



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

HELDER LEVI SILVA LIMA

**FILMES ANTIOXIDANTES COMESTÍVEIS DE CELULOSE BACTERIANA E
HIDROLISADO DE GELATINA DE PELE DE PESCADO**

FORTALEZA

2018

HELDER LEVI SILVA LIMA

**FILMES ANTIOXIDANTES COMESTÍVEIS DE CELULOSE BACTERIANA E
HIDROLISADO DE GELATINA DE PELE DE PESCADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa

Coorientadora: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida

FORTALEZA

2018

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)

- L698f Lima, Helder Levi Silva.
Filmes antioxidantes comestíveis de celulose bacteriana e hidrolisado de gelatina de pele de peixe /
Helder Levi Silva Lima. – 2018.
166 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.
Coorientação: Profa. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.
1. Revestimento comestível. 2. Suco de caju. 3. Nanofibras de celulose. 4. Peptídeos antioxidantes. 5.
Liberação controlada. I. Título.

CDD 660

HELDER LEVI SILVA LIMA

FILMES ANTIOXIDANTES COMESTÍVEIS DE CELULOSE BACTERIANA E
HIDROLISADO DE GELATINA DE PELE DE PESCADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 24 de Abril de 2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Fábila Karine Andrade
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Edy Souza de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo
Embrapa Agroindústria Tropical

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

Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A toda minha família e aos verdadeiros
amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me preservar. Agradeço aos meus verdadeiros amigos e família.

Agradeço a Dra. Morsyleide Rosa pela oportunidade, disposição, compreensão, suporte e direcionamentos durante o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço à Dra. Ana Iraidy pela ajuda, ensino, conselhos e dedicação. Agradeço a Dra. Maria de Fátima Borges, Dr. João Paulo, Dra. Elígenes Sampaio, Dra. Celli Muniz, Bruna Chagas, Ednaldo Benício pelo auxílio em diversos momentos. Agradeço aos demais colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia da Biomassa e Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa.

Agradeço aos colegas Dra. Catarina Gonçalves, Dr. Miguel Cerqueira, Dr. Miguel Gama, Dr. Pablo, Sara, Paula, pelo apoio nas atividades desenvolvidas durante o intercâmbio.

Agradeço aos meus amigos Natália Lima, Natália Moura, Ana Raquel Meireles, Raquel e Janaína Sobreira pela companhia, conversas e apoio.

Agradeço à Dra. Diana Azevedo e ao Dr. Bartolomeu Warlenepor aceitarem o convite de fazerem parte da banca de qualificação. Agradeço a Dra. Henriette Azeredo, Dra. Fábria Andrade, Dr. Edy Brito, Dr. Sueli Rodrigues e Dr. Bartolomeu Warlenepor aceitarem o convite de fazerem parte da banca de defesa.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará. Agradeço a Embrapa Agroindústria Tropical, Universidade do Minho e ao Laboratório Internacional Ibérico de Nanotecnologia por viabilizarem a execução dos experimentos.

Agradeço a CAPES, FUNCAP e CNPQ pelo apoio financeiro.

“Não espere por uma crise para descobrir o que é importante em sua vida” (Platão)

RESUMO

Polímeros comestíveis, compostos naturais e nanotecnologia estão comumente associados na pesquisa de filmes ativos de alto desempenho, uma alternativa inovadora para a preservação e melhoria da qualidade e da segurança dos alimentos. A celulose bacteriana (CB), um polímero natural nanoestruturado, apresenta propriedades singulares e aplicabilidade na indústria de alimentos. A CB pode ser obtida pela bioconversão de nutrientes presentes em resíduos ou subprodutos da agroindústria, como o suco de caju, após cultivo de linhagens da espécie *Komagaetaibacter Xylinus*. Peptídeos antioxidantes destacam-se como uma das classes de compostos bioativos que podem ser obtidos a partir da pele de Tilapia (*Oreochromis niloticus*), uma espécie de grande expressividade comercial. Tais peptídeos são potenciais alternativas aos antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos, os quais se relacionam a efeitos deletérios ao organismo humano. Neste trabalho, filmes antioxidantes a base de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF) e hidrolisado de gelatina de pele de tilápia (HA) foram desenvolvidos e caracterizados. Ao avaliar-se o efeito da quantidade de HA sobre a atividade antioxidante (Aox), o filme contendo de 60% de HA exibiu o melhor resultado. O filme contendo 40% de HA, 40% de CBNF e 20% de sorbitol (HS₄₀HA₄₀S₂₀) exibiu melhor desempenho quanto a Aox, solubilidade, estabilidade térmica e módulo de elasticidade (*E*) quando comparado com o mesmo filme plastificado com glicerol. A utilização de CBNF de fonte alternativa (fermentação do suco de caju) não afetou a Aox, cor, ângulo de contato, transparência, permeabilidade ao vapor de água e *E* do filme antioxidante CM₄₀HA₄₀S₂₀ composto por CBNF de meio alternativo (CM). A CBNF de suco de caju melhorou a resistência à tração, alongação, estabilidade térmica e grau de cristalinidade deste filme. Nenhum componente do filme HS₄₀HA₄₀S₂₀ ou CM₄₀HA₄₀S₂₀ exibiu citotoxicidade (*in vitro*) em células epiteliais do intestino humano sugerindo uma indicação de que são seguros para aplicações como filmes comestíveis. A liberação de proteína dos filmes contendo diferentes quantidades de HA ocorreu de forma rápida nos diferentes fluidos estudados com predominância de mecanismos de transporte não Fickiano associado em cada perfil.

Palavras-chave: Revestimento comestível. Suco de caju. Nanofibras de celulose. Peptídeos. Antioxidantes. Liberação Controlada

ABSTRACT

Edible polymers, natural compounds and nanotechnology are often associated in studies that aim to obtain high performance bioactive films, an innovative technology for food preservation and food quality/safety improvement. Bacterial cellulose (BC), a natural nanostructured polymer, exhibit unique properties and applicability in the food industry. BC can be obtained by bioconversion of nutrients from agroindustry residues or by-products, such as cashew apple juice, after cultivation of the *Komagaetaibacter* strain. Antioxidant peptides, a class of bioactive compounds, can be obtained from Tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), a fish species of great commercial expressiveness. Active peptides are potential alternatives to the synthetic antioxidants for foods, which are related to deleterious effects on the human health. In this work, antioxidant films based on nanofibrilated bacterial cellulose (BCNF) and Tilapia skin gelatinehydrolyzate (HA) were developed and characterized. When evaluating the effect of the HA amount on antioxidant activity (Aox), the film containing 60% of HA showed the best result. The film with 40% of HA, 40% of BCNF and 20% of sorbitol (HS₄₀HA₄₀S₂₀) exhibited better performance to Aox, solubility, thermal stability and Young modulus (*E*) when compared to the same film plasticized with glycerol. The use of CBNF from alternative source (cashew juice fermentation) did not affect the Aa, color, contact angle, transparency, water vapor permeability and Young's modulus of CM₄₀HA₄₀S₂₀ film composed by CBNF from alternative medium (CM). The alternative BCNF improves the tensile strength, elongation at break, thermal stability and crystallinity degree of CM₄₀HA₄₀S₂₀ film. Neither component of antioxidant film, HS₄₀HA₄₀S₂₀ or CM₄₀HA₄₀S₂₀, show cytotoxicity in assay with intestinal epithelial human cells (*in vitro*) suggesting an indication of safety for edible films applications. The release of protein from antioxidant films, containing different amounts of HA, occurs quickly in different fluids, with a predominance of non-Fickian transport mechanisms.

Keywords: Edible coating. Cashew juice. Cellulose nanofibres. Antioxidant peptides. controlled release

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Esquema temático das áreas de estudo envolvidas na presente tese.....	23
Figura 2–	Fotografias de celulose bacteriana.....	32
Figura 3 –	Fluxograma de obtenção da gelatina (GPT)	41
Figura 4 –	Fluxograma de obtenção do hidrolisado (HA)	42
Figura 5 –	Fluxograma de obtenção da celulose bacteriana (CB)	43
Figura 6 –	Fotografias: (a) Coloração de Gram da bactéria, (b,c) Remoção da película do meio de cultivo após 10 dias, (d) Película de CB purificada pronta para uso	44
Figura 7 –	Fluxograma de obtenção da CB TEMPO-oxidada (CBOX) e da suspensão de CB nanofibrilada (CBNF)	46
Figura 8 –	Fotografias: (a) CB seca triturada, (b) CB oxidada, (c) Suspensão de CB nanofibrilada (CBNF).....	47
Figura 9 –	Exemplo de plotagem de dados para o modelo de Korsmeyer-Peppas Curva até 100 μ M de Trolox	52
Figura 10 –	Atividade antioxidante do Trolox em função da concentração: (a) Até 100 μ M, (b) Até 40 μ M de Trolox	54
Figura 11 –	Micrografias das células CACO-2: (a) Células não aderidas, (b,c) Células em desenvolvimento, (d) Células confluentes	55
Figura 12 –	Exemplo de imagem para a medição da dimensão de fibra a partir de micrografia	58
Figura 13 –	Medidas de espessura de fibra sendo feitas em Image J Software	59
Figura 14 –	Atividade antioxidante do hidrolisado bruto em função da concentração de proteína: (a) Atividade absoluta, (b) Atividade relativa	62
Figura 15 –	Atividade antioxidante da fração < 10 kDa em função da concentração de proteína: (a) Atividade absoluta, (b) Atividade relativa	62
Figura 16 –	Atividade antioxidante da fração < 3 kDa em função da concentração de proteína: (a) Atividade absoluta, (b) Atividade relativa	65
Figura 17 –	Atividade absoluta do hidrolisado e as duas frações.....	65
Figura 18 –	Viabilidade celular das amostras do teste de potencial protetivo	66

