atividade microbiana em 18 gêneros de bactérias, incluindo alguns importantes patógenos alimentares e bactérias de deterioração. O óleo essencial de cravo apresentou o maior efeito inibitório, seguido de alecrim e lavanda. Após os autores elaboraram blendas de gelatina/quitosana incorporando óleo essencial de cravo que foram aplicados em filés de pescado durante o armazenamento refrigerado. Os autores observaram que o crescimento de microrganismos foi drasticamente reduzido em bactérias gram–negativas, especialmente enterobactérias, como é o caso da *Salmonella*

sp., enquanto bactérias lácticas permaneceram praticamente constantes durante grande parte do período de armazenamento.

Sendo assim, devido a inibição para *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp. nos filmes onde foi adicionado os concentrados de ácidos graxos insaturados, pode-se inferir que no caso de AGIs, estes não provocaram alterações nas propriedades antibactericidas dos filmes à base de gelatina de pescado, independente da adição ou não da quitosana. Todavia, os mecanismos de ação antimicrobiano destes materiais, não são claramente detalhados, uma vez que cada componente pode exibir um mecanismo de ação exclusivo que é específico para uma gama específica de alimentos e microrganismos. Dentre estes mecanismos, alguns foram identificados, como danos à parede celular, interação e ruptura da membrana citoplasmática, danos nas proteínas da membrana, vazamento de componentes celulares, coagulação do citoplasma e depleção da força motora do próton. Todos esses efeitos produzem a morte do microrganismo pela modificação da estrutura e composição das células das bactérias.²⁸³

5. CONCLUSÕES

Os materiais obtidos de polímeros biodegradáveis podem ser uma alternativa para a redução do impacto ambiental, causado pelos polímeros derivados do petróleo. Neste trabalho, foram utilizadas matérias-primas de diferentes origens, que foram extraídas e elaboradas a partir de resíduos da indústria pesqueira. Foram produzidas gelatina extraída de peles de corvina (*Micropogonias furnieri*), quitosana de resíduos de camarão (*Farfantepenaeus brasiliensis*) e concentrados de ácidos graxos insaturados de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*). Todos os processos realizados para obtenção das macromoléculas foram satisfatórios, visto que as propriedades de todos os biomateriais (gelatina, quitosana, ácidos graxos insaturados) apresentaram bons valores frente aos encontrados na literatura. A partir dessas macromoléculas foram produzidos filmes e blendas, que foram caracterizadas quanto suas propriedades mecânicas (RT e AR), de permeação (PVA), óticas, superfície (MEV), grupos funcionais (FTIR), térmicas (DSC) e antimicrobianas na conservação de files de merluza (*Merluccius hubbsi*).

Pôde-se constatar com os resultados que os filmes produzidos a partir desses biomateriais, são bastante promissores como embalagem ativa, pois apresentaram boas propriedades físico-químicas e microbiológicas. A adição de quitosana nos filmes à base de gelatina, promoveu um aumento significativo na RT dos filmes e diminuiu o AR. Estes valores foram mais expressivos quando utilizada quitosana de mais elevada M_v , pois esta promoveu um aumento nas interações entre os polímeros, diminuindo a flexibilidade dos filmes. Em relação a PVA, esta diminuiu com a adição de quitosana, pois o aumento das interações moleculares, causou uma aproximação das cadeias poliméricas, diminuindo os espaços moleculares para difusão dos vapores de água através dos filmes. Já nos filmes em que foram incorporados os AGIs, estes provocaram uma diminuição nos valores de RT, porque a adição do lipídio promoveu uma reorganização estrutural na matriz, onde as moléculas de quitosana, formaram uma cápsula ao redor da gotícula, diminuindo as interações entre os polímeros. Essa reorganização molecular, provocou um aumento bastante significativo nos valores de AR das blendas, visto que este alcançou resultados superiores aos filmes sintéticos de polietileno de baixa densidade. Em relação a PVA, esta diminuiu com a adição de AGIs, que além de ser um agente hidrofóbico, diminuiu a área de permeação das blendas.

Em relação a análise de superfície, esta mostrou que os filmes com a adição de quitosana de maior M_v apresentaram estruturas fibrosas na superfície, no entanto

quando os AGIs foram incorporados estas foram minimizadas, o que sugere uma modificação nas interações moleculares e uma possível reorganização molecular. Quanto a cor, a adição de quitosana e AGIs provocaram um aumento na opacidade dos filmes, em relação ao filme de gelatina. As análises de FTIR, apresentaram bandas características de filmes à base de gelatina de peixe, mesmo quando adicionado quitosana, todavia, com a adição de AGIs, ocorreu um aumento na intensidade das bandas amida-I, II, III, A e B, sugerindo que diminuíram as interações entre a gelatina e a quitosana. As DRX, foram características de filmes de gelatina, a adição de quitosana e AGIs, não alteraram os difratogramas nas proporções utilizadas. Quanto a análise térmica a adição de quitosana e AGIs, aumentou a temperatura de fusão dos filmes.

Em relação as análises microbiológicas para as bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp.. Os filmes inibiram totalmente o desenvolvimento destas nos filés embalados, indicando que estes filmes e blendas são bastante promissores na aplicação de embalagens antimicrobianas na conservação de filés de peixe.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Youssef, A. M., Abou–Yousef, H., El–Sayed, S. M., & Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016>
2. Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste. A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>
3. Mota, J. C. M., Almeida, M. M., Alencar, V. C., & Curi, W. F. (2009). Características e impactos ambientais causados pelos resíduos sólidos. Uma visão conceitual. / *Congresso Internacional de Meio Ambiente Subterrâneo*, (83), 1–15.
4. Stevanato, F. B., Petenucci, M. E., Matsushita, M., Mesomo, M. C., Souza, N. E., Visentainer, J. E. L., ... Visentainer, J. V. (2007). Avaliação química e sensorial da farinha de resíduo de tilápias na forma de sopa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(3), 567–571. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300022>
5. Leceta, I., Etxabide, A., Cabezudo, S., De La Caba, K., & Guerrero, P. (2014). Bio–based films prepared with by–products and wastes. Environmental assessment. *Journal of Cleaner Production*, 64, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.07.054>
6. Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garrigós, M. (2016). Gelatin–Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*, 6(4), 41. <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
7. Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Zuñiga, R. N., Khmelinskii, I., & Vieira, M. C. (2017). Mathematical modeling of gallic acid release from chitosan films with grape seed extract and carvacrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.187>
8. Shahbazi, Y. (2017). The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil as biodegradable materials for active food packaging. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 99, 746–753. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.065>

9. Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A. S., & Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, (February), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>
10. Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Ghavi, F. F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.081>
11. Gómez–Estaca, J., Gómez–Guillén, M. C., Fernández–Martín, F., & Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine–hide and tuna–skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1461–1469. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.007>
12. Jridi, M., Hajji, S., Ayed, H. Ben, Lassoued, I., Mbarek, A., Kammoun, M., ... Nasri, M. (2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.054>
13. Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahirou, T., Gu, W., & Li, B. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine Drugs*, 8(7), 1962–1987. <https://doi.org/10.3390/md8071962>
14. Leceta, I., Uranga, J., Arana, P., Cabezudo, S., De La Caba, K., & Guerrero, P. (2015). Valorisation of fishery industry wastes to manufacture sustainable packaging films. Modelling moisture–sorption behaviour. *Journal of Cleaner Production*, 91, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.12.009>
15. Kołodziejaska, I., & Piotrowska, B. (2007). The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1–ethyl–3–(3–dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103(2), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.049>
16. Liu, Z., Ge, X., Lu, Y., Dong, S., Zhao, Y., & Zeng, M. (2012). Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine–based

- films. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 311–317.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.008>
17. Srinivasan, A., & Viraraghavan, T. (2010). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents. A review. *Journal of Environmental Management*, 91(10), 1915–1929.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.05.003>
18. Rubio–Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M., Sanz, M. T., & Carballido, J. R. (2010). Production of omega–3 polyunsaturated fatty acid concentrates. A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.006>
19. Crexi, V. T., Monte, M. L., Monte, M. L., & Pinto, L. A. A. (2012). Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil. Chemical hydrolysis and urea complexation. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 329–334.
<https://doi.org/10.1007/s11746-011-1899-4>.
20. Pereira, D. S., Julião, L., Sucasas, L. F. A., Silva, L. K. S., Galvão, J. A., & Oetterer, M. (2006). Boas Práticas para Manipuladores de Pescado. O Pescado e o Uso do Frio Douglas. *Agroindústria, Alimentos & Nutrição*, 1–23.
21. Tachizawa, T. **Gestão com pessoas. uma abordagem aplicada às estratégias de negócios 5. ed.** Rio de Janeiro. Editora FGV, 2006.
22. ABRE (2018). <https://www.portalabre.com.br/Index.do>
23. Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach. A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 687–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>
24. Costa, T. L. E., Oliveira, T. A., Santos, F. K. G., Aroucha, E. M. M., & Leite, R. H. L. (2012). Avaliação de coberturas comestíveis compostas por quitosana e argila no revestimento em tomates sob refrigeração pelo método dipping. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, (July 2014), 12–19.
25. Santana, M. C. C. B., Machado, B. A. S., Silva, T. N., Nunes, I. L., & Druzian, J. I. (2013). Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. *Ciência Rural*, 43(3), 544–550.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000012>

