



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

VINICIUS SIDONIO VALE MORAES

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CERA DE ABELHA SOBRE AS
PROPRIEDADES DE FILMES BIODEGRADÁVEIS ELABORADOS
COM GELATINA DA PELE DE PEIXE**

BELÉM-PA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

VINICIUS SIDONIO VALE MORAES

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CERA DE ABELHA NAS
PROPRIEDADES DE FILMES BIODEGRADÁVEIS ELABORADOS
COM GELATINA DA PELE DE PEIXE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço

Co-Orientador: Prof. Dr. Camilo Barroso Teixeira

BELÉM-PA

2022

VINICIUS SIDONIO VALE MORAES


Data da Avaliação: 22/08/2022

Nota: ____ Conceito **APROVADO**

BANCA EXAMINADORA



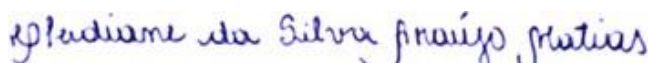
Prof.ª. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
PPGCTA/UFPA – Orientadora

Documento assinado digitalmente
 CAMILO BARROSO TEIXEIRA
Data: 23/08/2023 09:38:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Camilo Barroso Teixeira
FEA/UFPA – Co-Orientador

Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
Assinado de forma digital por
Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
Dados: 2023.08.22 09:23:30 -0300

Prof.ª. Dra. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
IFPA/Campus Castanhal – Membro Interno



Prof.ª. Dra. Cleidiane da Silva Araújo Matias
UEPA – Membro externo

Prof.ª. Dra. Luiza Helena da Silva Martins
ISPA/UFRA – Suplente interno

Prof.ª. Dra. Eleda Maria Paixão Xavier Neves
Suplente externo

BELÉM
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M827e Moraes, Vinicius Sidonio Vale.
EFEITO DA ADIÇÃO DE CERA DE ABELHA SOBRE
AS PROPRIEDADES DE FILMES BIODEGRADÁVEIS
ELABORADOS COM GELATINA DA PELE DE PEIXE /
Vinicius Sidonio Vale Moraes. — 2022.
63 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Lúcia de Fátima Henriques
Lourenço Coorientação: Prof^ª. Dra. Camilo Barroso Teixeira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2022.

1. Filme biodegradável. 2. Gelatina. 3. Cera de abelha.
I. Título.

CDD 664.09

*Aos meus pais Elcio e Rosa por todo apoio, amor, sacrifícios e princípios
passados.
Com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora de Nazaré por todo amor e cuidado comigo.

A Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Prof. Dra. Lúcia de Fátima Henrique Lourenço por toda paciência de ensinar, apoio acadêmico, emocional, críticas e cuidado.

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Camilo Barroso Teixeira por ser sempre solícito e atencioso para tirar dúvidas, não medindo esforços para ajudar.

Aos membros da minha banca Prof. Dra. Regina Sarkis Joele Peixoto e Prof. Dra. Cleidiane da Silva Araújo Matias, meus agradecimentos por toda colaboração e correções em meu trabalho.

A todos os meus amigos do LAPOA. Especialmente o Marcos, Dielen, Fernanda e Carol por todo auxílio, conversas e diversões nos dias de trabalho.

As minhas amigas da graduação Laiane Freire e Fernanda Rafaele pela amizade e companheirismo.

MUITO OBRIGADO!

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima. (Louis Pasteur)

*O coração do homem planeja o seu caminho, mas é Deus que dirige seus passos.
(Provérbios 16, 9)*

SUMÁRIO

SUMÁRIO	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DA PESCA	17
3.2. FILMES BIODEGRADÁVEIS	18
3.3. PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS	19
3.4. MATÉRIAS PRIMAS PARA FILMES BIODEGRADÁVEIS	20
3.4.1. PROTEÍNAS	20
3.4.2. PLASTIFICANTES	21
3.4.3. SURFACTANTES	22
3.4.4. LIPÍDIOS	22
3.5. PROPRIEDADES DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS	24
3.5.1. ESPESSURA	24
3.5.2. OPACIDADE E COR	25
3.5.3. SOLUBILIDADE EM ÁGUA	25
3.5.4. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA	26
3.5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	26
3.5.6. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. MATÉRIA PRIMA	28
4.2. OBTENÇÃO DA GELATINA	28
4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	28
4.4. ELABORAÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL	30
4.5. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DOS FILMES	30
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. CONDIÇÕES PARA OTIMIZAÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL	33

5.2. ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DO MODELO	34
5.3. GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	39
5.4. DESEJABILIDADE.....	40
5.5. ESPESSURA, PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA E SOLUBILIDADE	42
5.6. COR, TRANSMISSÃO DE LUZ, TRANSPARÊNCIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	45
5.7. TRANSMISSÃO DE LUZ, TRANSPARÊNCIA	46
5.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	48
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

RESUMO

Filmes biodegradáveis são materiais de fina espessura elaborados a partir de biomoléculas, que atuam como barreira contra umidade, gases, luz e injúrias mecânicas e podem estender a vida de prateleira dos produtos. Filmes biodegradáveis elaborados a partir de biomoléculas tem ganhado visibilidade atualmente, especialmente os elaborados da gelatina extraída da pele do peixe. Esses filmes apesar de apresentarem boas propriedades ópticas e mecânicas, possuem alta permeabilidade ao vapor d'água (PVA). E nessa pesquisa foram adicionadas a cera de abelha nos filmes e foi avaliado se contribuiu para melhorar as propriedades tecnológicas. Portanto, o objetivo do trabalho foi elaborar e caracterizar filme biodegradável elaborado com gelatina da pele da pescada amarela adicionado de cera de abelha utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido esteárico como surfactantes, visando melhorar as propriedades tecnológicas do filme. Foi realizado planejamento fatorial completo para definir as melhores regiões de barreira e solubilidade dos filmes. O planejamento indicou a tendência das concentrações para os melhores resultados das características do filme. Com base nisso, foram elaborados quatro filmes contendo 130 ml de solução filmogênica: a) filme controle com 2% de gelatina e 20% de glicerol; b) F1 com 2% de gelatina, 20% de glicerol, 5% de cera de abelha, 80% de SDS e 100% de ácido esteárico; c) F2 com 2% de gelatina, 20% de glicerol, 10% de cera de abelha, 80% de SDS e 100% de ácido esteárico e d) F3 com 2% de gelatina, 20% de glicerol, 15% de cera de abelha, 80% de SDS e 100% de ácido esteárico. A adição da cera de abelha no filme não influenciou de forma positiva na PVA devido o surgimento de bolhas na solução filmogênica. E a espessura apresentou resultados heterogêneos porque a cera não se incorporou totalmente na matriz do filme. No entanto, todos os filmes obtiveram ótimos resultados de solubilidade, justificados pela alta hidrofobicidade da cera. Os filmes obtidos eram opacos tendendo aos tons amarelo esverdeado e alta luminosidade, com excelente barreira UV, podendo ser utilizados em alimentos com sensibilidade a luz. A análise da microestrutura mostrou que os filmes eram pouco homogêneos, com estrutura semelhante a bi-camada, com espaços livres e rachaduras na matriz.

Palavras-chaves: Filme biodegradável; Gelatina; Cera de abelha

ABSTRACT

Biodegradable films are defined as thin materials made from biomolecules, which act as a barrier against moisture, gases, light and mechanical injuries and, consequently, extend the shelf life of products. Biodegradable films made from biomolecules have gained visibility today, especially those made from gelatin extracted from fish skin. Despite having good optical and mechanical properties, they have high water vapor permeability (PVA). The addition of lipids such as beeswax is a good option to solve this problem. The objective of this work was the elaboration and characterization of a biodegradable film from yellow hake skin gelatin added with beeswax using sodium dodecyl sulfate (SDS) and stearic acid as a surfactant, aiming to improve the technological properties of the film. A complete factorial design was carried out to define the region with the best barrier and solubility of the films. The planning indicated the tendency of the concentrations for the best results of the characteristics of the film. Based on this, four films of film-forming solution containing 130 ml were prepared, the first being a Control film composed of 2% gelatin and 20% glycerol; second film (F1) composed of 2% gelatin, 20% glycerol, 5% beeswax, 80% SDS and 100% stearic acid; third film (F2) composed of 2% gelatin, 20% glycerol, 10% beeswax, 80% SDS and 100% stearic acid and the fourth film (F3) composed of 2% gelatin, 20% glycerol, 15% beeswax, 80% SDS and 100% stearic acid. The thickness of the films presented heterogeneous results due to the poor incorporation of the wax in the film matrix. Likewise, the addition of beeswax to the film did not have a positive influence on PVA because of the appearance of bubbles in the film-forming solution. However, all films obtained excellent solubility results, justified by the high hydrophobicity of the wax. The films obtained results that indicate opaque films with greenish yellow tones and high luminosity, with an excellent UV barrier, and can be used in foods with sensitivity to light. The microstructure analysis showed inhomogeneous films, with bi-layer-like structures, free spaces and cracks in the matrix.

Keywords: Biodegradable film; Gelatin; Beeswax.

1. INTRODUÇÃO

As questões ambientais e os modelos sustentáveis de produção têm estimulado uma nova postura da sociedade e tem aumentado a busca por recursos renováveis, sustentáveis e economicamente viáveis. A valorização de resíduos é uma forma de minimizar os impactos de seu descarte indiscriminado no meio ambiente. Os subprodutos do processamento da indústria de pesca podem alcançar até 70% do peso inicial dos peixes e são considerados como matérias-primas de alta qualidade e baixo valor comercial.

O processamento do pescado gera muitos resíduos, como cabeça, carcaça, cascas e peles, ricos em proteínas miofibrilares e colagenicas. Estas possuem capacidade para formar redes, plásticas e elásticas, com boa barreira ao oxigênio podendo ser utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis. A gelatina é um exemplo de produto gerado a partir desses resíduos (SILVA et al., 2018). A gelatina é uma proteína hidrossolúvel parcialmente hidrolisada obtida do colágeno por hidrólise ácida ou alcalina, está presente na pele, ossos, escamas, tendões e tecidos conjuntivos. Vários estudos revelam que podem ser elaborados filmes a partir da gelatina da pele de peixe (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009; FRASSINETTI et al., 2020).

A crescente demanda do mercado por produtos com rótulos “verdes” ou “limpos”, menor quantidade de aditivos alimentícios sintéticos e de geração de resíduos, matéria prima de origem renovável, qualidade nutricional, embalagem de fácil degradação ou reuso/reciclagem está impulsionando a indústria a desenvolver novas formas de processamento de alimentos e de embalagens biodegradáveis (FILIPINI; ROMANI; MARTINS, 2020).

O comportamento dos filmes biodegradáveis dependem principalmente das suas propriedades mecânicas, estas por sua vez, dependem da composição do filme, processo de elaboração e da finalidade de sua aplicação. No entanto, quando materiais com diferentes hidrofobicidades são misturados, é necessária a adição de um composto emulsificante ou surfactante, para possibilitar a homogeneidade da dispersão (PEREIRA et al., 2019).

A utilização de revestimentos biodegradáveis é uma tendência mundial que vem aumentando ano após ano e tal fato tem impulsionado pesquisas para seu desenvolvimento e aprimoramento das suas propriedades. Filmes biodegradáveis elaborados a partir de proteínas são uma boa alternativa aos polímeros sintéticos, em função da sua biodegradabilidade e aproveitamento de resíduos gerados pela produção. Atuam como barreira contra agentes externos, biológicos e físicos, além de diminuir a perda de umidade aumentando a vida útil dos produtos (JAMROZ; KOPEL, 2020).

Filmes elaborados a partir de proteínas possuem boa proteção contra a luz UV e boa barreira a gases em ambientes secos, porém em ambiente com alta umidade relativa passam a absorver umidade. Em tais condições de uso os filmes adquirem características de baixa resistência mecânica e alta permeabilidade ao vapor d'água. Esses problemas podem ser superados com a adição de extrato de plantas, nanopartículas de preenchimento e lipídeos (JAMROZ; KOPEL, 2020; SHAHIDI; HOSSAIN, 2020a).

Filmes compostos ou bi-camada são amplamente pesquisados para melhorar as características de permeabilidade ao vapor d'água e oxigênio, força, flexibilidade e atividade antimicrobiana. Quando, na solução filmogênica, são adicionados componentes lipídicos, as propriedades de solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água e mecânicas são alteradas. Alterações essas que são objeto de estudo para criar um filme adequado para cada produto (AMIN et al., 2021; CORTES-RODRIGUEZ et al., 2020; LIU et al., 2020; SUN et al., 2021). Em especial, os filmes compostos de lipídeos podem proporcionar melhores características ao vapor d'água (SHAHIDI; HOSSAIN, 2020b)

Entre os aditivos lipídicos que podem ser encontrados óleos e ceras naturais ou oriundas do petróleo. A cera de abelha é um complexo lipídico que incorpora componentes orgânicos na forma líquida. É natural límpida e incolor, porém torna-se opaca após o manuseio das abelhas operárias da colméia e dia após dia a cera torna-se marrom devido ao acúmulo de pólen e propólis (DUMITRU et al., 2022).

A cera de abelha tem baixo ponto de fusão e é naturalmente composta por ácidos graxos, hidrocarbonetos, ésteres, agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes. Alguns estudos relatam que a adição em filmes reduziu significativamente a solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água (KHANZADI et al., 2015; KLANGMUANG; SOTHORNVIT, 2016; SUN et al., 2021). Assim esse trabalho teve

como objetivo elaborar e caracterizar filmes de gelatina da pele de peixe adicionados de cera de abelha.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar filmes biodegradáveis de gelatina de peixe e avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de cera de abelha sobre as propriedades tecnológicas dos filmes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar filmes de gelatina com diferentes concentrações de cera de abelha;
- Definir condições ótimas, através do planejamento experimental e função desejabilidade, para o processo de elaboração do filme biodegradável de gelatina da pele de peixe com cera de abelha;
- Caracterizar e avaliar a influência das diferentes concentrações de cera de abelha sobre as propriedades dos filmes: espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água, cor, transparência e a microestrutura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DA PESCA

Os resíduos gerados no processamento do pescado são considerados uma matéria prima de baixa qualidade, baixo valor comercial e na maioria dos casos não são utilizados podendo causar danos ecológicos e econômicos. Desta forma, o uso de subprodutos do pescado no processamento de novos produtos pode gerar dividendos para a economia e contribuir para a redução de impactos ambientais (MINOZZO, 2010).

