



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

JAQUELINE ALVES DE MATOS

**FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS A BASE DO POLISSACARÍDEO
SULFATADO DA ALGA VERMELHA (*Hypnea musciformis*) INCORPORADOS DE
ÁCIDO CAFEICO PARA APLICAÇÃO EM PESCADOS**

FORTALEZA

2020

JAQUELINE ALVES DE MATOS

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS A BASE DO POLISSACARÍDEO
SULFATADO DA ALGA VERMELHA (*Hypnea musciformis*) INCORPORADOS DE
ÁCIDO CAFEICO PARA APLICAÇÃO EM PESCADO

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

M381f Matos, Jaqueline Alves de.
Filmes e revestimentos comestíveis a base do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha (*hypnea musciformis*) incorporados de ácido cafeico para aplicação em pescado / Jaqueline Alves de Matos. – 2020.
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza .

Coorientação: Prof. Dr. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes .

1. Filmes comestíveis. 2. Carragenana. 3. Qualidade. 4. Pescado. I. Título.

CDD 639.2

JAQUELINE ALVES DE MATOS

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS A BASE DO POLISSACARÍDEO
SULFATADO DA ALGA VERMELHA (*Hypnea musciformis*) INCORPORADOS DE
ÁCIDO CAFEICO PARA APLICAÇÃO EM PESCADO

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 07/04/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Juliana Rabelo de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus maiores incentivadores e amados
minha família. Razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por toda luz, amparo e força para seguir até o final dessa caminhada. Aos meus pais Antônio e Maria por serem meus maiores incentivadores e exemplo de perseverança. Aos meus familiares pelo apoio e compreensão durante minhas ausências. Uma grande família, amada e abençoada por Deus, sem eles nada disso seria possível.

Ao Prof. Bartolomeu pela orientação, carinho, paciência, confiança, apoio e incentivo durante esse processo. Foi um privilégio desfrutar da sua experiência, ela me inspirou tornando mais rica depois desta longa etapa. Seus ensinamentos foram além da vida acadêmica, obtive importantes aprendizados para a vida. Agradeço por cada conselho, por cada mão amiga durante quase cinco anos de parceria profissional. Desejo muitas felicidades para sua vida e que nossos caminhos continuem se cruzando por muito tempo.

A professora Gleire por ser uma co-orientadora tão dedicada e sempre disponível para me auxiliar quando precisei, meu muito obrigada.

Aos membros do LATEPE (Laboratório de Tecnologia do Pescado) por toda a parceria, carinho e aprendizado. A Claudia Brandão pela ajuda nas análises microbiológicas, pelo carinho e amizade.

A Diego Alves do Vale um grande amigo e incentivador que ganhei durante essa jornada, esse trabalho também é seu, sem seu apoio os dias seriam bem mais difíceis, muito obrigada meu amigo que Deus continue iluminando seu caminho.

Aos membros do LAMAP (Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado) pela parceria e aprendizados durante a realização de parte dos experimentos.

Um obrigada especial para Gabriel Bezerra Santos companheiro de turma e que esteve sempre presente no decorrer da realização desse trabalho com sua amizade e olhar profissional.

Aos professores integrantes da banca examinadora André Luis Coelho da Silva, Francisca Gleire Rodrigues de Menezes e Juliana Rabelo de Sousa por aceitarem o convite, pela disponibilidade e sugestões que contribuirão para enriquecer este trabalho.

Aos professores do curso de Engenharia de Pesca que desde graduação sempre se disponibilizaram a ajudar com o uso de seus laboratórios, parcerias e incentivos em especial em especial, Reynaldo Amorim Marinho e Aldeney.

A secretaria da pós-graduação Rogéria Maria Setubal Oliveira que sempre atendeu minhas solicitações durante o curso com maior carinho e prontidão. Ao programa de Pós-

graduação em Engenharia de Pesca pela oportunidade em realizar o mestrado, aos alunos da pós-graduação pela amizade e confiança em me nomearem como representante discente do mestrado durante o curso.

A todos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e em especial a Rayane Leitão Claudino, Maíra Saldanha, Jéssica Almeida, Matheus Oliveira, Celso Pires, Vivania Alves, Hálisson Lucas Ribeiro, Lorena Alves, Fabrizia Quaresma, Manuela Vidal, Vanessa de Abreu Pereira, Juliana Rabelo de Sousa pela amizade, carinho, paciência e disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas. Ao Prof. Men de Sá pela parceria, carinho e paciência, obrigada por iluminar meu caminho durante o tempo que pude compartilhar da sua companhia.

Agradeço a Vanessa de Abreu Feitosa que me auxiliou nas análises realizadas durante o projeto e pela amizade.

Obrigada especial a você Niedja Fittipaldi que pelo acaso acadêmico chegou em minha vida e ficou, sou grata pelas correções no meu texto, pelo carinho e amizade, que Deus ilumine seu caminho para que você continue sendo luz na vida das pessoas.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Existem diversas matérias-primas formadoras de filmes e revestimentos comestíveis. Nesse contexto as macroalgas vermelhas se destacam por serem ricas em polissacarídeos sulfatados (PS) tais como a carragenana, que possui boas propriedades mecânicas e de barreira. O presente estudo teve por objetivo produzir filmes comestíveis a base de carragenana, com diferentes concentrações de plastificante (glicerol) e a incorporação de ácido caféico. A carragenana foi extraída a partir da alga vermelha (*Hypnea musciformis*) e caracterizada físico-quimicamente, através das análises de: composição centesimal, DSC, TGA, FTIR, RMN ^1H e ^{13}C e eletroforese em gel. As propriedades físicas, mecânicas e antimicrobiana da solução filmogênica (glicerol + ácido caféico) foram determinadas para avaliar a eficiência desse revestimento, visando possíveis aplicações nos produtos de pescado. A alga vermelha apresentou um rendimento, aproximadamente, de 28,4 % por grama de alga seca e os respectivos valores para composição centesimal referente à umidade, cinzas, lipídeos e proteínas que foram de 20,9 %, 21,28 %, 0,69 % e 14,37 %. Além disso não foram detectados contaminantes protéicos. A avaliação térmica (DSC e TGA) mostrou que o PS é termoestável e pode ser usado na formação de filmes comestíveis. A análise de FTIR identificou a presença de grupos funcionais característicos de agarocolóides. A eletroforese em gel de agarose revelou que o PS apresenta uma banda polidispersa ao longo do gel com característica heterogênea. Nenhum outro substituinte foi identificado pela análise de RMN ^1H e ^{13}C , existindo apenas a presença de sulfato no polissacarídeo. Os filmes comestíveis produzidos neste trabalho apresentaram flexibilidade, homogeneidade e solubilidade em água. Visivelmente, esses filmes exibiram uma coloração verde amarelada e pouca opacidade. A incorporação de glicerol aos filmes promoveu um aumento na permeabilidade ao vapor d'água. Valores baixos de tensão e deformação na ruptura sugerem o uso de um polissacarídeo não purificado. A atividade antimicrobiana foi verificada na solução filmogênica de 2,0 % do PS, apresentando halo de inibição para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Para o ácido caféico, essa atividade foi positiva para bactéria Gram-negativa (*Vibrio parahaemolyticus*) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). Por ser inócuo ao consumidor e biodegradável no meio ambiente, os filmes edíveis produzidos no presente trabalho apresentaram potencial para possíveis aplicação no pescado.

Palavras-chave: Filmes comestíveis. Carragenana. Qualidade. Pescado.

ABSTRACT

There are several materials forming edible films and coatings. In this context, red macroalgae are noted for being rich in sulfated polysaccharides (PS) such as carrageenan, which has good mechanical and barrier properties. The present study aimed to produce edible films based on carrageenan, with different concentrations of plasticizer (glycerol), and the incorporation of caffeic acid. Carrageenan was extracted from red algae (*Hypnea musciformis*) and characterized physically-chemically, through the analysis of: chemical composition, DSC, TGA, FTIR, ^1H NMR and ^{13}C and gel electrophoresis. The physical, mechanical and antimicrobial properties of the film-forming solution (glycerol + caffeic acid) were determined to evaluate the efficiency of this coating aiming at possible applications in fish products. The red algae showed a yield of approximately 28.4 % of the carrageenan per weight of dry algae, in addition no protein contaminants were detected. The values obtained for the centesimal composition referring to moisture, ash, lipids and PS proteins were 20.9 %, 21.28 %, 0.69 % and 14.37 %, respectively. Thermal evaluation (DSC and TGA) showed that the PS is thermostable and can be used in the formation of edible films. FTIR analysis identified the presence of functional groups characteristic of agarocolloids. Agarose gel electrophoresis revealed that the PS has a polydispersed band along the gel with a heterogeneous characteristic. No other substituents were identified by ^1H NMR and ^{13}C analysis, with only the presence of sulfate in the polysaccharide. The edible films produced in this work showed flexibility, homogeneity and solubility in water. Visibly, these films exhibited a yellowish green color and low opacity. The incorporation of glycerol in the films promoted an increase in water vapor permeability. Low stress and strain values at break suggest the use of a not purified polysaccharide. An antimicrobial activity was verified in the 2.0% PS filmogenic solution, presenting an inhibition halo for Gram-negative and Gram-positive bacteria. For coffee acid, this activity was positive for Gram-negative bacteria (*Vibrio parahaemolyticus*) and Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*). As it is produced in the consumer and biodegradable in the environment, edible films are allowed in the present work, potentially having potential for application in fish.

Keywords: Edible films. Carrageenan. Lifetime extension. Fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alga marinha vermelha (<i>Hypnea musciformis</i>)	22
Figura 2 – Estrutura química repetitiva de carragenanas D- alternantes e L- alternantes respectivamente	23
Figura 3 – Esquema da estrutura química das carragenanas	24
Figura 4 – Estrutura química da molécula ácido 3,4-diidroxicinâmico (ácido cafeico)	28
Figura 5 – Fluxograma do processo de extração do polissacarídeo sulfatado da vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	35
Figura 6 – Células de permeação para determinação da PVA contendo filme comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da <i>Hypnea musciformis</i>	44
Figura 7 – Mesa agitadora contendo filme comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da <i>Hypnea musciformis</i> para determinação da solubilidade	45
Figura 8 – Sistema para cor através do método de Hunter	46
Figura 9 – Prensa estampadora pneumática utilizada para corte dos filmes (corpos de prova)	47
Figura 10 – Corpo de prova acoplado ao equipamento do (EMIC)	48
Figura 11 – Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do PS da <i>Hypnea musciformis</i>	53
Figura 12 – Análise termogravimétrica (TGA) da kappa-carragenana extraída da alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	54
Figura 13 – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o PS extraído da <i>Hypnea musciformis</i> na faixa de 4500 a 500 cm ⁻¹	55
Figura 14 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H e ¹³ C) para o PS extraído da <i>Hypnea musciformis</i> (ligação éster sulfato no anel de galactose)	56
Figura 15 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H e ¹³ C) para o PS extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sinais característicos dos carbonos anoméricos das unidades de galactose 4 – sulfatada (δ 102,4 ppm) e 3,6-	57

anidro-alfa-D-galactopiranosose (δ 94,9 ppm)	
Figura 16 – Revelação das frações de κ -CAR obtidas da alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> por eletroforese em gel de agarose a 0,5%, corados com azul de toluidina a 1,0%	58
Figura 17 – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes de carragenana (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha <i>H. musciformis</i> com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e ácido cafeico (0,25%)	59
Figura 18 – Filmes elaborados com polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha <i>Hypnea musciformis</i> com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e 0,25% de ácido cafeico)	60
Figura 19 – Verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para PS extraído da alga vermelha <i>H. musciformis</i> , com solução de 2,0% de PS, 0,25% de ácido cafeico e água destilada estéril (controle) frente as bactérias Gram-negativas (<i>E. Coli</i> , <i>S. entérica</i> e <i>V. parahaemolyticus</i>) e Gram-positiva (<i>S. aureus</i>)	70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores de Permeabilidade ao vapor da água (PVA) e espessura (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *Hypnea musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) 61
- Tabela 2 – Valores de Solubilidade e peso (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *Hypnea musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) 63
- Tabela 3 – Valores de Luminosidade, a*, b* e Opacidade (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *Hypnea musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e ácido cafeico (0,25%) 64
- Tabela 4 – Valores da média (\pm desvio padrão) das propriedades mecânicas dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *Hypnea musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) 66
- Tabela 5 – Verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para a concentração de 2,0% de PS extraído da alga vermelha *Hypnea musciformis*, solução de 0,25% de ácido cafeico e água destilada estéril (controle) frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella* entérica) 68
- Tabela 6 – Custo de produção das soluções de revestimento produzido a partir do PS extraído da alga vermelha *Hypnea musciformis* 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AC	Ácido cafeico
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CuO	Óxido de cobre
DSC	Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura
EMPRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
FTIR	Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HCL	Ácido clorídrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
LATEPE	Laboratório de Tecnologia do Pescado
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂	Oxigênio
PUFA	Ácidos graxos insaturados
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Se	Selênio metálico
TGA	Análise Termogravimétrica
TS	Resistência à tração
Iota (ι)	Iota carragenana
Kappa (κ)	Kappa carragenana
Lambda (λ)	Lambda carragenana
Mu (μ)	Mu carragenana
Nu (ν)	Nu carragenana
Teta (θ)	Teta carragenana
PVA	Permeabilidade ao Vapor de Água
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UR	Umidade Relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

R\$ Real

% Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Algas marinhas	20
2.1.1	<i>Alga marinha vermelha Hypnea musciformis</i>	21
2.2	Polissacarídeos de algas marinhas	22
2.2.1	<i>Processos de extração de polissacarídeos de algas marinhas</i>	24
2.3	Filmes e revestimentos comestíveis	25
2.4	Ácido cafeico	27
2.5	Considerações gerais sobre bactérias patogênicas a ingestão de pescado	28
2.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.5.2	<i>Escherichia coli</i>	29
2.5.3	<i>Salmonella entérica</i>	30
2.5.4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	30
2.6	Antimicrobianos	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Material biológico	34
4.2	Processos de extração do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	34
4.3	Caracterização do polissacarídeo sulfatado da <i>Hypnea musciformis</i>	35
4.3.1	Composição centesimal do polissacarídeo	35
4.3.1.1	<i>Determinação de Umidade</i>	36
4.3.1.2	<i>Determinação de Cinzas</i>	36
4.3.1.3	<i>Determinação de Proteínas</i>	37
4.3.1.4	<i>Determinação de Lipídios</i>	38
4.4	Rendimento da extração do polissacarídeo	38
4.5	Determinação do conteúdo de proteína	39
4.6	Análise térmica do polissacarídeo sulfatado da <i>Hypnea musciformis</i>	39
4.6.1	<i>Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	39

4.6.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	40
4.6.3	<i>Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	40
4.6.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H e ¹³C)</i>	40
4.6.5	<i>Determinação do perfil eletroforético da carragenana por eletroforese em gel de agarose</i>	41
4.7	Produção e caracterização dos filmes de polissacarídeo sulfatado da alga vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	41
4.7.1	<i>Preparo das soluções dos filmes comestíveis</i>	41
4.8	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes	42
4.9	Métodos de avaliação das propriedades dos filmes comestíveis do polissacarídeo sulfatado da <i>Hypnea musciformis</i>	42
4.9.1	<i>Aspecto visual e manuseabilidade</i>	43
4.9.2	<i>Propriedades de barreira</i>	43
4.9.2.1	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	43
4.9.2.2	<i>Solubilidade</i>	45
4.9.3	<i>Propriedade óticas</i>	45
4.9.3.1	<i>Cor</i>	45
4.9.3.2	<i>Opacidade</i>	46
4.9.4	<i>Avaliação das propriedades mecânicas</i>	46
4.9.4.1	<i>Corpos de prova</i>	47
4.9.4.2	<i>Ensaio de tração</i>	47
4.10	Avaliação da atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha <i>Hypnea musciformis</i> e do ácido cafeico	48
4.10.1	<i>Bactérias-teste</i>	49
4.10.1.1	<i>Preparo dos inóculos bacterianos</i>	49
4.11	Custo de produção para as soluções filmogênicas	50
4.12	Análises Estatísticas	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Composição centesimal da alga <i>Hypnea musciformis</i>	51
5.2	Rendimento e composição química do polissacarídeo sulfatado da alga	51

	<i>Hypnea musciformis</i>	
5.3	Degradação térmica do polissacarídeo sulfatado da <i>Hypnea musciformis</i> ...	53
5.3.1	<i>Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	53
5.3.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	54
5.3.3	<i>Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	55
5.3.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H e ¹³C)</i>	56
5.3.5	<i>Determinação do perfil eletroforético da carragenana por eletroforese em gel de agarose</i>	57
5.4	Produção e caracterização dos filmes de polissacarídeo sulfatado da alga vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	58
5.4.1	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes</i>	58
5.4.2	<i>Aspecto visual e manuseabilidade</i>	59
5.4.3	<i>Propriedades de barreira</i>	61
5.4.3.1	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	61
5.4.3.2	<i>Solubilidade</i>	62
5.4.4	<i>Propriedade óticas</i>	64
5.4.4.1	<i>Cor e opacidade</i>	64
5.4.5	<i>Avaliação das propriedades mecânicas</i>	66
5.4.5.1	<i>Ensaio de tração</i>	66
5.4.6	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha <i>Hypnea musciformis</i> e do ácido cafeico</i>	68
5.4.7	<i>Custo de produção para as soluções filmogênicas</i>	70
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia procura constantemente novas estratégias para aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. Uma técnica bastante difundida é a utilização de filmes e revestimentos edíveis, essa tecnologia possui grande potencial para alcançar tal objetivo assegurando a segurança microbiológica e a proteção dos alimentos da influência de fatores externos, como a oxidação lipídica.

Os filmes comestíveis fornecem um reforço de camadas naturais para evitar as perdas de umidade, permitindo o intercâmbio no controle da passagem de gases como o dióxido de carbono (CO₂) e o oxigênio (O₂) (SABERI *et al.*, 2016). Embora conservantes sintéticos ou químicos sejam usados na elaboração de filmes para manter a qualidade durante o armazenamento, os consumidores atualmente buscam por alimentos sem conservantes, isso faz com que o interesse na elaboração de produtos à base de aditivos naturais seja intensificado (JEON *et al.*, 2002).

O uso de antioxidantes é uma alternativa na qual irá prolongar o *shelf life* (validade) nos produtos. De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, PORTARIA Nº 540-SVS/MS, DE 27/10/1997), qualquer aditivo alimentar é considerado como ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Essa definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

As moléculas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas se fazem presente como aditivos alimentares por se comportarem como agentes gelificantes, espessantes e emulsificantes em diferentes preparações na indústria alimentícia. Além dessas propriedades, estudos relatam outras aplicações desses compostos tais como antivirais, antifúngicos, antibacterianos, antioxidantes e anti-inflamatórios GUPTA; ABU- GHANNAM, 2011; CHOJNACKA *et al.*, (2012).