Figura 19 –	Relação linear entre quantidade de ROS e atividade antioxidante em ensaio utilizando células CACO-2.....	68
Figura 20 –	Efeito da quantidade de hidrolisado sobre a atividade antioxidante dos filmes de CBNF-HS e HA	69
Figura 21 –	Efeito da quantidade de hidrolisado sobre a atividade antioxidante dos filmes de CBNF-HS e HA: atividade relativa à quantidade de proteína	70
Figura 22 –	Fotografias: (a) Filme de CBNF-HS não plastificado, (b) Filme de CBNF-HS e HA não plastificado, (c) Filme de CBNF-HS e HA plastificado com sorbitol (HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀)	71
Figura 23–	Atividade antioxidante dos filmes de CBNF-HS e HA em função do tipo e quantidade de plastificante	72
Figura 24–	Micrografias das celuloses (controles): (a) MEV da CB-HS liofilizada, (b) MEV da CB-CM liofilizada, (c) MET da Suspensão de CBNF-HS, (d) MET da Suspensão de CBNF-CM	74
Figura 25 –	Micrografias (MEVs) dos filmes de CBNF: (a) CBNF-HS, (b) HS ₆₇ S ₃₃ , (c) HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀ , (d) CM ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	75
Figura 26 –	Perfis de degradação térmica: Celuloses não tratadas, (b) Celuloses nanofibriladas, (c) Efeito da adição dos plastificantes sorbitol e glicerol em CBNF-HS (d) Efeito da adição de sorbitol e hidrolisado em CBNF-HS	77
Figura 27 –	Perfis de degradação térmica: (a) Efeito da adição do sorbitol e hidrolisado em CBNF-CM, (b) Efeito do tipo de CBNF no filme antioxidante com 20% de sorbitol, (c) Componentes do filme HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀ separadamente	78
Figura 28 –	Derivadas termogravimétricas: (a) Celuloses não tratadas, (b) Celuloses nanofibriladas, (c) Efeito da adição dos plastificantes sorbitol e glicerol em CBNF-HS (d) Efeito da adição de sorbitol e hidrolisado em CBNF-HS	79
Figura 29 –	Derivadas termogravimétricas: (a) Efeito do sorbitol e hidrolisado em CBNF-CM, (b) Efeito do tipo de CBNF no filme antioxidante com 50% de sorbitol, (c) Componentes do filme HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀ separadamente	80

Figura 30 –	Ângulo de contato: (a) CB, CBNF-HS e HS ₆₇ S ₃₃ , (b) Filmes de CBNF-HS plastificados com glicerol ou sorbitol, (c) Efeito do hidrolisado no filme de HS ₆₇ HA ₃₃ , (d) Efeito do HA no filme CM ₆₇ HA ₃₃	88
Figura 31 –	Ângulo de contato: (a) Efeito do tipo de CBNF nos filmes com sorbitol, (b) Efeito do tipo de CBNF nos filmes com HA e sorbitol, (c) Efeito da quantidade de HA no filme HS ₆₇ HA ₃₃	89
Figura 32 –	Espectros de FTIR - 400 a 4000 cm ⁻¹	90
Figura 33 –	Espectros de FTIR - 1300 a 1900 cm ⁻¹	91
Figura 34 –	Viabilidade celular dos filmes de CBNF e controles	94
Figura 35 –	Perfis de liberação em água a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol	95
Figura 36 –	Perfis de liberação em ácido acético 3% (v/v) água a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol.....	95
Figura 37 –	Perfis de liberação em etanol 10% (v/v) a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol	96
Figura 38 –	Perfis de liberação em etanol 50% (v/v) água a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol	96
Figura 39 –	Perfis de liberação em água a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol	97
Figura 40 –	Perfis de liberação em ácido acético 3% (v/v) água a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol.....	97
Figura 41 –	Perfis de liberação em etanol 10% (v/v) a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol.....	98
Figura 42 –	Perfis de liberação em etanol 50% (v/v) água a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol	98
Figura 43 –	Massa seca dos filmes após processo de liberação a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado nos filmes de CBNF-HS, HA em: (a) água, (b) ácido acético, (c) Etanol 10% (v/v), (d) Etanol 50% (v/v).....	102
Figura 44 –	Massa seca dos filmes após processo de liberação a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado nos filmes de CBNF-HS, HA em: (a) água, (b) ácido acético, (c) Etanol 10% (v/v), (d) Etanol 50% (v/v).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Algumas propriedades da celulose bacteriana (CB) em relação a celulose vegetal (CV)	28
Tabela 2 –	Composição físico-química dos meios de cultura utilizados para a produção de celulose bacteriana (CB). CM: meio suco de caju integral pH 6. HS: Meio Hestrin e Schramm pH 6	45
Tabela 3 –	Composição dos diferentes filmes secos formulados a base de CBNF.....	48
Tabela 4 –	Quantidade de proteína no Hidrolisado bruto (HA) e frações	50
Tabela 5 –	Teor proteico e atividade antioxidante do hidrolisado bruto e frações	63
Tabela 6 –	Atividade antioxidante intracelular: (AoxI _S) Atividade em células estressadas, (AoxI) Atividade em células não estressadas	67
Tabela 7 –	Perda de massa, picos de DTG e teor de cinzas dos filmes e controles	76
Tabela 8 –	Propriedades mecânicas e índice de cristalinidade - I _C (%) dos filmes	81
Tabela 9 –	Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade dos filmes antioxidantes e controles	85
Tabela 10 –	Cor e transparência de alguns filmes antioxidantes e controles	92
Tabela 11 –	Quantidade de proteína liberada dos filmes antioxidantes de CBNF-HS HA e sorbitol após 20 minutos a 25 °C	99
Tabela 12 –	Quantidade de proteína liberada dos filmes antioxidantes de CBNF-HS, HA e sorbitol após 20 minutos a 4 °C	99
Tabela 13 –	Quantidade de proteína liberada dos filmes de CBNF-HS, HA e sorbitol no tempo final (3 horas) a 25 °C	99
Tabela 14 –	Quantidade de proteína liberada dos filmes de CBNF-HS, HA e sorbitol no tempo final (3 horas) a 4 °C	100
Tabela 15 –	Tempo no qual é liberado 50% da massa (t ₅₀) de proteína contida nos filmes de CBNF-HS, HA e sorbitol	100
Tabela 16 –	Coeficientes de regressão ajustados para modelo de Korsmeyer-Peppas..	104
Tabela 17 –	Classificação do mecanismo de transporte e expoente de liberação (n) - Modelo de Korsmeyer-Peppas	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
a^*	Parâmetro da análise de cor referente à faixa que varia de verde a vermelho
Aa	Atividade antioxidante
Aox	Atividade antioxidante absoluta
Aox _{Teq}	Atividade antioxidante em Trolox equivalente
AoxI	Atividade antioxidante intracelular
AoxI _S	Atividade antioxidante intracelular após estresse oxidativo por AAPH
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidroclorídrico
A _{fmt}	Intensidade de ROS
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Análise termogravimétrica
b^*	Parâmetro da análise de cor referente à faixa que varia de azul a amarelo
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CACO-2	Células epiteliais derivadas de adenocarcinoma de cólon humano
CB	Celulose bacteriana
CB-CM	Celulose bacteriana de meio alternativo CM
CBCXM	Celulose bacteriana carboximetilada
CB-HS	Celulose bacteriana de meio sintético HS
CBNF	Celulose bacteriana nanofibrilada
CBNF-CM	CBNF obtida após processamento de CB-CM
CBNF-HS	CBNF obtida após processamento de CB-HS
CBOX	Celulose bacteriana TEMPO-oxidada
Ci	Concentração inicial
CM	Suco de caju integral em pH 6 estéril (Meio de cultivo)

CNF	Celulose nanofibrilada
CV	Celulose vegetal
DCFH	Dicloro-dihidro-fluoresceína
DCFH-DA	Dicloro-dihidro-fluoresceína-diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTG	Derivada termoravimétrica
<i>E</i>	Propriedade mecânica "Módulo de elasticidade" ou "Módulo de Young"
EC ₅₀	Concentração de hidrolisado necessária para a redução da absorvância em 50% no teste antioxidante de captura de radical DPPH
EVOH	Polímero etileno-vinil álcool
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro para aplicações alimentares e farmacêuticas
HA	Hidrolisado enzimático antioxidante de gelatina de pele de tilápia
HBSS	Solução salina Hank'sBalanced
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxiethyl)-1-piperazinaethanolsulfônico
HPC	Polímero (Hidroxipropil) celulose
HPMC	Polímero Hidroxipropilmetilcelulose
HS	Meio de cultura Hestrin e Schramm
I _c	Índice de cristalinidade
<i>L</i> *	Parâmetro da análise de cor referente à luminosidade
MC	Meio de cultura MEM para cultivo de células CACO-2
MEM	Meio de cultura "MinimumEssential Media"
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
n.d	Dados não fornecidos ou não obtidos
P	Fração peptídica
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Polímero Policaprolactona

PG	Propilgalato
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Polímero Poli-3-hidroxi-butirato
PHBV	Polímero Poli-hidroxi-butirato-co-valerato
PLA	Polímero Poliacido láctico ou PDLA ou PLLA
PVA	Permeabilidade ao vapor de água ou Polímero Poliacetato de vinila
PVDC	Polímero Cloreto de polivinilideno
R ²	Coefficiente de correlação dos ajustes de regressão
R ² A	Coefficiente de correlação R ² ajustado
RDC	Resolução da diretoria colegiada da agência nacional de vigilância sanitária Brasileira
ROS	Espécies químicas reativas de oxigênio
TEMPO	Radical N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
T _f	Temperatura final de degradação
T _i	Temperatura inicial de degradação
T _{max}	Temperatura máxima de degradação ou pico de DTG
TROLOX	Ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic
TBHQ	Terc-butyl-hidroquinona
UV	Ultravioleta
V _c	Viabilidade Celular

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Significância estatística do teste de tukey
ε	Propriedade mecânica "Elongação na ruptura"
σ	Propriedade mecânica "Tensão"
$^{\circ}$	Graus
%	Porcentagem
~	Aproximadamente
©	Copyright
®	Marca Registrada