Na pesca ou aquicultura, cerca de 57% do peso total da captura é descartado na forma de resíduos, que inclui a cabeça, escamas, pele, nadadeira, cauda, barbatana, vísceras, coluna vertebral e restos de músculo. Que podem ser utilizados na elaboração de novos produtos como farinha para ração animal e silagem, agregando valor aos produtos e contribuindo para a redução de impactos ambientais (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018;).

A pele é considerada resíduo após a filetagem, um processamento industrial muito comum. Após limpa pode ser destinada para o curtume a fim de produzir peças de vestuário, acessórios ou para a extração da gelatina, se transformando em uma fonte de renda. A elaboração de biofilmes ou de produtos farmacêuticos utilizam o colágeno presente na pele, dando um destino seguro, sustentável e agregando valor a esse biopolímero (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; SHAHIDI; HOSSAIN, 2020a).

Finalmente em todas as etapas da cadeia produtiva de alimentos até chegar no mercado consumidor, há uma grande geração de resíduos. E diante deste cenário, a indústria é cobrada pelo governo e população em geral pela diminuição da geração de rejeitos e destinação correta, sendo obrigadas a inovar de várias formas (AGUIAR; GOULART, 2013).

3.2. FILMES BIODEGRADÁVEIS

Filmes são estruturas utilizadas para proteger produtos, mas para serem considerados biodegradáveis devem ser completamente e facilmente degradados por microrganismos. Esses filmes são identificados como materiais de fina espessura elaborados a partir de biomoléculas, que possuem propriedade de barreira a substâncias externas (gases, óleos e umidade) protegendo o produto e aumentando o seu tempo de vida de prateleira. Também podem ter em sua composição antioxidantes, antimicrobianos, óleos essenciais e outros compostos (KROCHTA; DE MULDER-JOHNSTON, 1997).

Os filmes biodegradáveis podem atuar protegendo a superfície dos alimentos evitando a perda de sabor, umidade, ataques de microrganismos, controlando a troca de gases (como etileno, oxigênio e dióxido de carbono) servindo também, como meio da incorporação de aditivos (corantes, aromatizantes, antioxidante e antimicrobianos) (FILIPINI; ROMANI; MARTINS, 2020; HASSAN et al., 2018). Após o uso são decompostos rapidamente em substâncias que não degradam o meio ambiente (SUN et al., 2021).

As propriedades descritas estão diretamente relacionadas com a polaridade, distribuição das cargas, conformação estrutural e peso molecular do biopolímero usado; com a formulação (pH da solução filmogênica, concentração de proteínas, tratamento térmico, tipo e concentração do plastificante) e parâmetros usados na fabricação (tempo de secagem, umidade relativa e temperatura de secagem) (LIU et al., 2020).

Apesar das ótimas propriedades que biofilmes podem apresentar, a natureza hidrofílica das moléculas ainda é um problema a ser resolvido (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). A adição de lipídios na solução filmogênicas ou a elaboração do filme em bicamadas, com a cera, segundo a literatura, tem se mostrado viável para redução da permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade (FORMIGA et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; SUN et al., 2021).

3.3. PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

O método mais utilizado na elaboração de filmes biodegradáveis é o *casting*, que consiste o preparo de uma solução coloidal da macromolécula e aditivos, aplicação em suporte adequado, seguida de secagem em condições rigorosamente controladas. Dessa forma, para a elaboração de filmes a partir de matérias primas biodegradáveis, é necessário o conhecimento de suas propriedades físico-químicas, particularmente da sua solubilidade em água e de sua capacidade de interação intermolecular (CAO et al., 2020; IBRAHIM; ELSAYED; HASNEIN, 2020).

A elaboração de biofilme requer polímero, solventes, plastificantes e outros reagentes. Ademais, alguns compostos podem ser adicionados durante a obtenção de biofilmes com o intuito de proporcionar ou melhorar, por exemplo, as propriedades de barreira à água, mecânicas, antimicrobiana e antioxidante. (CAO et al., 2020; FRASSINETTI et al., 2020a).

O processo de formação da estrutura dos filmes depende da natureza do biopolímero, do solvente utilizado, da temperatura aplicada e da presença de outras moléculas. As associações intermoleculares e intramoleculares e/ou ligações cruzadas das cadeias dos polímeros comumente estão envolvidas na formação desses revestimentos, formando uma rede tridimensional que captura os compostos adicionados (KOUHI; PRABHAKARAN; RAMAKRISHNA, 2020).

Os filmes compostos podem ser elaborados tendo como base dois principais métodos (GÓMEZ-ALDAPA et al., 2020a):

1. **Bicamada:** A proteína é dispersa em um solvente (água e/ou etanol), aquecida e espalhada sobre um suporte plano para a evaporação do solvente e o aditivo é aplicado sobre a camada proteica, formando duas camadas;
2. **Emulsionado:** O aditivo é incorporado na solução filmogênica, formando uma emulsão onde está é aquecida e espalhada sobre um suporte plano para a evaporação do solvente.

Neste momento, a distribuição de partículas e o tamanho do glóbulo de gordura são determinantes para estabilidade de emulsão, onde gotas menores formam filmes mais homogêneos, diminuindo a permeabilidade do vapor de água (PHAN THE et al., 2002; SHAHIDI; HOSSAIN, 2020a)

3.4. MATÉRIAS PRIMAS PARA FILMES BIODEGRADÁVEIS

As matérias primas utilizadas na produção de filmes biodegradáveis não devem apresentar riscos para o consumo humano e estar dentro do padrão estabelecido pela legislação, a fim de evitar a presença de compostos tóxicos e alergênicos (AVRAMESCU et al., 2020).

A produção de filmes biodegradáveis é um processo em que diversos biomateriais podem ser usados e produzindo bons resultados. Normalmente são elaborados a partir de fontes vegetais (carboidratos), animais (lipídeos e/ou proteínas), plastificantes, surfactante, aditivos e solventes.

3.4.1. Proteínas

As proteínas alimentares podem ser definidas como aquelas que apresentam elevada digestibilidade, presença de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e que atribua propriedades funcionais (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Essas macromoléculas orgânicas são constituídas por 21 aminoácidos primários, unidos entre si por ligações amídicas, denominadas ligações peptídicas; podendo ser organizadas em quatro níveis crescentes de complexidade de acordo com sua estrutura espacial (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

A formação de filmes de proteínas ocorre através da desnaturação das estruturas quaternárias e terciárias, através do calor na presença de solvente e pH regulado. Em temperaturas acima da temperatura de transição vítrea, a proteína passa por um rearranjo molecular, estabelecendo novas ligações enquanto o material se torna elástico, macio e moldável. Após resfriado, o material tem novas características devido as novas ligações covalentes e pontes de hidrogênio formadas (AVRAMESCU et al., 2020).

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante nos seres vivos, compondo cerca de 30% das proteínas dos vertebrados e está disponível principalmente na pele. Possui duas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ unidas por pontes de hidrogênio e ligações covalentes. É composto principalmente por glicina, prolina e hidroxiprolina (MENEZES et al., 2020).

A pele dos peixes tende a ter uma menor quantidade de ligações cruzadas no colágeno, além de ser livre de doenças oriundas da pecuária como febre aftosa, encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e restrições religiosas. O que torna o colágeno da pele de peixe uma boa opção para uso (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

A hidrólise parcial do colágeno gera a gelatina que é o principal biopolímero utilizado na indústria para fornecer estabilidade, elasticidade e viscosidade. Além disso ela possui uma estrutura linear e composição monomérica limitada, o que leva a boas características para a formação de filmes (HOSSEINI; GÓMEZ-GUILLÉN, 2018).

Em comparação com outras proteínas naturais utilizadas na formação de filmes a gelatina pode ser facilmente dissolvida na água, diferente da proteína da soja e da zeína do milho, as quais precisam ser dissolvidas em etanol e água a 100° C, respectivamente (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018).

Devido as boas características de formação de filme, os revestimentos biodegradáveis de gelatina podem ser bons substitutos para os plásticos derivados de petróleo, para a criação de filmes e embalagens para manter produtos alimentícios (HOSSEINI; JAVIDI; REZAEI, 2016).

Apesar dos filmes a base de proteínas possuírem boas propriedades de barreira a vapores e substâncias voláteis, os atributos mecânicos e barreira a água são menores em relação aos polímeros sintéticos. Assim ainda há uma crescente pesquisa para melhorar as propriedades dos filmes biodegradáveis utilizados para elaboração de embalagens (AVRAMESCU et al., 2020; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; GÓMEZ-ALDAPA et al., 2020b).

Dentre as espécies de peixe que podem ser extraídas as proteínas para utilização na elaboração de filmes biodegradáveis, pode ser citado a *Cynoscion acoupa*

A pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) é um peixe de grande comercialização no Brasil, segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção anual pesqueira extrativista nacional foi de aproximadamente 22.000 t, sendo a quarta espécie mais capturada no país nos últimos dez anos (MPA, 2012; Ferreira et al., 2016). As peles desta espécie geradas durante o processamento são estruturas ricas em colágeno proteico e podem ser utilizadas para a extração da gelatina, agregando valor aos resíduos pesqueiros e reduzindo a poluição ambiental (ARAUJO et al., 2021)

3.4.2. Plastificantes

Plastificantes são aditivos usados para aumentar a plasticidade, flexibilidade, extensibilidade, dispensabilidade, rigidez, propriedades mecânicas de polímeros, e eventualmente, utilizado para melhorar o processo de polimerização (SUYATMA et al., 2005; SUDERMAN; ISA; SARBON, 2018).

Normalmente os plastificantes são compostos de peso molecular relativamente baixo, como moléculas de polióis glicerol e sorbitol; podem ser copolimerizados junto com os polímeros, ou acrescentados ao polímero, reduzindo forças intramoleculares e intermoleculares, logo aumentando a mobilidade da cadeia, quando misturados com biopolímero aumentam a flexibilidade, diminuem a temperatura de transição vítrea com maior permeação ao vapor d'água e gás (KUORWEL et al., 2011).

Os plastificantes atuam em todas as funcionalidades dos biofilmes. A permeabilidade ao vapor d'água aumenta com a adição de concentrações maiores de plastificantes hidrofílicos, como é o caso de polióis, por exemplo o glicerol. O glicerol atua se ligando as moléculas do biopolímero diminuindo a densidade do solução e aumento a mobilidade dos compostos, assim facilitando a passagem de gases (MCHUGH; KROCHTA, 1994).

3.4.3. Surfactantes

Surfactantes são moléculas utilizadas para aumentar a estabilidade das emulsões. São classificados como substâncias macromoleculares anfifílicas e surfactantes de baixo peso molecular. As macromoléculas anfifílicas podem diminuir a tensão interfacial e formar um filme elástico estérico e os surfactante de baixo peso molecular podem apenas diminuir a tensão superficial (XIAO; LI; HUANG, 2016; ZHANG et al., 2020).

A associação da gelatina e surfactantes de baixo peso molecular é uma das formas ideais para que ocorra interações no equilíbrio lipofílico-hidrofílico, pois as cadeias polipeptídicas de gelatina com os grupos carregados positivamente e negativamente, na fase aquosa, interagem com surfactantes de baixo peso molecular e formam complexos com várias composições, assim, mudando as propriedades da gelatina e estabilizando emulsões. Essas interações sofrem influência do tipo de surfactante usado e também do estado conformacional das moléculas de gelatina (DERKACH, 2015).

3.4.4. Lipídios

Os lipídios podem ser adicionados a formulação de filmes biodegradáveis com o objetivo de melhorar a hidrofobicidade e conseqüentemente minimizar a migração de vapor de água no filme. Todavia, a adição de lipídios na formulação de filmes pode

aumentar a opacidade do filme e prejudicar suas propriedades mecânicas dependendo da composição e estrutura do filme (SHAHIDI; HOSSAIN, 2020b).

A atividade que os lipídios exercem nos filmes é dependente da sua estrutura química, arranjo químico, grau de saturação, comprimento da molécula, hidrofobicidade e o estado físico. Como por exemplo, a distribuição dos grupos químicos, o grau de insaturação e o comprimento das cadeias alifáticas que afetam a polaridade da molécula lipídica (RHIM; SHELLHAMMER, 2005).

As substâncias lipídicas mais usadas são ceras naturais (carnaúba, abelha, candelilla); cera proveniente do petróleo como a parafina; ácidos graxos (oleico, linoleico, linolênico, láurico, palmítico e esteárico), óleos vegetais (óleos de girassol, azeite, colza e milho) (KOUHI; PRABHAKARAN; RAMAKRISHNA, 2020; SHAHIDI; HOSSAIN, 2020a).

Filmes e revestimentos com lipídios podem ser obtidos através de emulsão e bicamadas. No filme obtido por emulsão os lipídios são difundidos na matriz polimérica, sendo um processo mais rápido contando apenas com a fundição e secagem. No processo de bicamada, os lipídios formam uma segunda camada sobre a matriz polimérica, que envolve quatro etapas de manipulação com duas fundições e duas secagens. Neste momento a distribuição de partículas e o tamanho do glóbulo de gordura são determinantes para a estabilidade de emulsão, onde gotas menores formam filmes mais homogêneos, diminuindo a permeabilidade do vapor de água (PHAN THE et al., 2002; SHAHIDI; HOSSAIN, 2020b)

3.4.4.1. Cera de abelha

A cera é produzida pelas glândulas de cera das abelhas é bem conhecida pela sua natureza hidrofóbica. A qualidade da cera é relacionada com a sua cor e florada local, sendo a recém fabricada da cor branca ou clara, após manipuladas pelas as abelhas em amarelo escuro e castanho (DIYANA et al., 2021; ESHETU et al., 2019).

A cera de abelha é relativamente macia e o seu ponto de fusão é na faixa de temperatura de 62°C – 64°C. É composta por ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, álcool graxo, diésteres, substâncias exógenas e hidrocarbonetos; majoritariamente por ésteres de oleato, palmitato e palmitoleato de álcoois de cadeia longa e as substâncias exógenas que são principalmente compostas por própolis, pólen,

traços de componentes florais e poluição. A composição da cera varia entre diferentes raças e famílias de abelhas (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018).