Os plastificantes são classificados como aditivos que auxiliam nas propriedades mecânicas dos polímeros nos quais foram adicionados, aumentando sua flexibilidade e a mobilidade das macromoléculas modificando a viscosidade do sistema (RABELLO, 2000).

Diversos plastificantes são usados em filmes comestíveis, dentre eles o glicerol ganha destaque devido a sua estabilidade e compatibilidade com as cadeias poliméricas dos filmes tornando-se um dos agentes plastificantes mais utilizados na composição de soluções filmogênicas (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2014; ASSIS; BRITO 2014).

Tendo em vista as propriedades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização química e térmica do polissacarídeo sulfatado (carragenanas) de alga vermelha (*Hypnea musciformis*), elaborar e caracterizar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes comestíveis a base do polissacarídeo sulfatado com diferentes concentrações de plastificante (glicerol) e incorporação de ácido cafeico e avaliar atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas para possíveis aplicações em pescado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Algas marinhas

As algas marinhas são organismos autotróficos que desempenham papéis importantíssimos para a manutenção e sustentação da estrutura dos ecossistemas costeiros, servindo de berçário a diversas formas primárias de vida marinha. A fisiologia, composição bioquímica e ciclo de vida desses organismos irão determinar a sua classificação. As algas marinhas estão agrupadas em três divisões ou filos: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas marrons ou pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (GUIMARÃES, 2017).

A forma de classificação das algas pela pigmentação inicialmente foi realizada pelo Harvey em 1836 e até hoje é utilizada como método de diferenciação. Porém, a presença de outros pigmentos fotossintetizantes a exemplo dos carotenóides e xantofilas pode induzir ao erro, confundindo o grupo quando separados com base na sua composição pigmentar. Esses organismos desempenham um papel econômico importante por apresentarem polissacarídeos em suas paredes, componentes usados desde alimentação, indústria farmacêutica, até assim como fertilizantes.

A utilização das algas como fonte de alimentação gerou interesse no desenvolvimento de pesquisas em relação a sua composição química, comprovando a existência de um conteúdo significativo de proteínas, vitaminas, sais minerais e polissacarídeos, estes amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícia e biotecnológica. Os polissacarídeos são substâncias mucilaginosas extraídas das paredes de algas vermelhas e pardas, são compostos formadores de géis em solução aquosa, além de possuírem propriedades de ação gelificante, emulsificantes e estabilizantes. Esses ficocolóides são classificados em três tipos: alginato, ágar e carragenana e de acordo com suas propriedades físicas o seu uso pode ser diverso.

2.1.1 Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*

O gênero *Hypnea* foi descrito por Lamouroux (1813) onde se baseou em seis espécies, onde a espécie do tipo *H. musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux (Kylin 1930, Papenfuss 1968), que recebeu esse nome por possuir uma semelhança com um musgo Hypnum Linnée. O gênero *Hypnea* compreende aproximadamente 67 espécies apresentando tamanho de talo que varia de 3 a 50 cm dependendo do táxon e está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais. *Hypnea musciformis* (Figura 1) é uma das representantes das algas vermelhas com ampla distribuição no litoral brasileiro e grande interesse econômico.

A ficoeritrina é o pigmento que confere a coloração avermelhada as rodofíceas. Apresentam clorofilas a e d, além dos pigmentos acessórios aloficocianina e ficocianina, estes encontram-se presentes nos tilacóides não empilhados, assim como pigmentos fotoprotetores (carotenóides). Apresentam talos ricos em polissacarídeos sulfatados, conhecidos como k-carragenana, características comumente encontradas nas rodofíceas (NAUER *et al.*, 2015).

A composição química das algas vermelhas consiste em: materiais inorgânicos, carboidratos, que são os principais componentes desses organismos, traços de lipídios, maior teor proteico, além de algumas espécies apresentarem conteúdo de fibras elevado (VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013).

A exploração de algas vermelhas tornou-se uma atividade importante nos últimos anos, pois a maioria dos gêneros das espécies algas vermelhas (*Eucheuma*, *Gracilaria*, *Hypnea*, *Kappaphycus*) são destinadas para a produção de alimentos humanos, assim como para a extração de ágar e carragenana, substâncias gelatinosas de grande importância comercial, usados na produção de aditivos alimentares (PEREIRA *et al.*, 2013).

Esse polissacarídeo sulfatado presente na parede celular dessas macroalgas configura o seu potencial econômico no litoral brasileiro pela utilização nas indústrias alimentícias e suas diversas aplicações, o que resulta em uma maior motivação para maricultura e caracterização bioquímica e farmacológica do ficocolóide de *H. musciformis* (MUÑOZ, 2011). Sua distribuição no litoral brasileiro ocorre em marés calmas e rasas, outros pontos de encontro dessas algas são os recifes, rochas, costas, estuários que vai desde litoral do Rio Grande do Sul até o litoral do Estado do Maranhão (NUNES *et al.*, 2013), essa espécie

tolera uma ampla gama de temperaturas da água, salinidades e intensidades de luz (YOKOYA; OLIVEIRA, 1992).

Figura 1 – Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2 Polissacarídeos de algas marinhas

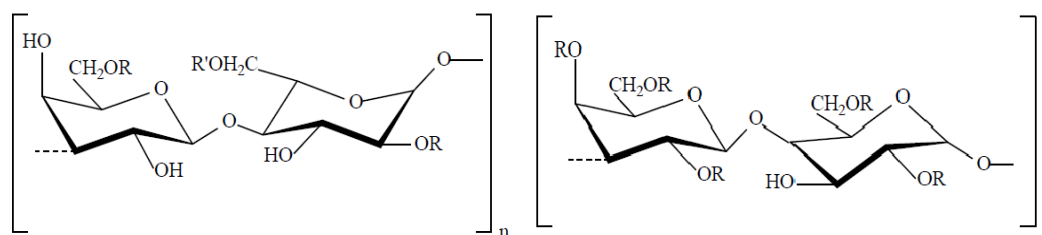
Os polissacarídeos sulfatados (PSs) são definidos como macromoléculas de estruturas complexas carregadas negativamente. Por possuírem pelo menos um grupo sulfato, esses polímeros de açúcares são heterogêneos e podem ser encontrados nas matrizes extracelulares das algas marinhas onde estão intimamente ligados a desempenharem papéis fisiológicos da vida desses organismos, como proteção contra a desidratação solar em períodos onde existe a oscilação entre marés (PERCIVAL; DOWELL, 1967).

A fonte mais importante de PS de origem não animal ocorre pela extração nas algas marinhas, possuindo uma ampla aplicação, além de serem naturalmente ativas. A variação desses polímeros tanto na estrutura quanto na concentração dependerá das condições ambientais e da espécie (COSTA *et al.*, 2010). Nas algas vermelhas os PSs são encontrados na forma de galactanas (carragenanas e ágar) compostos comercialmente exploradas em toda a indústria alimentícia. O interesse pelo estudo desses PSs isolados vem crescendo ao longo dos anos devido suas inúmeras atividades como ação anticoagulante, antioxidantes, anticancerígena, antialérgica e anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2010).

Os ficocolóides agaranas (ou simplesmente ágar) e carragenana possuem fibras dietéticas solúveis e insolúveis que retém água em maior quantidade quando comparados às fibras celulósicas. Essa habilidade de aumentar a viscosidade, formação de géis e / ou atuar como emulsificantes desperta o interesse para pesquisas (ELLEUCH *et al.*, 2011). As

carragenanas e agaranas são galactanas sulfatadas que diferem na configuração estereoquímica de suas moléculas, sendo atribuída a série D para as carragenanas e L para as agaranas (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química repetitiva de carragenanas D- alternantes e L- alternantes respectivamente.



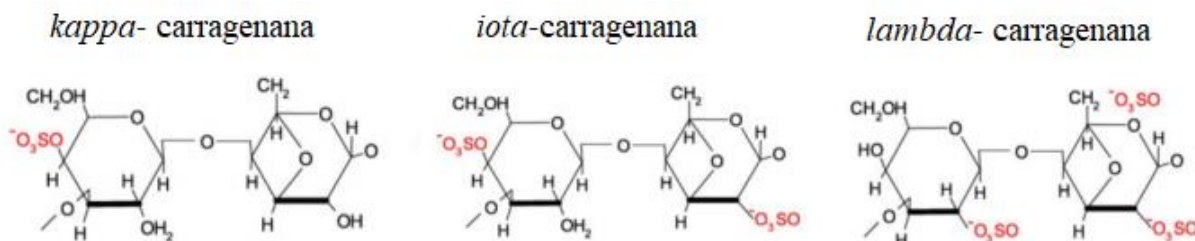
Fonte: ANDRADE (2016).

As algas marinhas vermelhas possuem galactanas sulfatadas como a classe química de polissacarídeos sulfatados encontrada nas suas paredes celulares. As carragenanas e agaranas diferem entre si quanto a estereoquímica molecular e são os hidrocolóides com aplicações amplas na indústria alimentícia (SALTMARSH, 2014). As galactanas sulfatadas (GS) são compostas por um grupo de carragenanas que possuem modificações originadas de substituições das hidroxilas livres e que tem suas formas básicas, (Figura 3) divididas em seis grupos: Iota (ι) -, Kappa (κ) -, Lambda (λ) -, Mu (μ) -, Nu (ν) - e Teta (θ) - CAR. Tal classificação é de suma importância comercialmente para que ocorra a diferenciação das diversas fontes de espécies de rodofíceas produtoras (RODRIGUES *et al.*, 2011).

O conteúdo de carragenana presente em algas varia de 30% a 60% do seu peso seco, e esse valor varia devido a espécie da alga e das condições marinhas em que as mesmas são submetidas, tais como luminosidade, nutrientes, temperatura e oxigenação da água. Diversas espécies de algas são produtoras de carragenanas do tipo kappa, iota e lambda. Existe ainda as carragenanas de composição mista, como kappa/iota, kappa/lambda ou iota/lambda, produzidas a partir de algumas espécies de algas. As espécies produtoras de carragenana tipo kappa são a *Hypnea musciformis*, a *Gigartina stellata*, a *Eucheuma cottonii*, a *Chondrus crispus* e a *Iridaea*. As espécies produtoras de carragenana tipo iota são a *Gigartina* e a *Eucheumaspinosum*. As espécies produtoras de carragenana tipo lambda são,

em geral, o gênero *Gigartina*.

Figura 3 - Esquema da estrutura química das carragenanas.



Fonte: Adaptado de FURLAN (2016).

2.2.1 Processos de extração de polissacarídeos de algas marinhas

Os procedimentos de extração e purificação de polissacarídeos tem como finalidade a obtenção desses compostos sejam eles na sua forma purificada ou não, e isso irá depender do tipo de metodologia empregada durante o processo. Relacionar o processo de extração com o tipo de polissacarídeo que pretende obter é de suma importância, pois tal procedimento vai influenciar diretamente nas propriedades funcionais desses compostos, como por exemplo no teor de sulfato da amostra e provavelmente no peso molecular da fração extraída.

Metodologias que utilizam variações de tempo e temperatura durante a extração destinam-se basicamente a obtenção de rendimento do polissacarídeo e nas propriedades de força do gel e viscosidade em que esse ficolóide é capaz de formar. A extração aquosa é um método bastante utilizado para a obtenção de polissacarídeos descrito na literatura, basicamente envolvem lavagens da alga seca para remoção de sais, areia, resíduos e microrganismos, seguidas de digestão em água quente ou ainda em soluções levemente alcalinas visando a obtenção de seus teores e propriedades. Antes de analisar sua estrutura química e propriedades físicas é indicado o tratamento de diálise, para a remoção de pequenas contaminações e aditivos, tais como sais inorgânicos e açúcares (MONTOLALU *et al.*, 2008).

É de suma importância que os processos de extração sejam aplicados de forma eficiente para a obtenção de bons rendimentos do ficolóide visto que, o mesmo pode variar de certas espécies de algas marinhas devido à sazonalidade, época do ano e fatores abióticos

como luz, temperatura e salinidade. O desenvolvimento e uso de procedimentos de extração consistentes também auxiliam em uma melhor compreensão dos componentes químicos e suas respectivas funções existentes nesses compostos.

Apesar de não existir protocolos padronizados de extração e purificação desses polissacarídeos, diversos estudos servem como embasamento para que a metodologia de extração seja realizada da forma mais eficiente possível.

2.3 Filmes e revestimentos comestíveis

Os filmes poliméricos são comumente preparados por um método denominado *casting*, onde inicialmente o polímero é solubilizado num solvente apropriado, em seguida aditivos como agentes reticulantes e/ou plastificantes são adicionados na concentração desejada. Posteriormente a solução é vertida em um suporte e seca em estufa ou à temperatura ambiente (PACHECO, 2016).

Por possuírem funções semelhantes às embalagens convencionais, os filmes comestíveis atuam como barreira a vapor de água e gases, garantindo a integridade dos alimentos. A biocompatibilidade, baixo custo e prolongação da vida útil do produto são características comuns desses materiais (GALUS e KADZIŃSKA, 2016).

As propriedades mecânicas dos filmes comestíveis podem ser melhoradas através de meios físicos, químicos ou métodos enzimáticos, isso resultará no maior desempenho da película protetora. Esses métodos são aplicados para melhorar o desempenho dos filmes como a permeabilidade ao vapor de água. Uma prática comum é a introdução de materiais compósitos como a junção de polissacarídeos e proteínas, esses materiais proporcionam melhores efeitos quando aplicados individualmente (CHENG *et al.*, 2019).

Filmes e revestimentos comestíveis vêm se tornando atualmente uma alternativa econômica e principalmente sustentável na elaboração de embalagens utilizando polímeros naturais com ampla disponibilidade como proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Os polímeros são um dos materiais mais usados na indústria, possuindo um potencial de aplicação multidimensional, com desenvolvimento e produção de tecnologia para a viabilização dos polímeros como fontes renováveis (DILARRI *et al.*, 2016).

Os biopolímeros naturais apresentam diversas vantagens em relação aos polímeros sintéticos, porém, seu uso é limitado devido seu caráter hidrofílico. Essa característica gera grandes modificações na sua textura e conseqüentemente suas propriedades

mecânicas, de transporte e solubilidade serão afetadas. A incorporação de compostos como plastificantes melhoram as propriedades mecânicas dos filmes comestíveis (VALE, 2017).

Filmes e revestimentos a base de polissacarídeos geralmente possuem uma estrutura com pouca flexibilidade conferindo ao material uma estrutura frágil e quebradiça. Assim é de suma importância a incorporação de um plastificante na estrutura desses materiais para que o mesmo possa exercer as propriedades mecânicas dos filmes. Os benefícios dependerão do tipo e concentração em que o plastificante será aplicado. Os plastificantes são substâncias amplamente usados na categoria de aditivos com intuito de proporcionar uma melhoria nas propriedades mecânicas de biomateriais, como flexibilidade e processabilidade (GAO *et al.*, 2016).

Eles atuam como redutores de forças intermoleculares entre cadeias de polímero e energia utilizadas para o movimento molecular e a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias, o que resultará em um aumento livre e conseqüentemente a mobilidade molecular. Plastificantes atuam ainda na modificação de propriedades físicas de polímeros, tais como propriedades térmicas e mecânicas. Os plastificantes são aditivos essenciais nos revestimentos e películas protetoras cuja base seja um biopolímero, pois, serão observadas melhorias na sua flexibilidade, diminuição da fragilidade, manutenção da integridade, deformação sem ruptura, ausência de poros e fissuras na matriz polimérica e manuseio de filmes (MÓNICA *et al.*, 2018).

Dentre os plastificantes mais usados o glicerol se destaca por ser um produto com grande disponibilidade, possui propriedades hidrofílicas pode ser utilizado como um material de partida para a produção de diferentes produtos químicos, além de sua boa estabilidade e a natureza não tóxica e baixa exsudação. O nome glicerol deriva da palavra grega *glykys* que em português significa doce, característica presente no seu gosto. Quimicamente o glicerol é um triálcool com 3 carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3 propanotriol, é um líquido incolor sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. (VALE, 2017).

As interações entre os constituintes (polímero, solvente, reticulantes e outros aditivos), as concentrações dos componentes usados na solução filmogênica, o processo de formação, o tipo de dispersão da solução para formação do filme, a força iônica entre polímero e reticulante e o processo de secagem é que vão conferir as características finais dos filmes (PACHECO, 2016).

2.4 Ácido cafeico

O ácido 3,4-dihidroxicinâmico é assim denominado por possuir duas hidroxilas no anel do ácido cinâmico nas posições 3 e 4, é o ácido fenólico mais representativo sendo encontrado em café, vinhos, ervas legumes e frutas, possuindo boa biocompatibilidade e biodegradabilidade sendo o principal representante dos ácidos hidrocínâmicos. Os ácidos fenólicos são um grupo diverso de metabolitos secundários de plantas aromáticas, assim o ácido cafeico por ser um composto fenólico produzido a partir de plantas é considerado como um composto orgânico farmacologicamente seguro possuindo características anticancerígena, antimicrobianos, anti-inflamatória, antioxidante e efeitos imunomoduladores (SEVDAN YILMAZ, 2019).

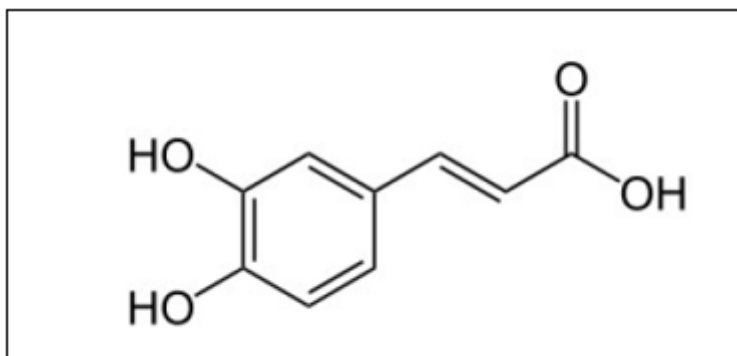
Outro destaque para tal composto é a sua utilização como agente reticulante de proteína que tem como finalidade melhorar características dos filmes a base de polissacarídeo. A rede reticulada pode aumentar a resistência à tração do filme resultante, embora isso geralmente reduza sua tenacidade e alongamento na ruptura. O ácido cafeico possui diversas formas como ésteres e amidas possuindo maior lipofilicidade com as células eucarióticas, sendo assim seus ésteres são amplamente distribuídos nos vegetais. Dentre os diversos ésteres encontrados podemos destacar o composto fenólico mais bioativo denominado de éster fenetil. Possuidor de um grande espectro de atividades farmacológicas, o mesmo é um componente da própolis presente na colmeia de abelhas (ARAUJO, 2017).