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 –	Coefficiente de regressão ajustado	50
Equação 2 –	Equação modelo de liberação ordem zero.....	51
Equação 3 –	Equação modelo de liberação primeira ordem	51
Equação 4 –	Equação modelo de liberação segunda ordem	51
Equação 5 –	Equação modelo de liberação quadrático	51
Equação 6 –	Equação modelo de liberação Hixson-Crowell	51
Equação 7 –	Equação modelo de liberação Weibull	51
Equação 8 –	Equação modelo de liberação Higuchi	51
Equação 9 –	Equação modelo de liberação Baker-Lonsdale	51
Equação 10 –	Equação modelo de liberação Korsmeyer-Peppas	51
Equação 11 –	Atividade antioxidante absoluta em %	53
Equação 12 –	Atividade antioxidante em Trolox equivalente	53
Equação 13 –	Viabilidade celular	56
Equação 14 –	Atividade antioxidante intracelular	57
Equação 15 –	Atividade antioxidante intracelular em sistema com células estressadas por AAPH	57
Equação 16 –	Índice de cristalinidade	60
Equação 17 –	Transparência	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	Filmes e revestimentos comestíveis	25
3.1.1	<i>Revestimentos ativos</i>	25
3.2	Celulose bacteriana (CB)	27
3.2.1	<i>CB: um polímero para aplicações versáteis</i>	27
3.2.2	<i>Celulose Bacteriana: Fontes e produção</i>	29
3.2.2.1	<i>Suco de caju como fonte de nutrientes</i>	33
3.2.3	<i>Celulose Bacteriana e a indústria de alimentos</i>	34
3.2.4	<i>Filmes de peptídeos e CB</i>	34
3.2.5	<i>Celulose nanofibrilada para filmes de alto desempenho</i>	35
3.3	Peptídeos e hidrolisados bioativos	36
3.4	Embalagens e revestimentos antioxidantes	38
4	METODOLOGIA	40
4.1	Obtenção dos materiais de trabalho	40
4.1.1	<i>Gelatina de pele de tilápia (GPT)</i>	40
4.1.2	<i>Hidrolisado antioxidante (HA)</i>	42
4.1.3	<i>Celulose bacteriana (CB)</i>	43
4.1.4	<i>Celulose bacteriana oxidada (CBOX)</i>	45
4.1.5	<i>Suspensão de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF)</i>	46
4.2	Estudo de desenvolvimento de filmes a base de CBNF e HA	47
4.2.1	<i>Obtenção dos filmes</i>	47
4.2.2	<i>Efeito da quantidade de HA, tipo de plastificante e tipo de CB</i>	48
4.2.3	<i>Ensaio de liberação de proteína dos filmes antioxidantes de CBNF-HS</i>	49
4.2.3.1	<i>Sistema</i>	49
4.2.3.2	<i>Caracterização dos filmes e fluidos após liberação</i>	49
4.2.3.2.1	<i>Adaptação metodológica</i>	50
4.2.3.3	<i>Modelagem</i>	50
4.2.3.3.1	<i>Modelagem dos perfis de liberação pela equação de Korsmeyer-Peppas</i>	51

4.3	Caracterização dos filmes antioxidantes de CBNF e seus componentes.....	52
4.3.1	<i>Teor proteico do hidrolisado e frações</i>	52
4.3.2	<i>Atividade antioxidante</i>	53
4.3.3	<i>Ensaio com células epiteliais do intestino humano</i>	54
4.3.3.1	<i>Cultivo celular</i>	54
4.3.3.2	<i>Citotoxicidade</i>	54
4.3.3.3	<i>Atividade antioxidante intracelular</i>	56
4.3.4	<i>Morfologia</i>	57
4.3.5	<i>Análise térmica</i>	59
4.3.6	<i>Propriedades mecânicas</i>	60
4.3.7	<i>Difração de Raios-X</i>	60
4.3.8	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	60
4.3.9	<i>Solubilidade</i>	61
4.3.10	<i>Angulo de contato</i>.....	61
4.3.11	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>.....	61
4.3.12	<i>Cor e Transparência</i>.....	62
4.4	<i>Análise estatística</i>.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	Caracterização do hidrolisado de gelatina de Pele de tilápia (HA)	63
5.1.1	<i>Teor proteico e atividade antioxidante</i>	63
5.1.2	<i>Citotoxicidade e atividade antioxidante intracelular do hidrolisado</i>	65
5.2	Filmes de CBNF e HA obtidos por casting.....	68
5.2.1	<i>Efeito da quantidade de hidrolisado sobre a Atividade antioxidante</i>.....	68
5.2.2	<i>Efeito do tipo e quantidade de plastificante e tipo de CBNF sobre a atividade antioxidante</i>	70
5.3	Caracterização de filmes de CBNF, HA e celuloses bacterianas controle..	73
5.3.1	<i>Morfologia das celuloses</i>	73
5.3.2	<i>Morfologia dos filmes de CBNF</i>	75
5.3.3	<i>Análise térmica (ATG)</i>.....	76
5.3.4	<i>Propriedades mecânicas e Raios-X</i>.....	81
5.3.5	<i>Solubilidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e ângulo de contato</i>	84
5.3.6	<i>Espectroscopia (FTIR)</i>.....	90
5.3.7	<i>Cor e transparência</i>.....	91

5.3.8	<i>Citotoxicidade in vitro</i>	93
5.4	Ensaio de Liberação de proteínas dos filmes antioxidantes	94
5.4.1	<i>Perfis de liberação</i>	94
5.4.2	<i>Massa seca dos filmes após liberação</i>	101
5.4.3	<i>Modelagem da liberação de proteína</i>	103
6	CONCLUSÕES	106
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	108
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICE A - PURIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA	140
	APÊNDICE B - OBTENÇÃO DE IMOBILIZADO ANTIOXIDANTE DE CB OU CBCXM OBTIDOS POR ADSORÇÃO	142
	APÊNDICE C - INCORPORAÇÃO DE NISINA EM FILMES DE CBNF-HS	149
	APÊNDICE D - DIFRATOGRAMAS	154
	APÊNDICE E - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA ALGUNS MODELOS DE LIBERAÇÃO ESTUDADOS	157
	APÊNDICE F -PERFIS DE LIBERAÇÃO: DADOS EXPERIMENTAIS AJUSTADOS PELA EQUAÇÃO DE KORSMEYER-PEPPAS	159

1 INTRODUÇÃO

Filmes e revestimentos comestíveis ativos são amplamente estudados como uma alternativa inovadora para a preservação e melhoria da qualidade e segurança dos alimentos (SALGADO *et al.*, 2015; PADRÃO *et al.*, 2016). Essa tecnologia auxilia no aumento da vida útil de alimentos através da diminuição do crescimento microbiano ou fenômenos de oxidação durante a liberação controlada de agentes ativos na superfície do alimento. Além disso, nutrientes, sabores e corantes podem ser adicionados a esses filmes, trazendo funcionalidades diferentes e adicionais (PEREZ *et al.*, 2012; COMA *et al.*, 2008). Nesse contexto, polímeros comestíveis e compostos ativos ou bioativos naturais são comumente associados em muitos trabalhos no objetivo de atenderem a demanda de certos consumidores por alimentos naturais e funcionais e responderem a preocupações ambientais relacionadas com a eliminação de embalagens não biodegradáveis e não renováveis (BAUER *et al.*, 2001; ATARÉS e CHIRALT *et al.*, 2016).

Dentre as substâncias naturais avaliadas para essa tecnologia ressaltam-se os peptídeos e hidrolisados bioativos que são obtidos preferencialmente por hidrólise enzimática de proteínas alimentares. Esse grupo apresenta ampla diversidade bioquímica e funcional, dentre as quais a atividade antioxidante é uma funcionalidade biológica observada na maioria dos hidrolisados, frações ou peptídeos isolados (HANNU e ANNE, 2006; CHI *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2012; MARTÍNEZ *et al.*, 2015; GENSKOWSKY *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). Em muitos estudos investiga-se a obtenção de hidrolisados de origem marinha ou outros tipos de pescado (SILA e BOUGATEF, 2016) dos quais se destaca o pescado Tilápia (*Oreochromis niloticus*) que possui uma grande expressão no mercado mundial. Produtos obtidos a partir da pele de tilápia agregam valor a esse resíduo gerado em grande escala (SAMPAIO *et al.*, 2016).

Embora muitos hidrolisados tenham poder de reduzir a oxidação de alimentos, poucos estudos mostraram esse potencial após serem incorporados em celulose bacteriana (CB), um polímero natural (LIN *et al.*, 2015a; LIN *et al.*, 2015b; NGUYEN *et al.*, 2008; SAMARANAYAKA *et al.*, 2011; HAN e ARISTIPPOS, 2005). Atualmente tal polímero ganha atenção devido a sua nanoestrutura e propriedades singulares. Trata-se de um material extracelular quimicamente idêntico à celulose vegetal, excretado por bactérias do gênero *Komagataeibacter* quando cultivado em meio de cultura e condições adequadas. A CB é um polissacarídeo promissor para a indústria alimentar devido à sua alta pureza (livre de lignina e