A adição de cera de abelha reduz a permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade dos biofilmes devido a sua hidrofobicidade e estrutura cristalina que são firmemente compactadas, alguns autores desenvolveram filmes com cera e evidenciaram essa informação (KHANZADI et al., 2015) com revestimentos de whey protein, concentrado de pululana com cera de abelha; (KLANGMUANG; SOTHORNVIT, 2016) produziu revestimentos a base de hidroxipropil metilcelulose adicionado de cera de abelha e (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018) que comparou filmes de gelatina adicionados de cera de abelha e cera de carnaúba.

3.5. PROPRIEDADES DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS

3.5.1. Espessura

A distância entre as duas principais superfícies do material é chamada de espessura, um parâmetro essencial no estudo de biofilmes mono ou multicamadas. Controlar a espessura dos biofilmes é primordial para manter a uniformidade, repetibilidade das medidas e validação das comparações de propriedades entre variados tipos de filmes (GENNADIOS, 2002).

Baseado na espessura do filme podemos inferir informações sobre a resistência mecânica e propriedades de barreira a gases e a vapor de água do material analisado, bem como estimar a vida útil dos alimentos que serão acondicionados nesse material (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2012).

A adição de plastificantes com alta afinidade pela umidade do ambiente, como por exemplo, o glicerol, pode ocasionar uma maior retenção de água na matriz e consequente aumento na espessura final dos mesmos (SANTACRUZ; RIVADENEIRA; CASTRO, 2015). Também, substâncias com características hidrofóbicas causam aumento na espessura da matriz do filme, devido a reorganização das moléculas durante a formação e secagem do filme (ATARÉS; CHIRALT, 2016).

3.5.2. Opacidade e cor

A opacidade é um parâmetro indicativo da proporção de luz que pode atravessar a superfície do material, logo, quanto maior a opacidade de um filme, menor será a quantidade de luz que entrará em contato com o alimento embalado (VILLALOBOS et al., 2005).

A transparência e a opacidade do polímero estão relacionadas com a composição da matriz. A incorporação de lipídios e consequente aumento da espessura tem impacto direto na aparência do filme, tornando-os mais opacos, diminuindo a exposição a raios ultravioletas podendo reduzir a deterioração dos alimentos (ADILAH et al., 2018; VILLALOBOS et al., 2005).

A adição de lipídios resulta em considerável diminuição da transmissão de luz, causada possivelmente devido ao espalhamento da luz na superfície das micelas de lipídios, que possuem índice de refração diferentes. Efeito esse que ocorrem em filmes compostos em função das diferentes camadas presentes no material (ATARÉS; CHIRALT, 2016; GÓMEZ-ESTACA et al., 2009).

A cor de um produto influencia diretamente na percepção do consumidor e na aparência global do produto, dando a ideia de alta ou baixa qualidade. É possível mensurar a cor através dos parâmetros L^* com a variação de 0 (preto) a 100 (branco), a^* verde (-) ao vermelho (+) e b^* do azul (-) até o amarelo (+), C^* valor do croma, h^* ângulo de tonalidade e ΔE a diferença total de cor.

3.5.3. Solubilidade em água

A aplicabilidade de filmes comestíveis depende fortemente de sua solubilidade, pois a alta atividade de água dos alimentos pode diminuir a vida útil dos filmes (CARPINÉ et al., 2016). A solubilidade dos filmes elaborados com gelatina está relacionada com a presença de aminoácidos hidrofílicos, aumentando sua solubilidade (SILVA et al., 2018).

A incorporação de lipídios acarreta a redução da permeabilidade ao vapor d'água, porém a adição de lipídios acima de determinada concentração, pode levar a desestabilização da estrutura, devido a redução das forças intermoleculares entre as

cadeias proteicas, aumentando a solubilidade (HASSAN et al., 2018; ROCHA et al., 2018).

3.5.4. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade é resultado dos efeitos combinados da difusão e solubilidade, representando a taxa de transporte da molécula permeante. É definida como uma propriedade do filme (vapor de água, oxigênio e gás carbônico), em condições definidas de temperatura, umidade relativa, espessura e diferença de pressão parcial (CARISSIMI; FLÔRES; RECH, 2018; KHANZADI et al., 2015)

A análise de permeabilidade serve para definir a potencial aplicação dos filmes em alimentos. Normalmente esses valores devem ser os menores possíveis para diminuir a troca de umidade entre o alimento e meio ambiente, mantendo a integridade do alimento.

Biofilmes que são muito permeáveis ao vapor d'água não pode ser utilizados em alimentos que não podem absorver água, como alimentos secos. Vários fatores afetam esse parâmetro, como característica do polímero, integridade da matriz, interação entre a matriz polimérica com os componentes do filme, plastificante utilizado e as condições de secagem (CARISSIMI; FLÔRES; RECH, 2018).

3.5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Grande parte dos componentes dos filmes estão em tamanho de micrôn, este que não pode ser visto a olho nu, como os agregados proteicos, as micelas do surfactante e os aditivos. Logo, a análise de microscopia eletrônica de varredura pode revelar a compatibilidade e microestruturas dos filmes compostos (RUBILAR et al., 2015; SUN et al., 2021).

A MEV fornece ao analista uma visão altamente ampliada da superfície do material que é muito aproximado do que seria esperado se pudesse ser visto a olho nu. Tal confiança na simples visualização tende a levar a erros na análise, por tal há equipamentos que podem ser utilizados na análise como, microsonda eletrônica e microsonda Auger de Varredura que complementem a micrografia com imagens de outros ângulos (BINDELL, 1992).

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma importante técnica para identificar grupos funcionais de biomoléculas. Esta técnica pode ser usada para obter um espectro de amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Quando a radiação passa pelo objeto parte é absorvida e parte será transmitida ao detector que demonstrará um espectro específico (SANTHIYA-NAIR et al., 2022).

A FTIR pode ser usada para identificar agregados proteicos em tecidos ou materiais. Normalmente os agregados são detectados com base na presença de um marcado específico, como as bandas de amida I e II, tendo como resultado a formação de estruturas intermoleculares em folhas β que podem ser visualizadas no espectro (BYRNE et al., 2020).

3.5.6. Planejamento fatorial completo

Os planejamentos fatoriais completos avaliam quantitativamente a influência das variáveis sobre a resposta de interesse também suas interações. Quando a pesquisa tem por objetivo maximizar o minimizar algum efeito de resposta, utiliza-se a superfície de resposta (BARROS NETO et al., 2003).

A metodologia de superfície de resposta pressupõe a utilização de planejamentos experimentais que tem por objetivo investigar a forma funcional dos processos ou sistemas que envolvem uma ou mais respostas que sofrem influência de variáveis ou fatores diferentes (CORZO; GOMEZ, 2004). O planejamento experimental é fundamental para o pesquisador investigar no processo em estudo, através da otimização, ou máximo e mínimo, se houver, ou determinar uma região ótima nas condições desejáveis (MYERS, 1971).

Fazendo uso dos resultados obtidos do planejamento fatorial, é possível utilizar a “função desejabilidade”. Essa função é muito utilizada na indústria para otimizar experimentos multivariáveis. É possível encontrar condições que fornecem a resposta mais acertada dentre uma combinação de várias respostas (GARCIA; PEREIRA FILHO, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA PRIMA

Foram utilizadas peles de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) coletadas no mercado do Ver-o-Peso localizado no município de Belém, Pará, Brasil. As peles foram acondicionadas em embalagens de polietileno, transportadas em caixas isotérmicas com gelo. No laboratório foram higienizadas em água clorada (5 ppm) à 4 °C e cortadas em 4 cm x 4 cm. Em seguida, embaladas a vácuo em embalagens de polietileno e congeladas em ultra freezer (Cold Lab, CL 200-80v) a -66 °C, até o processo de extração.

4.2. OBTENÇÃO DA GELATINA

A extração do colágeno da pele do pescado *Cynoscion acoupa* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Silva et al. (2017). As peles foram cortadas em 4 cm × 4 cm, lavadas em água corrente e imersas em cloreto de sódio (NaCl) (Isifar, Brasil) 0,6 mol/L em uma proporção de 1: 5 (peso/volume) por 15 minutos, sob agitação de 85 rpm a 25 °C em incubadora Shaker (Lucadema, Luca-223, Brasil). Em seguida, o material foi submerso em solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, Brasil) a 0,3 mol/L, seguindo o mesmo procedimento realizado anteriormente.

Em seguida, foi imerso em solução de ácido acético (C₂H₄O₂) (Audaz, Brasil) a 0,02 M, em uma proporção de 1:5 (peso/volume) por 60 minutos sob agitação e lavado em água corrente. A fase de extração foi realizada com água destilada em banho-maria (Tecnal, Te-057, Brasil) por 6 h a 50 °C, mantendo uma razão de 1: 5 (peso / volume).

Após a extração, o material filtrado foi colocado em bandejas de inox e seco em estufa a 60° C / 16 h (Tecnal, TE 394/3). Finalmente a gelatina seca foi acondicionada em sacos plásticos de polietileno a vácuo (Fastvac Wrapping Machine, F200, Brasil) e armazenada a - 26 °C em freezer até a elaboração dos filmes.

4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para estabelecer a melhor combinação gelatina-cera no processo de obtenção do biofilme, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2², constituído por ensaios lineares nos níveis -1 e +1, ensaios com pontos axiais + α e - α , definidos em +1,41 e -1,41, respectivamente e repetições no ponto central. A definição dos níveis das variáveis estudadas está descrita na Tabela 1.

Foram realizados 11 experimentos (Tabela 2), sendo 4 ensaios fatoriais (combinação entre os níveis ± 1), 4 ensaios no ponto central (quatro variáveis no nível 0) e 4 ensaios nos níveis axiais $\pm \alpha$. Tendo como variáveis de entrada (independentes): a concentração de gelatina seca (X1) e concentração de cera (X2). As variáveis dependentes estudadas foram: permeabilidade ao vapor de água e solubilidade, avaliadas na Tabela 2.

Tabela 1: Definição dos níveis das variáveis estudadas na obtenção do filme biodegradável

VARIÁVEIS	-α (-1,41)	-1	0	+1	+α (-1,41)
GELATINA (%) – X1	1,17	2	3	4	4,4
CERA (%) - X2	1,58	2	4	6	6,82

Tabela 2: Planejamento fatorial completo composto central rotacional (2^2) com valores reais e codificados.

Reais e Codificados		
Ensaio	X1 (%)	X2 (%)
1	-1 (2)	-1 (2)
2	1 (4)	-1 (2)
3	-1 (2)	1 (6)
4	1 (4)	1 (6)
5	0 (3)	-1,41 (1,58)
6	0 (3)	+1,41 (6,82)
7	-1,41 (1,17)	0 (4)
8	+1,41 (4,4)	0 (4)
9	0 (3)	0 (4)
10	0 (3)	0 (4)
11	0 (3)	0 (4)

X1= Concentração de gelatina; X2= Concentração de cera de abelha

Para a análise dos resultados experimentais, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta para verificar o comportamento do sistema no qual estão

combinadas as variáveis independentes e as variáveis dependentes (respostas). Assim, se obteve as equações e gráficos de influência dos fatores (Gelatina / Cera) sobre as variações de PVA e solubilidade. Com os dados, foi estabelecida a concentração de gelatina e cera ótimas para o processo de obtenção do filme biodegradável.

Os filmes foram elaborados de acordo com a metodologia proposta por Formiga et al. (2019) e Albuquerque et al. (2020). A elaboração iniciou com o preparo das soluções filmogênicas onde a gelatina foi misturada em diferentes concentrações (peso/volume). Foi adicionado conforme planejamento fatorial completo (Tabela 2) diferentes concentrações de cera. Adicionou-se também 20% de glicerol em relação a gelatina, 80% de Lauril Sulfato de Sódio (SDS), 100% de ácido esteárico, ambos em relação a concentração de cera.

4.4. ELABORAÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL

A gelatina foi aquecida em banho-maria a 60°C até total fusão e a cera foi aquecida a 70°C até total fusão. As soluções foram misturadas com agitador magnético e em seguida foram despejadas em bandejas redondas de silicone (22 cm de diâmetro e 4cm de altura) e secas em estufa com renovação de ar (Tecnal, TE 394/3) a 35°C por 18 h. Após secagem os filmes foram selados a vácuo em sacos de polietileno e mantidos sob congelamento até posterior análises.

4.5. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DOS FILMES

Nos quatros filmes biodegradáveis elaborados após o resultado do planejamento experimental foram realizadas análises de espessura, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, cor instrumental, transparência e transmitância de luz, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e caracterização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A espessura dos filmes foi feita de acordo com metodologia de Albuquerque et al (2020) e foi medida 8 vezes em pontos aleatórios, com micrômetro digital de resolução de 0,001 mm (Insize, IP54, Brazil).

A Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA) foi determinada pelo uso da metodologia da American Society for Testing and Materials (ASTM) modificado Método D882-95, descrito por Arfat et al. (2014). O filme foi selado em becker de permeação de vidro contendo sílica gel seco (0% UR; 0 Pa de pressão de vapor de água a 30 °C) com cola de silicone (adesivo de silicone, alta temperatura – Siloc). Os béqueres foram colocados em dessecador contendo água destilada a 30 °C (99% de UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor a 30 °C) e foram pesados em intervalos de 1 h ao longo de um período de 10 h. PVA do filme será calculada de acordo com a equação 1.

$$PVA = \frac{W.X}{A.t.\Delta P} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: W representa o ganho de peso do béquer (g); X é a espessura do filme (m); A é a área exposta da película (m²); t é o tempo de incubação (s); (ΔP) é a diferença de pressão de vapor através da película (4244,9 Pa, a 30 °C).

Para determinação da solubilidade, os filmes foram recortados em discos de 2 cm de diâmetro e foi determinada a matéria seca inicial em estufa a 105 °C por 24 horas. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipientes contendo 50 mL de água destilada. O sistema foi agitado em Incubadora Shaker refrigerada (Cientec, CT-712RNT, São Paulo, Brasil) com velocidade de 150 rpm por um período de 24 horas, a 25 °C. Após este período, as amostras foram removidas e secas (105 °C por 24 horas), para determinar a matéria seca que não se dissolveu em água (GONTARD et al., 1994).