Diversos estudos demonstram que os ésteres presentes no ácido cafeico possuem grande variedade de atividades biológicas, sendo capazes de exercerem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Apergillus flavus*. O ácido cafeico, é empregado como antioxidante natural para inibir a oxidação de lipídios de peixes presentes em diferentes matrizes alimentares (ARAUJO, 2017). Por serem amplamente distribuídos e comuns em sementes, frutas, tubérculos e partes herbáceas de muitas espécies vegetais, os ácidos hidroxicinâmicos ganharam espaço como antioxidantes alimentares ditos como naturais, (BRAVO, 1998).

Assim como outros compostos fenólicos, podem capturar diretamente os radicais livres ou eliminá-los através de uma série de reações acopladas a enzimas antioxidantes retardando o início da oxidação lipídica através da decomposição de hidroperóxidos (LEWIS, 1993). A estrutura molecular do ácido cafeico (figura 4), contém um grupo catecol com uma

cadeia de ácido carboxílico não saturada α , β que será eficiente por sua interação com vários tipos de radicais oxidantes (BORS *et al.*, 1995).

Figura 4 – Estrutura química da molécula ácido 3,4-diidroxicinâmico (ácido cafeico)



Fonte: OLIVEIRA (2017)

Assim, frente a essas informações, a adição de aditivos alimentares com ação antioxidante como ácido cafeico na formulação de filmes e revestimentos comestíveis torna-se uma importante ferramenta para minimizar a perda de qualidade do pescado prolongando o seu tempo de prateleira (OLIVEIRA, 2017).

2.5 Considerações gerais sobre bactérias patogênicas a ingestão de pescado

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 25% das mortes mundiais são causadas por infecções bacterianas, nos países em desenvolvimento esse número chega a 47% gerando de 13 a 17 milhões de óbitos por ano. Quando analisada particularmente as doenças fúngicas tiveram um aumento nas últimas duas décadas gerando em torno de 1,5 milhões de mortes por ano, assim a doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos são ainda um problema de saúde mundial necessitando de medidas preventivas ou remediadoras (ARAÚJO, 2017).

Comumente distribuídas nos mais diversos ambientes, frequentemente as bactérias como: *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são isolados em pescado (peixes, camarões, moluscos bivalves, caranguejos, sushis e sashimis). Por serem patógenas ao homem e não deterioradoras do produto normalmente não alteram a aparência do pescado, porém, a legislação estabelece limites para esses microrganismos a fim de sanar possíveis Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) e infecções (VIEIRA, 2004).

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertence à família Micrococcaceae, um grupo de bactérias Gram-positivas, em forma de coco. Atua como comensais na pele presente nas mãos e garganta, quando ocorre um desequilíbrio na microbiota do indivíduo esse microrganismo gera no hospedeiro a gastroenterite, doença mais comum provocada pela ingestão de alimentos que apresentam sua toxina pré-formada, onde o agente casual do surto não é a bactéria e, sim sua toxina (SANTIAGO, 2013).

A falta de higienização por parte dos manipuladores cria uma oportunidade de contaminação para o alimento gerando um risco potencial a saúde. Esse microrganismo é muito conhecido por sua patogenicidade ao homem e outros animais, sendo responsável por uma grande produção de enterotoxinas e, portanto, agente causador de graves intoxicações, quer sejam de origem alimentar ou não (VIEIRA, 2004). Medidas de controle na higiene pessoal dos manipuladores durante o manuseio e processamento do pescado evitaria a contaminação cruzada por meio de utensílios e equipamentos, contribuindo assim para a redução dos níveis de contaminação do produto (VIEIRA, 2004).

2.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, apresenta-se sob forma de bastonetes retos isolados ou aos pares. Microrganismo não esporogênico, anaeróbio facultativo que colonizam o trato gastrointestinal infantil dentro de poucas horas de vida, tornando-se um hospedeiro mutualista. É a principal representante do grupo dos coliformes fecais, grupo este restrito aos organismos que crescem no trato gastrointestinal do homem e de animais de sangue quente. Pelo menos três gêneros fazem parte desse grupo: *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, mas apenas a espécie *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e de animais, enquanto *Klebsiella* e *Enterobacter* estão presentes nos vegetais e solo (SANTIAGO, 2013).

Por ser a principal representante deste grupo, *Escherichia coli* se desenvolve no trato intestinal do homem e animais de sangue quente, a sua presença no meio indica contaminação fecal, podendo também ser encontrada em alimentos, o que caracteriza o contato destes com material contaminado. É uma bactéria do grupo dos coliformes termotolerantes causadora de doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos contaminados. Por não fazer parte da microbiota do pescado marinho, sua presença está

associada a contaminação fecal da água do local, de captura e/ou do transporte e manuseio (incluindo recipiente de transporte, gelo) (VIEIRA, 2004).

2.5.3 *Salmonella entérica*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, apresentam-se como bastonetes curtos, Gram-negativos, móveis, não formadores de esporos, de metabolismo aeróbio ou facultativamente anaeróbio. São amplamente distribuídas na natureza e frequentemente encontradas no trato intestinal de diversos animais, incluindo pássaros e homens e em uma larga variedade de alimentos como carne bovina, peixe, frutos do mar crus (VIEIRA, 2004).

Sua divisão baseia-se em suas análises genéticas, o gênero é dividido em duas espécies: *Salmonella entérica*, que contem seis subespécies e *Salmonella bongori* representada por uma única espécie. No entanto, a maioria dos casos de infecção por *Salmonella* em humanos, relacionados ao consumo de pescado, são causados pelos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (Greig & Ravel, 2009). A infecção no homem ocorre mediante o consumo de um alimento ou água contaminada resultando em lesões e irá depender da condição do seu sistema imunológico (SANTIAGO, 2013).

Segundo a legislação vigente no Brasil, a presença de *Salmonella* em 25 g de pescado fresco é suficiente para tornar o alimento impróprio para o consumo, diante do exposto existe uma grande preocupação na detecção desse grupo de bactérias em alimentos, já que a presença desse microrganismo serve como indicador geral da higiene do alimento por ser importante agente contaminador de muitos produtos caracterizando um risco para saúde do consumidor (SANTIAGO, 2013).

2.5.4 *Vibrio parahaemolyticus*

É uma bactéria Gram-negativa que se apresenta na forma de bastonetes curtos, apresenta flagelo polar halofílicos, anaeróbico facultativo, pertencente à família Vibrionaceae, causador de gastroenterite, infecções com erupções cutâneas e septicemia. Esse é o patógeno mais prevalente, em vários países do mundo, em casos de gastroenterites relacionadas ao consumo de pescado (NAIR *et al.*, 1985; WONG *et al.*, 1992; YU *et al.* 2013).

Esta bactéria é um patógeno humano que ocorre naturalmente no ambiente marinho, sendo frequentemente isolado de uma grande variedade de pescados. Sob o ponto de

vista clínico a toxinfecção causada por esse microrganismo pode ser muito parecida com aquelas produzidas por outras espécies de microrganismos. A semelhança com as sintomatologias típicas de Shigeloses, salmoneloses e patogenicias, causadas por cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* podem ocasionar enganos no diagnóstico e em alguns casos os sintomas diagnosticados podem lembrar caso moderado de cólera (SANTIAGO, 2013).

2.6 Antimicrobianos

É crescente a busca por alimentos de qualidade microbiológica no mercado, assim os filmes antimicrobianos vêm ganhando espaço como alternativas para suprir essa necessidade. A prática de incorporar substâncias antimicrobianas em materiais de embalagens vem se tornando uma alternativa no controle da contaminação microbiana nos alimentos. Nos últimos anos as embalagens antimicrobianas ganham destaque por conseguirem melhorar a segurança e a qualidade do alimento. Essa função é adquirida quando agentes antimicrobianos são incorporados no sistema da embalagem (PINHEIRO, 2010).

A incorporação desses agentes irá limitar ou prevenir o crescimento específico de microrganismos deterioradores e, ou patogênicos podendo reduzir a taxa de crescimento ou até mesmo a contagem de microrganismos vivos. Os antimicrobianos podem controlar a contaminação microbiana mediante três mecanismos: redução da taxa de crescimento dos microrganismos, aumento da fase lag ou inativação por contato.

As funcionalidades das embalagens ativas partem de um princípio básico no qual uma barreira microbiológica será adicionada frente as barreiras físicas existentes (oxigênio e umidade). A incorporação dos agentes antimicrobianos pode ser feita diretamente à matriz polimérica em rótulos ou estar contidos em sachês (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2004).

Nos filmes os agentes antimicrobianos podem ser adicionados de duas formas: incorporação e imobilização. Na incorporação como o nome já sugere ocorre uma liberação do composto para o alimento, já na imobilização o agente antimicrobiano atua apenas na superfície. Além da qualidade microbiológica, as embalagens que usam esse sistema são vantajosas pois liberam esses compostos de forma controlada atuando particularmente na superfície do produto, local onde ocorre a maior parte das deteriorações (HAN, 2005).

Apesar das vantagens citadas acima, alguns fatores devem ser observados para que a efetividade da embalagem não seja afetada como as características do agente antimicrobiano (solubilidade e tamanho da molécula) e do alimento, condições de estocagem

e distribuição (tempo e temperatura), método de preparo do filme (extrusão ou *casting*) e interação entre antimicrobiano e polímero (DAWSON *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir filmes comestíveis a base do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Hypnea musciformis*, com diferentes concentrações de plastificante (glicerol) e incorporação de ácido caféico.

3.2 Específicos

- Realizar a extração do polissacarídeo sulfatado extraído da alga vermelha (*Hypnea musciformis*);
- Realizar caracterização química e térmica do polissacarídeo;
- Determinar composição centesimal da alga vermelha (*Hypnea musciformis*);
- Formular e caracterizar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes com diferentes concentrações do polissacarídeo, plastificante e aditivo utilizado;
- Avaliar as propriedades físicas (solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, cor e opacidade) dos filmes elaborados;
- Avaliar as propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade) dos filmes elaborados;
- Verificar as atividades antimicrobianas das soluções filmogênicas;
- Aplicar análise estatística nos dados encontrados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), integrante do Departamento de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici, Fortaleza, Ceará) com parceria do Laboratório da Tecnologia de Biomassa (LTB) da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMPRAPA).

4.1 Material biológico

A alga marinha foi coletada em uma estação de cultivo em mar aberto na praia de Flexeiras, localizada no município de Trairi, Ceará. O número de cadastro desta alga no Sisgen é A16FF22. As amostras foram coletadas em período de maré baixa, acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório de tecnologia do pescado (LATEPE) do Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. O material foi lavado com água destilada, separado de organismos incrustantes, secado em papel filtro em temperatura ambiente. Posteriormente estocado a - 20°C até a extração dos polissacarídeos, estes extraídos a partir de dois métodos (extração a frio e extração a quente).

4.2 Processos de extração do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *H. musciformis*

A extração dos polissacarídeos iniciou-se com o descongelamento da alga, seguido da secagem em estufa de circulação de ar a 25°C (Figura 5). A moagem foi feita em um moinho de faca (Tecnal – Wiley TE-650/1) até a obtenção de um pó seco onde o qual foi submetido às posteriores extrações. Após serem desidratadas e moídas 5 g do produto bruto foram submetidas à extração aquosa sob agitação mecânica (1,5% m/v), à temperatura de 25°C durante 24 h. Esta etapa foi importante para eliminação de pigmentos e contaminantes. Após esse período o material foi filtrado e sobrenadante descartado. Após a filtração, o material passou por uma bre-extração em banho-maria (microproce SSADO - modelo 0215M2 -Quimis) durante 4h a 80°C para a remoção de compostos formadores de géis.

Os PSs foram precipitados (24h a 4°C) com adição de etanol comercial (1:3; v v-1). Para a retirada total do álcool, o polímero passou pelo processo de diálise em membranas de celulose (Sigma-Aldrich, 76 mm) em água destilada no volume de 2,5 litros com trocas a cada três horas de seis a oito vezes. O material seguiu para liofilização em liofilizador (Líotop, Serie; 39413, Brasil) a uma pressão entre 400 a 300 μ Hg em uma temperatura -50°C por 75 horas e posteriormente pesado e determinado o seu rendimento.

Figura 5 – Fluxograma do processo de extração do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Hypnea musciformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Caracterização do polissacarídeo sulfatado da *H. musciformis*

4.3.1 Composição centesimal do polissacarídeo

Um aspecto de grande importância, porém pouco estudada ou divulgada no meio científico, refere-se às propriedades nutricionais de algas. As análises físico-químicas da alga *Hypnea musciformis* foram realizadas em triplicatas. A composição centesimal corresponde à umidade, cinzas, proteínas e lipídios, seguindo os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de pescado e seus derivados, o resultado do somatório destes componentes deve ser próximo ou igual a 100, e a diferença de 100 pode ser considerada os carboidratos. (BRASIL, 2011).

4.3.1.1 Determinação de Umidade

É uma das medidas utilizadas na análise de alimentos, e está relacionada com características como: estabilidade, qualidade e composição da matéria. A determinação de umidade foi realizada por meio da utilização de materiais como cadinhos de porcelana, balança analítica, estufa, dessecador e pinça (para manusear os cadinhos). Aproximadamente 5 g das amostras homogeneizadas foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente tarados em balança analítica.

As amostras foram colocadas em estufa com temperatura entre 100 a 105°C por 24h, técnica descrita por (NAGAKURA, 1972). Depois os cadinhos foram retirados e transferidos para dessecador com auxílio de pinça, até atingir a temperatura ambiente, sendo pesados posteriormente. O resultado da umidade foi encontrado pela diferença de peso inicial e final gerando uma resultante em percentagem.

Cálculos:

$$\%U = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:

U – umidade;

V0 – peso do cadinho seco;

V2 – peso do cadinho com amostra;

V1 – peso do cadinho com amostra após secagem.

4.3.1.2 Determinação de Cinzas

As cinzas foram determinadas com o auxílio de cadinhos de porcelana, estufa, mufla (forno), dessecador e balança analítica. No procedimento, 5g de cada amostra obtida por meio da determinação de umidade foram adicionadas em cadinhos previamente tarados, que foram posteriormente pesados e transferidos para mufla a 550°C por 4h. Depois, os cadinhos foram para o dessecador até atingir a temperatura ambiente para em seguida serem pesados (BRASIL, 2011).

Cálculos:

$$\%C = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

C – cinza;

V0 – peso do cadinho;

V1 – peso do cadinho mais cinza;

V2 – peso do cadinho mais amostra.

4.3.1.3 Determinação de Proteínas

A determinação das proteínas foi efetuada por meio do método de *Micro-Kjeldahl*, onde foi utilizado papel vegetal contendo 0,2g de amostra macerada, acondicionados em tubos com 2g do catalisador, contendo uma mistura de sulfato de cobre (CuSO₄), selênio metálico (Se) e sulfato de potássio (K₂SO₄), e adicionados 4 mL de ácido sulfúrico. Em seguida, os tubos foram, foram levados ao aparelho digestor a 350°C, e foram observados até o final da digestão.

No aparelho destilador, a amostra digerida foi neutralizada com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, até o surgimento da coloração escura, devido a formação de óxido de cobre (Cu₂O). Esta mistura foi destilada por meio do arraste de vapor e o produto (destilado) foi recolhido em erlenmeyer com 10 mL da solução de ácido bórico (H₃BO₃) a 2%, adicionando-se 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) até completar 50 mL. Desse modo, a mistura destilada foi titulada com solução padrão de ácido clorídrico (HCL) a 0,04N em bureta até a coloração rosada e assim anotou-se o volume de ácido gasto. A porcentagem de nitrogênio total foi obtida através da fórmula:

$$\%NT = \frac{(\text{Volume da amostra} - \text{Volume do branco}) \times 0,014 \times 0,04}{\text{Peso da Amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

A conversão do nitrogênio total para proteína total foi obtida a partir da fórmula:

Cálculos:

$$\%PT = \%NT \times 6,25 \quad \text{Eq. (4)}$$

4.3.1.4 Determinação de Lipídios

Os lipídios foram determinados pelo método de Soxhlet, com o auxílio de equipamentos (dessecador, estufa, cartucho feito de papel filtro, aparelho determinador de gordura e balão receptor). A acetona foi utilizada como solvente orgânico para extração dos lipídios totais. Seguidamente, os balões foram colocados em estufa a 100°C durante uma hora. Logo após, os balões foram levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesados (BRASIL, 2011).

Posteriormente, foram pesados 3g de amostra macerada para serem colocadas nos cartuchos de extração (papel filtro) e tampadas com algodão. Os balões com 100 mL de solvente foram levados ao determinador de gordura para a extração a 90° C por 2 h. Logo após a extração, a amostra gotejou por trinta minutos (para a recuperação do solvente o aparelho foi calibrado para 150°C) e seguidamente os balões contendo o lipídio foram transferidos ao dessecador até atingir a temperatura ambiente para serem pesados. O cálculo para obtenção da porcentagem de lipídeos foi realizado conforme a equação abaixo:

Cálculos:

$$\%Lipídio = \frac{(Peso\ do\ balão + Gordura) - (Peso\ do\ Balão\ Vazio) \times 100}{(Peso\ da\ Amostra)} \quad Eq. (5)$$

4.4 Rendimento da extração do polissacarídeo

O rendimento da carragenana foi obtido por meio da utilização do cálculo da razão do peso liofilizado da alga pelo peso inicial da massa seca da alga. Isso resultou na porcentagem de carragenana extraída de uma amostra. O rendimento foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$Rendimento = \frac{peso\ final}{peso\ inicial} \times 100 \quad Eq. (6)$$

4.5 Determinação do conteúdo de proteína totais

A concentração do teor de proteínas contaminantes do polissacarídeo foi realizada segundo o método de Bradford (1976) utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm.

4.6 Análise térmica do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis*

4.6.1 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para estudar o processo de polimerização de polímeros, tais como, RMN, DCS, TGA. Entre estas técnicas, a mais utilizada na avaliação da cinética de reação é a análise térmica. A análise térmica inclui várias técnicas, através das quais as propriedades de um material podem ser determinadas em função do tempo ou da temperatura. Dentre as técnicas de análise térmica, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma das técnicas mais utilizadas permitindo determinar parâmetros termodinâmicos e cinéticos resultantes do processo de polimerização, tais como, calor (entalpia) de reação, energia de ativação, constante de velocidade, ordem e velocidade de reação. No estudo do comportamento cinético por DSC, pode-se observar os eventos térmicos resultantes do processo de polimerização de um sistema, possibilitando determinar a melhor temperatura ou condições de formulação dos compósitos (MARTINI, 2010).