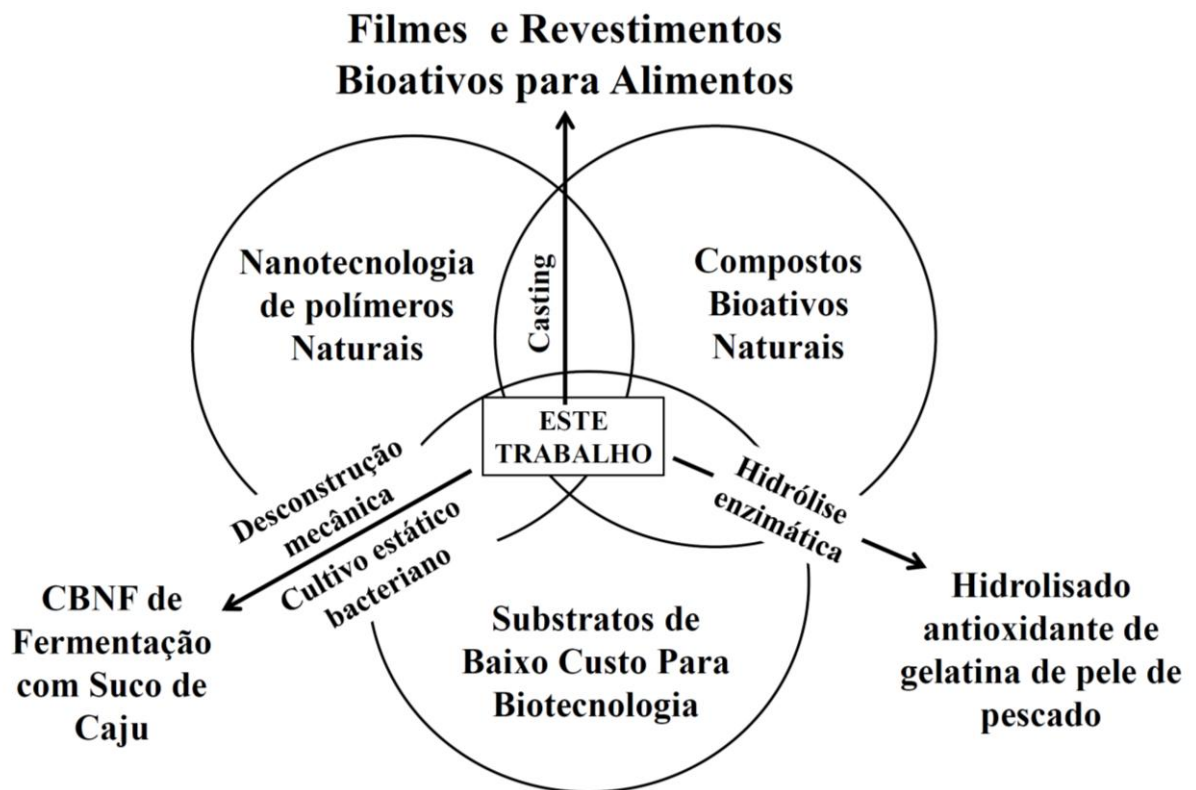
hemicelulose), grau alimentar, hidrofiliçidade, alta capacidade de sorção de líquidos e flexibilidade para ser moldada, colorizada e aromatizada. Além disso, pode ser usada como aditivo para melhorar a estabilidade térmica, ajustar viscosidade e substituir gordura em algumas formulações alimentares (SHI *et al.*, 2014; ULLAH *et al.*, 2016).

A produção de CB pode ser balanceada pela utilização de meios alternativos de baixo custo ou produtos da agroindústria (MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015; JOZALA *et al.*, 2016; CHAWLA, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2016) quando se objetiva aplicações alimentares. A "Nata de coco", uma sobremesa tradicional da Ásia, é produzida de forma artesanal por fermentação estática a partir de água de coco (BUDHIONO, 1999; CHAWLA, 2009). Um substrato bastante promissor para a obtenção de CB é o suco de caju, material obtido após processamento do pedúnculo do caju, o fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.). O laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical - Brasil, observou que a membrana de CB obtida com esse meio mantém as características típicas do material além de fornecer um bom rendimento quando comparado com o meio padrão (CARNEIRO, 2015; DUARTE *et al.*, 2015; LIMA, 2014). Além disso, o aproveitamento do pedúnculo é interessante uma vez que apenas 10% do total produzido é reutilizado na fabricação de alimentos (SILVEIRA *et al.*, 2012).

Neste cenário, a nanotecnologia fornece muitas possibilidades para o melhoramento do desempenho de materiais poliméricos comestíveis uma vez que eles ainda são deficientes em algumas propriedades tecnológicas importantes como as de barreira (AZEREDO, 2009). Atualmente, as nanofibras naturais são amplamente estudadas para a produção de materiais biodegradáveis de alto desempenho, como embalagens reforçadas, compósitos, papel eletrônico, membranas ópticas, filmes de barreira, materiais resistentes à chama e outros materiais de alta tecnologia (KARGARZH *et al.*, 2017; ISOGAI *et al.*, 2011). Vários tipos de tratamentos químicos e desconstrução mecânica são aplicados para a obtenção de fibras de celulose em nanoescala. A oxidação mediada a TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) em combinação com algum tipo de tratamento mecânico tem sido utilizada a fim de facilitar a obtenção de suspensões estáveis de nanofibras além de proporcionar diversas outras vantagens reacionais (ISOGAI *et al.*, 2011). Embora muitos processos para obtenção de nanofibras de celulose vegetal tenham sido amplamente estudados, poucos abordam a desconstrução de CB (TSALAGKAS *et al.*, 2016; SAITO *et al.*, 2006). Tal desconstrução traz versatilidade aos materiais que são originalmente estruturados de forma não fluida.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar filmes antioxidantes a base de celulose bacteriana e de hidrolisado de gelatina de pele de tilápia (HA). Também se avaliou a influência do suco de caju como meio alternativo para a obtenção de CBNF analisando o seu efeito sobre as propriedades desses filmes. Pensando na aplicação alimentar, foi avaliada a citotoxicidade de alguns filmes e do HA em células epiteliais do intestino humano. Tal trabalho envolveu diversas áreas do conhecimento estando centrado como mostra o esquema da Figura 1.

Figura 1 - Esquema temático das áreas de estudos envolvidas na presente tese



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Obter e caracterizar filmes antioxidantes a base de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF) por meio da adição de hidrolisado de gelatina de pele de tilápia (HA)

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da concentração de HA, tipo e quantidade de plastificante sobre a atividade antioxidante de filmes a base de CBNF e HA obtidos por casting;
- Caracterizar filmes a base de CB e HA quanto às suas propriedades físicas, mecânicas, morfológicas, estruturais, térmicas, ópticas e de barreira;
- Avaliar o efeito da CBNF obtida em meio de cultura alternativo (suco de caju) sobre algumas propriedades de um filme composto por CBNF, HA e sorbitol de formulação pré-definida;
- Avaliar e modelar o perfil de liberação de proteína de alguns filmes em diferentes fluidos simulantes alimentares;
- Avaliar a toxicidade do HA e CBNF em teste com células epiteliais do intestino humano CACO-2;
- Avaliar a capacidade de redução de ROS (espécies reativas de oxigênio) intracelular do HA em células CACO-2.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Filmes e revestimentos comestíveis

3.1.1 Revestimentos ativos

A produção de embalagens plásticas para aplicações em diversos setores industriais tem preocupado os estudiosos uma vez que apenas uma pequena parte do total utilizado é reciclada (RAGAERT *et al.*, 2017). A maioria das embalagens hoje não são biodegradáveis sendo correlacionadas com a geração de problemas ambientais (AZEREDO *et al.*, 2009). O estilo de vida moderno contribui para o aumento de problemas ambientais relacionados com a produção de grandes quantidades de embalagens no setor alimentício e dificuldades de reciclagem (LANDIM *et al.*, 2016; LICCIARDELLO *et al.*, 2017). A produção anual de plásticos oriundos do petróleo cresceu 200 vezes entre 1950 e 2014 (LI *et al.*, 2016). Materiais biodegradáveis são estudados e desenvolvidos anualmente, porém com pouca expressividade comercial. Mesmo assim as pesquisas na área avançam devido à necessidade de que embalagens plásticas sejam substituídas por embalagens biodegradáveis mesmo que parcialmente. Um material ideal nesse contexto é aquele que além de apresentar bom desempenho seja biodegradável e produzido a partir de fontes renováveis.

Por definição embalagem é o recipiente, o pacote ou a embalagem destinada a garantir a conservação e facilitar o transporte e manuseio dos alimentos (RDC 259, 2002). Atualmente o conceito científico de embalagem ganhou maior complexidade estando incluído nele o conceito de embalagens ativas e revestimentos comestíveis. Os filmes e revestimentos comestíveis são uma tecnologia que auxiliam na preservação e melhoramento da qualidade de alimentos, pois agem como barreira a umidade, gases, óleo e como carregador de substâncias (GARCÍA *et al.*, 2002; LUVIELMO *et al.*, 2012). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não dispõe de uma lei específica para esse tipo de embalagem sendo ela considerada um ingrediente. Materiais poliméricos naturais à base de polissacarídeos (funcionalizados ou não), proteínas e lipídeos tem exibido boas qualidades quando aplicados como filmes ou revestimentos comestíveis.

Geralmente revestimentos comestíveis são aplicados visando à manutenção da qualidade pós-colheita durante a estocagem e aumento da vida de prateleira de frutos, hortaliças e produtos cárneos (VALERO *et al.*, 2013; ABAD *et al.*, 2016; COMA *et al.*, 2008; AGUIRRE *et al.*, 2017; SATHIVEL 2005), retardamento da oxidação lipídica (VOLPE *et al.*, 2015), inibição do desenvolvimento microbiano (VOLPE *et al.*, 2015; GEMILI *et al.*, 2009;

NGUYEN *et al.*, 2008), redução da absorção de gorduras em frituras (GARCÍA *et al.*, 2002) e adição de propriedades sensoriais (BALDWIN *et al.*, 2012; 2016; AZEREDO *et al.*, 2009), inibidor de escurecimento e carregadores de nutrientes (GANIARI *et al.*, 2017).

Filmes comestíveis (ou coberturas comestíveis) são uma fina camada previamente formada que é aplicada sobre ou entre os componentes alimentares. O revestimento é formado após aplicação na forma líquida (solução filmógena ou filmogênica) sobre o próprio alimento (TAVASSOLI *et al.*, 2016; PEREZ *et al.*, 2012) usando a técnica de imersão ou de aspersão, seguindo de repouso para secagem e formação de película (LUVIELMO *et al.*, 2012).

Substâncias sintéticas ou naturais podem ser incorporadas em matrizes naturais (funcionalizadas ou não) ou em "blends" de polímero natural e sintético (ZAFAR *et al.*, 2016; MCMILLIN *et al.*, 2017; SALGADO *et al.*, 2015; MUXIKA *et al.*, 2017). Tradicionalmente os aditivos antioxidantes ou antimicrobianos são adicionados diretamente nos alimentos. Tais aditivos tendem a perder eficiência e atividade em função do tempo devido as suas características intrínsecas e instabilidade (ACEVEDO *et al.*, 2017). Os revestimentos ativos são uma alternativa de melhoramento da eficiência de ação desses compostos uma vez que promovem uma liberação controlada predominantemente na superfície onde é mais desejável na maioria dos produtos. Tais filmes interagem com o alimento de forma não passiva como é o caso principalmente dos antioxidantes e antimicrobianos, formados pela incorporação de substâncias com as mesmas propriedades (ESTACA 2007; SEYDIM e SARIKUS, 2006).