A cor instrumental dos filmes foi determinada em colorímetro controlado pelo programa Universal Software 3.2, trabalhando com D65 (luz do dia) e usando-se os padrões CIE Lab: L*, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a*, do verde (-) ao vermelho (+); e b*, do azul (-) ao amarelo (+) (GENNADIOS et al., 1996). Os filmes foram aplicados na superfície de uma placa branca padrão e os padrões L*, a*, b*, C e H foram medidas. A diferença de cor (ΔE^*) será calculada de acordo com a seguinte equação 4.

$$[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: ΔL^* , Δa^* e Δb^* são os diferenciais entre os cromas das amostras e do padrão branco: $L^* = 92,24$; $a^* = -5,15$; $b^* = 6,11$

A transmissão de luz (UV) e transparência, foi medida da faixa ultravioleta e visível (200 e 800 nm), cortando em retângulos com medida interna das cubetas (POR AS MEDIDAS). A transmissão de luz foi medida utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific, Evolution 60, Waltham, USA). A transparência foi calculada a 600 nm segundo a equação 5 (ARFAT et al., 2014).

$$\text{Transparência} = \frac{-\log\%T}{X} \quad \text{Equação 5}$$

Onde T é a transmitância fracionária em 600 nm e o X é a espessura do filme.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – LABMEV do Instituto de Geociências da UFPA. O equipamento utilizado foi MEV modelo LEO-1430. A amostra foi metalizada com ouro e o tempo de recobrimento será de 1,5 minutos. As condições de análises para as imagens de elétrons secundários foram: corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kv, distância de trabalho = 15 mm.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada de acordo com o método descrito por Benjakul et al. (2010). Os espectros de FTIR foram obtidos a 22°C usando uma célula de cristal de placa ATR Trough, 45°ZnSe, 80mm de comprimento, 10mm de largura, 4mm de espessura; PIKE Technology Inc., Madison, WI, EUA). Utilizou-se um espectrômetro Equinox 55 FTIR (Bruker Co., Ettlingen, GER). Para análise espectral, as amostras foram colocadas na célula de cristal, anexada ao conjunto do espectrômetro.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do software Statística® versão 10 (STATSOFT Inc., 2011) através da hierarquização dos efeitos, análise de variância, análise de superfície de resposta do modelo proposto ($p < 0,05$) e função desejabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CONDIÇÕES PARA OTIMIZAÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo com os respectivos níveis e respostas.

Tabela 3: Matriz codificada do Planejamento Fatorial Completo 2^2 para a otimização do filme biodegradável.

Variáveis independentes			Variáveis dependentes	
Ensaio	X1 (%)	X2 (%)	PVA*	SOL (%)
1	2 (-1)	2 (-1)	1,13E-07	5
2	4 (+1)	2 (-1)	5,28E-08	3
3	2(-1)	6 (1)	1,35E-07	10
4	4 (+1)	6 (1)	1,14E-07	17
5	3 (0)	1,58 (-1,41)	7,16E-08	2
6	3 (0)	6,82 (+1,41)	7,91E-08	4
7	1,17 (-1,41)	4 (0)	1,29E-07	2
8	4,4 (+1,41)	4 (0)	7,25E-08	11
9	3 (0)	4 (0)	6,98E-08	13
10	3 (0)	4 (0)	7,88E-08	10
11	3 (0)	4 (0)	9,08E-08	10

X1= Concentração de gelatina; X2= Concentração de cera de abelha; PVA: (g.m.m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹); SOL: Solubilidade em triplicata

O efeito estimado, coeficiente t e significância estatística (p) para cada fator do filme biodegradável em relação às respostas Permeabilidade ao Vapor de Água e Solubilidade, obtidos após o processo de produção podem ser visualizados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Esses valores foram determinados através do Erro Puro e optou-se em definir como variáveis significativas apenas àquelas que apresentaram significância a $p \leq 0,05$.

5.2. ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DO MODELO

Devido ao modelo completo do PVA não ter sido estaticamente significativo, pela análise de variância, decidiu-se fazer uma reparametrização do modelo. Os fatores retirados foram os que apresentaram os mais altos valores de p, são eles: Cera² e a interação Gelatina x Cera e Gelatina².

Tabela 4: Estimativa dos Efeitos da variável PVA associada a significância para cada resposta estudada.

Variáveis independentes	Efeitos	Erro puro	t	p	Coef. Limit-95%	Coef. Limit-+95%	Coeficiente
Média	0,112	0,010	11,565	0,007	0,070	0,153	0,112
Gelatina	0,058	0,012	4,906	0,039	0,007	0,109	0,029
Gelatina ²	-0,063	0,014	-4,453	0,047	-0,123	-0,002	-0,031
Cera	0,043	0,012	3,638	0,068	-0,008	0,094	0,022
Cera ²	-0,029	0,014	-2,025	0,180	-0,089	0,032	-0,014
Gelatina x Cera	0,045	0,017	2,675	0,116	-0,027	0,117	0,022

R²:0,81 e R^{ajustado}:0,63

O modelo completo está representado na Tabela 4 e o modelo reparametrizado é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Estimativa dos efeitos da variável PVA, reparametrizada, associada a significância para as respostas mais significativas.

Variáveis independentes	Efeitos	Erro puro	t	p	Coef. Limit-95%	Coef. Limit-+95%	Coeficiente
Média	81,320	4,427	18,368	0,003	62,273	100,369	81,321
Gelatina	23,499	7,456	3,152	0,088	-8,581	55,580	11,750
Cera	-40,478	7,456	-5,429	0,032	-72,558	-8,397	-20,239

R²:0,76 e R^{ajustado}:0,65

O efeito estimado demonstra o quanto cada fator influência nas respostas estudadas, logo quanto maior o seu valor, maior é a sua influência positiva ou negativa. O valor do coeficiente p indica o nível de significância da variável independente sobre a resposta em estudo (BARROS NETO et al., 2001). Neste estudo optou-se pelo valor de 95% como intervalo de confiança.

Na Tabela 5 é possível verificar que o efeito significativo para a PVA foi a Cera linear. O efeito apresentou valor negativo, demonstrando que o aumento da sua concentração provoca um aumento na PVA. Logo, não é necessário a adição de altas concentrações de cera para obter bons resultados de PVA.

Zhang; Simpson e Dumont (2018) comparando filmes de gelatina adicionados de cera de abelha e cera de carnaúba, também relatam que a adição de altas concentrações de cera não apresenta diferença significativa no PVA quando comparado aos filmes com baixa concentração de cera. Cortes-Rodrigues et al. (2020) em filmes de amido de mandioca com cera de abelha e proteína do leite também indicaram que baixas concentrações de cera, apresentaram melhores resultados de PVA.

A Figura 1 mostra o diagrama de Pareto com os valores dos efeitos significativos e não significativos do PVA. É possível verificar que a cera, o único parâmetro significativo, foi negativo, indicando que um aumento na concentração desse fator, aumenta o PVA, tornando o filme mais permeável. Para PVA o adequado é trabalhar com baixas concentrações de gelatina.

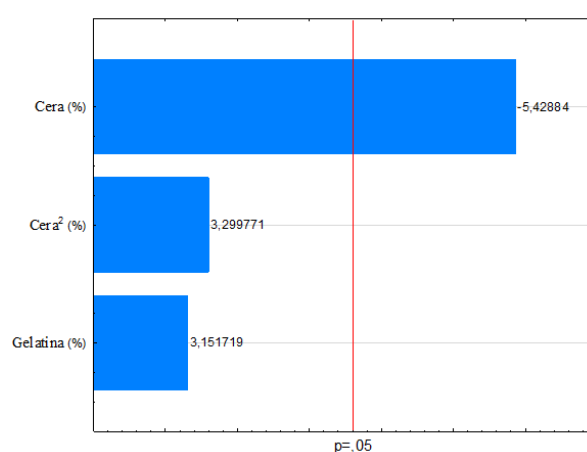


Figura 1: Efeito padronizado do diagrama de Pareto da variável PVA.

Devido o modelo completo da Solubilidade não ter sido estatisticamente significativo, pela análise de variância, decidiu-se fazer uma reparametrização do

modelo. Os fatores retirados foram os que apresentaram os valores mais altos de p Cera² e da interação Gelatina x Cera. O modelo completo está apresentado na Tabela 4 e o modelo reparametrizado na Tabela 6.

Tabela 6: Estimativa dos Efeitos da variável Solubilidade associada a significância para cada resposta estudada.

Variáveis independentes	Efeitos	Erro puro	t	p	Coef. Limit-95,%	Coef. Limit-+95,%	Coefficiente
Média	0,112	0,010	11,565	0,007	0,070	0,153	0,112
Gelatina	0,058	0,012	4,906	0,039	0,007	0,109	0,029
Gelatina ²	- 0,063	0,014	- 4,453	0,047	- 0,123	- 0,002	- 0,031
Cera	0,043	0,012	3,638	0,068	-0,008	0,094	0,022
Cera ²	-0,029	0,014	-2,025	0,180	-0,089	0,032	-0,014
Gelatina x Cera	0,045	0,017	2,675	0,116	-0,027	0,117	0,022

R²: 0,71 e R^{ajustado}: 0,43

Na Tabela 7 é possível verificar que a única variável que apresentou efeito significativo para a Solubilidade foi a Gelatina, exercendo maior influência. O efeito apresentou valor positivo, demonstrando que o aumento da sua concentração também aumenta a solubilidade. Logo, filmes com maiores concentrações de gelatina são mais solúveis.

Tabela 7: Estimativa dos Efeitos da variável Solubilidade, reparametrizada, associada a significância para as respostas mais significativas.

Variáveis independentes	Efeitos	Erro puro	t	p	Coef. Limit-95,%	Coef. Limit-+95,%	Coefficiente
Média	0,098	0,007	13,97	0,005	0,068	0,129	0,098
Gelatina	0,058	0,012	4,91	0,039	0,007	0,109	0,029
Gelatina ²	-0,054	0,014	-4,03	0,056	-0,113	0,004	-0,027
Cera	0,043	0,012	3,64	0,068	-0,008	0,094	0,022

R²: 0,59 e R^{ajustado}: 0,41

O aumento da concentração de gelatina resulta em acréscimo de compostos hidrofílicos nos filmes tornando-os mais solúveis. Segundo Limpan et al. (2010) filmes elaborados com proteínas de peixe tem alta absorção de água devido a hidrofobicidade de alguns aminoácidos presentes e da adição de plastificantes hidrofílicos, como o glicerol, contribuindo ainda mais para o aumento da solubilidade nesses filmes.

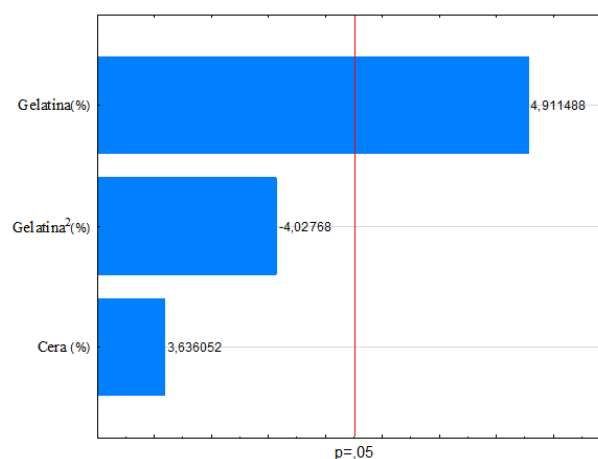


Figura 2: Efeito padronizado do diagrama de Pareto da variável Solubilidade.

Na Figura 2 é possível observar que o fator que apresentou o maior efeito significativo sobre a solubilidade foi a gelatina linear. Esse fator obteve efeito positivo em relação a resposta, ou seja, com o aumento da concentração de gelatina há um aumento da solubilidade. Segundo Vieira et al. (2018) a adição de elevadas concentrações de proteínas em filmes favorece o aumento de grupos polares e consequentemente a solubilidade de filmes biodegradáveis. Segundo Pires et al. (2013) a solubilidade também depende de fatores como a espécie de peixe, tipo de proteínas e método de preparação do filme.

Nas Tabelas 8 e 9 está apresentando a ANOVA para PVA e solubilidade.

Tabela 8: Análise de Variância (ANOVA) do modelo para a PVA.

ANOVA	SQ	GL	QM	F	p
Regressão	5575,32	3	1858,44	7,47	0,01
Resíduos	1742,16	7	248,88		
Falta de Ajuste	1520,45	3	506,82	4,57	0,18
Erro Puro	221,71	2	110,85		
Total	7317,48	10			

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática.

Tabela 9: Análise de Variância (ANOVA) do modelo para a Solubilidade.

ANOVA	SQ	GL	QM	F	p
Regressão	0.01	3	0.0050	3.402146	0.082558464
Resíduos	0.01	7	0.0015		
Falta de Ajuste	0.0066	3	0.0022	7.854568	0.11502772
Erro Puro	0.00056	2	0.0002		
Total	0.025	10			

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática.

A Análise de Variância (ANOVA) demonstrou que os modelos reparametrizados ajustados para as respostas PVA apresentou regressão estatisticamente significativa para PVA ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste F de Fisher e não significativa para Solubilidade. No entanto, o Teste F para resíduos (Falta de Ajuste) não foi significativa para as duas respostas, indicando que o modelo é apto para prever PVA e que o erro aleatório experimental da Solubilidade foi muito alto, devido à regressão não ter sido significativa.

De acordo com Barros Neto et al. (2001) uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F pode não ser útil para realizar previsões pois cobre uma faixa de variação pequena dos valores estudados. Foi observada uma grande variação na triplicata do ponto central indicando que ocorreu um alto erro de reprodutibilidade, no presente estudo.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) obtidos para as respostas PVA e Solubilidade através do erro puro foi 0,76 e 0,59, respectivamente indicando que o modelo pode explicar 76% da variação dos dados experimentais para o PVA e 59% da variação dos dados para a solubilidade. O modelo proposto das variáveis PVA e solubilidade na obtenção do filme biodegradável de gelatina e cera de abelha encontra-se a seguir:

$$\text{PVA} = 11,74.\text{Gelatina} - 20,24.\text{Cera} + 14,04.(\text{cera})^2 + 81,31 \quad (\text{equação 6})$$

$$\text{Solubilidade (\%)} = 0,029.\text{Gelatina} - 0,027.\text{Gelatina}^2 + 0,02.\text{cera} + 0,098 \quad (\text{equação 7})$$

5.3. GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Nas Figuras 3 e 4 estão apresentados os gráficos de Superfície de Resposta e Curva de Nível gerados através do modelo proposto para as variáveis PVA e Solubilidade, melhorando a visualização das variações das respostas.