26. Villadiego, A. M. D., Soares, N. F. S., Andrade, N. J., Puschmann, R., Minim, V. P. R., & Cruz, R. (2005). Filmes e Revestimentos Comestíveis na Conservação de Produtos Alimentícios. *Revista Ceres*, 52(300), 221–244.
27. Krochta, J. M., & Mulder–Johnston, C. (1997). Edible and Biodegradable Polymer Filmes. Challenges and Opportunities. *Food Technology*, 51(2), 60–74.
28. Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., & Gopal, T. K. S. (2015). Smart packaging systems for food applications. a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6125–6135. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1766-7>
29. Gutiérrez, L., Escudero, A., Batlle, R., & Nerín, C. (2009). Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8564–8571. <https://doi.org/10.1021/jf901459e>
30. César, D. S., Mori, C., & Batalha, M. O. (2010). Inovações tecnológicas de embalagens nas indústrias de alimentos. estudo de caso da adoção de embalagem ativa em empresas de torrefação de café. *Revista Brasileira de Inovação*, 9(2), 355–377. Retrieved from <http://www.ige.unicamp.br/ojs/index.php/rbi/article/viewArticle/478>
31. Labuza, T. P. (1975). Sorption phenomena in foods. Theoretical and practical aspects. *Theory, Determination and Control of Physical Properties of Food Materials*, (10), 197–219. https://doi.org/10.1007/978-94-010-1731-2_11
32. Rooney, M. L. (2005). 5 – Introduction to active food packaging technologies. *Innovations in Food Packaging*, 63–79. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50037-1>
34. Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3), 373–380. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00121-3)
35. Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(2), 113–126. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)
36. Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W., & Miltz, J. (2008). Efficacy of

polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT – Food Science and Technology*, 41(5), 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.006>

37. Singh, S., Lee, M., Park, Insik, Shin, Y., & Lee, Y. S. (2016). Antimicrobial seafood packaging. a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2505–2518. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2216-x>
38. Torres-pacheco, I. (2006). Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. *Food Biotechnology*, 661(2), 193–216.
39. Pires, D. R., Morais, A. C. N., Costa, J. F., Góes, L. C. D. S. A., & Oliveira, G. M. (2014). Aproveitamento do resíduo comestível do pescado . Aplicação e viabilidade Utilization of waste edible fish . Application and feasibility. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 9, 34–46.
40. Work, W. J., Horie, K., Hess, M., & Stepto, R. F. T. (2004). Definitions Of Terms Related To Polymer Blends, Composites, And Multiphase Polymeric Materials (IUPAC Recommendations 2004). *Pure and Applied Chemistry*, 76(11), 1985–2007.
41. Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., Domenek, S., & Guilbert, S. (2003). Thermoplastic processing of protein-based bioplastics. Chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding. *Macromolecular Symposia*, 197, 207–217. <https://doi.org/10.1002/masy.200350719>
42. Moura, J. M., Farias, B. S., Rodrigues, D. A. S., Moura, C. M., Dotto, G. L., & Pinto, L. A. A. (2015). Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 470–477. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0730-y>
43. Hernandez-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation – A review. *Journal of Food Science*, 73(2), 30–39. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>
44. Oliveira, A. F., Soldi, V., Coelho, C. M. M., Miqueloto, A., & Coimbra, J. L. M. (2009). Preparação, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. *Química Nova*, 32(7), 1845–1849. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700030>

45. Rydz, J., Sikorska, W., Kyulavska, M., & Christova, D. (2015). Polyester-based (bio)degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 564–596. <https://doi.org/10.3390/ijms16010564>
46. Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K. P. (2012). Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (52)5, 426-442. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2010.500508>
47. Rouhi, M., Razavi, S. H., Seyed, S. M. A. E. (2017). Optimization of crosslinked poly(vinyl alcohol) nanocomposite films for mechanical properties. *Materials Science & Engineering C, in press*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.135>
48. Moreno, O., Gil, À., Atarés, L., & Chiralt, A. (2017). Active starch–gelatin films for shelf–life extension of marinated salmon. *LWT – Food Science and Technology*, 84, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.005>
49. Wu, J., Sun, X., Guo, X., Ge, S., & Zhang, Q. (2017). Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. *Aquaculture and Fisheries*, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.06.004>
50. Chin, S., Han Lyn, F., & Nur Hanani, Z. A. (2017). Effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel on the physical and functional properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 12(April), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.008>
51. Mohebi, E., & Shahbazi, Y. (2017). Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation. A novel functional wrapping design. *LWT – Food Science and Technology*, 76, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.062>
52. Guo, M., Yadav, M. P., & Jin, T. Z. (2017). Antimicrobial edible coatings and films from micro–emulsions and their food applications. *International Journal of Food Microbiology*, 263(April), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.002>
53. Benbettaieb, N., Tanner, C., Cayot, P., Karbowski, T., & Debeaufort, F. (2017). Impact

of functional properties and release kinetics on antioxidant activity of biopolymer active films and coatings. *Food Chemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.065>

54. Sahraee, S., Milani, J. M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2017). Effect of corn oil on physical, thermal, and antifungal properties of gelatin-based nanocomposite films containing nano chitin. *LWT – Food Science and Technology*, 76, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.028>
55. Albertos, I., Avena-Bustillos, R. J., Martín-Diana, A. B., Du, W. X., Rico, D., & McHugh, T. H. (2017). Antimicrobial Olive Leaf Gelatin films for enhancing the quality of cold-smoked Salmon. *Food Packaging and Shelf Life*, 13(July), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.07.004>
56. López, D., Márquez, A., Gutiérrez-Cutiño, M., Venegas-Yazigi, D., Bustos, R., & Matiacevich, S. (2017). Edible film with antioxidant capacity based on salmon gelatin and boldine. *LWT – Food Science and Technology*, 77, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.039>
57. Campo, C., Pagno, C. H., Costa, T. M. H., Rios, O., & Flôres, S. H. (2017). Gelatin capsule waste. new source of protein to develop a biodegradable film. *Polímeros*, 27(2), 100–107. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2371>
58. Musso, Y. S., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2017). Smart edible films based on gelatin and curcumin. *Food Hydrocolloids*, 66, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.007>
59. Yang, H. J., Lee, J. H., Lee, K. Y., & Bin Song, K. (2017). Application of gelatin film and coating prepared from dried alaska pollock by-product in quality maintenance of grape berries. *Journal of Food Processing and Preservation*, (August 2016). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13228>
60. Treesuppharat, W., Rojanapanthu, P., Siangsanoh, C., Manuspiya, H., & Ummartyotin, S. (2017). Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. *Biotechnology Reports*, 15, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.002>
61. Rebelo, R., Fernandes, M., & Figueiro, R. (2017). Biopolymers in Medical Implants.

- A Brief Review. *Procedia Engineering*, 200, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.034>
62. Bergo, P., & Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1285–1289. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.014>
63. Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin. properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
64. Lacroix, M., & Vu, K. D. (2013). *Edible Coating and Film Materials. Proteins. Innovations in Food Packaging. Second Edition.* Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00011-4>
65. Rocha, M., Souza, M. M., & Prentice, C. (2018). **Biodegradable Films. An Alternative Food Packaging.** (A. M. Grumezescu & A. M. Holban, Eds.) (9th ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00009-9> 307
66. Anbinder, P. S., Peruzzo, P. J., Martino, M. N., & Amalvy, J. I. (2015). Effect of antioxidant active films on the oxidation of soybean oil monitored by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 151, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.008>
67. Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
68. Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigós, M. del C., & Jiménez, A. (2016). Active edible films. Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/app.42631>
69. Vieira, M. G. A., Silva, M. A., Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films. A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
70. Sobral, P. J., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)

71. Guilbert, S., Gontard, N., & Cuq, B. (1995). Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*, 8(6), 339–346. <https://doi.org/10.1002/pts.2770080607>
72. Lucena, C. A. A., Costa, S. C., Eleamen, G. R. A., Mendonça, E. A. M., & Oliveira, E. E. (2017). Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. *Polímeros*, 27(spe), 35–41. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2223>
73. Haimovici, M., Cardoso, L. G., & Gatto Unpierre, R. (2016). Stocks and management units of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) in southwestern Atlantic. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(5), 1080–1095. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue5-fulltext-18>
74. Carozza, C. (2010). Pesquería comercial de corvina rubia en Argentina (*Micropogonias furnieri*). *Frente Marítimo*, 21, 15–22.
75. MPA. (2011). Aquicultura. Retrieved from http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf
76. Leite, S. B. P., Sucasas, L. F. A., & Oetterer, M. (2016). Resíduos da comercialização de pescado marinho—volume de descarte e aspectos microbiológicos. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 10(1), 2112–2125. Retrieved from <https://revistas.utfpr.edu.br/rbta/article/view/2692>
77. Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219(1), 20–26. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0882-9>
78. Feltes, M. M. C., Correia, J. F. G., Beirão, L. H., Block, J. M., Ninow, J. L., & Spiller, V. R. (2010). Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe Alternatives for adding value for the fish processing wastes. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(6), 669–677. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000600014>
79. Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste. Treatments,

- environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(4), 726–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x>
80. Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Osako, K. (2011). Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*). Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*, 125(2), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.040>
81. Silva, R. S. G., Bandeira, S. F., Petry, F. C., & Pinto, L. A. A. (2011). Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. *Ciência Rural*, 41(5), 904–909. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000059>
82. Crexi, V. T., Monte, M. L., Soares, L. A. S., & Pinto, L. A. A. (2010). Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Food Chemistry*, 119(3), 945–950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.050>
83. Amirkolaie, A. K. (2011). Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Reviews in Aquaculture*, 3(1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
84. Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P., & Wu, W. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chemistry*, 135(3), 1975–1984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.086>
85. Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). **Química de Alimentos de Fennema (4ª ed)**. São Paulo. Artmed.
86. Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2007). **Bioquímica Volume 1**. São Paulo. Thompson.
87. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014). **Princípios de bioquímica de Lehninger (6th ed.)**. Porto Alegre. Artmed.
88. Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). From Collagen to Gelatine. In **Gelatine Handbook. Theory and Industrial Practice** (pp. 45–117). Weinheim, Germany. Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527610969.ch2>

89. Montero, P., Borderias, J., Turnay, J., & Leyzarbe, M. A. (1990). Characterization of Hake (*Merluccius Merluccius L.*) and Trout (*Salmo Irideus Gibb*) Collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 604–609. <https://doi.org/10.1021/jf00093a004>
90. Gómez–Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández–Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species. A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00035-2)
91. Gómez–Guillén, M. C., Pérez–Mateos, M., Gómez–Estaca, J., López–Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin. a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
92. Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material – Skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3), 277–281. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00188-0)
93. Laurindo, E. E., & Filho, I. R. B. (2017). Encefalopatia espongiiforme bovina atípica. uma revisão. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000392015>
94. Zhang, F., Xu, S., & Wang, Z. (2011). Pre–treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.05.003>
95. Wolf, F. A. (2002). Chapter V Collagen and gelatin. *Progress in Biotechnology*, 23(C), 133–218. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(03\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(03)80005-9)
<https://doi.org/10.1351/pac200476111985>
96. Catalina, M., Attenburrow, G. E., Cot, J., Covington, A. D., & Antunes, A. P. M. (2011). Influence of crosslinkers and crosslinking method on the properties of gelatin films extracted from leather solid waste. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(4), 2105–2111. <https://doi.org/10.1002/app.32932>
97. Gomez–Guillén, M. C., Gimenez, B., Lopez–Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative

- sources. A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
98. Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.08.009>
99. Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen–vs. Gelatin–Based Biomaterials and Their Biocompatibility. Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, (September 2017), 17–51. <https://doi.org/10.5772/24118>
100. Cataldo, F., Ursini, O., Lilla, E., & Angelini, G. (2008). Radiation–induced crosslinking of collagen gelatin into a stable hydrogel. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 275(1), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s10967-007-7003-8>
101. Chávez, F. V., Hellstrand, E., & Halle, B. (2006). Hydrogen exchange and hydration dynamics in Gelatin gels. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(43), 21551–21559. <https://doi.org/10.1021/jp057567s>
102. Chiou, B.–S., Avena–Bustillos, R. J., Shey, J., Yee, E., Bechtel, P. J., Imam, S. H., ... Orts, W. J. (2006). Rheological and mechanical properties of cross–linked fish gelatins. *Polymer*, 47(18), 6379–6386. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.07.004>
103. Boran, G., & Regenstein, J. M. (2012). **Fish Gelatin. Food Biochemistry and Food Processing. Second Edition (1st ed., Vol. 60).** Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch21>
104. Jamilah, B., & Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish – Black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77(1), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00328-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00328-4)
105. Arnesen, J. A., & Gildberg, A. (2007). Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, 98(1), 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.021>
106. Jellouli, K., Balti, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Barkia, A., & Nasri, M. (2011). Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes caprisus*). *LWT – Food Science and Technology*, 44(9), 1965–1970.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.005>

- 107.** Karayannakidis, P. D., & Zotos, A. (2016). Fish Processing By-Products as a Potential Source of Gelatin. A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(1), 65–92. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.827767>
- 108.** Eysturskarð, J., Haug, I. J., Elharfaoui, N., Djabourov, M., Draget, K. I. (2009). Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, 23, 1702–1711. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.008>
- 109.** Liu, H., Lia, D., Guo, S. (2008). Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatine from fish skins preserved by different methods. *LWT*, 41, 1425–1430. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.006>
- 110.** Zhou, P., Mulvaney, S. J., & Regenstein, J. M. (2006). Properties of Alaska pollock skin gelatin. A comparison with tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science*, 71(6), 313–321. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00065.x>
- 111.** Kasankala, L. M., Xue, Y., Weilong, Y., Hong, S. D., & He, Q. (2007). Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 98(17), 3338–3343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.019>
- 112.** Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2005). Storage of dried fish skins on quality characteristics of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 958–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.012>
- 113.** Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper. Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 20(8), 1216–1222. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.006>
- 114.** Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., & McHugh, T. H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71(4), 202–207. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00016.x>
- 115.** Nikoo, M., Benjakul, S., Bashari, M., Alekhorshied, M., Cissouma, A. I., Yang, N., &

- Xu, X. (2014). Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment. *Food Bioscience*, 5, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.10.004>
- 116.** Muiznieks, L. D., & Keeley, F. W. (2013). Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix. A fibrous protein perspective. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 866–875. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.022>
- 117.** Ninan, G., Jose, J., & Abubacker, Z. (2011). Preparation and characterization of gelatin extracted from the skins of rohu (*Labeo rohita*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(2), 143–161. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00467.x>
- 118.** Norziah, M. H., Al-Hassan, A., Khairulnizam, A. B., Mordi, M. N., & Norita, M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes. Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1610–1616. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.004>
- 119.** Cheow, C. S., Norizah, M. S., Kyaw, Z. Y., & Howell, N. K. (2006). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry*, 101(1), 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.046>
- 120.** Engel, J., & Bächinger, H. P. (2005). Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Topics in Current Chemistry*, 247, 7–33. <https://doi.org/10.1007/b103818>
- 121.** Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75(1), 1–9. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.1.1>
- 122.** Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.027>
- 123.** Dhall, R. K. (2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables. A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435–450.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>

- 124.** Qiu, X., Chen, S., Liu, G., & Yang, Q. (2014). Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets stored at by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. *Food Chemistry*, *162*, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.037>
- 125.** Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.092>
- 126.** No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods. A review. *Journal of Food Science*, *72*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x>
- 127.** Oliveira, W. F., Silva, P. M. S., Silva, R. C. S., Silva, G. M. M., Machado, G., Coelho, L. C. B. B., & Correia, M. T. S. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, *98*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>
- 128.** Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Cady, N. C., Bergkvist, M., & Niamsiri, N. (2017). Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant. *Food Control*, *86*, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.021>
- 129.** Mukhopadhyay, S., Sokorai, K., Ukuku, D. O., Jin, T., Fan, X., Olanya, M., & Juneja, V. (2018). Inactivation of *Salmonella* in grape tomato stem scars by organic acid wash and chitosan–allyl isothiocyanate coating. *International Journal of Food Microbiology*, *266*, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.018>
- 130.** Escárcega–Galaz, A. A., Sánchez–Machado, D. I., López–Cervantes, J., Sanches–Silva, A., Madera–Santana, T. J., & Paseiro–Losada, P. (2018). Mechanical, structural and physical aspects of chitosan–based films as antimicrobial dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, *18*, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149>

- 131.** Lotfi, M., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Divsalar, E., & Kuswandi, B. (2018). Nanostructured chitosan/ monolaurin film. Preparation, characterization and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* on ultrafiltered white cheese. *Lwt*, *92*, 576–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.020>
- 132.** Sotelo–Boyás, M. E., Correa–Pacheco, Z. N., Bautista–Baños, S., & Corona–Rangel, M. L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food–borne pathogens. *LWT – Food Science and Technology*, *77*, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>
- 133.** Kheiri, A., Jorf, S. A. M., Mallhipour, A., Saremi, H., & Nikkhah, M. (2016). Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of *Fusarium* head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 1261–1272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.072>
- 134.** Chen, J., Zou, X., Liu, Q., Wang, F., Feng, W., & Wan, N. (2014). Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. *Crop Protection*, *56*, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.007>.
- 135.** Garcia, L. G. S., Guedes, G. M. M., Silva, M. L. Q., Castelo–Branco, D. S. C. M., Sidrim, J. J. C., Cordeiro, R. A., ... Brilhante, R. S. N. (2018). Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. *Carbohydrate Polymers*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
- 136.** Kulig, D., Zimoch–Korzycka, A., Kró, Z., Oziembłowski, M., & Jarmoluk, A. (2017). Effect of film–forming alginate/chitosan polyelectrolyte complex on the storage quality of pork. *Molecules*, *22*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010098>
- 137.** Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2011). Chitosan–gelatin composites and bi–layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1372–1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>
- 138.** Benbettaïeb, N., Kurek, M., Bornaz, S., & Debeaufort, F. (2014). Barrier, structural

and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2409–2419. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6570>