Revestimentos ativos podem ser utilizados em parceria com outras técnicas de preservação visando melhores resultados no aumento da vida de prateleira de produtos (ABAD *et al.*, 2016). Filmes ativos compostos por matrizes e substâncias naturais são muito estudados devido às suas vantagens com relação ao impacto ambiental e saúde humana. Desde as últimas décadas os consumidores buscam por alimentos mais naturais e a indústria busca por novas técnicas inovadoras de preservação que incluem revestimentos ativos. Uma das vertentes de pesquisa estuda a incorporação de hidrolisado antioxidante (GIMÉNEZ *et al.*, 2009).

Muitas matrizes poliméricas podem liberar aditivos naturais de forma controlada (GEMILI *et al.*, 2009). Sistemas de liberação nanoestruturados na área de filmes são uma vertente explorada atualmente devido às suas vantagens e potencialidades fornecidas. A incorporação de nanoestruturas visa melhorar algumas propriedades de revestimentos já desenvolvidos ou novas formulações que apresentam baixas propriedades mecânicas ou de

barreira. Entretanto, os efeitos toxicológicos desses sistemas ainda são uma preocupação (ACEVEDO *et al.*, 2017).

Com relação à nanocelulose, Lavoine *et al.* (2012) e Roman (2017) acreditam que embora os estudos não demonstrem que materiais nesta escala tenham efeito tóxico as pesquisas ainda devem avançar em número antes de se tomar uma conclusão precipitada. Existem apenas cinco estudos somando estudos de toxicidade oral e dérmica. Já com relação a citotoxicidade os estudos existentes apresentam resultados discordantes. Acredita-se que as propriedades físico-químicas, carga superficial, forma, grau de agregação e impurezas são variáveis que podem influenciar nos diferentes resultados (ROMAN, 2017).

3.2 Celulose Bacteriana (CB)

3.2.1 CB: um polímero para aplicações versáteis

A celulose bacteriana (CB) é um polímero natural nano-estruturado quimicamente caracterizado como celulose em 1886 (BROWN *et al.*, 1986) sendo portanto, um homopolissacarídeo formado por subunidades de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) com cadeias ligadas entre si através de ligações de hidrogênio inter e intra-moleculares formando estruturas cristalinas ou amorfas insolúveis em água (DONINI *et al.*, 2010; LAVOINE *et al.*, 2012). A CB recebeu muitos nomes dependendo do contexto no qual foi utilizada como por exemplo mãe do vinagre, nata de coco, Zooglea ou biocelulose.

A CB é alvo de muitos estudos desde sua descoberta, devido as suas características morfológicas, físicas e estruturais diferenciadas quando comparados com a celulose vegetal. Tal polímero exhibe características adequadas para aplicações em áreas de grande importância como biomedicina e eletrônica. As características mais relevantes frequentemente mencionadas na literatura são biocompatibilidade e alta cristalinidade. Entretanto a CB exhibe diversas outras propriedades como alta resistência mecânica (quando em forma de membrana), alta capacidade de absorção de água, grau alimentar, alta porosidade, baixa densidade, grande área superficial, permeabilidade seletiva, hidrofiliabilidade superficial e pureza (livre de lignina e hemiceluloses) (DOURADO *et al.*, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 - Algumas propriedades da celulose bacteriana (CB) em relação a celulose vegetal (CV)

Propriedade	CV	CB	Referência
Largura da fibra (nm)	40 - 140 x 10 ³	70 - 80	Pecoraro <i>et al.</i> (2008)
Índice de cristalinidade (%)	56 - 65	65 - 79	Pecoraro <i>et al.</i> (2008)
Grau de polimerização (10 ³)	13 - 14	2 - 14	Watanabe (1998) Pecoraro <i>et al.</i> (2008)
Módulo de Young (Gpa)	5,5 - 12,6	15 - 30	Pecoraro <i>et al.</i> (2008)
Área superficial específica (m ² /g)	1-30	37	Kim (2002)
Quantidade de água (%)*	60	98,5	Pecoraro <i>et al.</i> (2008)
Módulo de Young de uma fibra (Gpa)	20	114	Hsieh <i>et al.</i> (2008) Pereira <i>et al.</i> (2014)

*Quantidade de água que pode ser absorvida

Os campos de pesquisa e aplicações mais comuns da CB são em Biomedicina, Indústria alimentar, Farmacologia, Cosmética, Eletrônica e Têxtil. Atualmente buscam-se avanços no desenvolvimento de novos materiais à base de CB para aplicações em nanotecnologia, biotecnologia, imobilização, adsorção, catálise e engenharia, sendo desenvolvidos atualmente aerogéis, membranas, compósitos, matrizes, nanofibras, micro ou nano-cristais, e diversos outros tipos de produtos ou tecnologias envolvendo a CB em aplicação direta ou potencial. As seguintes aplicações já foram estudadas: sobremesas (SHI *et al.*, 2014), clarificação de sucos (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2000), produtos funcionais (CHAU *et al.*, 2008), aditivos (PAXIMADA *et al.*, 2016), ingredientes (LIN *et al.*, 2011), embalagens ou filmes ativos e comestíveis (PADRÃO *et al.*, 2016), implantes (LOU *et al.*, 2016), tratamento ortodôntico (YOSHINO *et al.*, 2013), restauração óssea (BUSUIOC *et al.*, 2016), cultura de células (SANTOS *et al.*, 2015), regeneração de tecidos e "Scaffolds" (LUO *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2016), miringoplastia (BISKIN *et al.*, 2016), curativos e filmes antimicrobianos (JANPETCH *et al.*, 2016), excipientes (AMIN *et al.*, 2014), liberação controlada de substâncias/fármacos (JUNCU *et al.*, 2016), máscara facial (AMNUAIKIT *et al.*, 2011), nanocristais (VASCONCELOS *et al.*, 2017), nanofibrilas (TSALAGKAS *et al.*, 2016), CB/Nanotubos (YAN *et al.*, 2008), restauração de papéis (SANTOS *et al.*, 2016), papéis especiais e resistentes (YOUSEFI *et al.*, 2013), compósitos e blendas (DUFRESNE *et al.*, 2017; FORESTI *et al.*, 2017), template (LUO *et al.*, 2016), catálise (SUN *et al.*, 2016), aerogéis e hidrogéis (LIEBNER *et al.*, 2010), adsorvente (STOICA *et al.*, 2016), separação e purificação (BAKSHPOUR *et al.*, 2017), proteínas/enzimas (DROZD *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2013), microrganismos e probióticos (FIJAŁKOWSKI *et al.*, 2016), peptídeos

bioativos (GAO *et al.*, 2014), lecitina (ZHANG *et al.*, 2015), sensores e eletrodos (LIU *et al.*, 2017), baterias (JIANG *et al.*, 2015), materiais ópticos e condutores (TERCJAK *et al.*, 2016), fone de ouvido (DONÍNI *et al.*, 2010), agentes para redução de arrasto (OGATA *et al.*, 2015) e indicador de pH (POURJAVAHHER *et al.*, 2017).

3.2.2 Celulose Bacteriana: Fontes e produção

Embora a celulose possa ser extraída de diversas fontes na natureza como por exemplo madeira, algodão, folhas de sisal (*Agave sisalana*), animais do gênero *Urochordata* e parede celular de alguns gêneros de algas, fungos e bactérias, a celulose excretada por bactérias destaca-se por ser um polímero nano-estruturado possível de ser sintetizado em grandes quantidades através de bioconversão de açúcares (CHAWLA *et al.*, 2009; VAN DAELE *et al.*, 1992; LAVOINE *et al.*, 2012; RÖMLING *et al.*, 2015).

A CB é um polissacarídeo insolúvel em água, sendo majoritariamente produzido por bactérias do gênero *Komagataeibacter* (anteriormente denominada de *Gluconacetobacter* ou *Acetobacter* em cultivo estático ou agitado ou sob regime contínuo, batelada, semi-contínuo ou intermitente (YAMADA *et al.*, 2012a; YAMADA *et al.*, 2012b; ÇAKAR *et al.*, 2014). Além dos métodos convencionais citados vários outros tipos de reatores e técnicas foram desenvolvidos visando o aumento da produção ou obtenção de CB com características específicas (ISLAM *et al.*, 2017; BORZANI *et al.*, 1995).

O meio de cultura frequentemente utilizado para a produção de CB é o meio sintético HS desenvolvido de 1954 a 1957 (SCHRAMM *et al.*, 1957; HESTRIN e SCHRAMM, 1954a; HESTRIN e SCHRAMM 1954b), embora outros meios sintéticos tenham sido avaliados posteriormente a fim de se aumentar a produção adequando-se ao tipo de processo e linhagem utilizada. Estudos genéticos procuram entender e modificar a forma como a CB é sintetizada a fim de se obter materiais com propriedades específicas e aumento do rendimento produtivo (FLOREA *et al.*, 2016; BULDUM *et al.*, 2017). Fontes alternativas de nutrientes como resíduos ou subprodutos da agroindústria podem ser utilizados para reduzir custos mantendo o rendimento quando se compara com produções a partir de meios sintéticos. Suco de frutas, xaropes, melaços, água de coco, glicerol, resíduos e outros produtos podem servir como fonte de nutrientes para a produção de CB, sendo necessário ajustes na concentração, pH e suplementação com fontes protéicas ou outros compostos químicos (ISHIHARA *et al.*, 2002; FAN *et al.*, 2016; JOZALA *et al.*, 2015; ÇAKAR *et al.*, 2014; BAE e SHODA 2004; BAE e

SHODA 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017; BILGI *et al.*, 2016; ERBAS *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2013; CARREIRA *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015; KUROSUMI *et al.*, 2009; VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Muhamad *et al.* (2017) consideram que a produção de CB em países que geram grandes quantidades de resíduos agroindustriais pode significar um avanço no sentido de substituir a celulose vegetal por bacteriana para diversos fins, inclusive para a área farmacêutica que demanda a maior parte da celulose produzida mundialmente. Embora se recomende que a CB para aplicações biomédicas seja produzida a partir de meio de cultivo sintético como o HS por exemplo (HESTRIN e SCHRAMM, 1954) e a maioria das pesquisas envolvendo películas de CB para diferentes aplicações usem este meio padrão, a produção pode ser simplificada pela utilização de meios alternativos de baixo custo ou produtos da agroindústria quando pensa-se em aplicações alimentares (MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015; JOZALA *et al.*, 2016; CHAWLA, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2016). Outro aspecto importante no âmbito da substituição da fonte celulósica é que a manutenção das florestas é vista como uma forma de reduzir o aquecimento global e fontes alternativas de produção de celulose que dispensem o desmatamento merece atenção. Meios alternativos ainda são estudados atualmente como forma de redução de custos e aproveitamento de biomassa agroindustrial.