Durante toda análise de DSC a temperatura é controlada e tanto a amostra quanto o material de referência são mantidos à mesma temperatura durante o todo o processo térmico. A análise de DSC para a carragenana foi realizada utilizando-se um equipamento da TA INSTRUMENT (modelo Q20) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo constante de 50 mL.min⁻¹ a partir de 5,1 mg da amostra em pó, com taxa de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 0°C a 400°C.

4.6.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

Na análise termogravimétrica (TGA) da carragenana foi realizada utilizando-se um equipamento da PerKinElmer (modelo STA 6000) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo constante de 50 mL.min⁻¹. A partir de aproximadamente 18,49 mg das amostras em pó, com taxa de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25 a 800°C. Essa análise tem como principal objetivo monitorar a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas e analisar a perda ou a agregação de massa da amostra em temperaturas variadas.

4.6.3 Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, a espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. A descrição da amostra ocorre pelo fato que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). A análise foi realizada pelo método KBr (amostra seca e em pó foi misturada com brometo de potássio e prensada em pastilhas) no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria tropical em espectrofotômetro de marca Varian (modelo FT-IR) na faixa de comprimento de entre 400 e 4000 cm⁻¹.

4.6.4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H e ¹³C)

O Espectro de RMN ¹H foi obtido através do espectrômetro agilent, a partir do procedimento descrito por Signimi e Campana-filho 1998. Inicialmente, uma solução acidificada de 1 % (v/v) de ácido clorídrico será utilizada para dissolver a carragenana. Aproximadamente 10 mg de carragenana será solubilizada em 1mL de ácido clorídrico 1% por um período de 24 h em temperatura ambiente. Uma alíquota dessa solução será colocada em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro em uma temperatura de 70°C.

4.6.5 Determinação do perfil eletroforético da carragenana por eletroforese em gel de agarose

O perfil eletroforético da carragenana foi determinado de acordo com metodologia de (DIETRICH; DIETRICH, 1976) as amostras foram carregadas em gel de agarose a 0,5%. As amostras (20 µg) foram aplicadas em gel de agarose 0,5% e submetidas à migração eletroforética com uma solução tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). A corrida foi realizada utilizando-se voltagem constante (110 V) durante 60 min. Em seguida, os polissacarídeos foram fixados no gel foram fixados com uma solução de N-cetil-N, N, N-brometo de trimetilamônio a 1,0% por 24h, seguido de secagem. Posteriormente, o gel foi corado com azul de toluidina a 1,0% e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v).

4.7 Produção e caracterização dos filmes de polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Hypnea musciformis*

A produção e caracterização dos filmes foi realizada integralmente no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da EMBRAPA Agroindústria Tropical, Fortaleza- CE.

4.7.1 Preparo das soluções dos filmes comestíveis

Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia proposta por (SOUZA *et al.*, 2010) com adaptações de (VÁSCONEZ *et al.*, 2009). Inicialmente foram preparadas três soluções estoque do polissacarídeo com três concentrações diferentes, 2,0%, 3,0% e 4,0% (p/v) respectivamente dissolvida em água destilada (v/v). Essas soluções passaram por um processo de agitação em um agitador magnético por um período de 2 horas a 40° C. Posteriormente cada solução foi subdivida em três soluções para receber diferentes concentrações de glicerol: 1,0 e 1,5% (m/v), as mesmas ficaram sob agitação em um agitador magnético por 30 minutos, gerando 9 soluções.

O processo de formulação dos filmes continuou com a adição de 0,25 % de ácido cafeico nas soluções que receberam o plastificante. Antes de ser adicionado as soluções, essa concentração de ácido cafeico foi dissolvida em etanol durante 30 minutos sob agitação

mecânica, pois o mesmo é insolúvel em água. O volume de 150 mL para cada solução foi calculado de acordo com a necessidade requerida do material para a realização das análises de caracterização dos filmes.

A solução obtida foi homogeneizada no Turrax (homogenizador modelo T25 Digital Ultra Turrax 10-1500mL 230V) sob rotação de 8000 RPM durante 5 minutos, esse procedimento tem como finalidade reduzir as partículas existentes tornando a solução mais homogênea possível. Posteriormente a solução foi filtrada e desgaseificada a temperatura ambiente durante 30 minutos em rotoevaporador até desaparecimento total das bolhas e remoção de solventes voláteis, por meios de processos de condensação e evaporação. Finalmente as soluções filmogênicas foram depositadas em 2 placas de vidro (29,7 x 42 cm) e secas a (18°C) por 48h.

4.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes

Os filmes isolados foram submetidos a uma análise espectrométrica através da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. A análise foi realizada pelo método ATR no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria tropical em espectrofotômetro de marca Varian (modelo FT-IR) na faixa de comprimento de entre 400 e 4000 cm^{-1} .

4.9 Métodos de avaliação das propriedades dos filmes comestíveis do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis*

Os métodos utilizados para a determinação dos filmes comestíveis são derivados dos métodos clássicos aplicados aos materiais sintéticos.

4.9.1 Aspecto visual e manuseabilidade

A primeira caracterização dos filmes se refere ao aspecto visual e manuseabilidade, os filmes foram caracterizados subjetivamente antes das demais análises, aqueles que possuíam aspecto irregular, descontínuo ou quebradiço foram descartados para a realização dos demais ensaios visando à utilização apenas de filmes homogêneos, uma vez

que essas características indesejáveis impediriam ou dificultariam as análises posteriores. Os filmes comestíveis devem apresentar as propriedades organolépticas mais neutras possíveis, ou seja, devem possuir características como pouca opacidade consequentemente claros e transparentes, inodoros e insípidos. Os filmes a base de hidrocolóides são geralmente neutros diferentes dos filmes elaborados a base de lipídeos ou derivados de ceras, estes frequentemente opacos, moles e escorregadios ao degustar.

4.9.2 Propriedades de barreira

As propriedades de barreira dos filmes podem ser definidas como a capacidade que o material possui em resistir a absorção ou a evaporação de gases e vapores, pode ser definida ainda como a capacidade de resistência a permeação de lipídeos e a passagem de luz.

4.9.2.1 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água é uma propriedade bastante estudada em filmes comestíveis, devido à importância da água nas reações de deterioração dos alimentos. Os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes comestíveis podem ser utilizados em prognósticos da vida útil de produtos embalados, pois filmes que apresentam boa barreira às trocas de vapor de água podem ser utilizados para prolongar a vida útil dos mesmos (LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014).

Assim, análise tem como intuito avaliar a capacidade que uma embalagem, no caso do presente estudo os filmes, possuem de transmissão de umidade da atmosfera para o produto. Assim o valor da PVA deve ser o mais baixo possível afim de diminuir essa transferência de umidade entre os alimentos e o ambiente, isso consequentemente irá atuar de forma positiva aumentando a vida útil do produto.

A medição da permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada por gravimetria baseada no método ASTM E96-92 (MCHUGH *et al.*, 1994) com modificações. Os filmes foram selados no topo de uma célula de permeação (Figura 6) contendo 50 mL de água destilada (100% UR, 2337 Pa, pressão de vapor de água 20°C). As células foram pesadas em intervalos de 2 h durante 8 h e acondicionadas em um dessecador a 25 °C a 10% de UR contendo sílica, onde a circulação de ar constante fora da célula de teste foi realizada usando

um ventilador em miniatura. Condições de pressão de água em estado estacionário e uniforme foram assumidas no sistema e a inclinação da curva que representa a perda de peso em função do tempo foi obtida por regressão linear. A medida (PVA) dos filmes foi determinada da seguinte maneira:

$$PVA = (WVTR \times L) / \Delta P, \quad \text{Eq. (7)}$$

onde, WVTR é a taxa de transmissão de vapor de água ($\text{g} \times \text{m}^{-2} \times \text{h}^{-1}$) medida através do filme (calculado a partir da inclinação da curva dividida pela área do filme), L é a espessura média do filme (m) e ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor da água (atm) nos dois lados do filme. Para cada tipo de filme foram realizadas três repetições. A espessura de cada amostra foi medida utilizando-se um micrômetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil), em nove diferentes posições de cada amostra avaliada. Os valores médios foram utilizados para calcular a permeabilidade ao vapor de água.

Figura 6 – Células de permeação para determinação da PVA contendo filme comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da *Hypnea musciformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.2.2 Solubilidade

A solubilidade é definida como a porcentagem da matéria seca do filme após 24 h de imersão em água destilada (GONTARD *et al.*, 1992). A matéria seca inicial dos filmes foi determinada por secagem de discos com 2 cm de diâmetro em uma estufa, a 100°C, durante 24 h. Após este período, os discos foram pesados e imersos em 50 mL de água destilada, com agitação periódica de 76 rpm através de uma mesa agitadora orbital SL 180 (marca SOLAB),

por 24 h a 25°C (Figura 7). Após o processo de agitação, os filmes foram retirados e secos (100 °C por 24 h) para determinar a matéria seca final. A solubilidade foi expressa como sendo a diferença entre a matéria seca inicial e final em relação à matéria seca inicial. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 7 – Mesa agitadora contendo filme comestíveis de polissacarídeo sulfatado extraído da *Hypnea musciformis* para determinação da solubilidade.



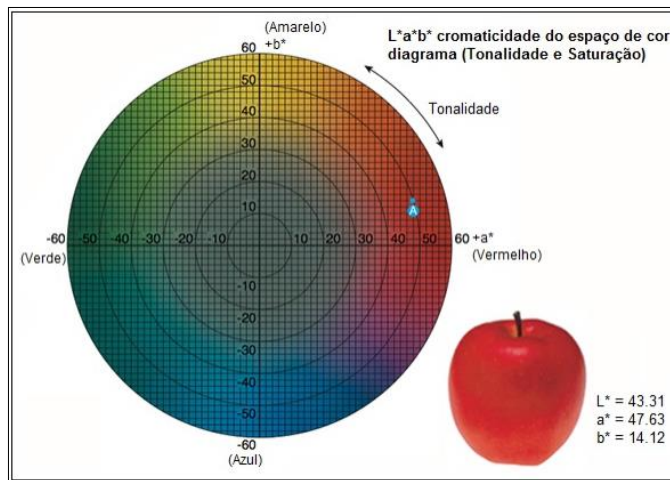
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.3 Propriedade óticas

4.9.3.1 Cor

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro Minolta (Sensing, o SpectraMagic NX, Minolta, Japão) utilizando uma escala L^* , a^* , b^* do sistema CIELab, desenvolvido por Hunter (1975). Onde L^* varia de preto a branco (0 a 100), a^* varia do verde ao vermelho (-60 a +60) e b^* varia de azul a amarelo (-60 a +60), (Figura 8). O espaço de cor $L^*a^*b^*$ foi criado após a teoria de cores opostas, onde duas cores não podem ser verdes e vermelhas ao mesmo tempo, ou amarelas e azuis ao mesmo tempo. Nove repetições foram realizadas para cada amostra de filme.

Figura 8 – Sistema para cor através do método de Hunter.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.3.2 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada usando um medidor de cor e de acordo com a escala de cores Hunterlab. Seguindo este método, a opacidade (Y) foi calculada como a razão entre a opacidade de cada amostra sobre o padrão preto (Yb) e a opacidade de cada amostra no padrão branco (Yw). De três repetições de cada amostra de filme foram determinados aleatoriamente três Yb e Yw e a média deles foi utilizada para a realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em percentagem.

$$\text{Opacidade (Y \%)} = \frac{Yb}{Yw} \times 100 \quad \text{Eq. (8)}$$

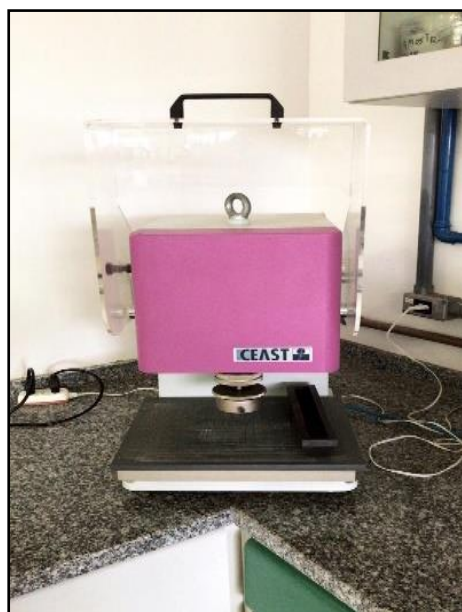
4.9.4 Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas existentes nos materiais determinam a resposta destes as influencias mecânicas externas, ou seja, estando associadas a capacidade de desenvolver deformações reversíveis e irreversíveis e de apresentar resistência a quebra. O teste mais utilizado para medir força mecânica é o teste de tração, onde podem ser derivadas as propriedades de resistência a tração, alongação, força resultante e módulo de elasticidade. As propriedades mecânicas são medidas pela deformação que uma amostra pode sofrer e pelo monitoramento da força e deformação até que se rompa (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

4.9.4.1 Corpos de prova

Os corpos de prova utilizados para os ensaios mecânicos foram cortados por uma prensa estampadora pneumática (Figura 9), cuja pressão de operação utilizada foi de sete bar e acondicionados em um dessecador contendo nitrato de magnésio hexahidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) para mantê-los em um ambiente com umidade relativa e temperatura em torno de $50 \pm 5\%$ e $24 \pm 2^\circ C$, respectivamente, por no mínimo 40 h até o momento das análises.

Figura 9 – Prensa estampadora pneumática utilizada para corte dos filmes (corpos de prova).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.4.2 Ensaio de tração

Os ensaios de tração (tensão máxima de ruptura e deformação na ruptura) para caracterização mecânica dos filmes foram realizados seguindo as orientações da ASTM-D-882-91 (1991). Os corpos de prova com comprimento de 63,24 mm e largura de 12,86 mm foram afixados por meio de garras acopladas a uma travessa móvel da Máquina Universal de Ensaio, seguindo as orientações da ASTM-D-882-91. A taxa de deformação de tração é controlada pelo mecanismo de direcionamento, enquanto a tensão de tração sustentada pela amostra é registrada pela célula de carga, ambos acoplados à travessa fixa.

O equipamento utilizado para análise foi o EMIC (Figura 10), com uma célula de carga de 100 N. A velocidade de tracionamento utilizada foi de 50 mm/min, sendo a distância inicial entre as garras de 30 mm. A tensão máxima de ruptura foi expressa em MPa e calculada dividindo a força máxima (N) necessária para romper o corpo de prova pela área inicial transversal (m²) da amostra. A deformação na ruptura foi calculada como sendo a razão entre o comprimento final no ponto de ruptura da amostra pelo comprimento inicial da amostra (30 mm) e expressa em porcentagem. Os ensaios foram realizados em quintuplicatas para cada amostra.

Figura 10 – Corpo de prova acoplado ao equipamento do (EMIC)



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Avaliação da atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas

A avaliação da atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas foi realizada frente a quatro cepas padrões: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. As cepas foram crescidas em ágar de soja tríptica (TSA) e, para o caso específico de *Vibrio parahaemolyticus*, foi adicionado 1% (p/v) de NaCl na composição do TSA. As cepas foram

incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h.

4.10.1 Bactérias-teste

4.10.1.1 Preparo dos inóculos bacterianos

Das culturas crescidas em TSA a 35 °C por 24 h, foi retirada uma porção do inóculo e homogeneizada em 9 mL de solução salina 0,85% de cloreto de sódio (p/v) para *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* e 9 mL de solução salina 1,0% de cloreto de sódio (p/v) para *V. parahaemolyticus* até se obter uma turvação equivalente à turbidez 0,5 na escala de *McFarland*. A absorvância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal), sendo considerado o intervalo entre 0,08 e 0,10 em um comprimento de onda de 625 nm. A turbidez óptica comparável à solução padrão 0,5 de *McFarland* equivale a uma suspensão contendo, aproximadamente, 1×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL) (CLSI, 2013).

Cada bactéria-teste, com concentração do inóculo ajustada, foi inoculada, em duplicata, em placas contendo ágar Mueller-Hinton sem adição de NaCl para *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* e com adição de 1% de NaCl (p/v) para *V. parahaemolyticus*, com auxílio de um swab de algodão estéril (CLSI, 2013). Em cada placa com o meio de cultura inoculado com a bactéria-teste, foram perfurados três poços de seis mm de diâmetro com o auxílio de um perfurador de inox esterilizado. No primeiro poço foi adicionado uma alíquota de 50 µL da solução filmogênica do PS na concentração de 2,0%, no segundo poço, o mesmo volume de água destilada estéril e no terceiro poço a solução de 0,25% de ácido cafeico.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 h. Após o período de incubação, cada placa foi conferida para avaliação da atividade antimicrobiana. A presença de um halo transparente ao redor dos poços confirmaria o resultado qualitativo positivo da ação antimicrobiana. Para essa análise inicialmente utilizou-se a concentração de 2,0% do polissacarídeo com intuito de avaliar a eficiência do material em sua menor concentração. Em caso positivo encerra-se a análise tendo em vista que, nas demais concentrações (3,0 e 4,0 % de PS) a resposta continuaria sendo satisfatória, em caso negativo, os testes continuariam para as demais concentrações de solução filmogênica do PS do presente estudo.

4.11 Custo de produção para as soluções filmogênicas

A partir de 15 g foi determinado o preço da carragenana extraída, sem considerar os custos com a energia elétrica e água para então determinar os preços da solução por litro produzido.

4.12 Análises Estatísticas

Os resultados foram avaliados usando a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando o software *STATISTICA* (versão 10, *STATISTICA* Statsoft Inc., US).

5 RESULTADOS

5.1 Composição centesimal da alga *Hypnea musciformis*

No presente estudo os resultados no teor de nutrientes foram expressos por 100 g de peso seco para ser possível comparar os valores referentes desses compostos. A composição centesimal aproximada alga *Hypnea musciformis* estava na faixa de valores relatados para outras espécies de algas marinhas. Além dos valores nutricionais mencionados no presente estudo, as algas possuem uma vantagem frente aos outros produtos marinhos como os baixos níveis de compostos alergênicos, o que torna o uso dessas macroalgas uma alternativa aos produtos marinhos com altos compostos alérgicos (NOGUCHI *et al.*, 1994; FLEURENCE *et al.*, 2012).

O resultado referente a umidade (20,9%) encontra-se dentro da faixa descrita como zona de adsorção primária, local onde os alimentos que possuem umidade inferior a 30% estão livres da proliferação de microrganismos, pois a água está fortemente ligada ao alimento impedido que se forme soluções diluídas que servirão de substrato para os microrganismos poderem se desenvolver (BELFORT, 2012). Esse valor foi bem superior a dados encontrado para *H. musciformis*, *H. spinella* e *G. córnea* onde apresentaram umidade de 8,63%, 8,11% e 7,29% respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2005). Algas da espécie *Scenedesmus obliquus* também apresentaram valores de umidade inferiores ao encontrado no presente estudo (10,37%) (SILVA *et al.*, 2020).