- 139.** Poverenov, E., Rutenberg, R., Danino, S., Horev, B., & Rodov, V. (2014). Gelatin–Chitosan Composite Films and Edible Coatings to Enhance the Quality of Food Products. Layer–by–Layer vs. Blended Formulations. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), 3319–3327. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1333-7>
- 140.** Bandeira, S. F., Silva, R. D. S. G., Moura, J. M., & Pinto, L. A. A. (2015). Modified Gelatin Films from Croaker Skins. Effects of pH, and Addition of Glycerol and Chitosan. *Journal of Food Process Engineering*, 38(6), 613–620. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12191>
- 141.** Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects. Common principles and differences. *European Journal of Cell Biology*, 90(9), 759–769. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.014>
- 142.** Campana–Filho, S. P., Britto, D., Curti, E., Abreu, F. R., Cardoso, M. B., Battisti, M. V., ... Lavall, R. L. (2007). Extração, estrutura e propriedades de α e β –quitina. *Quimica Nova*, 30(3), 644–650.
- 143.** Lopes, J. B. B. S., Vasques, R. O., Guimarães, F. J., Cetra, M., & Couto, E. C. G. (2010). Proporção Sexual do Camarão Sete–Barbas *Xiphopenaeus Kroyeri* na Costa de Ilhéus, Bahia, Brasil, 36(4), 251–262.
- 144.** FAO. (2007). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- 145.** IBAMA. (2011). Desembarques de pescados no Rio Grande do Sul, 2011. Projeto Estatística Pesqueira – Rio Grande.
- 146.** Hu, G., Chen, J., & Gao, J. (2009). Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.032>
- 147.** Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan. Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>

148. Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan. modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
149. Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, 4(5), 1380–1385. <https://doi.org/10.1021/bm034115h>
150. Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., & Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico–chemical properties. *Polymer*, 44(26), 7939–7952. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025>
151. Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
152. Campana–Filho, S. P., & Signini, R. (2001). Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros. Ciência e Tecnologia**, 11(4), 169–173. <https://doi.org/10.1590/S0104–14282001000400006>
153. Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers. Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
154. Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1–27. [https://doi.org/10.1016/S1381–5148\(00\)00038–9](https://doi.org/10.1016/S1381–5148(00)00038–9)
155. Crini, G., & Badot, P. M. (2008). Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies. A review of recent literature. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 33(4), 399–447. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001>
156. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... Heras, Á. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203–230. <https://doi.org/10.2174/187231309788166415>
157. Jeong, Y. Il, Kim, D. G., Jang, M. K., & Nah, J. W. (2008). Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)–grafted water–

soluble chitosan. *Carbohydrate Research*, 343(2), 282–289.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.025>

158. Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W. R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303(3), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00179-1)
159. Sannan, T., Kurita, K., & Iwakura, Y. (1976). Studies on Chitin, 1 – Effect of Deacetylation on Solubility. *Die Makromolekulare Chemie*, 177(12), 3589–3600. <https://doi.org/10.1002/macp.1976.021771210>
160. Rinaudo, M., & Domard, A. (1989). Solution properties of chitosan . Chitin and Chitosan, (January 1989), 71–86.
161. Aiba, S. (1992). Studies on chitosan. 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(4), 225–228. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80032-7](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80032-7)
162. Rege, P. R., & Block, L. H. (1999). Chitosan processing. Influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research*, 321(3–4), 235–245. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00172-X)
163. Weska, R. F., Moura, J. M., Batista, L. M., Rizzi, J., & Pinto, L. A. A. (2007). Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes. Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 749–753. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.006>
164. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35–52. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00160-7)
165. Craveiro, A. A., Craveiro, A. C., & Queiroz, D. (1999). **Quitosana. A fibra do futuro.** (PADETEC, Ed.). Ceará.
166. Sorlier, P., Denuzière, A., Viton, C., & Domard, A. (2001). Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 2(3), 765–772. <https://doi.org/10.1021/bm015531+>

167. Jiang, X., Chen, L., & Zhong, W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.05.004>
168. Masuelli, M., & Renard, D. (2017). **Advances in physicochemical Properties of Biopolymers (Part 2).**
169. Grem, C. I. S., Lima, B. N. B., Carneiro, W. F., Queirós, Y. G. C., & Mansur, C. R. E. (2013). Chitosan Microspheres Applied for Removal of Oil from Produced Water in the Oil Industry. *Polímeros*, 23(6), 705–711. <https://doi.org/10.4322/polimeros.2014.008>
170. Ulański, P., & Rosiak, J. (1992). Preliminary studies on radiation–induced changes in chitosan. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part*, 39(1), 53–57. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(92\)90171-B](https://doi.org/10.1016/1359-0197(92)90171-B)
171. Lu, Y., Wei, G., & Peng, J. (2004). Radiation Degradation of Chitosan in the Presence of H₂O₂. *Chinese Journal of Polymer Science*.
172. Bozkir, A., & Saka, O. M. (2004). Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery. effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Delivery*, 11, 107–112. <https://doi.org/10.1080/10717540490280705>
173. Chechan, R. A., Mohyaddin, M. O., & Mohamed, S. A. (2015). Utilization of Iraqi date syrup as substrate for production of chitosan by fungi on polyethylene sheet. 1– Optimization of production condition. *J. Genet. Environ. Resour. Conserv. Journal of Gene c and Environmental Resources Conserva On*, 3(31), 10–1610. Retrieved from www.jgerc.com
174. Chamanara, V., Shabanpour, B., Gorgin, S., & Khomeiri, M. (2012). An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.016>
175. Tammineni, N., Ünlü, G., & Min, S. C. (2013). Development of antimicrobial potato peel waste–based edible films with oregano essential oil to inhibit *Listeria monocytogenes* on cold–smoked salmon. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 211–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03156.x>

176. Sánchez–Ortega, I., García–Almendárez, B. E., Santos–López, E. M., Amaro–Reyes, A., Barboza–Corona, J. E., & Regalado, C. (2014). Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/248935>
177. Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstein, J. M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation. A review. *Food Chemistry*, 240(July), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034>
178. EMBRAPA. (2018). <https://www.embrapa.br/>
179. Melo, A. R., & Stipp, N. A. (2001). A Piscicultura em Cativoiro como Alternativa Econômica para as Áreas Rurais. *Geografia*, 10(2), 175–193.
180. Echevengúá, M. M., Echevengúá, W. O., Carbonera, A. A., Prentice–Hernández, C., & Figueiredo, M. R. C. (2008). Qualidade da polpa da carpa Húngara transportada viva ou no gelo, 38, 2004–2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000700032>
181. EFSA. (2010). Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including rancidity. *EFSA Journal*, 8(10), 1–48. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1874>.
182. Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids. Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894>
183. Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., & Weil, A. (2010). **Harper. Bioquímica Ilustrada (29th ed.)**. São Paulo. Amgh.
184. Gunstone, F. D. (2003). *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals* (1st ed.). University of St Andrews, UK. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/lipids-for-functional-foods-and-nutraceuticals/gunstone/978-0-9531949-3-3>
185. Contreras–Guzmán, E. S. (1994). **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal, São Paulo. Fundação Universidade Estadual Paulista.
186. Martins, M. B., Piotto, R. F., & Barbosa, M. (2008). Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça Properties of Omega–3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. *Inst*

Ciência Saúde, 26(2), 153–156.

187. Garófolo, A., & Petrilli, A. S. (2006). Balanço entre ácidos graxos ômega–3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Revista de Nutricao*, 19(5), 611–621. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000500009>
188. Moraes, F. P., & Colla, L. M. (2006). Alimentos Funcionais E Nutraceuticos. Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2), 109–122. <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2082>
189. Kromhout, D., Yasuda, S., Geleijnse, J. M., & Shimokawa, H. (2012). Fish oil and omega–3 fatty acids in cardiovascular disease. Do they really work? *European Heart Journal*, 33(4), 436–443. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr362>
190. Ponnusamy, K., Ambasankar, K., & Ponniah, A. G. (2012). Production and marketing of fish meal in India – a study, 59(1), 147–149.
191. Rizzi, J., Hamon, D. F., & Pinto, L. A. A. (2014). Extração de óleo de resíduos de carpa (*Cyprinus carpio*) e anchoita (*Engraulis anchoita*) utilizando diferentes métodos. *Vetor*, 24(2), 127–148.
192. Windsor, M., & Barlow, S. (1984). *Introduction to the Fishing Products*. Zaragoza, Spain. Acribia Publishing House.
193. Ferrari, R., Oliveira, V., & Scabio, a. (2005). Biodiesel from soybean. characterization and consumption in an energy generator. *Química Nova*, 28(1), 19–23. <https://doi.org/Doi 10.1590/S0100-40422005000100004>
194. Crexi, V. T., Souza–Soares, L. A., & Pinto, L. A. A. (2009). Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fishmeal and ensilage processes. Characteristics and lipid profiles. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(8), 1642–1648. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01982.x>
195. Hafidi, A., Pioch, D., & Ajana, H. (2005). Membrane–based simultaneous degumming and deacidification of vegetable oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(2), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.12.001>
196. Sabah, E., Çinar, M., & Çelik, M. S. (2007). Decolorization of vegetable oils. Adsorption mechanism of β –carotene on acid–activated sepiolite. *Food Chemistry*,