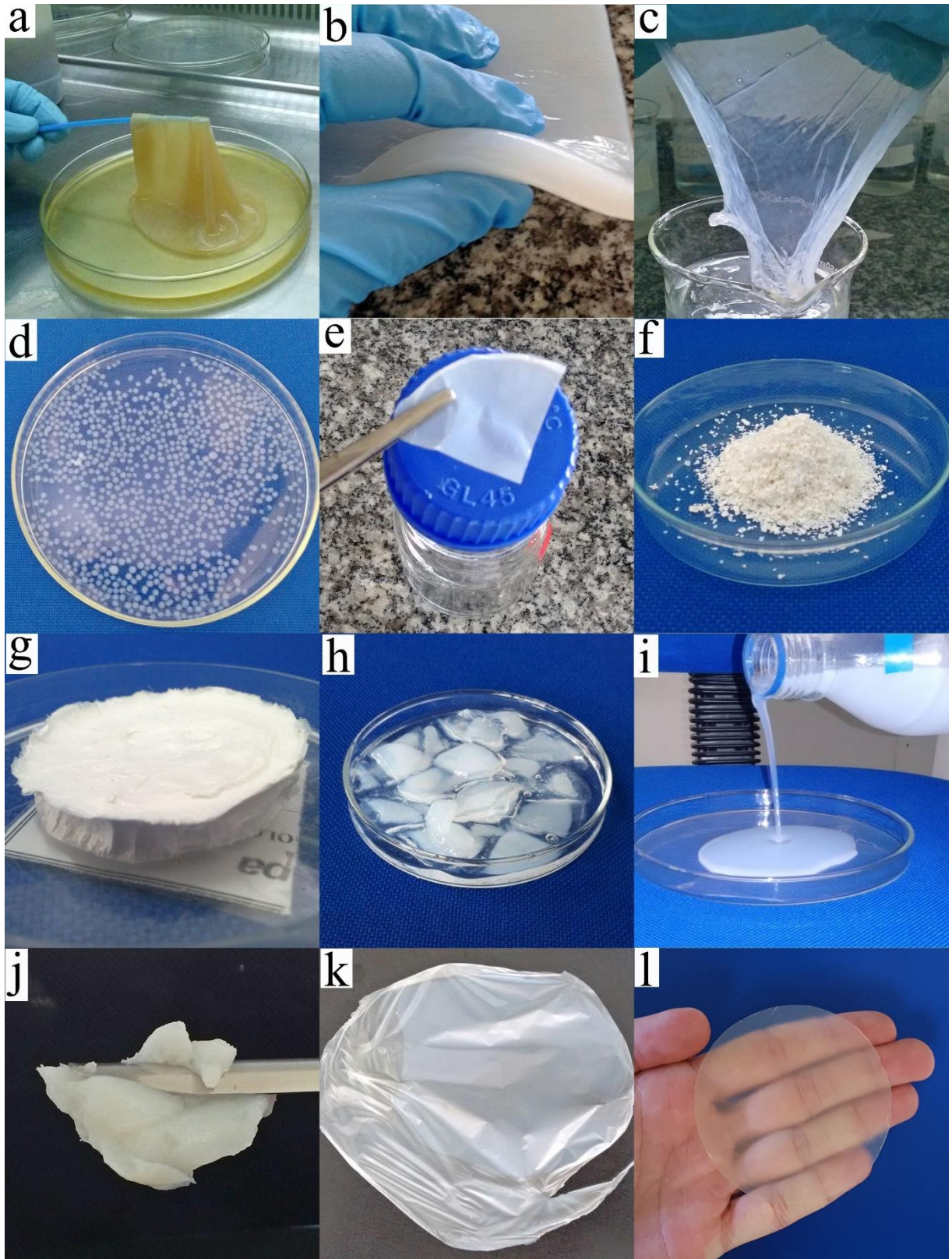
A CB pode ser obtida de duas formas básicas: membrana ou pellet. Membranas de diferentes espessuras são obtidas em cultivo estático (Figura 2a,b,c) e pellets em cultivo agitado (Figura 2d). Os pellets podem apresentar formato arredondado ou irregular (estrelas). Transformações físicas e químicas podem ser feitas na CB após sua obtenção para quando se pretende aumentar ainda mais a flexibilidade de aplicações como é o caso da CB em pó (AMIN *et al.*, 2014), CB nanofibrilada (LIN *et al.*, 2015; TSALAGKAS *et al.*, 2016; ISOGAI *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2006; SAITO *et al.*, 2011), nanocristais de CB (VASCONCELOS *et al.*, 2017; GEORGE *et al.*, 2011; SACUI *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015), CB carboximetilada (MOOSAVI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2015; SCHLUFTER *et al.*, 2010), hidroxipropilmetil celulose de CB (CHEN *et al.*, 2014), dentre outras (ABEER *et al.*, 2014).

A Figura 2 mostra fotografias de algumas formas de CB que podem ser obtidas por diferentes processos. Uma membrana de CB úmida ao ser seca por calor úmido a 50 °C tem aspecto mais delgado e compacto e pode ser moída (Figura 2e,f). Quando liofilizada a CB apresenta aspecto mais esponjoso (Figura 2g). Já a suspensão de CB nanofibrilada (CBNF)

tem aspecto líquido ou pastoso dependendo da concentração (Figura 2i,j). Ao ser submetida a casting a suspensão fluida de CBNF apresenta aspecto mais delgado (Figura 2k) ou translúcido (Figura 2l) que a membrana de CB não funcionalizada.

Figura 2 – Fotografias de celulose bacteriana: (a) Película sendo removida do Meio de cultivo após fermentação, (b) Película pura de CB de cultivo estático em estado úmido, (c) Película de CB com espessura reduzida, (d) Esferas de CB de cultivo agitado em estado úmido, (e) Película de CB seca a 50 °C, (f) CB seca moída, (g) Película de CB liofilizada, (h) CB carboximetilada, (i) Suspensão de CBNF (CB nanofibrilada) 1%, m/m, (j) Suspensão de CBNF concentrada por centrifugação, 5%, m/m, (k) Filme seco de CBNF, (l) Filme seco CBNF plastificado com sorbitol. Fonte: Figuras obtidas pelo próprio autor.

Figura 2



3.2.2.1 Suco de caju como fonte de nutrientes

O suco de caju é obtido da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale, L.*), através de prensagem, sendo uma das principais formas de aproveitamento do pedúnculo que é um subproduto do processamento da castanha. Em 2011 foram produzidas 40 milhões de toneladas de pedúnculo sendo 11% delas produzidas no Brasil (FAO, 2014). A produção de caju no Brasil se concentra no Nordeste abrangendo 95% de toda produção nacional sendo considerada uma das principais atividades agroindustriais da região.

Mesmo com o aproveitamento existente na alimentação humana (suco, cajuína, geléia e doces) (FONTES *et al.*, 2013) grande parte (90%) do pedúnculo resultante do processamento da castanha é desperdiçado. Tanto o pedúnculo como o suco de caju são fontes de vários nutrientes como vitamina C, cálcio, fósforo, antioxidantes, aminoácidos e principalmente açúcares que pode chegar a uma concentração de até 150 g/L (BARRETO *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2004; SANCHO *et al.*, 2007). Diante disso o suco de caju tem despertando interesse na área de processos fermentativos por apresentar uma alternativa viável para a agregação de valor a esse resíduo, sendo estudado para a produção de diversos tipos de produtos como celulose bacteriana, biossurfactantes, proteínas unicelulares, oligossacarídeos e outras (CARNEIRO, 2015; CHAGAS *et al.*, 2007; FONTES *et al.*, 2009; FONTES *et al.*, 2013; HONORATO *et al.*; 2007; FREITAS *et al.*, 2013; RABELO *et al.*, 2009; SHENOY *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2012; BETIKU *et al.*, 2016).

O suco de caju suplementado com fontes de nitrogênio já foi estudado para a produção de CB pela linhagem *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 em cultivo estático apresentado produção próxima a do meio sintético HS. A produção de CB com suco sem suplementação foi de 52% da produção em meio HS considerada satisfatória em virtude do baixo custo do meio, já que dispensa suplementação. As características térmicas e estruturais da película desse meio alternativo não diferem de forma expressiva quando comparada com o padrão HS, apresentando características típicas de CB relatadas na literatura (CARNEIRO, 2015) tendo, portanto, potencial para aplicação nas diversas áreas de estudo que envolvem CB.

3.2.3 Celulose bacteriana e a indústria de alimentos

A CB é um polissacarídeo promissor para a indústria de alimentos uma vez que apresenta alta pureza, grau alimentar (GRAS), ausência de toxicidade e alergenicidade, hidrofiliabilidade e boa capacidade para sorção de líquidos. Além disso, é um material versátil que pode ser obtido em diferentes formatos (filme/membrana, filamentos, esferas, partículas e whiskers) com possibilidade de ser moldado (quando em cultivo estático), colorido e/ou flavorizado (depois ou durante a fermentação) (SHI *et al.*, 2014; ULLAH *et al.*, 2016).