O conteúdo de proteína no presente estudo foi de 14,37 % esse valor encontra-se dentro da faixa de algas vermelhas (10-30%), porém foi inferior ao nível encontrado nas algas *H. musciformis*, *H. spinella* e *G. córnea* onde apresentaram 27,13%, 25,9% e 21,54% de proteína respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2005), nas algas vermelhas, *Palmaria palmata* 18,4% (MERCER *et al.*, 1993, Mai *et al.*, 1995a) e nas algas da espécie *Scenedesmus obliquus* (40,42%) (SILVA *et al.*, 2020). O teor referente a proteína difere de acordo com a espécie, as algas pardas possuem um conteúdo baixo, em torno de 5-15% do peso seco, enquanto as algas verdes e vermelhas apresentam valores entre 10-30% do peso seco. Esses valores estão de acordo com dados encontrados na literatura descritos para outras algas vermelhas do filo Rhodophyta que varia de 10 a 25% (FLEURENCE, 2004).

O valor de lipídio 0,69% foi inferior a normalidade descrita para algas (1–5%). Esse resultado se assemelha com o encontrado por SILVA *et al.*, 2020 para a alga

Scenedesmus obliquus que foi de 05,57%. Dados encontrados por VIEIRA *et al.*, 2005 encontram-se dentro da normalidade estabelecida para as algas, valores de lipídio (2,45%, 1,99% e 2,36%) foram descritos para as algas *H. musciformis*, *H. spinella*, *G. córnea* respectivamente. Apesar de possuírem um baixo teor de lipídios, as algas apresentam elevado teor de ácidos graxos insaturados (PUFA), isso se torna importante, pois os PUFA's são benéficos na alimentação, sendo alguns essenciais ao metabolismo, e somente adquiridos através dos alimentos (PATARRA, 2008).

As algas do presente estudo apresentaram 21,28% de conteúdo de cinzas, valores O teor de cinzas da espécie *Hypnea musciformis* 21,28% do presente estudo foi superior ao de outras espécies do mesmo gênero *H. pannosa* (15%) e *H. japonica* (19%), porém inferior quando comparada a *H. charoide* (23-35%). O alto teor de cinzas nas algas resulta do carbonato de cálcio que limita a presença de outros nutrientes e reduz a digestibilidade dos nutrientes (WONG e CHEUNG, 2000).

5.2 Rendimento do polissacarídeo sulfatado da alga *H. musciformis*

A metodologia aplicada para a obtenção do rendimento de polissacarídeos pode ser de origem enzimática, ácida e/ou aquosa, sofrendo variações em seu resultado de acordo com a espécie e época do ano em que a alga será coletada (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967). A alga vermelha *Hypnea musciformis* do presente estudo foi sujeita à extração de polissacarídeos sulfatados em meio aquoso tendo como resultado um rendimento de 28,41% e não foi detectada a presença de contaminantes proteicos.

Esse resultado foi superior ao encontrado por (NISHIKAWA, 2017) onde obteve 24% de rendimento ao extrair alginato da alga marinha *Sargassum filipendula*.

Os valores de rendimentos encontrados por (AZIZA *et al.*, 2008) do ficocolóide atingiram 34,5% em agosto e 13,5 em setembro do ano em estudo, no ano seguinte tais valores de rendimento foram de 41,0% para setembro e 23,4% em novembro confirmando que, apesar dos autores utilizarem a mesma metodologia de extrações e espécie de alga marinha, ocorreram variações nos resultados. Isso pode ser explicado pela sazonalidade em que as algas foram estudadas avaliadas.

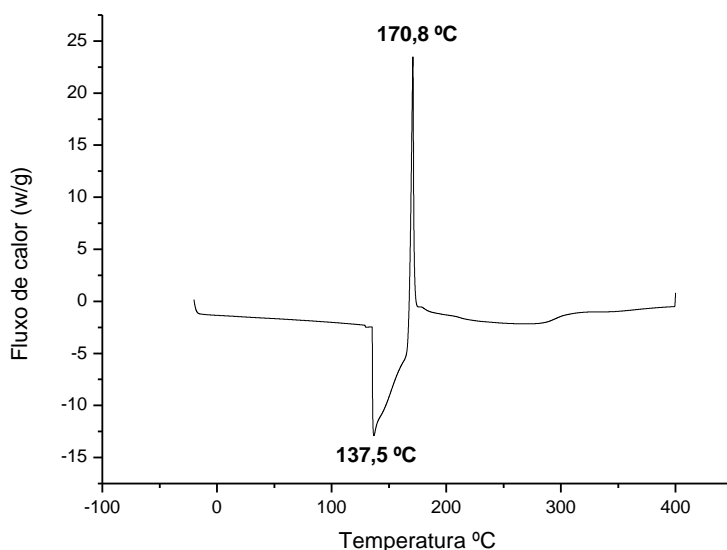
O resultado do presente estudo difere do valor encontrado por (RODRIGUES *et al.*, 2009) onde realizaram três extrações de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* e obtiveram como rendimento final um valor de 47,14%.

5.3 Degradação térmica do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis*

5.3.1 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da carragenana foi realizada com o objetivo de verificar as transições físicas e/ou químicas ocorridas durante o processo de decomposição do polímero. O comportamento térmico da curva de DSC para o PS extraído da alga vermelha *H. musciformis* no intervalo de temperatura de 25°C a 400°C (↑) (Figura 11).

Figura 11 – Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do PS da *H. musciformis*



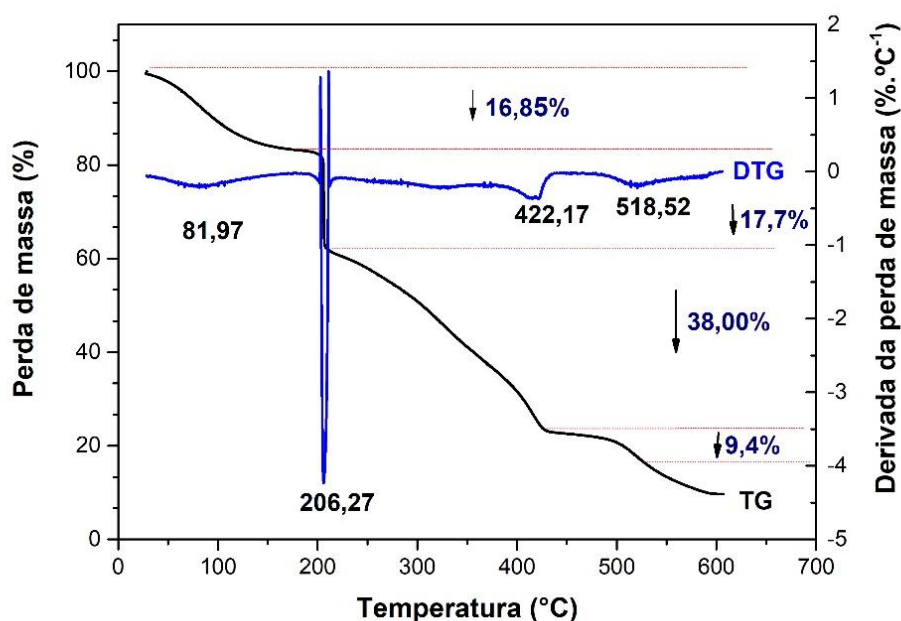
Fonte: Elaborado pelo autor.

O primeiro evento térmico (ponto 1) apresentou uma transição endotérmica, com temperatura 137°C, provavelmente pode ter ocorrido a fusão do PS, pois o aquecimento acima da temperatura de cristalização resulta no surgimento de um pico endotérmico na curva de fluxo de calor, correspondendo à temperatura de fusão, que está relacionada a um movimento significativo das cadeias moleculares devido à desestruturação dos cristais pelo aumento da temperatura (DAVANÇO, 2006). Já para o segundo evento térmico (ponto 2) a curva apresentou uma transição exotérmica a 170,8°C, tal pico indica a degradação do polímero.

5.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A variação da massa inicial corresponde à perda de moléculas de água presente na amostra (Figura 12). Posteriormente, surge um pico bastante acentuado em torno de 206°C, o qual pode ser relacionado com a degradação do polímero. Em seguida, em torno de 422°C pode ocorrer à decomposição térmica de outros constituintes orgânicos, assim como também pode estar associado. O resíduo da amostra em 600°C foi em torno de 10%.

Figura 12 – Análise termogravimétrica (TGA) da kappa-carragenana extraída da alga marinha vermelha (*Hypnea musciformis*).

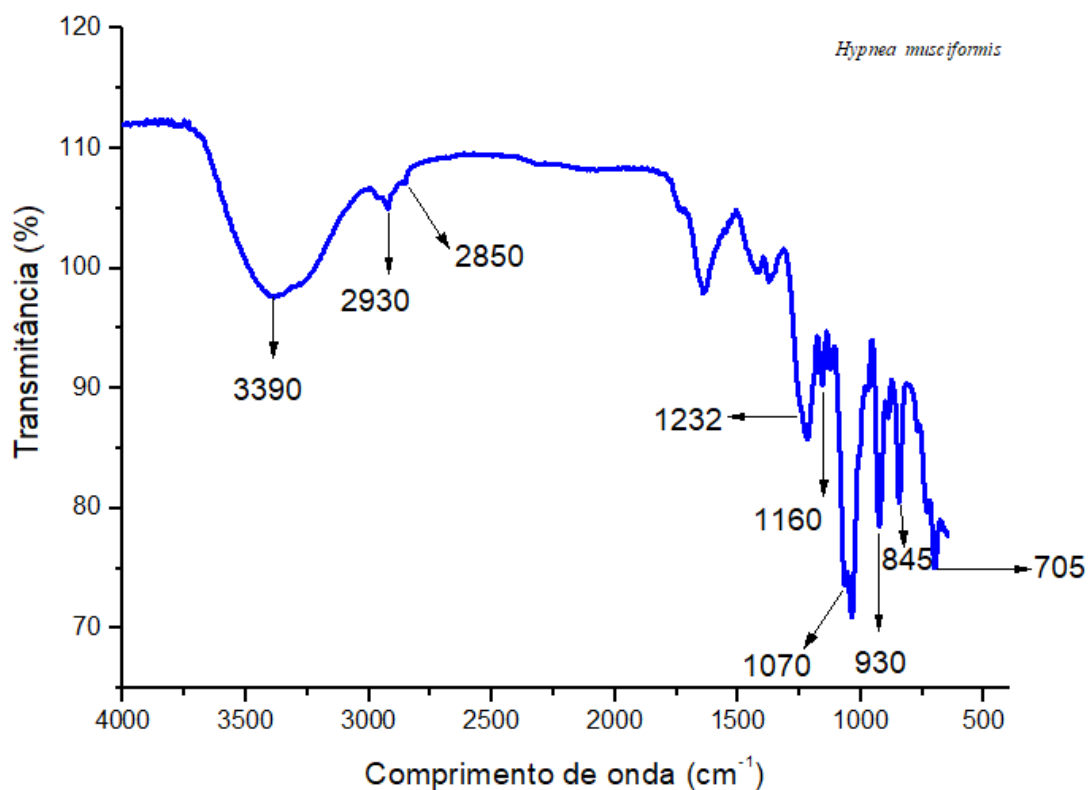


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Análise de Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

O espectro vibracional do polissacarídeo sulfatado obtido por extração aquosa da alga *H. musciformis* (Figura 13) apresentou bandas características dos principais grupamentos químicos que constituem a kappa carragenana. As bandas em 3390 e 2930-2850 são referentes aos grupos hidroxila e vibrações de estiramento simétrica e assimétrica de C-H em grupos metileno. A presença da unidade 3,6-anidro-alfa-D-galactopiranosose pode ser verificada através das bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico da ponte C-O em 1070 e 930 cm^{-1} , respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2013).

Figura 13 – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o PS extraído da *H. musciformis* na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .



Fonte: Elaborado pelo autor.

A banda em 1160 indica a presença de vibrações de estiramento da ligação C-O-C das ligações glicosídicas (ALVES *et al.*, 2016). O grupamento sulfato, bem como a sua localização na unidade de D-galactose, foram verificados através das bandas em 1232 referente às vibrações de estiramento assimétricas de O=S=O e das bandas em 845 atribuída a ligação éster sulfato em C4 (C-O-SO₄) e em 705 atribuída ao grupo sulfato em C4

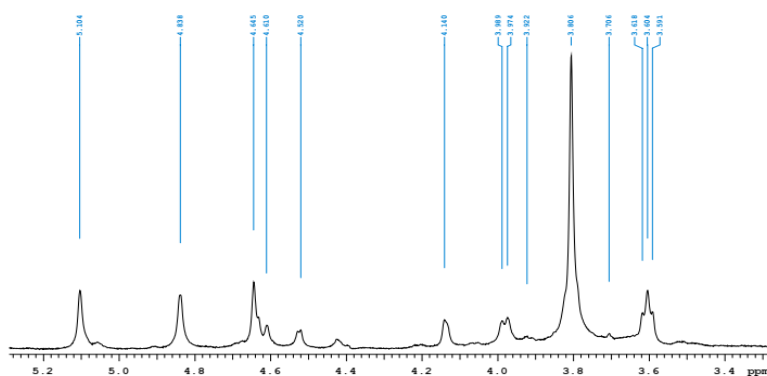
(COSENZA *et al.*, 2014).

A análise de FT-IR do *H. musciformis* resultou em uma boa explicação de bandas características de agarocolóides estando de acordo com diversos resultados obtidos por outros autores (RHEIN-KNUDSEN *et al.*, 2017; SELVALAKSHMI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2008).

5.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H e ^{13}C)

Carragenanas diferenciam-se estruturalmente a partir dos tipos de substituintes, grau de ramificação e padrão de sulfatação. Os principais substituintes, além do grupo sulfato, são piruvato e metoxila (COSENZA *et al.*, 2014). Com a finalidade de verificar a presença de outros substituintes e confirmar a estrutura da kappa-carragenana realizou-se análise de RMN ^1H e ^{13}C . Desta forma, o espectro de carbono do polissacarídeo sulfatado obtido por extração aquosa da alga *H. musciformis* (Figura 15) apresentam sinais característicos dos carbonos anoméricos das unidades de galactose 4 – sulfatada (δ 102,4 ppm) e 3,6-anidro-alfa-D-galactopiranosose (δ 94,9 ppm) (COSENZA *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2011).

Figura 14 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H e ^{13}C) para o PS extraído da *H. musciformis* (ligação éster sulfato no anel de galactose).



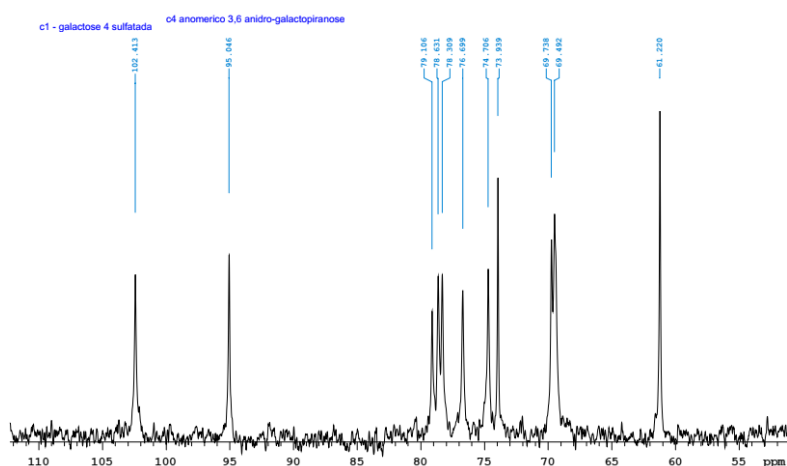
Fonte: Elaborado pelo autor.

A localização da ligação éster sulfato no anel de galactose pode ser verificada no espectro de RMN ^1H (Figura 14) e ^{13}C através do deslocamento químico em 4,84 ppm referente ao próton ligado ao carbono 4 sulfatado desta unidade (ALVES *et al.*, 2011).

A localização da ligação éster sulfato no anel de galactose pode ser verificada no espectro de RMN ^1H (Figura 14) e ^{13}C através do deslocamento químico em 4,84 ppm

referente ao próton ligado ao carbono 4 sulfatado desta unidade (ALVES *et al.*, 2011). Não foram identificados outros substituintes, além do sulfato, de acordo com os resultados obtidos. Os demais deslocamentos químicos são bem descritos na literatura e referem-se aos carbonos e hidrogênios que constituem a cadeia estrutural polissacarídica (ROCHAS; LAHAYE, 1989; ALVES *et al.*, 2011; COSENZA *et al.*, 2014).

Figura 15 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H e ^{13}C) para o PS extraído da *H. musciformis* (sinais característicos dos carbonos anoméricos das unidades de galactose 4 – sulfatada (δ 102,4 ppm) e 3,6-anidro-alfa-D-galactopiranoose (δ 94,9 ppm).



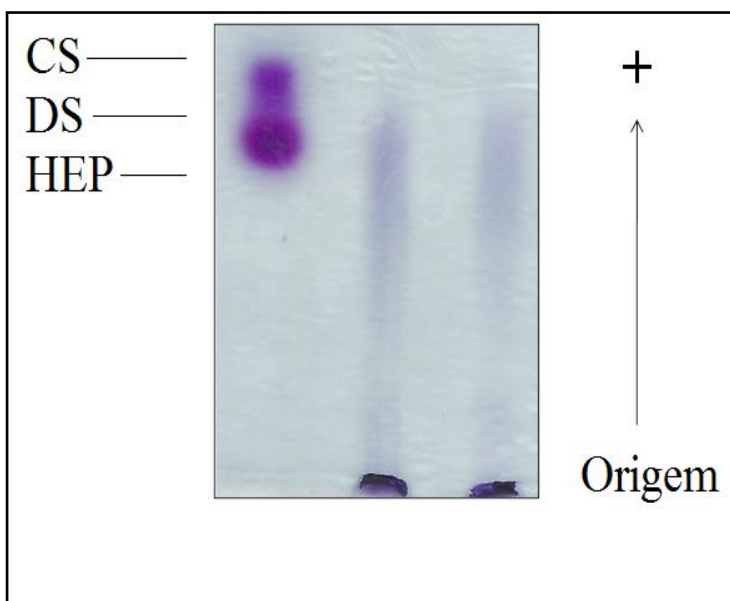
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.5 Determinação do perfil eletroforético da carragenana por eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose revelou que o PS da espécie *H. musciformis* apresenta uma banda polidispersa ao longo do gel (Figura 16). A metacromasia não foi tão intensa revelando uma amostra com pouca carga negativa em relação à quantidade de grupamento sulfato existente, uma vez que o azul de toluidina é capaz de se associar a compostos sulfatados e apresentar uma coloração violácea.