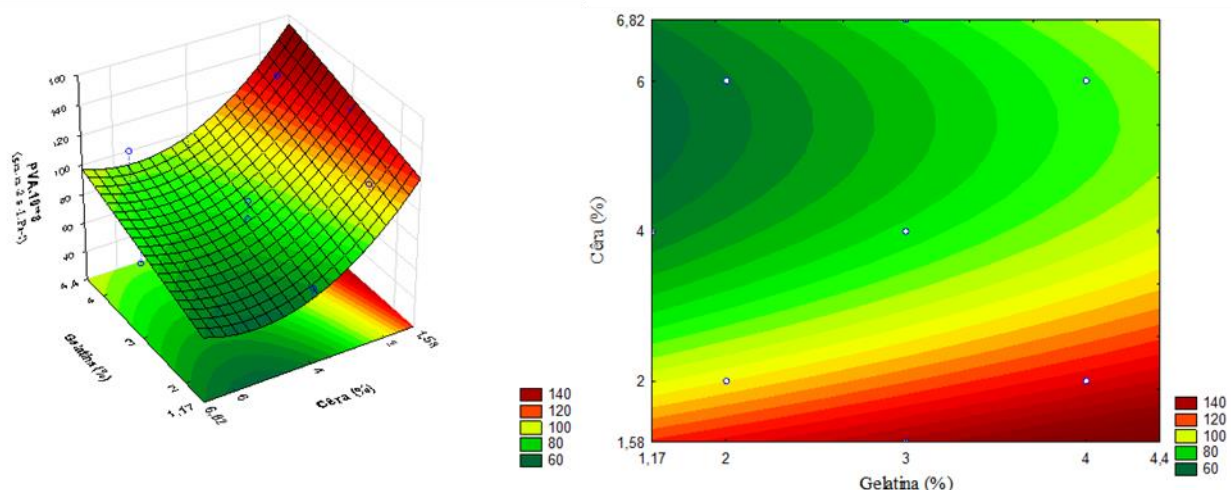


Figura 3: Superfície de resposta e curvas de nível para PVA, relacionando a concentração de gelatina (%) com a concentração de cera (%).

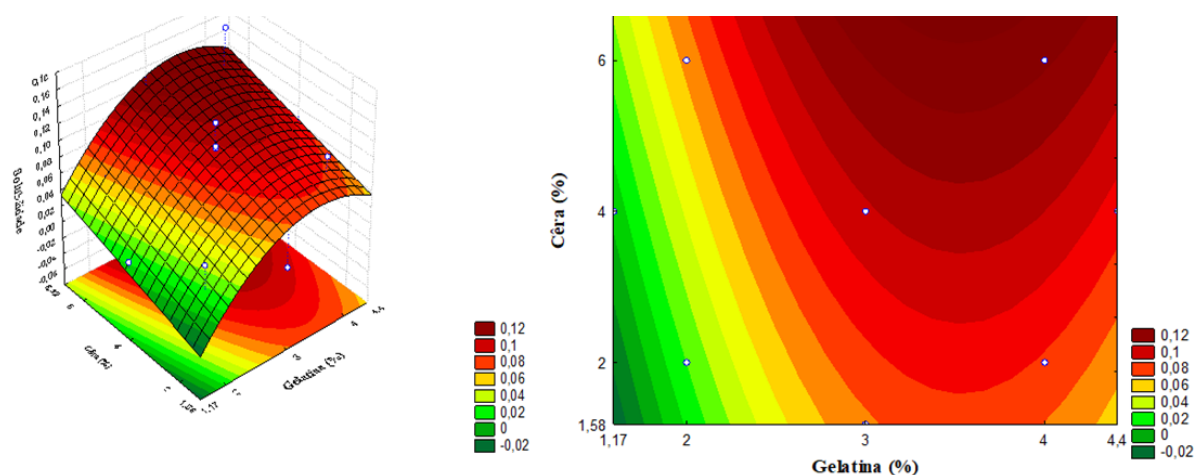


Figura 4: Superfície de resposta e curvas de nível para Solubilidade, relacionando a concentração de gelatina (%) com a concentração de cera (%).

Na Figura 3 é possível observar que há um aumento da PVA ao aumentar a concentração de gelatina e diminuir a da cera. Esse comportamento é justificado pelas características hidrofílicas da gelatina, devido a composição de aminoácidos, especialmente altas concentrações de prolina e hidroxiprolina e também à concentração máxima de cera que possui um efeito significativo sobre o PVA (SUN et al., 2021).

Observa-se que efeito produzido pela adição da cera sobre a resposta PVA foi menos intenso do que a da gelatina, de acordo com a Tabela 5.

A Figura 4 mostra a superfície de resposta e as curvas de nível da variável Solubilidade. Considerando os resultados apresentados na Tabela 8, ficou evidente o efeito negativo, dentro dos limites estipulados, de altas concentrações de gelatina sobre o filme biodegradável. É possível visualizar que na região de 4% em diante de concentrações de cera resulta em maior solubilidade, este comportamento é justificado por existir um limite em que o surfactante é capaz de homogeneizar a gelatina (BASWAL et al., 2020).

Zhang; Simpson; Dumont (2018) relataram que ao adicionar cera de abelha em filmes de gelatina reduziu a solubilidade dos provavelmente devido a ao aumento do caráter hidrofóbico causado pela extensão das moléculas de cera de modo a criar uma rede de proteção entre o filme e o meio externo.

5.4. DESEJABILIDADE

A estimativa das condições ótimas para a obtenção de filme de gelatina com cera foi realizada com base nos modelos estatísticos propostos e com o auxílio da técnica de otimização simultânea denominada “Função Desejabilidade”.

Na Figura 5 é apresentada a simulação das condições otimizadas a partir dos modelos polinomiais obtidos (equações 6 e 7) e os perfis de desejabilidade considerando os menores valores de PVA e Solubilidade como os valores desejáveis ($d=1$) para obtenção do filme da gelatina da pele da pescada amarela com adição de cera de abelha, dentro das faixas de valores estabelecidas nos ensaios experimentais.

Na Figura 5, os três primeiros gráficos superiores representam a simulação do modelo polinomial para PVA (Equação 6) para cada variável independente, na segunda linha os três gráficos representam a simulação do modelo polinomial para Solubilidade (Equação 7). A linha vermelha, nos gráficos, indica qual melhor condição para cada variável para se obter o menor resultado de PVA e de Solubilidade. A linha azul central representa os valores ótimos de PVA e Solubilidade. Os dois gráficos inferiores representam a otimização via função desejabilidade indicando as condições ótimas das variáveis independentes obtendo um resultado $d = 0,93$.

Baseado no resultado da função desejabilidade é possível perceber que para obter filmes com o valor máximo da função desejabilidade global (igual a 93%), utilizando as variáveis PVA e Solubilidade, deve-se utilizar concentrações de 1,17% de gelatina e 5,41% de cera.

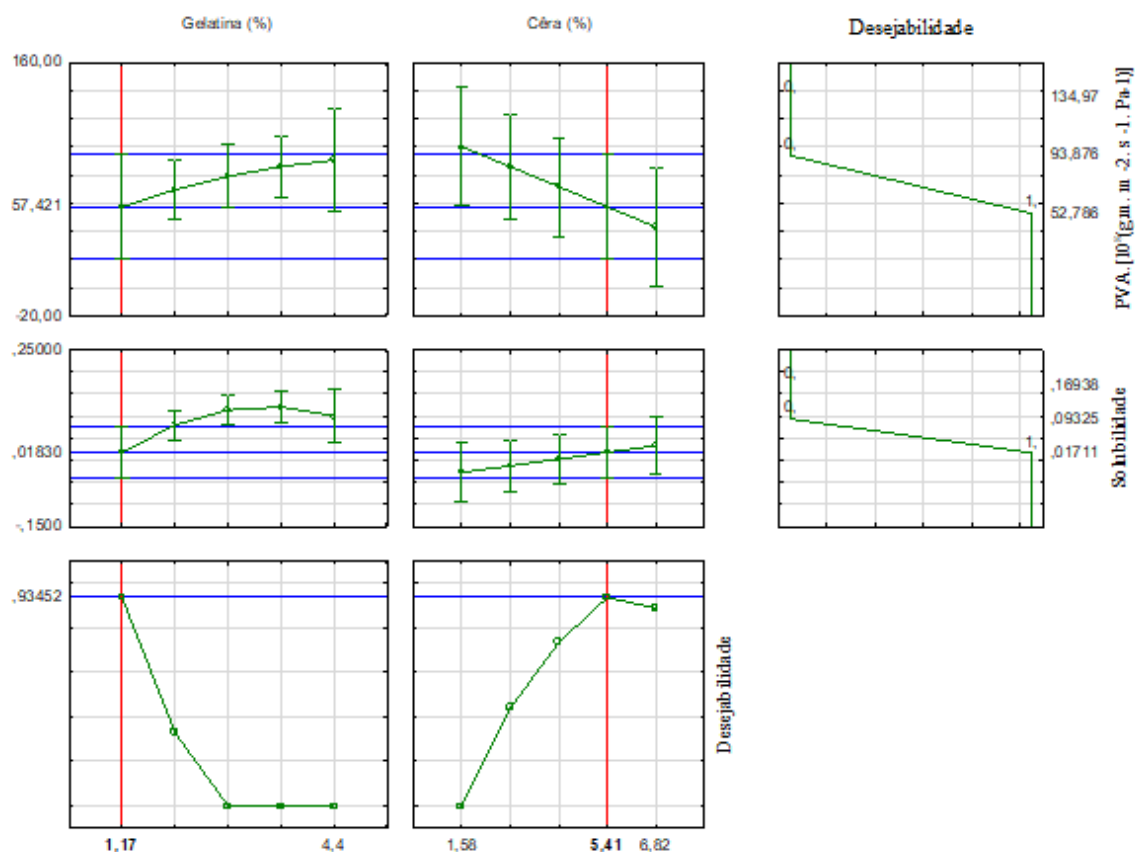


Figura 5: Perfis de valores preditos e desejabilidade para as respostas PVA e Solubilidade.

Experimentalmente é possível afirmar que a utilização de baixas concentrações de gelatina e altas concentrações de cera não cria um filme passível de ser seco, desenformado e analisado. Por tal, seguindo a tendência de baixa concentração de gelatina e elevadas concentrações de cera, em relação a gelatina, decidiu-se elaborar um filme nas concentrações de 2% de gelatina e 5%, 10 e 15% de cera, e filme controle com 2% de gelatina.

5.5. ESPESSURA, PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA E SOLUBILIDADE

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de Espessura, Permeabilidade ao Vapor D'água e solubilidade dos filmes de gelatina com formulações do FC (filme controle), F1 (5%), F2 (10%) e F3 (15%) de cera de abelha.

Tabela 10. Resultado das análises de Espessura, Permeabilidade ao Vapor D'água (PVA) e Solubilidade dos filmes de gelatina e cera de abelha

Amostras	Espessura (mm)	PVA (g. m. m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	Solubilidade (%)
FC	0,1227 ± 0,0153 ^a	5,01E-08 ± 6,25E-09 ^a	75,03±3,39 ^a
F1	0,1203 ± 0,0049 ^a	4,91E-08 ± 2,01E-09 ^{ab}	2,7015±0,8990 ^b
F2	0,1550 ± 0,0085 ^b	6,33E-08 ± 3,49E-09 ^{ab}	3,7339±1,4007 ^b
F3	0,1323 ± 0,0065 ^{ab}	1,10E-08 ± 9,54E-05 ^b	3,5385±1,8067 ^b

Resultados expressos como média + desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre os diferentes filmes ($P \leq 0,05$). Sendo, FC: Filme controle (2% gelatina, 20% glicerol); F1: Filme1 (2% gelatina, 20% glicerol, 5% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico); F2: Filme 2 (2% gelatina, 20% glicerol, 10% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico) e F3: Filme 3 (2% gelatina, 20% glicerol, 15% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico).

Os resultados da análise de espessura (Tabela 10), mostraram que o filme F2 apresentou diferença ($p \leq 0,05$) quando comparado com os filmes FC e F1. Não houve diferença significativa entre os filmes F2 e F3. A espessura dos filmes está intrinsecamente ligada a composição e forma de preparo dos mesmos e é próxima da descrita na literatura por Zhang; Simpson; Dumont (2018) e Pereira et al. (2019).

A diferença de espessura dos filmes F2 e F3, pode ser justificada pela pouca homogeneização do surfactante com o lipídio, a não formação de micelas pela cera de abelha e o surgimento de bolhas. Devido a isso os agregados de cera formam uma bicamada, aumentando a espessura e aspereza, alterando conseqüentemente o PVA (VIEIRA et al., 2018). E essa afirmação pode ser confirmada pela Microscopia Eletronica de Varredura. Mas, nem sempre as variações das propriedades dos filmes são uma consequência das alterações da espessura, no entanto, deve ser tomado em conta,

já que a produção em *casting* dificulta o controle da espessura em filmes (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

A PVA alta é uma das principais limitações dos filmes a base de proteínas para serem utilizadas em embalagens alimentícias. A natureza hidrofílica das proteínas da pele do peixe possuem aminoácidos polares e grande quantidade do radical hidroxila (OH), o que diminui a barreira ao vapor d'água do filme (JEYA SHAKILA et al., 2012). Por outro lado a cera, uma gordura sólida, tem uma estrutura de alta densidade, moléculas grandes, alto teor de álcoois graxos e alcanos conferindo características hidrofóbicas (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018).

Desta forma é possível verificar na Tabela 10 que a PVA do filme F3 foi diferente ($p \leq 0,05$) do filme FC e que os filmes F1 e F2 não diferem do FC e F3. E foi observada melhoria da PVA no filme F1, F2 com a adição cera de abelha. O que pode ser devido as interações proteína-lipídio e seus efeitos nas ligações formadas na rede, além do alongamento no caminho de migração do vapor d'água, servindo assim como barreira (SUN et al., 2021).

O resultado encontrado na presente pesquisa não foi satisfatório quando comparado ao descrito na literatura, pois são relatados baixos valores de PVA com a adição de lipídeos (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018; PEREIRA et al., 2019; SUN et al., 2021; ZHANG et al., 2020; AMIN et al., 2021). Porém, na elaboração dos filmes foram observadas muitas bolhas no interior da solução filmogênica e a alta viscosidade da solução impossibilitou a retirada das bolhas, apesar da utilização de banho ultra termostático. Isso também pode ser atribuído a pouca interação entre a cera de abelha e a gelatina, fazendo com que álcoois, fenóis e outros compostos hidrofílicos se difundam e interajam com a água, causando deformações na rede do biofilme, podendo aumentar a PVA (YANG et al., 2019; SUN et al., 2021). Também deve-se levar em conta que as interações entre pontes de hidrogênio, cadeias hidrofóbicas com ligações iônicas que foram geradas no filme não disponibilizem sítios para a retenção da água, assim permitindo que a mesma perpassa o filme (CORTES-RODRIGUEZ et al., 2020).