Tradicionalmente conhecida como "Nata de Coco", a CB é amplamente comercializada nas Filipinas, sendo produzida principalmente a partir de água de coco ou suco de abacaxi. Nutricionalmente a CB é classificada como fibra alimentar. Na indústria alimentícia a CB é utilizada como modificador de textura, estabilizante e ingrediente de produtos cárneos e sobremesas. Na pesquisa busca-se ampliar ainda mais essa aplicação através do desenvolvimento de novos produtos ou tecnologias como membrana para clarificação de suco de frutas (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2000), filmes ativos (NGUYEN *et al.*, 2008) e outras inovações como substrato para impressora 3D (SCHAFFNER *et al.*, 2017).

3.2.4 Filmes de peptídeos e CB

Embora polímeros naturais sejam muito estudados para aplicações como filmes comestíveis, poucos estudos envolvem CB (JIPA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2014). Na maioria dos casos a CB é modificada visando a inserção de algum grupo funcional que melhore a capacidade absorviva ou aumente a interação da substância com a matriz (LIN *et al.*, 2015; AKDUMAN *et al.*, 2013).

O peptídeo ϵ -polilisina foi incorporado em filmes de CB via "crosslinking" para a obtenção de um compósito ativo. Os filmes apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e potencial para serem aplicados na área alimentar (GAO *et al.*, 2014). Filmes de CB incorporados de nisina apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e bactérias aeróbias. O autor sugere que tal filme apresenta potencial para inibição microbiana em superfície de salsichas e outros alimentos cárneos (NGUYEN *et al.*, 2008). Lin *et al.* (2015) estudaram a liberação controlada de peptídeos antioxidantes de gelatina de tilápia previamente incorporados em filmes de CB, HBC (hidroxipropilmetil celulose de CB) e DFBB (CB oxidada/alginato e quitosana). A

liberação dos peptídeos ocorreu de forma mais lenta nos filmes de CB íntegros quando comparados com os demais devido a diferenças na estrutura porosa.

3.2.5 Celulose nanofibrilada para filmes de alto desempenho

Nanofibras são amplamente estudadas visando a produção de materiais biodegradáveis de alta performance como embalagens, compósitos, papel eletrônico, membranas óticas, filmes de barreira, materiais resistentes ao fogo e outros produtos da indústria high-tech (KARGARZH *et al.*, 2017; ISOGAI *et al.*, 2011). Atualmente a nanotecnologia tem sido uma grande aliada na melhoria das propriedades de filmes biodegradáveis e comestíveis. Materiais nano-estruturados ou reforçados com nanofibras e nanopartículas podem apresentar propriedades mecânicas e de barreira superiores quando comparados com os mesmos materiais em escala macro (MAO *et al.*, 2013).

A celulose nanofibrilada consiste de uma rede de micro/nano-fibrilas de 10–100 nm de largura e >100 nm de comprimento. As dimensões variam de acordo com a fonte de celulose e método de extração/produção (BESBES *et al.*, 2011). O tratamento químico e/ou a desconstrução mecânica podem ser aplicados para a obtenção de fibras de celulose nesta escala. Os tratamentos mecânicos usualmente utilizados incluem homogeneização, microfluidização de alta pressão, desconstrução mecânica em blender e ultrassom (LAVOINE *et al.*, 2012; KAWEE *et al.*, 2018). Os tratamentos químicos que incluem oxidação mediada a TEMPO (n-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), carboximetilação, acetilação, hidrólise ácida e tratamento enzimático geralmente precedem a desconstrução mecânica (FUKUZUMI *et al.*, 2010; BESBES *et al.*, 2011; PÄÄKKÖ *et al.*, 2007; RODIONOVA *et al.*, 2012; TINGAUT *et al.*, 2010; IFUKU *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2009). Cada tipo de tratamento gera um material para aplicações específicas. A microfluidização, por exemplo, visa a homogeneização de suspensões ou emulsões para melhorar a aplicabilidade na área alimentícia e farmacêutica e pode dar origem a uma dispersão viscosa semelhante a um gel em baixas concentrações (2%) (BAI *et al.*, 2016; GALOYAK *et al.*, 2015).

A oxidação mediada a TEMPO é um tipo de tratamento químico geralmente aplicado antes do tratamento mecânico visando a obtenção de fibras mais uniformes uma vez que tal combinação facilita a separação de estruturas agregadas aumentando a estabilidade da suspensão (LAVOINE *et al.*, 2012). O grau de oxidação visa reduzir o número de passos necessários para a obtenção de um gel na desconstrução mecânica (BESBES *et al.*, 2011). Tal

oxidação proporciona vantagens quando comparada com outros tratamentos químicos, tais como: manutenção da cristalinidade e morfologia do material original, reação com tempo reduzido, exigência de condições brandas de processo (temperatura e pressão), seletividade química e não-reatividade ou sensibilidade à luz, ar ou umidade (ISOGAI *et al.*, 2011). Além disso essa oxidação aumenta a versatilidade do material para engenharia de tecidos (LUO *et al.*, 2013). Embora muitos processos para obtenção de CNF vegetal tenham sido amplamente estudados, existem poucos processos para a obtenção de suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana (CBNF) (TSALAGKAS *et al.*, 2016; SAITO *et al.*, 2006).

Na oxidação mediada a TEMPO ocorre a inserção de grupos aldeídos ou carboxílicos na estrutura química da celulose pela oxidação de grupamentos alcoólicos (primários e secundários) na presença de NaClO (ou NaClO₂) e NaBr (ou Kbr). A repulsão eletrostática entre as cadeias celulósicas, causada pela presença desses grupamentos (aldeídos ou carboxílicos), modifica as ligações de hidrogênio e afetam a força de interação entre as cadeias. Alguns autores propuseram diferentes esquemas visando uma completa elucidação dos mecanismos reacionais desta oxidação (SOUZA, 2004) que ainda é considerada complexa. Pode ocorrer uma redução no grau de polimerização da celulose que varia em função da intensidade de oxidação. O grau de oxidação é uma expressão da quantidade de grupamentos aldeídos ou carboxílicos inseridos na estrutura do polímero.

3.3 Peptídeos e hidrolisados bioativos

Peptídeos bioativos são definidos como um fragmento protéico que apresenta algum impacto positivo no organismo humano ou em sistemas biológicos. Diversos tipos de atividades biológicas de origem peptídica foram reportadas: antioxidante (NEVES *et al.*, 2017), antibacteriana (PU *et al.*, 2017), antiviral (XIE *et al.*, 2016), antifúngica (MUHIALDIN *et al.*, 2016), antiploriferativa (MARCELA *et al.*, 2016), antitrombótica (NASRI *et al.*, 2017), Imunoregulatória (BAI *et al.*, 2015), anticancerígena ou antitumoral (SETRERRAHMANE *et al.*, 2017), anti-hipertensiva (OCHOA *et al.*, 2016), hipolipidêmica (UDENIGWE *et al.*, 2015), anticoagulante (REN *et al.*, 2014), opióide (KONG *et al.*, 2008); anti-apetite (PARK *et al.*, 2015), Citomoregulatório (ZHAO *et al.*, 2014), Hipoglicêmica (KIANG *et al.*, 2015), hipocolesterolêmica (PARK *et al.*, 2015), antiaterosclerótica (RYZHAK *et al.*, 2012), antiinflamatória (GUPTA *et al.*, 2017), antimelanogênica (OCHIAI *et al.*, 2016), antimutagênica ou antigenotóxica (SUÁREZ *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2002),

regulador gastrointestinal (SHIMIZU *et al.*, 2004), suplementação (KHOSRAVI *et al.*, 2015), plastificante (NUANMANO *et al.*, 2015), emulsificante (NALINANON *et al.*, 2011), crioprotetora (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2015), saborizante (ARIHARA *et al.*, 2006) e estimulante bacteriano (ZHAO *et al.*, 1996).

Peptídeos bioativos podem ser obtidos por extração de material orgânico presente na natureza, síntese microbiana, síntese enzimática, síntese por DNA recombinante, hidrólise química e hidrólise enzimática de fontes proteicas (PEREZ *et al.*, 2012). Uma sequência peptídica ou hidrolisado contendo mais de uma sequência podem apresentar mais de um tipo de atividade biológica simultaneamente (BOUGATEF *et al.*, 2009; CONLON *et al.*, 2014).

A intensidade das atividades biológicas conferidas por esses peptídeos variam de acordo com a composição de aminoácidos característica da sequência e proporção mássica delas nos hidrolisados podendo conferir efeitos sinérgicos (MATSUI *et al.*, 2018; MOHAMMADI *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2012; KARAMAN *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2018; LENG *et al.*, 2016).

Hidrolisados proteicos são frequentemente usados como ingredientes funcionais, nutracêuticos ou medicinais (AMBIGAIPALAN *et al.*, 2015). Após a ingestão, modificação pelo sistema gastrointestinal e absorção pelo intestino, esses peptídeos podem ter ação fisiológica no sistema nervoso, imune, gastrointestinal e cardiovascular (NASRI *et al.*, 2017). Peptídeos com atividade biológica podem apresentar outras propriedades tecnológicas como agente crioprotetor e plastificante (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2015; NALINANON *et al.*, 2011; NUANMANO *et al.*, 2015).