Esse resultado se assemelha aos achados por ANDRADE (2016) onde em seus experimentos com exemplares da alga vermelha *S. filiformis* também revelaram que o PS da espécie em estudo apresentou uma banda polidispersa ao longo do gel.

Figura 16 – Revelação das frações de κ -CAR obtidas da alga marinha vermelha *H. musciformis* por eletroforese em gel de agarose a 0,5%, corados com azul de toluidina a 1,0%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

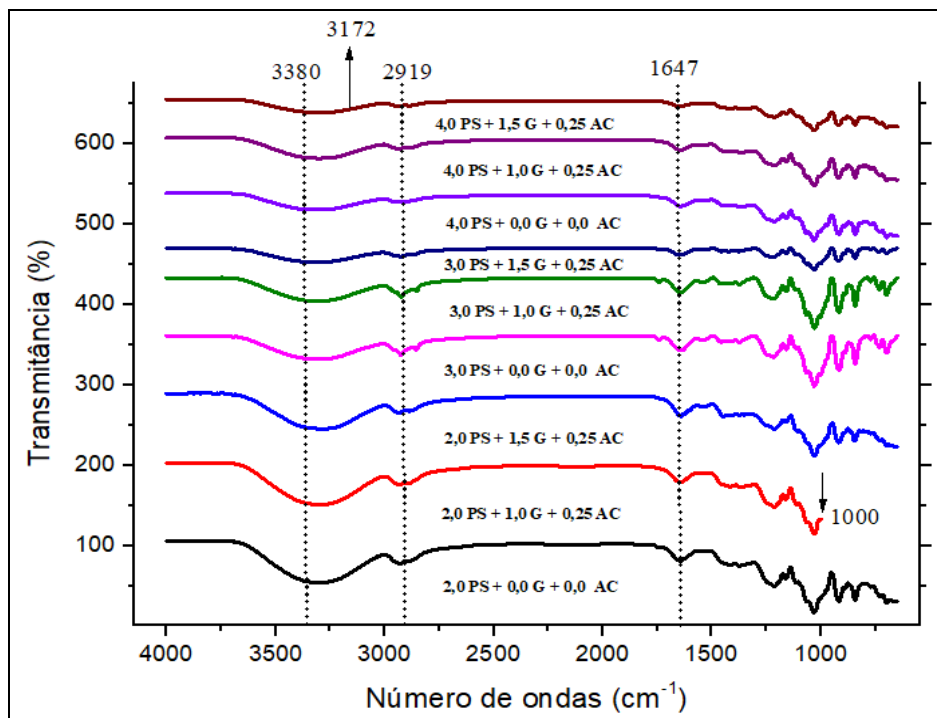
Legenda: CS (Sulfato de Condroitina,) DS (Sulfato de Dermatan) HEP (Heparina).

5.4 Produção e caracterização dos filmes de polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Hypnea musciformis*

5.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes

A análise de FTIR foi realizada com intuito de avaliar as interações entre os diferentes componentes utilizados nas formulações dos filmes. A banda de 3380 cm^{-1} ocorre devido à frequência de estiramento do grupo OH em filmes compostos por carragenana. A banda em torno de 2919 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento C-H. A presença de água é confirmada pelas bandas de absorção a 1647 cm^{-1} (Figura 17). As faixas de 998 a 1148 cm^{-1} podem ser evidenciadas nas bandas de absorção de glicerol correspondentes às vibrações das ligações CC e CO (RAMOS *et al.*, 2013).

Figura 17 – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes de carragenana (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *H. musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e ácido cafeico (0,25%).



Fonte: Elaborado pelo autor.

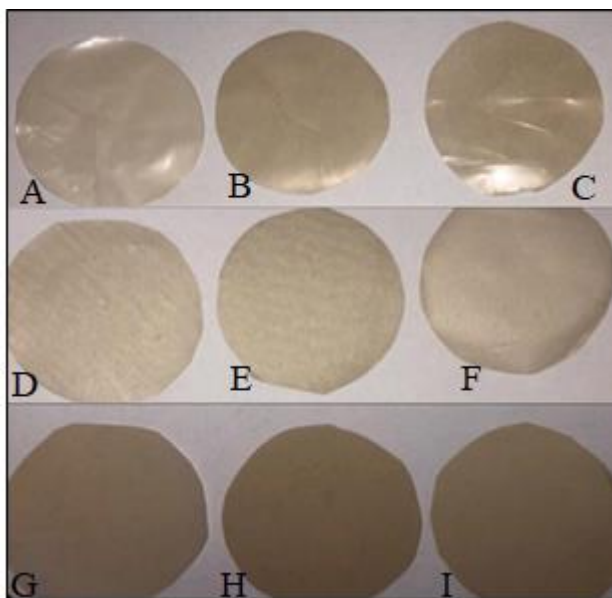
Os espectros de FTIR dos filmes controle (carragenana) mostraram padrões semelhantes nas posições das bandas características do polissacarídeo, indicando a boa miscibilidade dos filmes com seus componentes. As regiões esticadas exibiram miscibilidade e interações intermoleculares entre os componentes. A banda do grupo fenólico no ácido cafeico que ocorre em 3172 cm^{-1} . Os espectros de FTIR dos filmes não estão separados em blocos pois não existe diferença entre as principais bandas.

5.4.2 Aspecto visual e manuseabilidade

A caracterização visual revelou que os filmes do PS incorporados com diferentes concentrações de glicerol e ácido cafeico mostraram-se com boa flexibilidade, suavidade, textura homogênea, facilmente removidos das placas de fundição e com bom aspecto visual. A boa resistência ao manuseio também foi observada, semelhante a resultados obtidos nos filmes compostos à base de κ -carragenana e pectina (ALVES *et al.*, 2010) e nos filmes à base

de κ -carragenana (NOURI *et al.*, 2020).

Figura 18 – Filmes elaborados com polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *H. musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e 0,25% de ácido cafeico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Figura A – 2,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC; Figura B – 2,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC; Figura C – 2,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC; Figura D – 3,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC; Figura E – 3,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC; Figura F – 3,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC; Figura G – 4,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC; Figura H – 4,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC e Figura I – 4,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC. PS = Polissacarídeo Sulfatado; G= Glicerol e AC = Ácido cafeico.

Quanto maior a concentração de PS e dos demais compostos na formulação, mais escuro e menos transparente se tornou o filme (Figura 18). Os filmes incorporados com diferentes concentrações de glicerol e ácido cafeico tinham um aroma agradável (comparado ao filme controle), o que pode ser vantajoso quando usado para fins de embalagem comestível.

Geralmente os filmes comestíveis a base de biopolímeros atuam na proteção contra umidade, funcionam como carreadores de aditivos alimentares, são biodegradáveis, possuem boas propriedades de barreira e mecânicas. Essas características melhoram a aparência dos alimentos, preservam suas propriedades durante a estocagem e manipulação, mantendo as características sensoriais e propriedades de textura nos produtos.

5.4.3 Propriedades de barreira

5.4.3.1 Permeabilidade ao vapor de água

Os valores de permeabilidade ao vapor da água (PVA) e espessura (média \pm desvio padrão) para cada uma das formulações de filmes produzidos, com diferentes combinações de PS, glicerol e ácido cafeico, estão representados na tabela 3. Os valores de espessura dos filmes variaram de $0,54 \pm 0,03$ a $0,32 \pm 0,01$ mm. A medida em que 1,0% de glicerol foi incorporado nos filmes a espessura destes aumentaram, isso também foi observado quando 1,5% do plastificante foi incorporado.

Tabela 1 – Valores de Permeabilidade ao vapor da água (PVA) e espessura (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *H. musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e 0,25% de ácido cafeico.

Concentrações (%)	Permeabilidade ao vapor de água - PVA (g/m.dia.atm)	Espessura (mm)
2,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	$1,30 \pm 0,07^a$	$0,32 \pm 0,01$
2,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	$1,39 \pm 0,09^a$	$0,34 \pm 0,02$
2,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	$1,40 \pm 0,06^a$	$0,36 \pm 0,01$
3,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	$1,66 \pm 0,05^b$	$0,46 \pm 0,03$
3,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	$1,77 \pm 0,02^{bc}$	$0,48 \pm 0,01$
3,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	$1,82 \pm 2,37^{bc}$	$0,50 \pm 0,02$
4,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	$1,94 \pm 0,05^{cd}$	$0,52 \pm 0,01$
4,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	$2,05 \pm 0,26^d$	$0,53 \pm 0,03$
4,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	$2,09 \pm 0,25^d$	$0,54 \pm 0,03$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PS = Polissacarídeo Sulfatado; G = Glicerol e AC = Ácido cafeico. As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA $p < 0,05$).

A espessura, umidade, entre outros fatores podem influenciar na eficiência dos filmes. Geralmente filmes mais espessos apresentam menores valores de PVA, isso ocorre, pois, a espessura influencia na taxa de transferência de vapores e solutos (GENNADIOS; WELLER; GOODING, 1994; MCHUGH; KROCHTA, 1994). A capacidade que uma embalagem de alimento possui para diminuir a transmissão de umidade da atmosfera imediata para o produto é determinada pela PVA, uma das propriedades mais importantes dos filmes comestíveis (SHAIKH *et al.*, 2019). A PVA deve ser o mais baixa possível com o intuito de diminuir a transferência de umidade entre os alimentos e o ambiente circundante e, assim, aumentar sua vida útil do produto.

Os valores encontrados para PVA dos filmes a base de PS do presente estudo variaram de $2,09 \pm 0,25$ a $1,30 \pm 0,07$ g/m.dia.atm. A adição de 1,0% de glicerol aumentou o valor de PVA, essa tendência continuou quando 1,5% do plastificante foi incorporado nos filmes, isso ocorre devido à maior afinidade do sistema em atrair moléculas de água, pois os plastificantes apresentam comportamento hidrofílico. A medida em que a concentração da matriz polimérica foi elevada ocorreu em um aumento da PVA, resultado da afinidade que esse PS possui com a água.

Apesar dos filmes possuírem em sua formulação um composto fenólico (ácido cafeico) configurando uma propriedade hidrofóbica desse composto, ou seja, atuando para impedir o transporte de água através dos filmes isso não foi evidenciado no presente estudo. Essa contradição pode ser explicada pela concentração em que o composto foi adicionado à solução filmogênica.

5.4.3.2 Solubilidade

Os valores de solubilidade e peso (média \pm desvio padrão) para cada uma das formulações de filmes produzidos com diferentes combinações de PS, glicerol e ácido cafeico do presente estudo estão representados na tabela 2, os valores variaram de 96,18 a 82,24%. Verificou-se que houve uma diminuição na solubilidade dos filmes com o aumento na concentração de glicerol, ou seja, o plastificante teve um efeito positivo.

Tabela 2 - Valores de Solubilidade e peso (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *H. musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e 0,25% de ácido cafeico.

Concentrações (%)	Solubilidade (%)	Peso (mg)
2,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	96,18 \pm 2,30 ^{ab}	0,18 \pm 0,01
2,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	89,73 \pm 2,44 ^{ab}	0,32 \pm 0,01
2,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	88,05 \pm 2,49 ^{ab}	0,34 \pm 0,02
3,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	90,36 \pm 3,32 ^{ab}	0,36 \pm 0,01
3,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	91,65 \pm 1,53 ^b	0,46 \pm 0,03
3,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	90,73 \pm 4,92 ^{ab}	0,48 \pm 0,01
4,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	84,78 \pm 2,07 ^a	0,50 \pm 0,02
4,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	84,77 \pm 0,46 ^a	0,52 \pm 0,01
4,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	82,24 \pm 0,23 ^a	0,53 \pm 0,03

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PS = Polissacarídeo Sulfatado; G = Glicerol e AC = Ácido cafeico. As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA $p < 0,05$).

A natureza hidrofílica do glicerol diminui as interações entre as moléculas de biopolímero, conseqüentemente, aumenta a atração da água para a matriz polimérica, resultando em regiões mais móveis com maiores distâncias entre as cadeias. Filmes elaborados a base de amido e carragenana demonstraram o mesmo comportamento dos valores de solubilidade do presente estudo (SANDHU *et al.*, 2020).

A interação que ocorre entre o amido e a carragenana gera um maior grau de compactação de suas matrizes, isso ocorreu por que, ambas as variáveis independentes apresentaram efeito negativo na solubilidade dos filmes, isso foi relatado anteriormente por filmes elaborados de amido de lótus / proteína de soro de leite / casca de psyllium (SUKHIJA *et al.*, 2016). A diminuição da solubilidade também pode ser relacionada com a presença do ácido cafeico, resultados similares referentes a solubilidade de filmes a base de ácido cafeico com quitosana foi descrito por NUNES *et al.* (2013).

Os produtos alimentares podem exigir filmes insolúveis em água para melhorar

sua vida útil e resistência à água outro não, como no caso onde a solubilização do filme na água antes do consumo do produto é importante em aplicações como encapsulamento de alimentos ou aditivos. Assim, quando analisada em particular essa propriedade deve ser interpretada de acordo com a necessidade do produto SANDHU *et al.* (2020).

5.4.4 Propriedades óticas

5.4.4.1 Cor e opacidade

Os valores de luminosidade (L^*), a^* e b^* e opacidade (média \pm desvio padrão) para cada uma das formulações de filmes produzidos, com diferentes combinações de PS, glicerol e ácido cafeico, estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de Luminosidade, a^* , b^* e Opacidade (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *H. musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e ácido cafeico (0,25%).

Concentrações (%)	L^*	a^*	b^*	Opacidade (%)
2,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	91,30 \pm 1,31 ^d	0,08 \pm 0,04 ^a	5,25 \pm 0,49 ^b	2,99 \pm 0,78 ^a
2,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	92,91 \pm 1,77 ^a	0,17 \pm 0,06 ^a	5,71 \pm 1,31 ^b	2,71 \pm 0,61 ^a
2,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	92,88 \pm 0,48 ^a	0,12 \pm 0,01 ^a	5,70 \pm 0,36 ^b	2,25 \pm 0,39 ^a
3,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	91,33 \pm 0,44 ^d	-0,32 \pm 0,01 ^{abc}	8,37 \pm 0,56 ^a	3,82 \pm 0,32 ^c
3,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	93,30 \pm 0,09 ^{ac}	-0,42 \pm 0,03 ^a	8,60 \pm 0,20 ^a	4,88 \pm 0,45 ^b
3,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	92,21 \pm 0,66 ^{bc}	-0,40 \pm 0,02 ^c	8,40 \pm 0,49 ^a	4,76 \pm 0,25 ^{bc}
4,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	91,16 \pm 1,18 ^{cd}	0,36 \pm 0,06 ^{bc}	9,00 \pm 1,08 ^a	4,17 \pm 0,20 ^a
4,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	92,22 \pm 0,08 ^{ab}	0,27 \pm 0,01 ^{ab}	9,05 \pm 0,15 ^a	2,97 \pm 0,05 ^b
4,0 PS + 1,5 G + 0,0 AC	91,80 \pm 0,79 ^{ab}	0,24 \pm 0,03 ^{ab}	8,88 \pm 0,91 ^a	2,77 \pm 0,14 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PS = Polissacarídeo Sulfatado; G = Glicerol e AC = Ácido cafeico. As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA $p < 0,05$).

As diferentes concentrações dos filmes a base de PS incorporados de ácido cafeico e glicerol apresentaram uma variação de 93,30 \pm 1,31 a 91,16 \pm 1,18 para a luminosidade. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) com o aumento da concentração

do polímero nem com a adição de 1,0% de plastificante. Os valores de a^* (eixo verde – vermelho), para o presente trabalho variaram de $-0,42 \pm 0,03$ a $0,36 \pm 0,06$ não ocorrendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Os valores negativos encontrados para o parâmetro a^* indicam uma leve predominância para a cor verde.

Os valores de b^* (eixo azul – amarelo) apresentaram a seguinte variação $5,25 \pm 0,49$ a $9,05 \pm 0,15$. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) para os filmes de 3,0 e 4,0% de PS com maior predominância da coloração amarela devido as maiores concentrações do polímero estarem presentes nessas formulações, porém estes diferiram dos filmes de menor concentração de polissacarídeo em estudo. A opacidade do presente estudo variou de $2,25 \pm 0,39$ a $4,88 \pm 0,45$. Tais valores praticamente não diferem entre si ($p < 0,05$), sendo observado maior valor de opacidade para o filme com 3,0% de PS e 1,0% de glicerol.

Testando o efeito de diferentes concentrações de emulsificantes nas características de filmes a base de carragenana HANANI *et al.* (2018) obtiveram valores próximos aos do presente estudo para os parâmetros L^* e opacidade que foram, respectivamente $87,36 \pm 0,49$ e $4,30 \pm 0,22$. No trabalho desenvolvido por NAZURAH *et al.* (2017) onde ocorreu a caracterização físico-química de filmes à base carragenana incorporados a vários óleos vegetais, obteve-se o valor de $3,93 \pm 0,08$ referente a opacidade, valor que se assemelha ao do presente estudo.

Resultados bem semelhantes ao presente estudo podem ser visualizados no trabalho de THAKUR *et al.* (2016) onde ao caracterizarem filme comestível biodegradável de amido de arroz, obtiveram valores de $95,52 \pm 0,2$ para luminosidade, $-0,31 \pm 0,00$ para o valor de a^* , $5,03 \pm 0,25$ referente ao b^* e $8,48 \pm 0,57$ para opacidade, valores bem próximos aos do presente estudo.

Dada a importância da luz no processo de oxidação dos alimentos, a propriedade de barreira à luz dos filmes de embalagem é uma função essencial para proteger alimentos sensíveis à luz. Neste estudo, a incorporação de 1,0% de glicerol e 0,25% de ácido cafeico nos filmes composto de 3,0% de PS resultou em filmes mais escuros ($L^* 93,30 \pm 0,09$) com mais vermelhidão e amarelecimento. Filmes com uma coloração mais intensa podem oferecer maior proteção aos alimentos embalados contra descoloração, sabores desagradáveis e perdas de nutrientes causadas pela oxidação induzida pela luz (ALIABADI *et al.*, 2018).

5.4.5 Avaliação das propriedades mecânicas

5.4.5.1 Ensaaios mecânicos

Os valores das propriedades mecânicas (média \pm desvio padrão) para cada uma das formulações de filmes produzidos, com diferentes combinações de PS, glicerol e ácido cafeico, estão representados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores das propriedades mecânicas (média \pm desvio padrão) dos filmes de polissacarídeo sulfatado (2,0; 3,0; e 4,0%) obtido da alga vermelha *H. musciformis* com diferentes concentrações de glicerol (0,0; 1,0 e 1,5%) e ácido cafeico (0,25%).