Foi observado em outros estudos que a adição de baixas concentrações de cera de abelha a filmes de gelatina produz efeitos semelhantes à adição de concentrações mais altas (CORTES-RODRIGUEZ et al., 2020; SUN et al., 2021). Na atual pesquisa não foi verificada diferença estatística entre os filmes F1 e F2 que obtiveram os melhores

resultados para PVA. Comparando com o FC, o F1 se torna o filme mais viável economicamente, pois mesmo com pequenas concentrações de reagentes ainda se obtém resultados relevantes nas propriedades analisadas. Essa combinação de resultados relevantes de solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água demonstra potencial para a aplicação dos filmes em frutas (BASWAL et al., 2020).

Nos filmes analisados, não houve diferença ($p \leq 0,05$) na solubilidade entre os filmes adicionados de cera de abelha, porém houve diferença significativa em relação ao controle, sendo que o F1 apresentou a melhor solubilidade (2,70%). Resultados semelhantes foram descritos na literatura, onde o aumento das concentrações de cera de abelha adicionada obteve uma diminuição progressiva e acentuada da solubilidade (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018).

Os resultados encontrados confirmam que o aumento das concentrações de cera adicionada diminui proporcionalmente a solubilidade dos filmes de gelatina (KHANZADI et al., 2015). Esse comportamento foi observado por Velickova et al. (2013) em filmes de quitosana com cera de abelha e por Zhang; Simpson; Dumont (2018) em filmes de gelatina com cera de abelha e de carnaúba. Tal comportamento pode ser atribuído ao caráter hidrofóbico das ceras que ao interagir com a matriz proteica atuou diminuindo as interações da matriz do filme com a água (CORTES-RODRIGUEZ et al., 2020).

Revestimentos comestíveis com alta solubilidade em água se decompõem facilmente na natureza e são digeridos com facilidade pelo corpo humano. Em contrapartida, filmes com baixa solubilidade em água evitam a perda de água e absorção de umidade em alimentos (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018). Este parâmetro é influenciado pela integridade do filme, grau de desnaturação das proteínas e hidrofobicidade do plastificante. E visa diminuir ou evitar perdas dos componentes funcionais dos alimentos revestidos. São preferidos filmes com baixa solubilidade em água, mas como os de gelatina possuem alta solubilidade faz-se necessária a adição de compostos hidrofóbicos (JEYA SHAKILA et al., 2012; ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018).

5.6. COR, TRANSMISSÃO DE LUZ, TRANSPARÊNCIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Tabela 11 mostra os resultados da análise de cor, com os parâmetros L^* , a^* , b^* , c^* , h^* e ΔE^* , nos filmes estudados. Os parâmetros de cor são importantes para a aparência global, aceitação e uso das embalagens em alimentos (AKHTAR et al., 2013). O parâmetro L^* (luminosidade) demonstrou altos valores e não apresentou diferença ($p \leq 0,05$) em nenhuma das amostras. Comportamento próximo aos de Albuquerque et al. (2020) em filmes de gelatina com óleo essencial de *Piper divaricatum* encontrando o valor de L^* na faixa de 86,56% a 87,75%. Vieira et al. (2018) nos filmes de proteínas miofibrilares adicionados de ácido esteárico também encontrou altos valores luminosidade 89,17% a 87,34%.

Todos os filmes apresentaram um leve esverdeamento de acordo com os valores de a^* . Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as amostras analisadas. Nos valores encontrados para b^* , apenas o F3 diferiu significativamente dos outros filmes. Houve um aumento numérico gradual nos valores de b^* com a adição da cera, mostrando um tom amarelado. Tal característica também pode ser associada a elevada concentração de SDS adicionada e a cor natural da cera de abelha (RHIM et al., 2002).

Autores também relataram tons esverdeados e amarelados nos filmes após adicionar cera de abelha sendo a^* (-0,33 até -0,41); b^* (2 até 0,88) (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018) e a^* (-1,4 até -1,9); b^* (2,5 até 9,1) (CORTES-RODRIGUEZ et al., 2020).

Esses valores de a^* e b^* encontrados configuram o material seco no espaço CIE L^* , a^* , b^* com aparência translúcida (permite a passagem de luz, mas não permite que os objetos sejam observados claramente), fosco ou com pouco brilho, de tom amarelo esverdeado devido a cera de abelha e SDS (GALUS; LENART, 2019).

O valor de croma C representa a pureza e intensidade da cor, ajudando a distinguir uma cor fraca de uma cor forte (Ferreira, 1991). Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os valores de croma encontrados. Como este parâmetro depende dos valores de a^* e b^* , é possível verificar uma tendência a coloração clara. Na diferença total de cor (ΔE^*) os filmes F2 e F3 diferiram significativamente do FC. Os valores encontrados estão na faixa de 6,58 a 8,20 demonstrando que com o aumento das

concentrações de cera de abelha, há um aumento da diferença total de cor quando comparados ao Controle.

A diferença de cor nos produtos em geral é muito importante, pois se a cor do produto não for padronizada, afeta diretamente a percepção e satisfação do cliente com o produto. De acordo com a Comissão Internacional de Iluminação (CIE) os valores obtidos na diferença total de cor (ΔE^*) maiores de 3,5 são distintamente percebidos por observadores inexperientes, causando impacto visual à primeira vista (GALUS; LENART, 2019).

Tabela 11: Tabela com os resultados da análise de cor dos filmes

Amostras	L^*	a^*	b^*	C^*	H	ΔE^*
FC	90,10±0,72 ^a	-0,59±0,02 ^a	8,93±0,42 ^a	8,95±0,42 ^a	93,76±0,26 ^a	5,81±0,13 ^a
F1	91,84±1,01 ^a	-0,69±0,02 ^a	10,82±1,10 ^{ab}	10,84±1,11 ^a	93,68±0,47 ^a	6,58±0,83 ^{ab}
F2	89,39±2,14 ^a	-0,59±0,07 ^a	11,17±1,53 ^{ab}	10,85±1,00 ^a	93,08±0,71 ^a	7,68±0,44 ^{bc}
F3	89,55±0,54 ^a	-0,67±0,11 ^a	12,42±0,64 ^b	12,44±0,63 ^a	93,10±0,60 ^a	8,20±0,69 ^c

Resultados expressos como média + desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre os diferentes filmes ($P \leq 0,05$). Sendo, FC: Filme controle (2% gelatina, 20% glicerol); F1: Filme1 (2% gelatina, 20% glicerol, 5% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico); F2: Filme 2 (2% gelatina, 20% glicerol, 10% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico) e F3: Filme 3 (2% gelatina, 20% glicerol, 15% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico).

5.7. TRANSMISSÃO DE LUZ, TRANSPARÊNCIA

O comportamento dos filmes em vários comprimentos de onda (200 nm a 800 nm) e a transparência (T600 nm) estão expostos na Tabela 12. Em uma visão global nos comprimentos de onda analisados, os filmes adicionados de cera apresentaram uma boa barreira a transmissão de luz e indicaram não transparência (transmitância abaixo de 90%). Resultados semelhantes foram encontrados por Sun et al. (2021) em seu trabalho com revestimentos para ovos adicionado de cera de abelha.

A exposição a luz visível e UV pode causar desnaturação proteica e perda de alguns nutrientes. A adição da cera de abelha reduziu significativamente a transmitância ultravioleta na faixa de 300nm a 400nm, havendo diferença significativa entre as formulações. O bloqueio eficaz da transmissão de luz UV pode ser atribuído a presença de seus compostos bioativos (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018).

A transmissão de luz manteve-se em valores baixos com a adição da cera de abelha (5%, 10% e 15%), o que já era esperado. Resultados semelhantes foram relatados na literatura em filmes de proteínas miofibrilares adicionados de ácido esteárico (VIEIRA et al., 2018), revestimentos de gelatina adicionados de ácido siríngico e ácido protocatecuico (YANG et al., 2019), revestimentos de quitosana e cera de abelha em casca de ovos (SUN et al., 2021).

Tabela 12: Resultados da análise de transmissão de luz e transparência dos filmes

Comprimento de onda (nm)	FILMES			
	FC	F1	F2	F3
200	92,40±0,51 ^a	55,39±0,51 ^b	52,17±1,68 ^c	57,81±1,51 ^b
280	43,50±0,45 ^a	77,82±0,28 ^b	77,57±0,62 ^b	67,52±0,72 ^c
350	99,60±0,45 ^a	25,80±0,19 ^b	16,75±0,90 ^c	19,74±1,23 ^d
400	99,93±0,90 ^a	27,69±0,48 ^b	15,23±0,80 ^c	17,85±2,34 ^c
500	95,16±0,90 ^a	99,99±0,02 ^b	99,34±0,87 ^b	99,97±0,06 ^b
600	99,76±0,74 ^a	36,67±0,43 ^b	21,89±1,91 ^c	30,85±1,32 ^d
700	99,63±0,53 ^a	39,67±0,43 ^b	39,08±2,25 ^b	24,79±1,84 ^c
800	98,68±1,01 ^a	41,34±1,15 ^b	26,64±1,46 ^c	38,12±0,14 ^a
Transparência (T600)	16,23±0,03 ^a	13,06±0,18 ^b	8,64±0,24 ^c	11,28±0,14 ^d

Resultados expressos como média + desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os diferentes filmes ($P \leq 0,05$). Sendo, FC: Filme controle (2% gelatina, 20% glicerol); F1: Filme1 (2% gelatina, 20% glicerol, 5% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico); F2: Filme 2 (2% gelatina, 20% glicerol, 10% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico) e F3: Filme 3 (2% gelatina, 20% glicerol, 15% cera de abelha, 80% SDS, 100% Ácido esteárico).

Normalmente revestimentos biodegradáveis para alimentos devem o mais próximo possível do incolor para serem semelhantes aos polímeros sintéticos. Porém, o tom amarelo dos filmes não é um fator prejudicial, pois tal característica pode evitar a deterioração causada pelos raios UV (VIEIRA et al., 2018).

5.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os resultados da Microscopia Eletrônica de Varredura para os filmes biodegradáveis Controle, F1 (5% de cera de abelha), F2 (10% de cera de abelha) e F3 (15% de cera de abelha) estão apresentados nas Figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

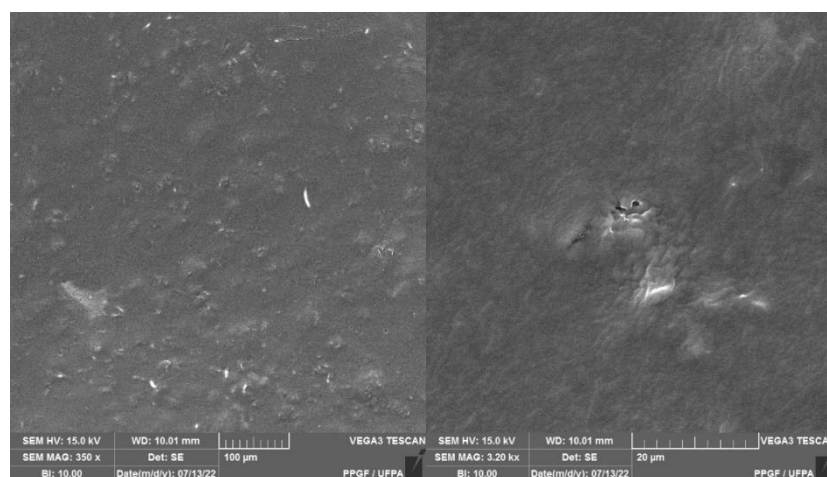


Figura 6: Micrografias da superfície do filme controle (FC), 350X e 3200X.

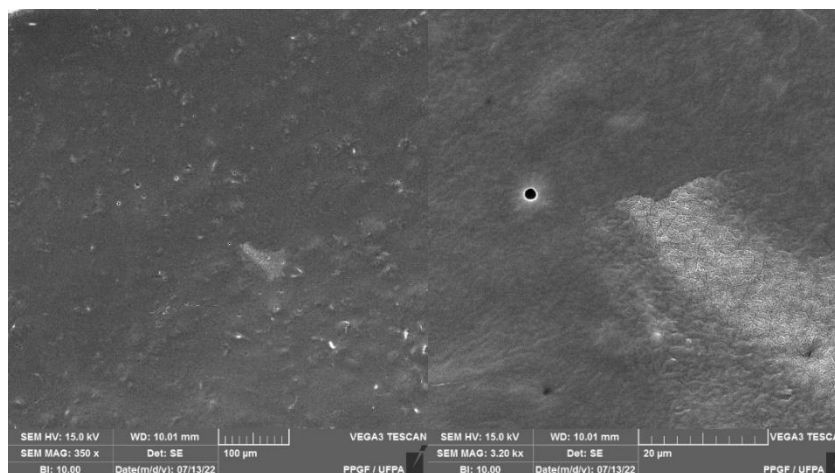


Figura 7: Micrografias da superfície do filme F1 (5% de cera), 350X e 3200X.

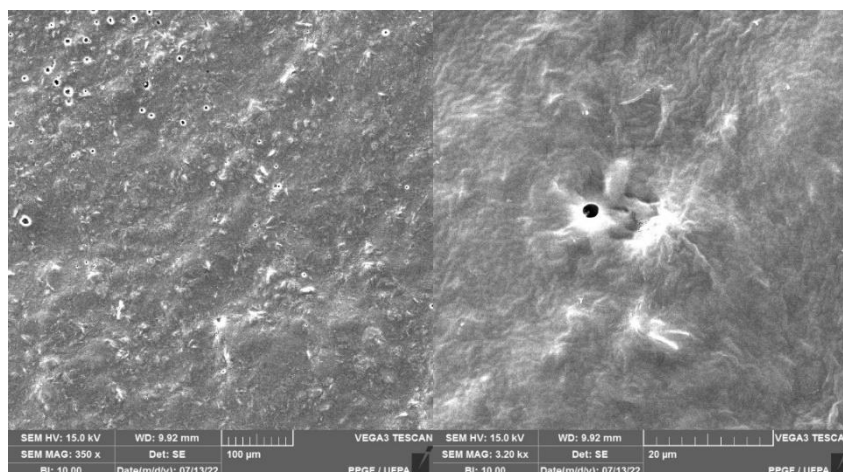


Figura 8: Micrografias da superfície do filme F2 (10% de cera) 350X e 3200X.