100(4), 1661–1668. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.052>

- 197.** Cunha, D. C., Crexi, V. T., & Pinto, L. A. A. (2009). Winterization of fish oil with solvent. “*Winterização*” de Óleo de Pescado via Solvente, 29(1), 207–213. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67649842596&partnerID=40&md5=3387a2da3826eeb4a0f6bc63b823ac59>
- 198.** Liu, S., Zhang, C., Hong, P., & Ji, H. (2006). Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation. Optimization of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 73(3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.020>
- 199.** Paim, R. M., Monte, M. L., Rizzi, J., & Pinto, L. A. A. (2012). Concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus Carpio*) utilizando o método da complexação com uréia. *Vetor*, 22(1), 18–37.
- 200.** Reineri, D., & Ferreira, S. (2005). Alcoólise de Óleo Oriundo de Vísceras ee Frango, 6, 0–6.
- 201.** Geris, R., Alessandra, N., Amaral, B. A., Maia, I. D. S., Dourado, V., Roque, J., ... Ba, S. (2007). Biodiesel de Soja—Reacción de transesterificación. *Quim. Nova*, 30(5), 1369–1373.
- 202.** Schuchardt, U., Sercheli, R., & Matheus, R. (1998). Transesterification of Vegetable Oils. a Review General Aspects of Transesterification Transesterification of Vegetable Oils Acid–Catalyzed Processes Base–Catalyzed Processes. *J. Braz. Chem. Soc.*, 9(1), 199–210. <https://doi.org/10.1590/S0103-50531998000300002>
- 203.** Freedman, B., Butterfield, R. O., & Pryde, E. H. (1986). Transesterification kinetics of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 63(10), 1375–1380. <https://doi.org/10.1007/BF02679606>
- 204.** Carvalho, P. O., Campos, P. R. B., Noffs, M. D., Oliveira, J. G., Shimizu, M. T., & Silva, D. M. (2003). Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quimica Nova*, 26(1), 75–80. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100014>
- 205.** Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. Review. *Progress in Polymer Science*, 36, 1254–

1276. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>
- 206.** Denavi, G., Tapia–Blácido, D. R., Añón, M. C., Sobral, P. J. A., Mauri, A. N., & Menegalli, F. C. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, *90*(3), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.001>
- 207.** Henrique, C. M., Cereda, M. P., & Sarmiento, S. B. S. (2008). Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *28*(1), 231–240. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100033>
- 208.** Canevarolo Jr., S. V. (2006). **Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros.**
- 209.** Dung, P., Milas, M., Rinaudo, M., & Desbrières, J. (1994). Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *24*(3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90132-5)
- 210.** Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J. L. (1992). Edible Wheat Gluten Films. Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, *57*(1), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- 211.** ASTM. (2000a). ASTM. Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting. In **ASTM annual book of ASTM standarts** (pp. 160–168). Philadelphia. American Society for Testing and Materials.
- 212.** Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2000). Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Edible Starch–based Films and Coatings. *Journal of Food Science*, *65*(6), 941–947. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09397.x>
- 213.** Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015). Fabrication of bio–nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, *44*, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.004>
- 214.** Sarantopoulos, C. I. G. L., & Teixeira, F. G. (2017). **Embalagens Plásticas Flexíveis. Principais polímeros e avaliação de propriedades (2nd ed.).**

Campinas. ITAL/CETEA.

215. ASTM. (2000b). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In **ASTM annual book of ASTM standards** (pp. 907–914). Philadelphia. American Society for Testing and Materials. <https://doi.org/10.1520/E0096>
216. Fernandes, A. P. S., Costa, J. B., Soares, D. S. B., de Moura, C. J., & de Souza, A. R. M. (2015). Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 45(2), 192–199. <https://doi.org/10.1590/1983-40632015v4530844>
217. Lopes, J. O., Garcia, R. A., Latorraca, J. V. F., & do Nascimento, A. M. (2014). Alteração da Cor da Madeira de Teca por Tratamento Térmico. *Floresta e Ambiente*, 21(4), 521–534. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.013612>
218. Callister, W., & Rethwisch, D. (2007). **Materials science and engineering. an introduction. Materials Science and Engineering (Vol. 94)**. [https://doi.org/10.1016/0025-5416\(87\)90343-0](https://doi.org/10.1016/0025-5416(87)90343-0)
219. Zenebon, O., Pascuet, N. S., & Tiglea, P. (2008). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz (IV). São Paulo.
220. Forato, L. A., Filho, R. B., Osiro, D., Bicudo, T. D. C., & Colnago, L. A. (2010). A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. *Embrapa Instrumentação*, 1–16.
221. Souza, F. C. S., Santos, J. M. G. M., Campos, L. M. A., & Carvalho, L. S. (2014). Análise da eficácia das técnicas de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamento ácido, visando a produção de etanol de segunda geração (e2g). *UNIFACS*, 157–174.
222. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2006). **Principles of Instrumental Analysis. Analytica Chimica Acta** (6th ed., Vol. 1). Thompson. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000849363>
223. Albers, A. P. F., Melchiades, F. G., Machado, R., Baldo, J. B., & Boschi, A. O. (2002). Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. *Cerâmica*, 46, 34–37. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132002000100008>

224. Ionashiro, M. (2004). *Giolito – Fundamentos da Termogravimetria Análise Térmica Diferencial Calorimetria Exploratória Diferencial*. Giz Editorial. São Paulo.
225. Jasour, M. S., Ehsani, A., Mehryar, L., & Naghibi, S. S. (2015). Chitosan coating incorporated with the lactoperoxidase system. An active edible coating for fish preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1373–1378. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6838>
226. Min, S., Harris, L. J., & Krochta, J. M. (2005). Listeria monocytogenes Inhibition by Whey Protein Films and Coatings Incorporating the Lactoperoxidase System. *Journal of Food Science*, 70(7), 317–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11476.x>
227. Nowzari, F., Shábanpour, B., & Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 141(3), 1667–1672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.022>
228. Gómez–Estaca, J., López de Lacey, A., López–Caballero, M. E., Gómez–Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>
229. Angelescu, V., Gneri, F. S., & Nani, A. (1958). **La Merluza Del Mar Argentino (Biologia Y Taxonomia)**. Buenos Aires.
230. Dias–Neto, J., & Dias, J. F. O. (2015). **O uso da biodiversidade aquática no Brasil. uma avaliação com foco na pesca.**
231. Thangam, Y., & Ranchitha, B. (2016). Biosynthesis of Omega 3 ' fatty Acids and the Activation of Anticancerous Effect in Human, 5(11), 726–732.
232. Ramires, M., Rotundo, M. M., Begossi, A., & Cruz, R. O. (2012). The use of fish in Ilhabela (São Paulo / Brazil). preferences , food taboos and medicinal indications The use of fish in Ilhabela (São Paulo / Brazil). preferences , food taboos and medicinal indications, 12(1), 0–9.
233. Nagarajarao, R. C. (2016). Recent Advances in Processing and Packaging of Fishery Products. A Review. *Aquatic Procedia*, 7, 201–213.

<https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.028>

234. MS. (2018). <http://portalms.saude.gov.br/>
235. Goes, E. S. R., Souza, M. L. R., Michka, J. M. G., Kimura, K. S., Lara, J. A. F., Delbem, A. C. B., & Gasparino, E. (2016). Fresh pasta enrichment with protein concentrate of tilapia. nutritional and sensory characteristics. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36(1), 76–82. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0020>
236. Ribeiro, A. L. M. S., Oliveira, G. M., Ferreira, V. M., Pereira, M. M. D., & Silva, P. P. O. (2009). Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 16(3), 109–112. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.185>
237. FDA. (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. *Fish and Fishery Products Hazard and Control Guidance Fourth Edition*, 4(April), 1–401. <https://doi.org/10.1039/9781847558398-00136>
238. Gava, A. J., & Silva, C. A. B. (2014). **Tecnologia de Alimentos – Princípios e Aplicações**. (Nobel, Ed.) (2nd ed.). Brasil. <https://doi.org/8521313829>
239. Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. (2001). *Microbiologia dos Alimentos* (1st ed.).
240. Chapaval, L., Moon, D. H., Gomes, J. E., Duarte, F. R., & Tsai, S. M. (2008). An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(2), 299–306. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318230bdf8>
241. Shinohara, N. K., Barros, V. B., Jimenez, S. M. C., Machado, E. C. L., Dutra, R. A. F., & Filho, J. L. L. (2008). *Salmonella* spp., importante agente patogénico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(5), 1675–1683. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>
242. ANVISA. (2018). <http://portal.anvisa.gov.br/>
243. Silva, R. S. G., Bandeira, S. F., & Pinto, L. A. A. (2014). Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). *LWT – Food Science and Technology*, 57(2), 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.026>
244. BSI. (2018). <https://www.bsi.bund.de/EN/Publications/TechnicalGuidelines/>

TR03125/BSITR03125.html

- 245.** Dotto, G. L., Campana-filho, S. P., & Pinto, L. A. A. (2017). **Frontiers in Biomaterials (3rd ed.)**. Bentham & Books.
- 246.** Dotto, G. L., Souza, V. C., Moura, J. M., Moura, C. M., & Pinto, L. A. A. (2011). Influence of Drying Techniques on the Characteristics of Chitosan and the Quality of Biopolymer Films. *Drying Technology*, 29(15), 1784–1791. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.602812>
- 247.** Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., & Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan. Advocating the first derivative UV–spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45(4), 713–719. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00288-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00288-9)
- 248.** Alsarra, I. A., Betigeri, S. S., Zhang, H., Evans, B. A., & Neau, S. H. (2002). Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*, 23(17), 3637–3644. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00096-0)
- 249.** Roberts, G. A. F., & Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(6), 374–377. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(82\)90074-5](https://doi.org/10.1016/0141-8130(82)90074-5)
- 250.** Monte, M. L., Monte, M. L., Pohndorf, R. S., Crexi, V. T., & Pinto, L. A. A. (2015). Bleaching with blends of bleaching earth and activated carbon reduces color and oxidation products of carp oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(6), 829–836. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400223>
- 251.** Rhim, J. W., Park, H. M., Há, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for Food Packaging Applications. *Progress in Polymer Science*, 1-70 <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>
- 252.** Youn, D. K., No, H. K., & Prinyawiwatkul, W. (2009). Physicochemical and functional properties of chitosans affected by sun drying time during decoloration. *LWT – Food Science and Technology*, 42(9), 1553–1556. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.004>
- 253.** Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleiteix, F., & Vandamme, T. F. (2010).