Concentrações (%)	Tensão na Ruptura – TR (MPa)	Deformação na Ruptura – DR (%)
2,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	8,67 \pm 0,86 ^a	1,54 \pm 0,41 ^a
2,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	7,36 \pm 0,41 ^a	1,93 \pm 0,63 ^a
2,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	6,04 \pm 0,47 ^a	1,12 \pm 0,09 ^a
3,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	16,74 \pm 1,71 ^c	2,18 \pm 0,35 ^a
3,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	11,60 \pm 0,77 ^b	2,96 \pm 0,60 ^b
3,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	14,35 \pm 2,23 ^{bc}	1,70 \pm 0,58 ^a
4,0 PS + 0,0 G + 0,0 AC	25,52 \pm 0,31 ^e	3,27 \pm 0,07 ^b
4,0 PS + 1,0 G + 0,25 AC	23,31 \pm 0,96 ^{de}	3,15 \pm 0,34 ^b
4,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC	21,97 \pm 1,75 ^d	3,17 \pm 0,35 ^b

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PS = Polissacarídeo Sulfatado; G = Glicerol e AC = Ácido cafeico. As médias mais o desvio padrão com letras distintas possuem diferença estatisticamente significativa entre si pelo teste de Tukey (ANOVA $p < 0,05$).

As propriedades de tração determinam a capacidade que os filmes comestíveis possuem em suportar uma força externa e manter sua integridade sem romper. Essa propriedade se torna importante pois afeta a aplicação e conseqüentemente o transporte e manuseio dos produtos embalado nesses filmes (SHAIKH *et al.*, 2019). A resistência à tração de filmes do presente estudo variou entre 6,04 e 25,52 Mpa, ocorrendo diferenças estatística

entre os tratamentos. GIMENEZ *et al.* (2013) relatam, que normalmente quanto maior é a concentração do polímero na formulação de um filme maior será a resistência do mesmo e isso foi comprovado no presente estudo.

Filmes compósitos PS / AC com maiores concentrações de carragenana exibiram maior resistência à tração e deformação na ruptura, mostrando que a concentração de carragenana afeta positivamente essas propriedades mecânicas. Geralmente o desempenho mecânico de um filme depende do composto ativo e sua incorporação, bem como o tipo de matriz polimérica e a interação entre os diferentes componentes (TALÓN *et al.*, 2017). SUN *et al.*, (2013) prepararam filmes compostos a partir de proteínas de amido de ervilha / amendoim e relataram aumento da resistência à tração com um aumento na concentração de amido, ou seja, a matriz polimérica atuou de forma positiva gerando filmes resistente.

Valores próximos de tensão na ruptura variou entre 8,90 e 28 Mpa foram encontrado por SANDHU *et al.* (2020) em filmes preparados a partir de amido e carragenana, verificou-se que as concentrações de amido e carragenana afetaram positivamente a resistência à tração. Os valores de TR obtidos também se assemelharam ao estudo realizado por SHOJAEE-ALIABADI *et al.* (2014) na preparação de filmes de carragenana incorporados com óleos essenciais onde obtiveram (10,3 a 25 MPa), porém diferem de outros estudos onde os valores de TS foram bem superiores (44,6 Mpa), encontrados em filmes desenvolvidos com carragenana por (GANESAN *et al.*, 2018).

Esses valores baixos de TR podem ser resultado do uso de um polímero que não passou por um processo efetivo de purificação, isso foi relatado por (KU *et al.*, 2008) que obtiveram baixos valores em suas propriedades mecânicas, sendo estes 2,32 MPa para a TR e 28,96% para a DR elaborando filmes a base de 1,5% de PS.

A deformação na ruptura dos filmes foi avaliada para estimar a extensibilidade dos filmes antes de se romperem. Nota-se que as diferenças estatísticas entre as formulações foram mínimas. As propriedades mecânicas descritas por inúmeros autores na literatura referentes a filmes comestíveis a base de polissacarídeos são diversas e essas variações são referentes ao tipo de polímeros e plastificantes utilizados na formulação dos filmes.

5.4.6 Avaliação das propriedades mecânicas Avaliação da atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Hypnea musciformis* e do ácido cafeico

Os resultados obtidos revelam a inibição da concentração mínima de PS usada no estudo (2,0%) para todas as bactérias testadas, demonstrando que em maiores concentrações essa atividade poderá ser mais expressiva, o que torna interessante a continuação dos estudos. Os resultados referentes a eficiência do ácido cafeico frente as bactérias testadas, mostrou-se presente para Gram-negativas (*Vibrio parahaemolyticus*) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*).

Tabela 5 - Verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para PS extraído da alga vermelha *H. musciformis*, com solução de 2,0% de PS, 0,25% de ácido cafeico e água destilada estéril (controle) frente as bacterias Gram-negativas (*E. Coli*, *S. entérica* e *V. parahaemolyticus*) e Gram-positiva (*S. aureus*).

Concentração da solução filmogênica	Halo de inibição (presença ou ausência)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC 18950	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella Entérica</i> ATCC 13076
PS 2,0%	Presença	Presença	Presença	Presença
AC 0,25%	Presença	Presença	Ausência	Ausência
Água destilada estéril (Controle)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

Fonte: Elaborado pelo autor.

Um fator que pode ter interferido positivamente na efetividade da carragenana, é o período em que as algas em estudo foram coletadas, é de conhecimento que as mudanças ambientais regulam a composição, estrutura e funcionamento desses organismos. Estudos revelam a presença de máxima atividade antimicrobiana em algas coletadas entre abril e julho (período próximo a coleta do presente estudo) quando a temperatura da água e a luminosidade

apresentam-se mais elevadas, tornando as algas mais eficiente na realização de suas atividades metabólicas, tal fato foi relatado por (MARÉCHAL *et al.* 2004).

Resultados diferentes foram encontrados por (JAISWAL *et al.* 2019), onde testaram a atividade antibacteriana de filmes de hidrogel à base de carragenana contra duas bactérias patogênicas, *S. epidermis* e *E. coli*, segundo os autores o filme puro de carragenana não mostrou atividade antibacteriana contra ambas as bactérias, apenas as demais formulações em estudo.

Em seus experimentos (SOUZA *et at.* 2018) revelam as atividades *in vitro* de kappa-carragenana isolada de alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* como potencial antimicrobiano, anticâncer e neuroprotetor o polissacarídeo teve ação antibacteriana e antifúngica contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente. Filmes produzidos bionanocompósitos antimicrobianos à base de carragenina foram estudados por (ROY *et al.*, 2019) resultado em resultados positivos os filmes, exibindo forte atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas Gram-negativas, *E. coli* transmitidas por alimentos, mas leve atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, *L. monocytogenes*.

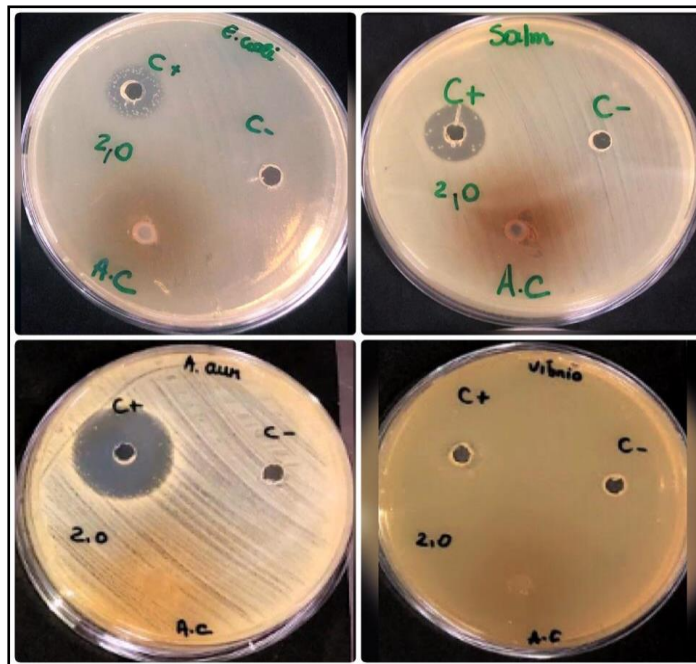
Poucos trabalhos na literatura abordam a ação do ácido cafeico sobre bactérias, porém existem vários trabalhos que o apontam como constituinte principal da própolis, e o mesmo sendo responsável pela ação antibacteriana da própolis (ALJADI *et al.* 2003). Foi demonstrado que ácidos orgânicos e compostos fenólicos, incorporados em filmes de carragenana são capazes de inibirem efetivamente a deterioração microbiana em alimentos embalados. A incorporação de ácido cítrico, ou láctico no filme demonstrou uma ação bactericida e bacteriostática contra *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* e algumas outras cepas patogênicas (EL-FAWAL, 2014; ROCHA *et al.*, 2014 e SCHREIBER, 2012).

Em seus estudos (FARHAN *et al.* 2020) desenvolveram filmes comestíveis ativos à base de carragenana semi-refinada para avaliarem as propriedades antioxidantes, de cor e aplicação em embalagens de peito de frango. As amostras embaladas no filme de carragenana tiveram contagens bacterianas significativamente menores do que as embaladas em filme de polietileno durante todo o período de armazenamento. O aumento no crescimento bacteriano nos filmes de polietileno pode ser atribuído aos sucos pingados dessas amostras, que por sua vez podem causar contaminação cruzada.

Os filmes de carragenana não apresentaram nenhum gotejamento de sucos, isso foi atribuído ao papel da matriz desses filmes na prevenção ou redução do vazamento de suco (GENNADIOS *et al.*,1997). Os autores sugerem que o gotejamento de sucos ocorre quando

os alimentos, no caso os cortes de frescas, aves ou peixes são embalados em bandejas plásticas de varejo o que torna o produto pouco atraentes para os consumidores. Isso pode ser minimizado com a aplicação das embalagens comestível. A matriz por sua característica hidrofílica pode aderir melhor ao músculo e assim evitar a liberação de líquido, seja por absorção ou por maior sustentação do músculo, impedindo a liberação de líquido intersticial devido a uma variação de temperatura. A verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para PS extraído da alga vermelha *H. musciformis* pode ser observada na figura 19.

Figura 19 – Verificação da atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco para PS extraído da alga vermelha *H. musciformis*, com solução de 2,0% de PS, 0,25% de ácido cafeico e água destilada estéril (controle) frente as bacterias Gram-negativas (*E. Coli*, *S. entérica* e *V. parahaemolyticus*) e Gram-positiva (*S. aureus*).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.7 Custo de produção para cada solução filmogênica

De acordo com o rendimento da alga calculado anteriormente de aproximadamente 28,41%, a cada 5 g de alga extraída gerava em torno de 1,5 g de carragenana liofilizada. Para a produção de 15 g de carragenana se faz necessário a realização de 10 extrações e cada extração necessita de 1 L de álcool, totalizando 10 L para a obtenção de 15g de carragenana.

Em escala laboratorial existe ainda outros gastos como água e energia elétrica que são imensuráveis ao longo do estudo. Os custos podem ser reduzidos em uma escala comercial encontrando formas de aperfeiçoar a extração e aquisição de reagentes mais baratos. Observa-se que a solução de 1 litro de revestimento na menor concentração já possui um preço elevado para ser produzida (Tabela 6), assim para que a produção filmogênica de carragenana seja implementada de forma efetiva na indústria são necessários avanços inovadores em toda a cadeia produtiva, desde cultivo e colheita de algas, transporte, extração até a fabricação e comercialização do produto.

Tabela 6 - Custo de produção das soluções de revestimento produzido a partir do PS extraído da alga vermelha *H. musciformis*.

Revestimento	Litro	Preço R\$
2,0 %	1	77,77
30 %	1	116,66
4,0%	1	155,54

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

O filme com 4,0 PS + 1,5 G + 0,25 AC apresentou boa resposta para as propriedades de barreira como solubilidade, propriedades óticas (cor e opacidade) e propriedades mecânicas. Apesar de possuir o maior valor de PVA em relação as demais formulações, pode ser considerado o mais indicado no presente estudo para possíveis aplicação em pescados.

Por ser inócuo ao consumidor e biodegradável no meio ambiente, os filmes edíveis produzidos no presente trabalho apresentaram grande potencial como revestimentos comestíveis, atuando como barreira de produtos pesqueiros.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Constituição (1997). Portaria Nº 540 nº 540, de 27 de agosto de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Portaria Nº 540, de 27 de Outubro de 1997. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad. Acesso em: 13 jan. 2019.
- ALIABADI. S. SHOJAEI.; HOSSEINI.H.; MOHAMMADIFAR.M.A.; MOHAMMADI.A.; GHASEMLOU.M.; HOSSEINI.S.M, *et al.* Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, 101 (2014), pp. 582-591.
- ALJADI. A.M.; YUSOFF. K.M. **Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties**. Turk J. Med. Sci., 33 (2003), pp. 229-236.
- ALVES, V.D.; N. COSTA.; COELHO, I.M.. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. **Carbohydr. Polymers.**, 79 (2010), pp. 269-276.
- ANDRADE, RENATO, MARTINS. **Carragenanas da alga vermelha *Solieria filiformis*: Caracterização estrutural e avaliação da atividade cicatrizante**. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ARAUJO, Mariana de Oliveira. **Preparação de derivados do ácido cafeico e avaliação das suas atividades antimicrobianas**. 2017. 178f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- ASSIS, O. B. G.; BRITO, D. **Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações**. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014.
- AZIZA, M. *et al.* Seasonal variation of the growth, chemical composition and carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux harvested along the Atlantic coast of Morocco. **Scientific Research and Essay**, v.2, n.10, p.509- 514, 2008.
- BELFORT, Antonio Dantas e *et al.* **Potencial nutricional das algas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Solieria filiformis*: Análises da composição centesimal**. VII CONNEPI- Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e inovação, Palmas, Tocantis 2012.
- BENJAMA, Omme; MASNIYOM, Payap. Nutritional composition and physicochemical properties of two green seaweeds (*Ulva pertusa* and *U. intestinalis*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. Songklanakar. **Journal of Science and Technology**. Songkla. p.575-583, 2011.
- BORS, W., MICHEL, C., SCHIKORA, S. **Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials – A pulse-radiolysis study** Free Radical Biology and Medicine, 19 (1995), pp. 45-52.

BRADFORD, Marion Mckinley. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescados e seus derivados. Brasília, DF, 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance *Nutrition Reviews*, 56 (1998), pp. 317-333.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CHENG ZHANG.; ZHIGAO WANG.; YANG LI.; YIJIE YANG.; XINGRONG JU.; RONG HE. The preparation and physiochemical characterization of rapeseed protein hydrolysate-chitosan composite films. **Food Chemistry**. v. 272, p. 694-701, 2019.

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 38, p. 20-27, 2014.

CHOJNACKA, Katarzyna. Biologically active compounds in seaweed extracts the prospects for the application. **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, p.20-28, 2012.

CIAN, R. E.; SALGADO, P. R.; DRAGO, S. R.; GONZÁLEZ, R. J.; MAURI, A. N. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. **Food Chemistry**, 146, p. 6–14, 2014.

COSTA, L. S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p.21-28, jan. 2010. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2010.03.005>.

CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes**. Campinas. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, 2006.

DAWSON, P.L.; HIRT D.E.; RIECK J.R.; ACTON J.C; SOTTHIBANDHU. A. (2003) Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. **Food Research International**, 36:959-968.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v 70, n. 2, p. 645-647,

1976.

DILARRI, G.; MENDES, C. R.; MARTINS, A. O. Síntese de biofilmes de quitosana reticulados com tripolifosfato atuando como gente quelante na fixação de nanopartículas de prata. **Ciência & Engenharia**. v. 25, p. 97-103, 2016.

EL-AASSAR, M. R.; EL FAWAL, G. F.; KAMOUN, E. A.; FOUUDA, M. M. G. Controlled drug release from cross-linked κ -carrageenan/hyaluronic acid membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 322-329, 2015.

EL-FAWAL, G. (2014). Preparation, characterization and antibacterial activity of biodegradable films prepared from carrageenan. **Journal of Food Science and Technology**, 51(9), 2234–2239.

ELLEUCH, Mohamed *et al.* Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p.411-421, jan. 2011. Elsevier BV. B
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077>.

FARHAN.A.; MOHDHANI.N. Active edible films based on semi-refined κ -carrageenan: Antioxidant and color properties and application in chicken breast packaging. **Food Packaging and Shelf Life**. Volume 24, June 2020, 100476.

FERREIRA, L. G. Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo Laurencia (Cerámiales, Rhodophyta). 2011. 217 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2011.

FERNÁNDEZ, C. M.; KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RANTANEN, J.; KROGARS, K.; HEINAMAKI, J.; IRAIZOZ COLARTE, A.; YLIRUUSI, J. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 69-76, 2004.

FLEURENCE, J.; MORANÇAIS, M.; DUMAY, J.; DECOTTIGNIES, P; TURPIN, V.; MUNIER, M.; GARCIA-BUENO, N; JAOUEN, P. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? **Trends In Food Science & Technology**, Estados Unidos, v. 27, p.57-61, 2012.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins. In R.Y. Yada (Ed), *Proteins in food processing*. Cambridge: **Woodhead Publishing Limited**. 2004. p. 197-213.

FUJII, M.T.; CASSANO V.; STEIN E.M.; CARVALHO L.R. Visão geral da taxonomia e dos principais metabólitos secundários e suas atividades biológicas relacionadas à saúde humana do complexo Laurencia (Cerámiales, Rhodophyta) do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 21, n. 2. p. 268-282, 2011.

GANESAN. R.A.; MUNISAMY.S.; BHAT.R. Effect of potassium hydroxide on rheological and thermo-mechanical properties of semi-refined carrageenan (SRC) films. **Food Bioscience**. Volume 26, December 2018, Pages 104-112.

GALUS, S.; KADZINSKA, J. Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. **Food Hydrocolloids**, Warsaw, v. 52, p. 78-86, 2016.

GAO C.; POLLET E.; AVÉROUS L. Innovative plasticized alginate obtained by thermo-mechanical mixing: Effect of different biobased polyols systems. PubMed. p. 669-676, 2016.

GENNADIOS.A.; HANNA. M.A.; KURTH. L.B.. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. **LWT-Food Science and Technology**, 30 (1997), pp. 337-350.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; GOODING, C. H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable hydrophilic edible films. **Journal Food Engineering**, 21, p. 395-409, 1994.

GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ DE LACEY, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, 30 264-271, Madrid, Spain, 2013.