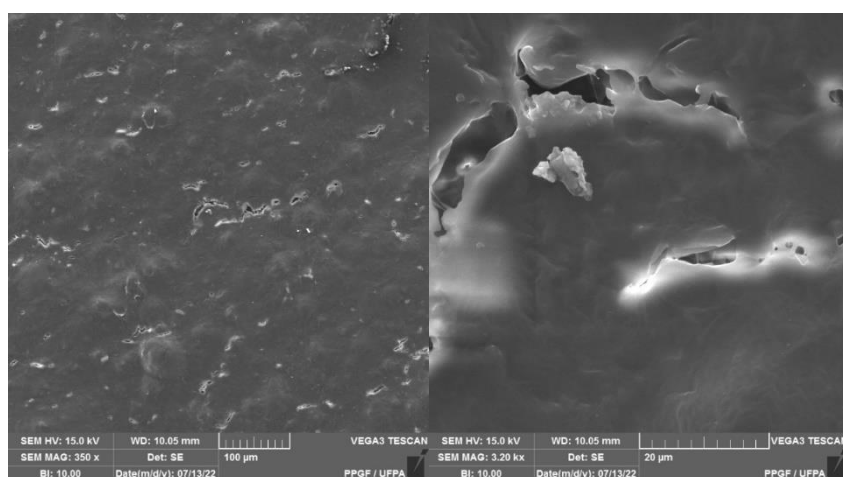


Figura 9: Micrografias da superfície do filme F3 (15% de cera) 350X e 3200X.

A micrografia presente na Figura 6 (Filme Controle) revela uma estrutura pouco homogênea, onde a gelatina formou uma rede contínua e densa. Esta matriz pode ser associada a alta solubilidade, pois contém somente a gelatina que é hidrofílica (75,03%). Também é possível observar pontos brancos presentes sob a matriz. Esses pontos podem ser alguma espécie de material insolúvel que se adicionou a solução filmogênicas. Ademais é possível observar pequenas fendas, como na imagem a 3200X. Tal falha na matriz pode ter sido causado pelo tratamento á vácuo em que os filmes foram submetidos para serem embalados antes de armazenar.

A Figura 7 mostra os resultados da MEV do filme elaborado com 5% de cera de abelha (F1). É possível observar que a cera de abelha se incorporou parcialmente com a matriz proteica, indicando que a adição de baixas concentrações de cera de abelha facilita a homogeneização. Ocorreu a presença de pequenas bolhas (350x) devido a

formação de espuma durante o processo de elaboração do filme e estruturas ásperas (3200x), resultado de porções de cera que não se incorporaram ao filme.

A micrografia do filme com 10% de cera de abelha (F2, Figura 8) revela a presença de muitas irregularidades (350x) e algumas bolhas (3200x) ao longo da matriz que afetaram a espessura e o PVA do filme. É possível perceber que nesta concentração, grande parte do lipídio presente não se incorporou ao filme e formou uma estrutura por cima da matriz causando ressecamento e impressão áspera na superfície do filme.

Na Figura 9 (F3), há muitas estruturas irregulares (350x) e a presença de rachaduras (3200x) na superfície, o que indica a imiscibilidade da cera e do surfactante em altas concentrações, causando uma grande variação da espessura do filme, que por sua vez afeta o PVA. Isso pode ser justificado, pelo fato da cera de abelha ser sólida em temperatura ambiente e quando aquecida as suas partículas assumem formas irregulares que podem se associar em agregados com ampla distribuição de tamanho dificultando a ação dos surfactantes, sendo esperado a formação de bi-camada e irregularidades na espessura como foi visualizado (FABRA et al., 2009).

A adição dos surfactantes SDS e ácido esteárico para homogeneizar a cera de abelha não foi uma boa alternativa, pois tal combinação proporcionou a formação e aprisionamento de bolhas na superfície do filme. Em contrapartida Vieira et al. (2018) elaborou filmes adicionando SDS com ácido esteárico e obteve revestimentos homogêneos e sem presença de bolhas. Isso sugere que adição da cera de abelha alterou a estrutura morfológica do filme de gelatina de peixe refletindo na variação de espessura e alta PVA. Os filmes com maiores concentrações de cera e conseqüentemente surfactante, tiveram alterações morfológicas resultando em coloração esbranquiçada. Davanço et al. (2007) também obteve coloração esbranquiçada em filmes ao utilizar SDS e altas concentrações de ácidos graxos.

A mudança na estrutura morfológica dos filmes pode ser atribuída a não formação de micelas da cera, por não possuir natureza anfifílica, e imiscibilidade da mesma. Onde a adição de altas concentrações não permite ao surfactante emulsionar todos os compostos e há a separação em fases, criando um filme bi-camada (KANICKY; SHAH, 2002).

Na análise microscópica foi possível observar que a emulsão formada não foi estável o suficiente para se manter durante a secagem. A evaporação da água presente

pode ter causado alterações na estrutura devido a casos de desestabilizações da emulsão, como coalescência, floculação e separação em fases e ter gerado aumento da rugosidade superficial, heterogeneidade interna e aspereza superficial. E apesar do caráter hidrofóbico da cera não foi possível observar bons resultados para PVA (FABRA et al., 2009; VIEIRA et al., 2018).

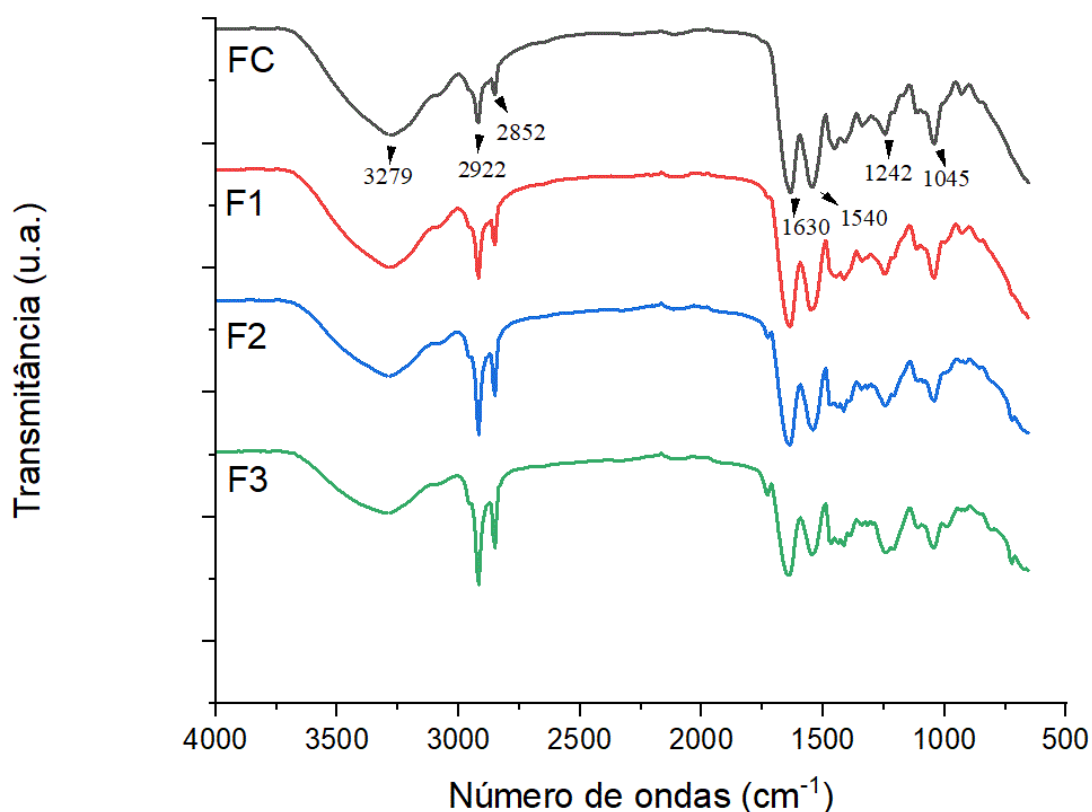


Figura 10: Espectro de FTIR dos filmes controle (FC), Filme 1 (F1), Filme 2 (F2) e Filme 3 (F3).

Na Figura 10 estão apresentados os espectros de FTIR para os filmes FC, F1, F2 e F3. A alteração no comprimento de ondas a partir da alteração dos grupos funcionais permite analisar as interações intermoleculares entre os compostos e explicar as variações das propriedades dos filmes. No espectro do FC estão os valores para cada pico, estes que sofrem variação insignificante em relação aos outros espectros e por isso os valores do número de onda não são discriminados nos outros espectros.

As amostras demonstraram todas as características espectrais típicas de filme de proteína com cera e são encontradas nas regiões de amida, 3279, 2922, 1630, 1540 e 1240 cm^{-1} , correspondendo respectivamente à amida-A (estiramento da ligação NH),

amida- B (estiramento da ligação CH e -NH_3^+) e grupos de estiramento alifático (-CH_3 ou CH_2) adicionados pela cera, amida-I (estiramento da ligação C=O), amida II (oriunda da deformação angular de NH e alongamento da ligação CN) e a amida-III (alongamento de CN e vibração de flexão de NH). O pico 1045 cm^{-1} é devido ao alongamento C-O e vibrações de deformação OH (KAEWPRACHU et al. 2018; SILVA et al. 2021; SUN et al. 2021).

Há um amplo pico de absorção na faixa de 3000 cm^{-1} a 3705 cm^{-1} , na banda de amida I, ele é atribuído a um estiramento N-H , NH_3^+ e CH e ligações de hidrogênio intermoleculares entre as moléculas de C, isso indica a incorporação e interação das moléculas de glicerol na formação do filme (KIRAN; LIN; XUESONG ; LI, 2016; Silva et al. 2021). Há um aumento da amplitude no pico 2922, esse aumento indica a presença de componente hidrofóbico, neste caso adicionado pela cera (Souza, Monte, Pinto. 2011).

Os espectros de FTIR demonstraram variação na amplitude e não variaram no número de ondas, onde, segundo Kaewprachu et al. 2018, indica que não houve interação entre os componentes, justificando os resultados de permeabilidade ao vapor d'água.

6. CONCLUSÃO

A adição de cera de abelha a filmes biodegradáveis de gelatina da pele de peixe atuou muito bem melhorando as características de solubilidade e servindo como barreira a luz, fatores que levam a degradação e oxidação de compostos dos alimentos, levando-os a deterioração.

Dentre as variáveis independentes estudadas, a concentração de cera de abelha foi a que exerceu maior efeito significativo sobre as propriedades estudadas.

Algumas propriedades do filme de gelatina da pele de peixe com cera de abelha, como PVA e MEV, foram afetadas por bolhas e partes insolúveis não visíveis e a estrutura final do filme seco com espaço vazios causados pelas bolhas e rachaduras visíveis e invisíveis a olho nu. A Espectroscopia de infravermelho com transformado de Fourier demonstrou que não houve interação entre os componentes do filme, confirmando os achados para PVA.

Conclui-se que melhorias podem ser feitas para otimizar a homogeneização da cera na gelatina para gerar filmes uniformes. Filmes bi-camadas também podem ser pesquisados a fim de contornar o problema emulsificação da cera.

7. REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. D882-91: **Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Philadelphia: ASTM, 1996. (Annual Book of ASTM Standards).

ADILAH, A. N.; JAMILAH, B.; NORANIZAN, M. A.; HANANI, Z. A. N. Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, 16, p. 1-7, 2018.

AKHTAR, M.-J.; JACQUOT, M.; JAMSHIDIAN, M.; IMRAN, M.; ARAB-TEHRANY, E.; DESOBRY, S. Fabrication and physicochemical characterization of HPMC films with commercial plant extract: Influence of light and film composition. **Food Hydrocolloids**, 31, n. 2, p. 420-427, 2013.

AMIN, U.; KHAN, M. K. I.; KHAN, M. U.; EHTASHAM AKRAM, M.; PATEIRO, M.; LORENZO, J. M.; MAAN, A. A. Improvement of the Performance of Chitosan-Aloe vera Coatings by Adding Beeswax on Postharvest Quality of Mango Fruit. **Foods**, 10, n. 10, 2021.

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; OSAKO, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, 39, p. 58-67, 2014.

ARAÚJO, C. S.; PINO-HERNÁNDEZ, E.; BATISTA, J. T. S.; PEIXOTO JOELE, M. R. SARKIS; REGO, J. A. R.; LOURENÇO, L. F. H. Optimization of fish gelatin drying processes and characterization of its properties. **Scientific Reports**. 11, 20655, 2021.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, 48, p. 51-62, 2016.

AVRAMESCU, S. M.; BUTEAN, C.; POPA, C. V.; ORTAN, A.; MORARU, I.; TEMOCICO, G. Edible and Functionalized Films/Coatings—Performances and Perspectives. **Coatings**, 10, n. 7, p. 687, 2020.

BASWAL, A. K.; DHALIWAL, H. S.; SINGH, Z.; MAHAJAN, B. V. C.; KALIA, A.; S GILL, K. Influence of carboxy methylcellulose, chitosan and beeswax coatings on cold storage life and quality of Kinnow mandarin fruit. **Scientia Horticulturae**, 260, p. 108887, 2020.

BARROS NETO, B. DE; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: UNICAMP, 2003. 299p.

BINDELL, J. B. 2.2 - SEM: Scanning Electron Microscopy. *In*: BRUNDLE, C. R.;EVANS, C. A. e WILSON, S. (Ed.). **Encyclopedia of Materials Characterization**. Boston: Butterworth-Heinemann, p. 70-84, 1992.

BOX, G. E. P.; HUNER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experiments – An introduction to design, data analysis and model building. New York: Wiley Series in Probability and Mathematic Statistics, 1978.

BYRNE, B.; BEATTIE, J. W.; SONG, C. L.; KAZARIAN, S. G. Chapter 1 - ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging of proteins. *In*: OZAKI, Y.; BARANSKA, M.;LEDNEV, I. K. e WOOD, B. R. (Ed.). **Vibrational Spectroscopy in Protein Research**: Academic Press, 2020. p. 1-22.

CAO, W.; YAN, J.; LIU, C.; ZHANG, J.; WANG, H.; GAO, X.; YAN, H.; NIU, B.; LI, W. Preparation and characterization of catechol-grafted chitosan/gelatin/modified chitosan-AgNP blend films. **Carbohydrate Polymers**, 247, p. 116643, 2020.