Nanoparticles by spray drying using innovative new technology. The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.113>

- 254.** Muzzarelli, C., Stanic, V., Gobbi, L., Tosi, G., & Muzzarelli, R. A. A. (2004). Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.002>
- 255.** Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24(17), 2871–2880. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00117-0)
- 256.** Guerrero, P., & De La Caba, K. (2010). Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.008>
- 257.** Duan, R., Zhang, J., Xing, F., Konno, K., & Xu, B. (2011). Study on the properties of gelatins from skin of carp (*Cyprinus carpio*) caught in winter and summer season. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.002>
- 258.** Hanjabam, M. D., Kannaiyan, S. K., Kamei, G., Jakhar, J. K., Chouksey, M. K., & Gudipati, V. (2013). Optimisation of gelatin extraction from Unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) skin waste. response surface approach. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 976–983. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1075-y>
- 259.** Koli, J. M., Basu, S., Venkateswarlu, G., Choukasy, M. K., & Nayak, B. B. (2013). Optimization of fish gelatin extraction from skins and bones. A comparative study. *Ecology, Environment and Conservation*, 19(1), 47–56.
- 260.** Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.001>
- 261.** Sarabia, A. I., Mez-Guilleã, M. C., & Montero, P. (2000). The effect of added salts

- on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. *Food Chemistry*, 70, 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00073-X)
- 262.** Moura, C. M., Moura, J. M., Soares, N. M., Pinto, L. A. A. (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction. Used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing*, 50, 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.03.003>
- 263.** Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 66(6), 865–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15188.x>
- 264.** Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.022>
- 265.** Kulkarni, V., Jain, S., & Khatri, F. (2014). Degumming of Pongamia Pinnata by Acid and Water Degumming Methods, 6(8), 3969–3978.
- 266.** Souza, V. C., Monte, M. L., & Pinto, L. A. A. (2013). Effect of carp (*Cyprinus carpio*) oil incorporation on water vapour permeability, mechanical properties and transparency of chitosan films. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(6), 1309–1317. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12093>
- 267.** Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T., & Nilswan, K. (2015). Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil. Physical, structural and thermal properties. *Food Hydrocolloids*, 48, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.025>
- 268.** Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 194, 1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.004>
- 269.** Yao, Y., Ding, D., Shao, H., Peng, Q., & Huang, Y. (2017). Antibacterial Activity and Physical Properties of Fish Gelatin–Chitosan Edible Films Supplemented with D-Limonene. *International Journal of Polymer Science*, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/1837171>

- 270.** Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2010). Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, *96*(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.046>
- 271.** Kim, D., & Min, S. C. (2012). Trout Skin Gelatin-Based Edible Film Development. *Journal of Food Science*, *77*(9), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02880.x>
- 272.** Le, T., Maki, H., Takahashi, K., Okazaki, E., & Osako, K. (2015). Properties of Gelatin Film from Horse Mackerel (*Trachurus japonicus*) Scale. *Journal of Food Science*, *80*(4), E734–E741. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12806>
- 273.** Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, *134*(3), 1571–1579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.094>
- 274.** Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., & Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, *28*(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.003>
- 275.** Coutinho, F. M. B., Mello, I. L., & Maria, L. C. S. (2003). Polietileno. principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros*, *13*(1), 01–13. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282003000100005>
- 276.** Burlein, G. A. D., & Rocha, M. C. G. (2014). Mechanical and morphological properties of LDPE/ PHB blends filled with castor oil pressed cake. *Materials Research*, *17*(1), 97–105. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392013005000196>
- 277.** Dias, M. V., Medeiros, H. S., Soares, N. F. F., Melo, N. R., Borges, S. V., Carneiro, J. D. S., & Pereira, J. M. T. A. K. (2013). Development of low-density polyethylene films with lemon aroma. *LWT – Food Science and Technology*, *50*(1), 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.005>
- 278.** Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. *Food*

Hydrocolloids, 19(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.04.017>

- 279.** Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., ... Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin–chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.04.004>
- 280.** Valenzuela, C., Abugoch, L., & Tapia, C. (2013). Quinoa protein–chitosan–sunflower oil edible film. Mechanical, barrier and structural properties. *LWT – Food Science and Technology*, 50(2), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.010>
- 281.** Ma, W., Tang, C. H., Yin, S. W., Yang, X. Q., Wang, Q., Liu, F., & Wei, Z. H. (2012). Characterization of gelatin–based edible films incorporated with olive oil. *Food Research International*, 49(1), 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.037>
- 283.** Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- 284.** Khanzadi, M., Jafari, S. M., Mirzaei, H., Chegini, F. K., Maghsoudlou, Y., & Dehnad, D. (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate Polymers*, 118, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.015>

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Produção Bibliográfica Vinculada a Tese

a) Artigos Completos Publicados Em Periódicos

Bandeira, S.F.; Silva, R.S.G.; Moura, J.M. & Pinto, L.A.A. (2017) Characterization and Film-Forming Properties of Gelatins from Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Skin and Bones, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(4), 447–456. <https://doi.org/10.1080/10498850.2016.1210268>

Moura, J.M.; Farias, B.S.; Rodrigues, D.A.S.; Moura, C.M.; Dotto, G.L.; Pinto, L.A.A. (2015). Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 23, 470–477. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0730-y>

Bandeira, S.F.; Silva, R.S.G.; Moura, J. M. ; Pinto, L. A. A. (2015). Modified Gelatin Films from Croaker Skins. Effects of pH, and Addition of Glycerol and Chitosan. *Journal of Food Process Engineering*, v. 38, 613–620. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12191>

APÊNDICE 2. Produção Bibliográfica Desenvolvida durante a Tese

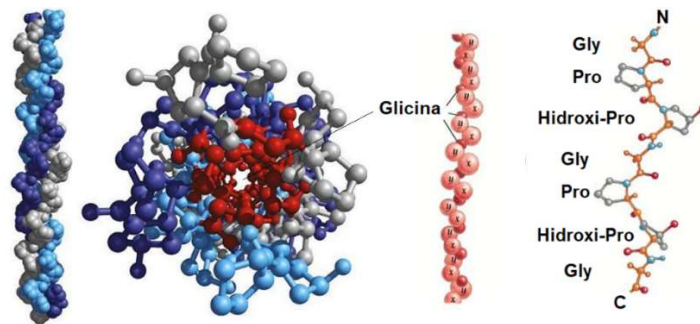
- Rodrigues, D.A.S.; Moura, J.M.; Dotto, G.L.; Cadaval, T.R.S.; Pinto, L.A.A. (2018). Preparation, Characterization and Dye Adsorption/Reuse of Chitosan–Vanadate Films. *Journal of Polymers and the Environment*, v. print, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1171-6>.
- Larrosa, A.P.Q.; Camara, A.S.; Moura, J.M.; Pinto, L.A.A. (2018). Spirulina sp. biomass dried/disrupted by different methods and their application in biofilms production. *Food Science and Biotechnology*, v. Press, p. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0397-y>
- Hack, C.; Porciuncula, L.; Weber, A.; D’oca, C.; Russowsky, D.; Moura, J.; Pinto, L.; D’oca, M. (2018). N–Alkylated Sulfamic Acid Derivatives as Organocatalyst in Multicomponent Synthesis of Fatty Dihydropyrimidinones. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 00, p. 1–8. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180112>
- Silva, J.M.; Farias, B.S.; Gründmann, D.D.R.; Cadaval, T.R.S.; Moura, J.M.; Dotto, G.L.; Pinto, L.A.A. (2017). Development of chitosan/Spirulina bio–blend films and its biosorption potential for dyes. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(11), 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.44580>.
- Dotto, G.L.; Ocampo–Pérez, R.; Moura, J.M.; Cadaval, T.R.S.; Pinto, L.A.A. (2016). Adsorption rate of Reactive Black 5 on chitosan based materials. geometry and swelling effects. *Adsorption*, 22(7), 973–983. <https://doi.org/10.1007/s10450-016-9804-y>.
- Dotto, G.L.; Santos, J.M.N.; Moura, J.M.; Pinto, L.A.A. (2016). Ultrasound–assisted treatment of chitin. evaluation of physicochemical characteristics and dye removal potential. *E–Polymers*, 16(1), 49–56. <https://doi.org/10.1515/epoly-2015-0159>.
- Moura, J.M.; Gründmann, D.D.R.; Cadaval, T.R.S.; Dotto, G.L.; Pinto, L.A.A. (2016). Comparison of chitosan with different physical forms to remove Reactive Black 5 from aqueous solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 1, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.04.003>

Hennig, E.; Moura, J.M.; Cadaval, T.R.S.; Dotto, G.L.; Pinto, L.A.A. (2015). Removal of Fe(III) and Cr(VI) onto chitosan obtained from shrimp wastes. Evaluation of process factors, kinetics and interactions. *Vetor*, 25, 128–146. <https://periodicos.furg.br/vetor/article/viewFile/6181/3875>.