GHANNAM, A.; ABBAS, A.; ALEK, H.; AL-WAARI, Z.; AL-KTAIFANI, M. Enhancement of local plant immunity against tobacco mosaic virus infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformes*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 19-27, 2013.

GNIEWOSZ, M.; SYNOWIEC. A.; KRAŚNIEWSKA. A.; PRZYBYŁ. J.L.; WĘGLARZ. Z. **The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples.** **Food Control**, 37 (2014), pp. 351-361.

GONÇALVES, A. A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, v. 1, 608p.

GONTARD, N., GUILBERT, S., & CUQ, J.-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, p.190-199, 1992.

GONZÁLEZ A.; MC STRUMIA.; CIA IGARZABAL. Proteína de soja reticulada como material para filmes biodegradáveis: Síntese, caracterização e biodegradação **Jornal de Engenharia de Alimentos**, v. 106 n. 4, p. 331-338, 2011.

GUIMARÃES, Cybele Pinheiro. **Polissacarídeos sulfatados de rodófitas *Hypnea musciformis* como aditivos em apresetados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise de estocagem sob refrigeração.** 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GUPTA, Shilpi; ABU-GHANNAM, Nissreen. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. **Trends In Food Science & Technology**, v. 22, p.315-326, 2011.

HANANI. NUR.Z.A.; HUSNA. A.B.A.ELMA. Effect of different types and concentrations of emulsifier on the characteristics of kappa-carrageenan films. **International Journal of**

Biological Macromolecules. Volume 114, 15 July 2018, Pages 710-716.

HAN, J.H (2005) Antimicrobial packaging systems. In: Han JH (Ed.) Innovations in food packaging. Baltimore, **Elsevier Science & Technology Books.** p. 80-107.

HOSTINS, Bárbara; BRAGA André; LOPES, Diogo L.A.; WASIELESKY Wilson; POERSCH, Luís H. Effect of temperature on nursery and compensatory growth of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* reared in a super-intensive biofloc system. *Aquacultural Engineering*, Rio Grande, v.66, p. 62-67, 2015.

JAISWAL, L., SHANKAR, S., RHIM, J.-W. Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application. **Carbohydrate Polymers.** Volume 224, 15 November 2019, 115191.

JEON, Y. J.; KAMIL, J. Y. V. A.; SHAHIDI, F. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5167–5178, 2002.

J. P. MERCER, K.-S. MAI & J. DONLON (1993) Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus and *Haliotis discus hannai* Ino I. Effects of algal diets on growth and biochemical composition, *Invertebrate Reproduction & Development*, 23:2-3, 75-88, DOI: 10.1080/07924259.1993.9672298

KOLYBABA, M.; TABIL, L. G.; PANIGRAHI, S.; CRERAR, W. J.; POWELL, T.; WANG, B. Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future. CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting Sponsored by the Red River Section of ASAE Quality Inn & Suites 301 3rd Avenue North Fargo, North Dakota, USA October, p. 3-4, 2008.

KU, K. J.; HONG, Y. H.; SONG, K. B. Mechanical properties of a *Gelidium corneum* edible film containing catechin and its application in sausages. **Journal of Food Science**, 73 (3), C 217 e C 221; 2008.

LEWIS, N.G. ALSCHER, R.G. HESS, J.L. (Eds.) Plant phenolics Antioxidants in higher plants, CRC Press, Boca Raton, FL (1993).

MACIEL, J. S., CHAVES, L. S., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, D. I. A., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, P. A. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, 71, 559e565, 2008.

MARÉCHAL.J.P.; CULIOLIB.G.; HELLIO.C.; GUYON. H.T.; CALLOW.M.E.; CLARE.A.Y.; MAGNÉ.A.O. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** Volume 313, Issue 1, 15 December 2004, Pages 47-62.

MARTINI, D. S. **Polímeros derivados do biodiesel do óleo de linhaça: obtenção e propriedades físico-químicas.** Programa De Pós-Graduação Em Química. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (Tese). Tese apresentada como

requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química. Porto Alegre, Maio/2010.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability Properties of Edible Films. In *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*; Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M., Eds.; Technomic Publishing: Lancaster, PA; p. 139-188, 1994.

MELLO, J.T.C. 1973 Estudo populacional do camarão-rosa *Penaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) e *P. paulensis* (Pérez-Farfante, 1967). *Boletim do Instituto de Pesca*, 2: 19-65.

MÓNICA, C.; BERNARDINA, G. M.; JESÚS, F. M.; DOLORES. Study on the effect of graphene and glycerol plasticizer on the properties of chitosan-graphene nanocomposites via in situ green chemical reduction of graphene oxide. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.114.p. 599-613, 2018.

MUÑOZ, J.; KUMAR, V.; FOTEDAR, R. Seaweed culture with special reference to Latin America. In: Fotedar RK, Phillips BF (eds) *Recent advances and new species in aquaculture*. Wiley-blackwell, Oxford, p.252-276, 2011.

NAIR, G.B.; SARKER, B.L.; ABRAHAM, M.; PAL, S.C. Serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from hydrobiologically dissimilar aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v50, n724-726, 1985.

NAGAKURA, K. General analysis. In: OKADA, M, *et al.* (Ed.). *Utilization of Marine Products*. Tokyo: **Overseas Technical Cooperation Agency**. p. 159-169, 1972.

NAUER F., CASSANO V, OLIVEIRA M.C. Description of *Hypnea pseudomusciformis* sp. nov., a new species based on molecular and morphological analyses, in the context of the *H. musciformis* complex (Gigartinales, Rhodophyta). 2015. **Journal of Applied Phycology**.

NAZURAH. R. N. F.; HANANI. Z.A. NUR. Physicochemical characterization of kappa-carrageenan (*Eucheima cottoni*) based films incorporated with various plant oils. **Carbohydr. Polymers.**, 157 (2017), pp. 1479-1487.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*, v. 58, n. 4, p.187-205, 2013.

NISHIKAWA, Emily. **Bioadsorção de cádmio em resíduo da extração de alginato da alga marinha sargassum filipendula**.2017.104 f. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas,2017.

NOGUCHI, T., MATSUI, T., MIYAZAWA, K., ASAKAWA, M., IIJIMA, N., SHIDA, Y. Poisoning by the red alga “Ogonori” (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima coast Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan. *Toxicon*, 32, 1533-1538, 1994.

NOURI, A.; YARAKI, M.T.; LAJEVARDI, A.; RAHIMI, T.; TANZIFI.; M., GHORBANPOUR, M. An investigation of the role of fabrication process in the physicochemical properties of κ -carrageenan-based films incorporated with *Zataria multiflora* extract and nanoclay. *Food Packaging and Shelf Life*, 23 (2020), Article 100435.

NUNES. C. Chitosan–caffeic acid–genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media **Carbohydrate Polymers** Volume 91, Issue 1, 2 January 2013, Pages 236-243.

NUNES, J. M. C. *et al.* Rhodophyceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

OLIVEIRA. L. M.; ALVES. R.M.V.; SARANTÓPOULOS. C.I.G.L.; PADULA. M.; GARCIA. E. E. C.; COLTRO. L. Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Campinas: Centro de tecnologia de embalagem – CETEA. p. 219, 1996.

OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, PAPLV (2004) Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, 7:161-165.

OLIVEIRA, Jakson de Martins. **Géis de colágeno e gelatina do resíduo da tilápia (*Oreochromis niloticus*) para incorporação e liberação controlada in vitro da astaxantina**. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado Ciência e tecnologia de alimentos) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

ORIA, A. B.; GUTIERREZ, G. R.; SENENT, F. R.; PRIOR, A. F.; BOLANOS, J. F. Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. **Meat Science**. v. 148, p. 213-218, 2019.

PACHECO, Laíssa Rodrigues Esposti. **Obtenção e Caracterização de uma matriz polimérica a base de alginato com diferentes agentes reticulantes**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2016.

PAŞCALĂU, V.; POPESCU, V.; POPESCU, G. L.; DUDESCU, M. C.; BORODI, G.; DINESCU, A.; PERHAIȚA, I.; PAUL, M. The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the cross-linked composite films. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 536, p. 418-423, 2012.

PATARRA, A.R.F. **Pesquisa de Ácidos Gordos em macroalgas marinhas do litoral dos Açores**. Dissertação de mestrado. 2008.75 f. Dissertação (Mestrado em Ciencia do Mar-Recursos Marinhos, especialidade em Biologia Marinha) Universidade do Porto, 2008.

PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of merine algal polysaccharides. Academic Press, New York, p.219-0, 1967.

PEREIRA L.; GHEDA S.F.; RIBEIRO CLARO P.J. Análise por espectroscopia vibracional de polissacarídeos de algas marinhas com potencial uso nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticos **Int. J. Carbohydr. Chem**, 537202 p. 1-7. 2013.

PEREZ, Roberto C.; DEFEO Omar. Growth and mortality of transient shrimp populations (spp.) in a coastal lagoon of Mexico: role of the environment and density-dependence **ICES J. Mar. Sci.**, 62 (1) (2005), pp. 14-24.

PINHEIRO, A.C.; BOURBON, A.I; QUINTAS, M.A.C.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J. A.;

VICENTE, A. A. (2010) **Diffusion of bioactive peptides from chitosan-based edible films – effects of temperature and peptides molecular weight**. In Total Food – Sustainability of the Agri-Food Chain; Waldron, K.W, Moates, G.K. and Faulds, C.B., Ed; Cambridge, UK: RSC Publishing, pp. 233-237.

RABELLO, M. **Aditivação de Polímeros**. São Paulo: Editora Artliber, p. 141, 2000.

RAMOS. O.L.; REINAS.I.; SILVA.S.I.; FERNANDES. J.C.; CERQUEIRA. M.A.; PEREIRA. A.A.; VICENTE, M.F.; POCAS, M.E.; PINTADO.; MALCATA. F.X. **Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom**. Food Hydrocoll., 30 (2013), pp. 110-122.

RASOOL.A.; ATA.S.; ISLAM. A.; RIZWAN.M.; AZEEM.K.M.; MEHMOOD.A.; KHAN. U.R.; QURESHI.R.U.A.; MAHMOOD.A.H. **Kinetics and controlled release of lidocaine from novel carrageenan and alginate-based blend hydrogels**. International Journal of Biological Macromolecules. Volume 147, 15 March 2020, Pages 67-78.

RASOOL, N.; YASIN, T.; HENG, J. Y. Y.; AKHTER, Z. **Synthesis and characterization of novel pH-, ionic strength and temperature- sensitive hydrogel for insulin delivery**. Polymer, v. 51, p. 1687-1693, 2010.

RHEIN-KNUDSEN, N.; ALE, M. T.; AJALLOUEIAN, F.; YU, L. Y.; MEYER, A. S. **Rheological properties of agar and carrageenan from Ghanaian red seaweeds**. Food Hydrocolloids, 63, p. 50–58, 2017.

ROCHA, M. d., LOIKO, M. R., TONDO, E. C., PRENTICE, C. (2014). **Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films in-corporated with organic acids**. Food Hydrocolloids, 37(Supplement C), 213–220.

RODRIGUES, José Ariévil Gurgel *et al.* **Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia***. Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 40, n. 2, p.224-231, abr-jun, 2009.

RODRIGUES, José Ariévil Gurgel *et al.* **Isolamento, fracionamento e avaliação toxicológica in vivo de polissacarídeos sulfatados de *Hypnea musciformis***. Ciência Rural, Santa Maria, v.41, n. 7, p.1211-1217, jul. 2011.

ROY.S.; RHIM. J.W. **Carrageenan-based antimicrobial bionanocomposite films incorporated with ZnO nanoparticles stabilized by melanina**. Food Hydrocolloids. Volume 90, May 2019, Pages 500-507.

RUPEREZ, P. **Mineral content of edible marine seaweeds**. Food Chemical. 79, 2002. p. 23–26.

SABERI, B.; THAKUR, R.; VUONGA, Q. V.; CHOCKCHASAWASDEEA, S.; GOLDING, J. B.; SCARLERR, C. J.; STATHOPOULOS, C. E. **Optimization of physical and optical properties of biodegradable edible films based on pea starch and guar gum**. Industrial Crops and Products. v. 86, p. 342-352, 2016.

SALTMARSH, Mike. **Recent trends in the use of food additives in the United Kingdom.** Journal Of The Science Of Food And Agriculture, [s.l.], v. 95, n. 4, p.649-652, 27 maio 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6715>.

SCHREIBER, S. B. (2012). **Chitosan-gallic acid films as multifunctional food packaging.** Masters dissertation. Graduate School at Trace: The University of Tennessee.

SELVALAKSHMI, S.; VIJAYA, N.; SELVASEKARAPANDIAN, S.; PREMALATHA, M. **Biopolymer agar-agar doped with NH₄SCN as solid polymer electrolyte for electrochemical cell application.** Journal of Applied Polymer Science, 134, p. 15, 2017.

SANTIAGO, Janaína de Araújo Sousa.; ARAÚJO, Pedro Filipe Ribeiro.; SANTIAGO, André Prata.; CARVALHO, Fátima Cristiane Teles de.; VIEIRA, Regine Helena Silva dos Fernandes. **Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados – revisão.** Ciência. Mar, Fortaleza, 2013, 46(2): 92 – 103.

SANDHU, K.S. *et al.* **Physical, structural and thermal properties of composite edible films prepared from pearl millet starch and carrageenan gum: Process optimization using response surface methodology.** International Journal of Biological Macromolecules, v.143, p. 704-713, 2020.

SEVDAN YILMAZ. **Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*.** Fish & Shellfish Immunology. v. 86.p 384-392, 2019.

SHAIKH. M.; HAIDER.S.; ALI T.M., HASNAIN. A. **Physical, thermal, mechanical and barrier properties of pearl millet starch films as affected by levels of acetylation and hydroxypropylation.** Int. J. Biol. Macromol. 124 (2019), pp. 209-219.

SHARIFZADEH. G.; WAHIT. M. U.; SOHEILMOGHADDAM. M.; WHYE. W. T.; PASBAKSH. P. **Kappa-carrageenan/halloysite nanocomposite hydrogels as potential drug delivery systems.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 67, p. 426-434, 2016.

SILVA, F. R.; DORE F.C.M.P.G.; MARQUES C.T.; NASCIMENTO M.S.; BENEVIDES N.M.B.; ROCHA H.A.O.; CHAVANTE S.F.; LEITE E.L. **Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans.** Carbohydrate Polymers, [s.l.], v. 79, n.1, p.26-33, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.010>.

SILVA, M.E.T.D., CORREA, K.D.P., MARTINS, M.A., DA MATTA, S.L.P., MARTINO, H.S.D., COIMBRA, J.S.D.R. **Active edible films based on semi-refined κ-carrageenan: Antioxidant and color properties and application in chicken breast packaging.** Journal of Functional Foods.,v.65, p. 103711, 2020, DOI: 10.1016/j.jff.2019.103711

SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. **Biodegradable films based on biopolymers for food industries.** In M. L. Passos, & C. P. Ribeiro (Eds), Innovation in Food Engineering: New techniques and products, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 511-537, 2010.

SOUZA, B., CERQUEIRA, M., BOURBON, A., PINHEIRO, A., MARTINS, J., TEXEIRA, J. **Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria biridiae***. *Food Hydrocolloids*, 27, p. 287–292, 2012.

SOUZA, R.B., FROTA, A.F., SILVA, J., ALVES, C., NEUGEBAUER, A.Z., PINTEUS, S., RODRIGUES, J.A.G., CORDEIRO, E.M.S., DE ALMEIDA, R.R., PEDROSA, R., BENEVIDES, N.M.B. **In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential**. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 112, June 2018, Pages 1248-1256.

SPAGNOL, Caroline Magnani. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. 2014. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, 2014.

SUN. Q.; SUN. C.; XIONGL. **Mechanical, barrier and morphological properties of pea starch and peanut protein isolate blend films**. *Carbohydr. Polymers.*, 98 (2013), pp. 630-637.

SUKHIJA. S.; SINGH. S.; RIAR. C.S. **Analyzing the effect of whey protein concentrate and psyllium husk on various characteristics of biodegradable film from lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome starch**. *Food Hydrocoll.*, 60 (2016), pp. 128-137.

THAKUR. R.; SABERIA.B.; PRISTIJONO.P.; GOLDING.J.; STATHOPOULOS.C.; SCARLETT.C.; BOWYER.M.; VUONG.Q. **Characterization of rice starch- κ -carrageenan biodegradable edible film. Effect of stearic acid on the film properties**. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 93, Part A, December 2016, Pages 952-960.

VALE, Diego do Alves. **Filmes e revestimentos do caranguejo-uçá (*ucides cordatus*) com aplicação em postas de serra (*scomberomorus brasiliensis*) congeladas**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

TALÓN, E.; TRIFKOVIC, K. T.; NEDOVIC, V. A.; BUGARSKI, B. M.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. **Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts**. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 1153-1161, 2017.

VARGHESE. J. S.; CHELLAPPA. N.; FATHIMA. N. N. **Gelatin-carrageenan hydrogels: Role of pore size distribution on drug delivery process**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 113, p. 346-351, 2014.

VASCONCELOS, Bárbara Monique de Freitas; GONÇALVES, Alex Augusto. **Macroalgae and their uses - alternatives for brazilian industries**. *Revista Verde*, Mossoro, v. 8, n. 5, p.125-140, dez. 2013.

VÁSCONEZ, M. B.; FLORES, S. K.; CAMPOS, C. A.; ALVARADO, J.; GERSCHENSON, L. N. **Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings**. *Food Research International*, v. 42, p. 762–769, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática.** São Paulo: Varela, 2004. 380p. ISBN 858551972X.

VIERA, M.P., COURTOIS DE VIÇOSE, G., ROBAINA, L., IZQUIERDO, M.S.
First development of various vegetable-based diets and their suitability for abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture*, v. 448, p. 75-82, 2015, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.03.002.

WONG, H.C.; TING, S.H.; SHIEH, W.R. **Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan.** *J. Appl. Bacteriol.*, v.73, p.197-202, 1992.

WONG.K.H., CHEUNG. C.K.P. **Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: Part I — proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties.** *Food Chemistry*., v. 71, p. 475-482, 2000, DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00175-8

WYNNE, M.J. **Uma lista de verificação de algas marinhas bentônicas do Atlântico Ocidental tropical e subtropical: quarta revisão.** *Nova Hedwigia* 145: 1-202, 2017.

YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. **Temperature responses of economically importante red algae and their potential for mariculture in Brazilian Waters.** *Journal Of Applied Phycology*, v. 4, p.339-345, 1992.

YU, W.; JONG, K.; Lin, Y.; TSAI, S.; Tey, Y.H.; WONG, H. **Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan.** *Intern. J. Food Microbiol.*, v.160, p.185-192, 2013.