CARISSIMI, M.; FLÔRES, S. H.; RECH, R. Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. **Algal Research**, 32, p. 201-209, 2018.

CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; DE ANDRADE, E. F.; BERTAN, L. C.; MAFRA, M. R. Effect of the natural surfactant *Yucca schidigera* extract on the properties of biodegradable emulsified films produced from soy protein isolate and coconut oil. **Industrial Crops and Products**, 83, p. 364-371, 2016.

CORTES-RODRIGUEZ, M.; VILLEGAS-YEPEZ, C.; GIL GONZALEZ, J. H.; RODRIGUEZ, P. E.; ORTEGA-TORO, R. Development and evaluation of edible films based on cassava starch, whey protein, and bees wax. **Heliyon**, 6, n. 9, p. e04884, 2020.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2018. 9788582715468.

DERKACH, S. R. Interfacial layers of complex-forming ionic surfactants with gelatin. **Advanced Colloid Interface Science**, 222, p. 172-198, 2015.

DIYANA, Z. N.; JUMAIDIN, R.; SELAMAT, M. Z.; SUAN, M. S. M. Thermoplastic starch/beeswax blend: Characterization on thermal mechanical and moisture absorption properties. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, 190, p. 224-232, 2021.

DUMITRU, C. D.; NEACSU, I. A.; GRUMEZESCU, A. M.; ANDRONESCU, E. Bee-Derived Products: Chemical Composition and Applications in Skin Tissue Engineering. **Pharmaceutics**, 14, n. 4, 2022.

ESHETU, A.; IBRAHIM, A. M.; FORSIDO, S. F.; KUYU, C. G. Effect of beeswax and chitosan treatments on quality and shelf life of selected mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Heliyon**, 5, n. 1, p. e01116, 2019.

LIMPAN, N.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; PRASARPRAN, S. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as

influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**, 100, n. 1, p. 85-92, 2010.

FABRA, M. J.; JIMÉNEZ, A.; ATARÉS, L.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of Fatty Acids and Beeswax Addition on Properties of Sodium Caseinate Dispersions and Films. **Biomacromolecules**, 10, n. 6, p. 1500-1507, 2009.

FARHAN, A.; HANI, N. M. Characterization of edible packaging films based on semi-refined kappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. **Food Hydrocolloids**, 64, p. 48-58, 2017.

FERREIRA, G. V. B.; BARLETTA, M.; LIMA, A. R. A.; DANTAS, D. V.; JUSTINO, A. K. S.; COSTA, M.: Plastic debris contamination in the life cycle of *Acoupa* weakfish (*Cynoscion acoupa*) in a tropical estuary. **ICES Journal of Marine Science**. 73, 1-13, 2016.

FILIPINI, G. d. S.; ROMANI, V. P.; MARTINS, V. G. Biodegradable and active-intelligent films based on methylcellulose and jambolão (*Syzygium cumini*) skins extract for food packaging. **Food Hydrocolloids**, 109, p. 106139, 2020.

FORMIGA, A. S.; PINSETTA, J. S. J.; PEREIRA, E. M.; CORDEIRO, I. N. F.; MATTIUZ, B. H. Use of edible coatings based on hydroxypropyl methylcellulose and beeswax in the conservation of red guava 'Pedro Sato'. **Food Chemistry**, 290, p. 144-151, 2019.

FRASSINETTI, S.; CASTAGNA, A.; SANTIN, M.; POZZO, L.; BARATTO, I.; LONGO, V.; RANIERI, A. Gelatin-based coating enriched with blueberry juice preserves the nutraceutical quality and reduces the microbial contamination of tomato fruit. **Natural Products Research**, p. 1-5, Sep 17 2020a.

FRASSINETTI, S.; CASTAGNA, A.; SANTIN, M.; POZZO, L.; BARATTO, I.; LONGO, V.; RANIERI, A. Gelatin-based coating enriched with blueberry juice preserves the nutraceutical quality and reduces the microbial contamination of tomato fruit. **Natural Products Research**, 35, n. 24, p. 6088-6092, Dec 2020b.

GARCIA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Development of a Sample Preparation Method for Raw Material Evaluation of School Supplies. **Química Nova**, 2015.

GALUS, S.; LENART, A. Optical, mechanical, and moisture sorption properties of whey protein edible films. **Journal of Food Process Engineering**, 42, n. 6, 2019.

GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. CRC press, 2002. 1420031988.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.; FRONING, G. W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, 61, n. 3, p. 585-589, 1996.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. **Journal of Food Engineering**, 92, n. 1, p. 78-85, 2009.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; DÍAZ-CRUZ, C. A.; CASTRO-ROSAS, J.; JIMÉNEZ-REGALADO, E. J.; VELAZQUEZ, G.; GUTIERREZ, M. C.; AGUIRRE-LOREDO, R. Y. Development of Antimicrobial Biodegradable Films Based on Corn Starch with Aqueous Extract of Hibiscus sabdariffa L. **Starch - Stärke**, 73, n. 1-2, p. 2000096, 2020a.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; DÍAZ-CRUZ, C. A.; CASTRO-ROSAS, J.; JIMÉNEZ-REGALADO, E. J.; VELAZQUEZ, G.; GUTIERREZ, M. C.; AGUIRRE-LOREDO, R. Y. Development of Antimicrobial Biodegradable Films Based on Corn Starch with Aqueous Extract of Hibiscus sabdariffa L. **Starch - Stärke**, p. 2000096, 2020b.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. EDIBLE COMPOSITE FILMS OF WHEAT GLUTEN AND LIPIDS - WATER-VAPOR PERMEABILITY AND OTHER PHYSICAL-PROPERTIES. **International Journal of Food Science and Technology**, 29, n. 1, p. 39-50,1994.

HASSAN, B.; CHATHA, S. A. S.; HUSSAIN, A. I.; ZIA, K. M.; AKHTAR, N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, 109, p. 1095-1107, 2018.

HOSSEINI, S. F.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. A state-of-the-art review on the elaboration of fish gelatin as bioactive packaging: Special emphasis on nanotechnology-based approaches. **Trends in Food Science & Technology**, 79, p. 125-135, 2018.

HOSSEINI, S. F.; JAVIDI, Z.; REZAEI, M. Efficient gas barrier properties of multi-layer films based on poly(lactic acid) and fish gelatin. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, 92, p. 1205-1214, 2016.

IBRAHIM, S.; ELSAYED, H.; HASNEIN, M. Biodegradable, Antimicrobial and Antioxidant Biofilm for Active Packaging Based on Extracted Gelatin and Lignocelluloses Biowastes. **Journal of Polymers and the Environment**, 2020.

JAMROZ, E.; KOPEL, P. Polysaccharide and Protein Films with Antimicrobial/Antioxidant Activity in the Food Industry: A Review. **Polymers (Basel)**, 12, n. 6, 2020.

JEYA SHAKILA, R.; JEEVITHAN, E.; VARATHARAJAKUMAR, A.; JEYASEKARAN, G.; SUKUMAR, D. Comparison of the properties of multi-composite fish gelatin films with that of mammalian gelatin films. **Food Chem**, 135, n. 4, p. 2260-2267, 2012.

KANICKY, J. R.; SHAH, D. O. Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. **Journal of colloid and interface science**, 256, n. 1, p. 201-207, 2002.

KAEWPRACHU, P., OSAKO, K., BENJAKUL, S., & RAWDKUEN, S. Effect of protein concentrations on the properties of fish myofibrillar protein based film compared with PVC film. **Journal of Food Science and Technology**, 53(4), 2083–2091, 2016.

KHANZADI, M.; JAFARI, S. M.; MIRZAEI, H.; CHEGINI, F. K.; MAGHSOUDLOU, Y.; DEHNAD, D. Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate-pullulan by application of beeswax. **Carbohydr Polym**, 118, p. 24-29, 2015.

KLANGMUANG, P.; SOTHORNVIT, R. Combination of beeswax and nanoclay on barriers, sorption isotherm and mechanical properties of hydroxypropyl methylcellulose-based composite films. **LWT - Food Science and Technology**, 65, p. 222-227, 2016.

KOUHI, M.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Edible polymers: An insight into its application in food, biomedicine and cosmetics. **Trends in Food Science & Technology**, 103, p. 248-263, 2020.

KROCHTA, J.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Scientific Status Summary-edible and biodegradable polymer films. **Food Technology**, 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

KROCHTA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. **Protein-based films and coatings**, 1, p. 1-40, 2002.

KUORWEL, K. K.; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S. W. Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. **Journal of Food Science**, 76, n. 3, p. R90-R102, 2011.

LIU, Z.; LIN, D.; SHEN, R.; YANG, X. Characterizations of novel konjac glucomannan emulsion films incorporated with high internal phase Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, 109, p. 106088, 2020.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs Glycerol-Plasticized Whey Protein Edible Films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42, n. 4, p. 841-845, 1994.

MENEZES, M.; RIBEIRO, H. L.; ABREU, F.; FEITOSA, J. P. A.; FILHO, M. Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 189, p. 110852, 2020.

Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. **MPA**, Brasília. 129 pp, 2012.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. d. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35, p. 179-189, 2000.

PEREIRA, G. V. d. S.; PEREIRA, G. V. d. S.; NEVES, E. M. P. X.; JOELE, M. R. S. P.; LIMA, C. L. S. d.; LOURENÇO, L. d. F. H. Effect of adding fatty acids and surfactant on the functional properties of biodegradable films prepared with myofibrillar

proteins from acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*). **Food Science and Technology**, 39, n. suppl 1, p. 287-294, 2019.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. Protein-based films and coatings. **Edible coatings and films to improve food quality**, p. 13-77, 2012.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, B.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, 30, n. 1, p. 224-231, 2013.

PHAN THE, D.; DEBEAUFORT, F.; PEROVAL, C.; DESPRE, D.; COURTHAUDON, J.; VOILLEY, A. Arabinoxylan– Lipid-Based Edible Films and Coatings. 3. Influence of Drying Temperature on Film Structure and Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, n. 8, p. 2423-2428, 2002.

RHIM, J. W.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, 15, p. 199 - 205, 2002.

RHIM, J. W.; SHELLHAMMER, T. H. Lipid-based edible films and coatings. *In: Innovations in food packaging*: Elsevier, p. 362-383, 2005.

ROCHA, M. d.; ALEMÁN, A.; ROMANI, V. P.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P.; PRENTICE, C. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. **Food Hydrocolloids**, 81, p. 351-363, 2018.

RUBILAR, J. F.; ZUNIGA, R. N.; OSORIO, F.; PEDRESCHI, F. Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose/whey protein isolate (HPMC/WPI) edible films. **Carbohydrate Polymers**, 123, p. 27-38, 2015.

SANTACRUZ, S.; RIVADENEIRA, C.; CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, 49, p. 89-94, 2015.

SANTHIYA-NAIR, K.; SHANMUGAPRIYA; LOGEISWARIY, P.; SREERAMANAN, S.; SHAKILA, R.; CHEN, Y.; LEONG, Y.-H.; KARUPIAH, S.; SASIDHARAN, S. Chapter 3 - Purification of herbal biomolecules. *In*: MANDAL, S. C.; NAYAK, A. K. e DHARA, A. K. (Ed.). **Herbal Biomolecules in Healthcare Applications**: Academic Press, 2022. p. 47-62.

SHAHIDI, F.; HOSSAIN, A. Preservation of aquatic food using edible films and coatings containing essential oils: a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, 62, n. 1, p. 66-105, 2020a.

SHAHIDI, F.; HOSSAIN, A. Preservation of aquatic food using edible films and coatings containing essential oils: a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, p. 1-40, 2020b.

SILVA, N. D. S. E.; ENRIQUE JOSÉ GREGORIOPINO HERNÁNDEZ; ARAÚJO, C. D. S.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. d. F. H. Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. **CyTA - Journal of Food**, 16, n. 1, p. 340-349, 2018.

SOUZA, V. C.; MONTE, M. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. **International Journal of Food Science & Technology**, 46, n. 9, p. 1856-1862, 2011.

SUDERMAN, N.; ISA, M. I. N.; SARBON, N. M. The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. **Food Bioscience**, 24, p. 111-119, 2018.

SUN, R.; SONG, G.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; CHI, Y.; MA, Y.; LI, H.; BAI, S.; ZHANG, X. Effect of basil essential oil and beeswax incorporation on the physical, structural, and antibacterial properties of chitosan emulsion based coating for eggs preservation. **Lwt**, 150, p. 112020, 2021.

SUYATMA, N. E.; TIGHZERT, L.; COPINET, A.; COMA, V. Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 10, p. 3950-3957, 2005.

VELICKOVA, E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; ALVES, V. D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. **LWT - Food Science and Technology**, 52, n. 2, p. 80-92, 2013.

VIEIRA, L. L.; ARAÚJO, C. d. S.; NEVES, E. M. P. X.; BATISTA, J. T. S.; PEIXOTO JOELE, M. R. S.; LOURENÇO, L. d. F. H. Emulsified films produced with proteins extracted from whitemouth croaker byproducts: Development and characterization. **Boletim do Instituto de Pesca**, 44, n. 3, p. 1-13, 2018.

VILLALOBOS, R.; CHANONA, J.; HERNÁNDEZ, P.; GUTIÉRREZ, G.; CHIRALT, A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, 19, n. 1, p. 53-61, 2005.

XIAO, J.; LI, Y.; HUANG, Q. Recent advances on food-grade particles stabilized Pickering emulsions: Fabrication, characterization and research trends. **Trends in Food Science & Technology**, 55, p. 48-60, 2016.

YANG, K.; DANG, H.; LIU, L.; HU, X.; LI, X.; MA, Z.; WANG, X.; REN, T. Effect of syringic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antibacterial

properties of chitosan film for quail eggs preservation. **Int J Biol Macromol**, 141, p. 876-884, 2019.

ZHANG, T.; DING, M.; TAO, N.; WANG, X.; ZHONG, J. Effects of surfactant type and preparation pH on the droplets and emulsion forms of fish oil-loaded gelatin/surfactant-stabilized emulsions. **Lwt**, 117, p. 108654, 2020.

ZHANG, Y.; SIMPSON, B. K.; DUMONT, M.-J. Effect of beeswax and carnauba wax addition on properties of gelatin films: A comparative study. **Food Bioscience**, 26, p. 88-95, 2018.