ANEXOS

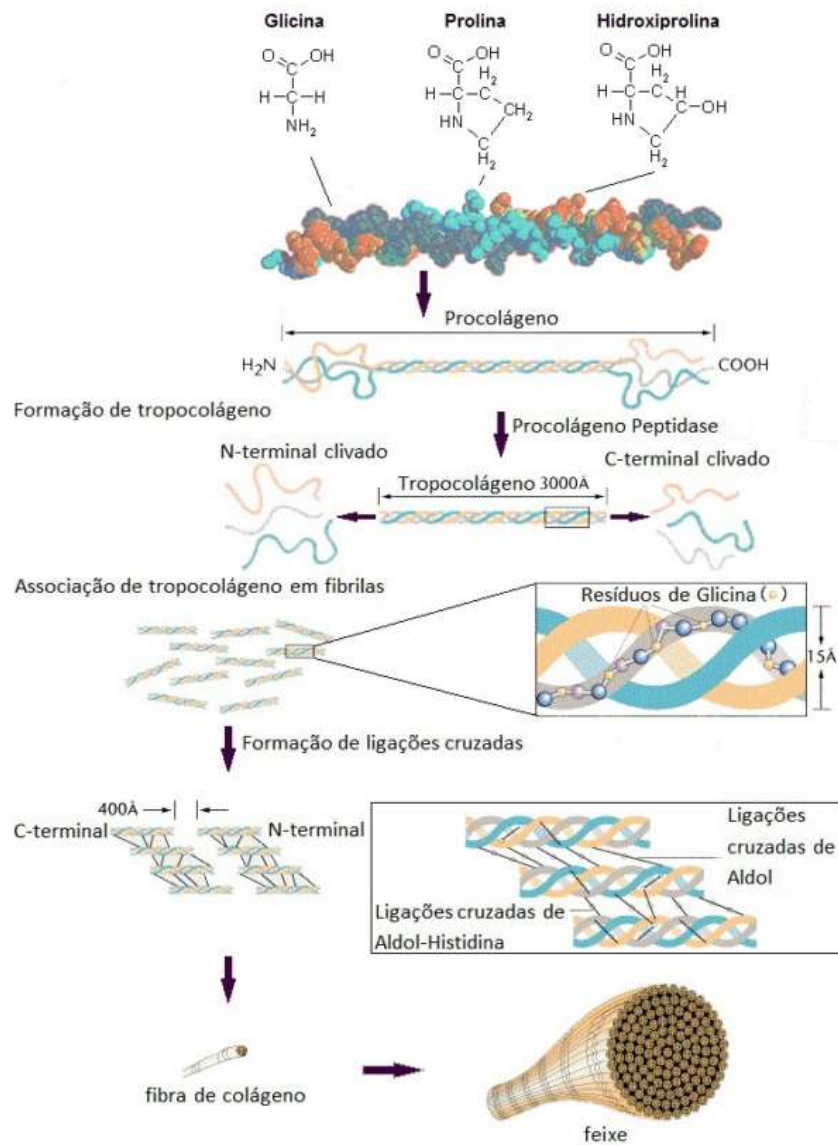
ANEXO 1

Figura A1. Representação da organização dos aminoácidos no colágeno



Fonte. Adaptado de (Muiznieks & Keeley, 2013).

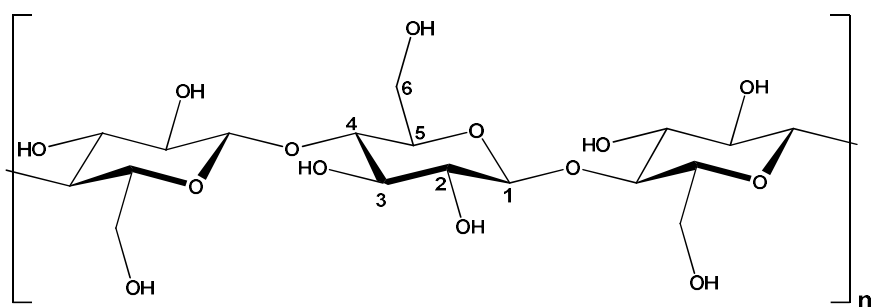
Figura B1. Organização e estrutura do colágeno



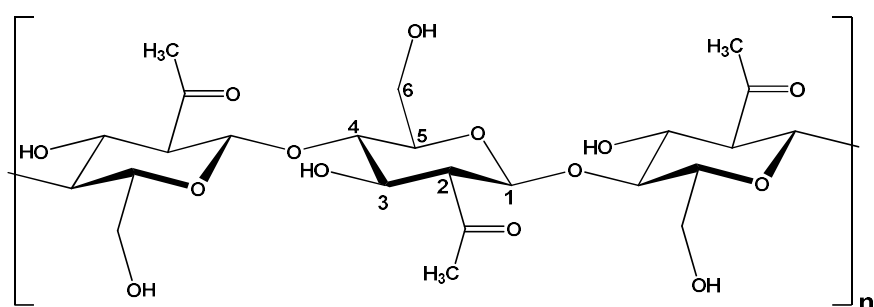
Fonte. (Silva & Penna, 2012)

ANEXO 2

Figura A2. Estruturas químicas (a) celulose e (b) quitina



(a) Celulose



(b) Quitina

Figura B2. Esquema do comportamento da quitosana em meio ácido

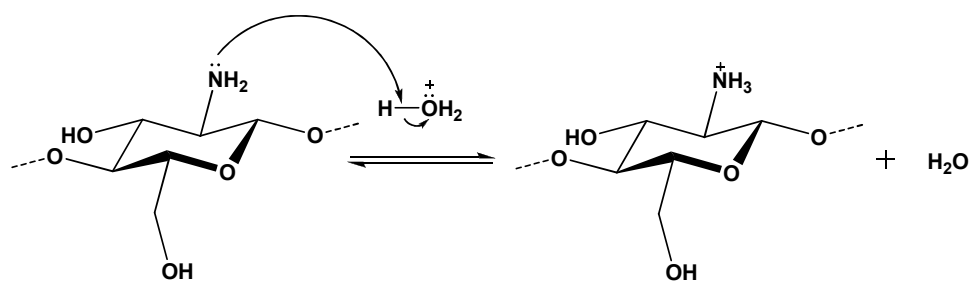
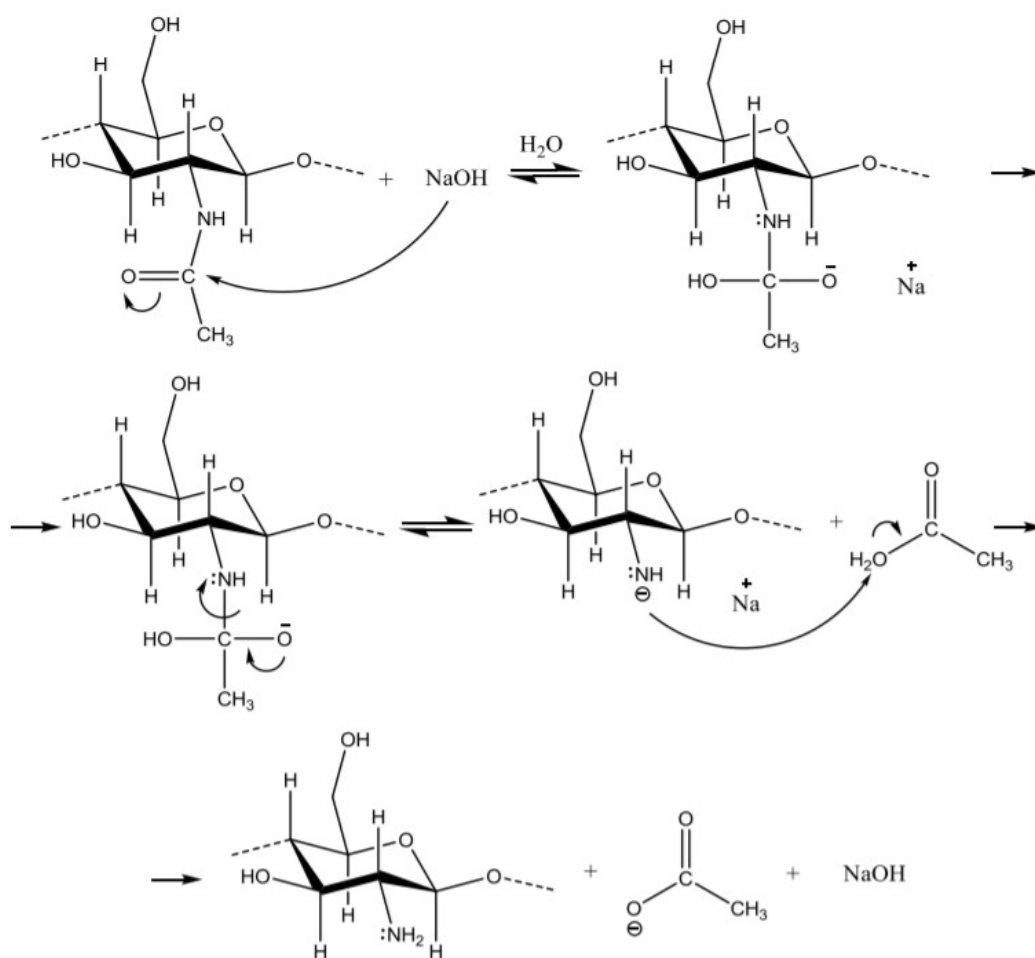
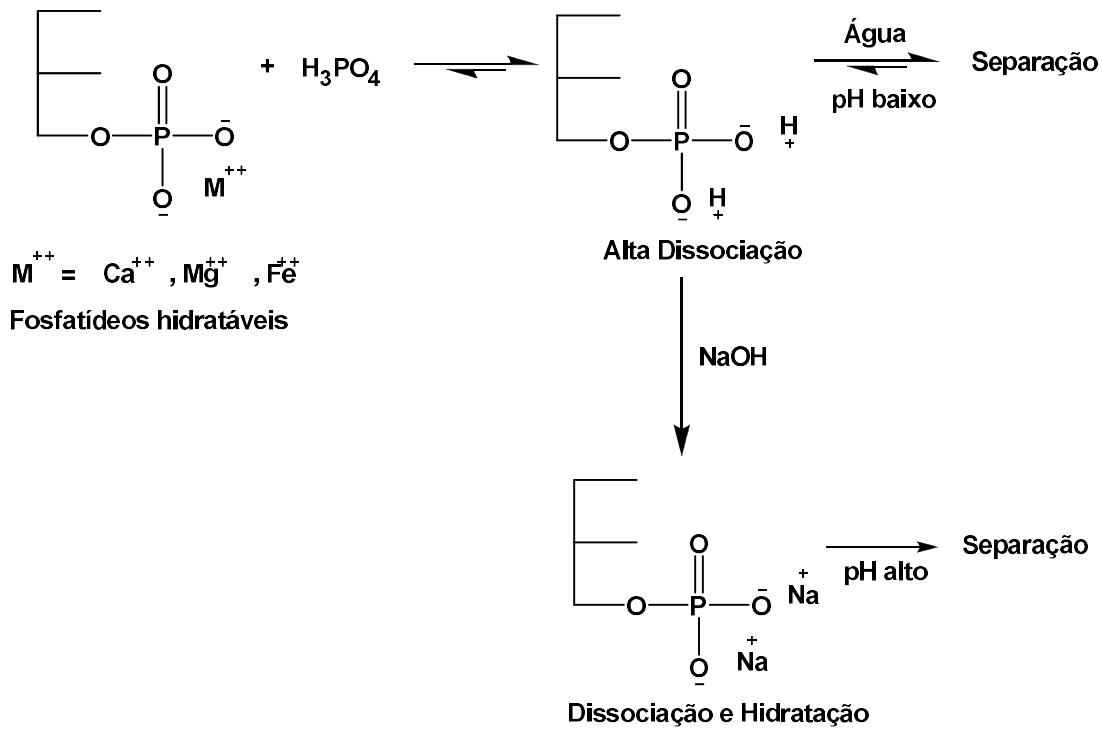


Figura C2. Esquema do mecanismo de hidrólise alcalina da quitina



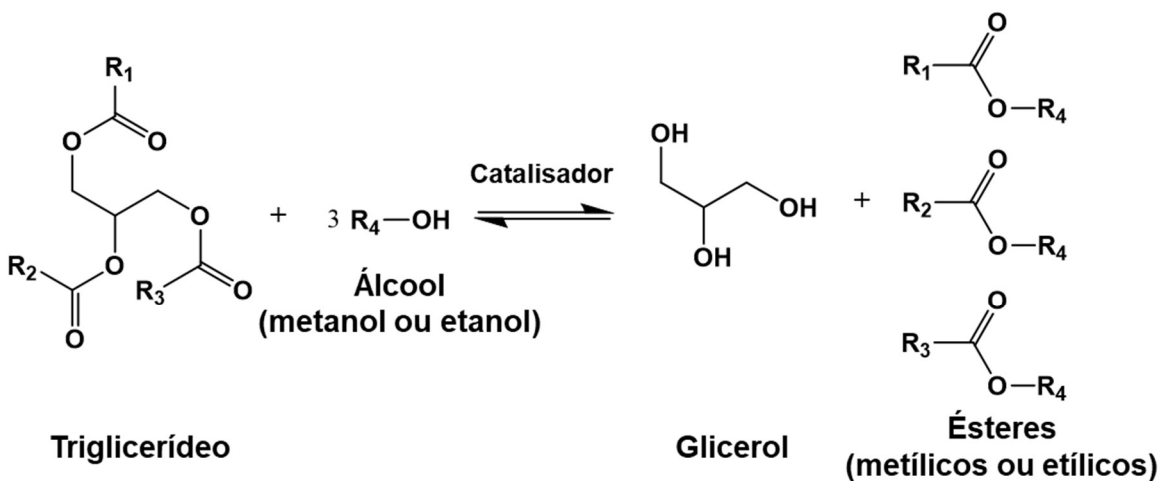
ANEXO 3

Figura A3. Reação de degomagem



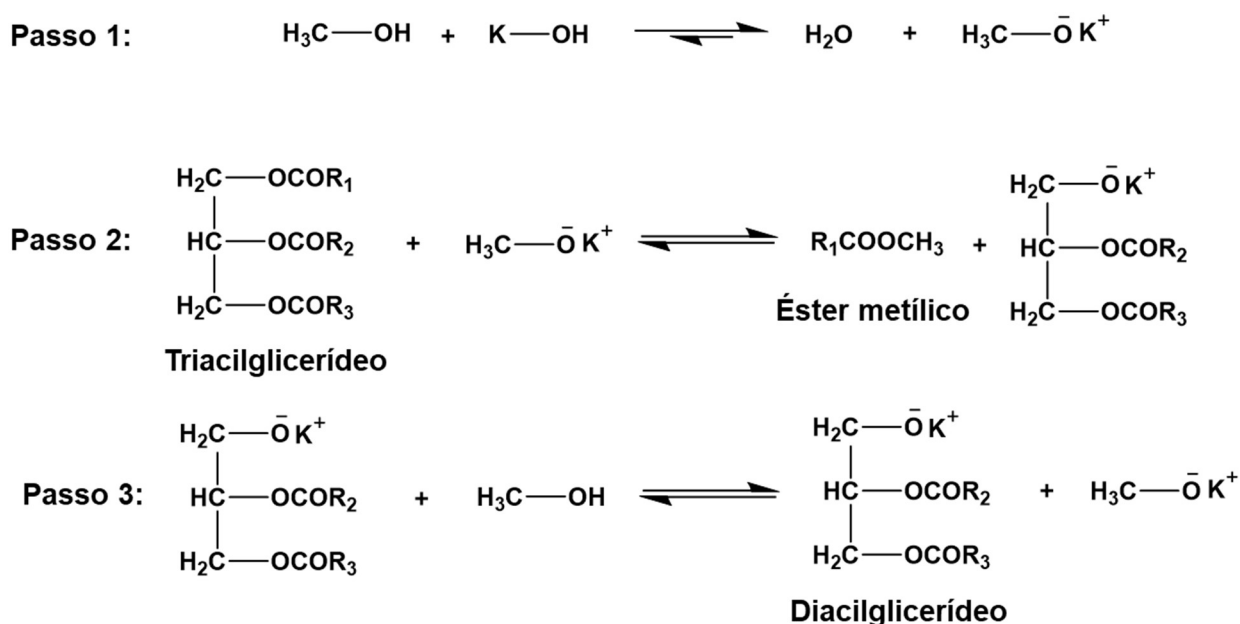
Fonte. Adaptado de Kulkarni, Jain, & Khatri, (2014)

Figura B3. Equação geral da reação de transesterificação ou alcoólise



Fonte. Adaptado de Reineri & Ferreira ²⁰⁰

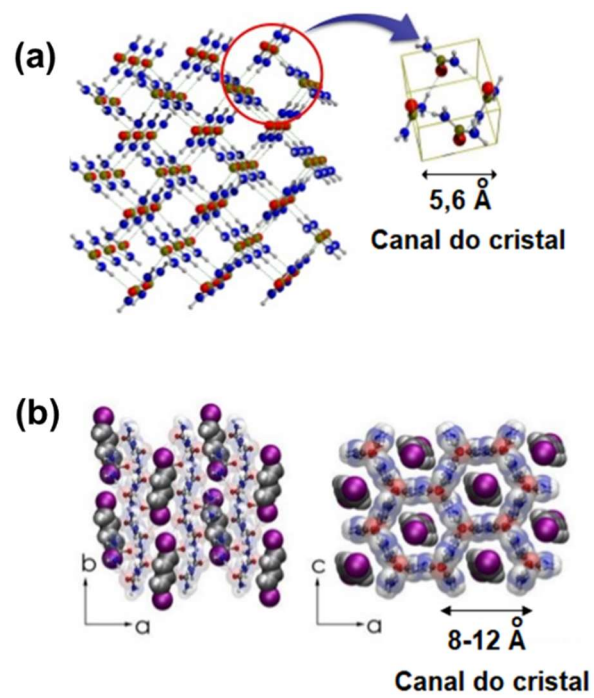
Figura C3. Equações da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo



Fonte. Adaptado de Geris et al.²⁰¹

O primeiro passo é a reação da base com o álcool, produzindo um alcóxido e o catalisador protonado. O ataque nucleofílico do alcóxido no grupo carbonila do triglicerídeo gera um intermediário tetraédrico, onde a mistura de alquil ésteres e os correspondentes ânions do diglicerídeo são formados (Passo 2). A última etapa desprotona o catalisador, o que regenera as espécies ativas (Passo 3), que agora é capaz de reagir com uma segunda molécula de álcool, iniciando outro ciclo catalítico. Diglicerídeos e monoglicerídeos são convertidos pelo mesmo mecanismo para uma mistura de alquil ésteres e glicerol.

Figura D3. Complexação com ureia. (a) cristalização da ureia e (b) cristalização da ureia na presença de ácidos graxos



Fonte. Adaptado de Ratnayake, Olsson, Matthews, & Ackman, (1988)