Embora peptídeos antioxidantes possam ser obtidos através de hidrólise enzimática de diversos tipos de fontes proteicas, fontes de origem marinha ou outros pescados de água doce são as mais estudadas (ATEF *et al.*, 2017; SOO *et al.*, 2016; REN *et al.*, 2008; NGO *et al.*, 2010; MENDIS *et al.*, 2005; JE *et al.*, 2005; QIAN *et al.*, 2008; JEMIL *et al.*, 2016; ZHUANG e SUN 2011; KARNJANAPRATUM *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2001; CHI *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2013; NIKKO *et al.*, 2015). Hidrolisados enzimáticos de gelatina de pele de peixe apresentam majoritariamente atividade antioxidante embora possam exibir outros tipos de atividade. Dentre as espécies de pescado dos quais se pode extrair gelatina de pele tem-se a tilápia (*Oreochromis niloticus*), uma espécie bastante comercializada e processada no mundo. Vários processos químicos de extração de gelatina e colágeno foram desenvolvidos visando o aproveitamento da pele (CHO *et al.*, 2005; EASTOE *et al.*, 1957; NAGAI *et al.*, 2000; SAMPAIO *et al.*, 2017; SEE *et*

al.,2010; KARIM *et al.*, 2009; YOSHIMURA *et al.*, 2000; JAMILAH *et al.*, 2002; MAHBOOB, 2015). A pele de tilápia é um resíduo do processamento dessa espécie que tem como principal produto de interesse comercial o filé. A utilização da pele neste âmbito é uma forma de valorizar a cadeia produtiva e aproveitar resíduos.

3.4 Embalagens e revestimentos antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a oxidação de moléculas facilmente oxidáveis, como lipídios e proteínas. Quando adicionados em produtos de carnes protegem os mesmos da deterioração causada pela oxidação, aumentando a vida útil dos mesmos (KARRE *et al.*, 2013). Os antioxidantes sintéticos BHT, BHA, TBHQ e PG são usados em produtos cárneos sob regulamentação, porém estudiosos acreditam que os mesmos estão relacionados com efeitos negativos ao organismo humano (WESSLING *et al.*, 1998; KARRE *et al.*, 2013).

Muitos antioxidantes naturais são estudados ou aplicados como as classes químicas dos tocoferóis, compostos fenólicos e extratos de plantas (RAMALHO *et al.*, 2006). Pesquisas já mostraram que alguns antioxidantes naturais podem ser mais efetivos que os sintéticos, impulsionando assim maior interesse dos pesquisadores por vários outros tipos de compostos naturais que possam ser tão efetivos quanto os sintéticos e mais baratos (KARRE *et al.*, 2013). Algumas das potenciais fontes de antioxidantes naturais são listadas a seguir: ameixa, extrato de semente de uva, uva do monte, romã, oxicoco, extrato de casca de pinheiro, alecrim, orégano, canela, cravo, brócolis, batata, abóbora, curry, urtiga, sálvia, tomilho, menta e gengibre (SHAH *et al.*, 2014; KARRE *et al.*, 2013).

A redução da oxidação foi observada em produtos como rissóis de carne (bovina, porco, cabra e búfalo), salsicha, carne moída cozida ou crua (cordeiro, porco e bovina), nuggets, linguiça, óleo de girassol, peixes, sandinhas defumadas e produtos lácteos (queijo, yogurte, leite) após a adição direta de compostos antioxidantes naturais (SHAH *et al.*, 2014; ALP *et al.*, 2010; BAÑÓN *et al.*, 2007; HAYES *et al.*, 2010; COLINDRES *et al.*, 2011; JONGBERG *et al.*, 2011; KULKARNI *et al.*, 2011; MANSOUR *et al.*, 2000; AHN *et al.*, 2007; AHN *et al.*, 2002; NUÑEZ *et al.*, 2008; ALENISAN *et al.*, 2017). Tais compostos naturais podem conferir cor, odor e sabor ao produto final o que é desvantajoso na maioria das aplicações (KARRE *et al.*, 2013). Dessa forma, hidrolisados proteicos e peptídeos purificados podem ser uma alternativa para contornar esse problema.

A obtenção e aplicação de peptídeos são bastante estudadas atualmente por serem considerados um dos potenciais substitutos dos aditivos sintéticos em alimentos (LIN *et al.*, 2017; XIANG *et al.*, 2016). Anisina é o único peptídeo utilizado em escala industrial como bacteriocina (SILVA *et al.*, 2013; VALDÉS *et al.*, 2014).

As embalagens antioxidantes podem agir liberando os agentes antioxidantes sobre o alimento ou removendo compostos indesejáveis do próprio alimento ou do "headspace". Pequenas quantidades de extratos antioxidantes podem modificar as propriedades mecânicas ou de barreira dos filmes estudados, sendo possível inclusive melhorar tais propriedades. A adição de agentes plastificantes que na maioria dos casos são necessários para a obtenção de filmes com boas propriedades mecânicas podem afetar a forma como os agentes antioxidantes são liberados no alimento (GANIARI *et al.*, 2017).

A maioria das pesquisas se concentra no estudo das propriedades antioxidantes do filme e não após aplicado sobre algum tipo de alimento (ATARÉS *et al.*, 2010; ABDOLLAHI *et al.*, 2012; ABDOLLAHI *et al.*, 2012; AKHTAR *et al.*, 2012; ARCAN *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2015; BIFANI *et al.*, 2007; BOLUMAR *et al.*, 2011; GENSKOWSKY *et al.*, 2015; ESTACA *et al.*, 2009; ESATACA *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2010; DASHIPOUR *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2007; JIMÉNEZ *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2013; PASTOR *et al.*, 2013; NORAJIT *et al.*, 2010; MAYACHIEW *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2002; MARCOS *et al.*, 2014; LOPEZ *et al.*, 2013; SIRIPATRAWAN *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2015; ABREU *et al.*, 2012). Entretanto, alguns alimentos estudados após aplicação de filmes comestíveis antioxidantes foram: amêndoas torradas, peixes, bifés bovinos, sementes (noz e girassol torrado), salsicha de porco, rissóis de porco, presunto, peru, frango (GANIARI *et al.*, 2017; OUSSALAH *et al.*, 2004; ATARÉS *et al.*, 2011; SIRIPATRAWAN *et al.*, 2012; ESTACA *et al.*, 2017; SABAGHI *et al.*, 2015; GONZALEZ *et al.*, 2009; AHN *et al.*, 2007; BISWAS *et al.*, 2002; KANATT e CHAWLA 2018; İZCI *et al.*, 2018; BOLUMAR *et al.*, 2016; ESTACA *et al.*, 2007; CHOULITOU DI *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2009; ABREU *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2010; OUSSALAH *et al.*, 2004; DICASTILLO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2016; SIRIPATRAWAN *et al.*, 2012; NERÍN *et al.*, 2006; VITAL *et al.*, 2016).

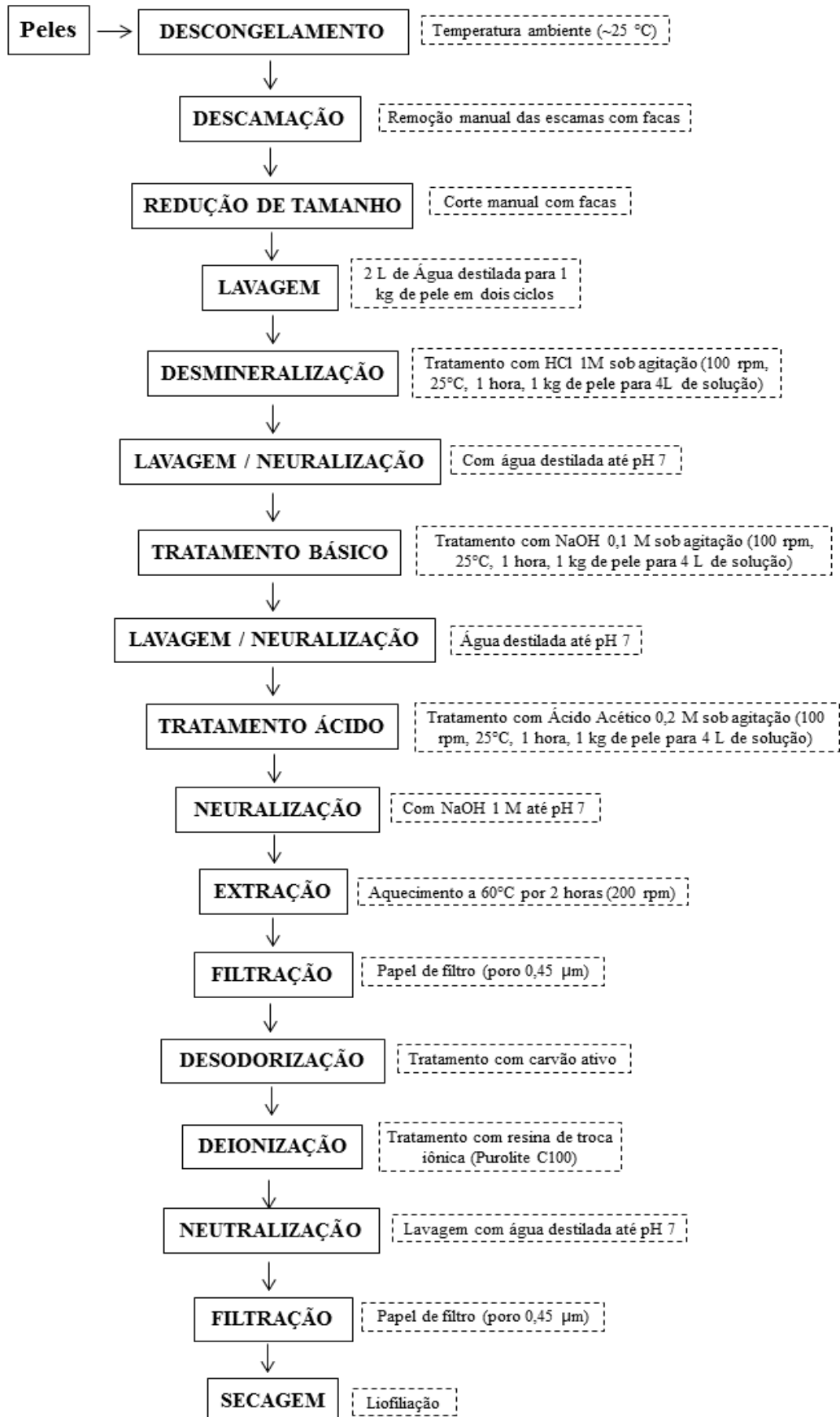
4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos materiais de trabalho

4.1.1 Gelatina de pele de tilápia (GPT)

A Gelatina de pele de tilápia (GPT) foi obtida seguindo processo desenvolvido por Sampaio *et al.*, (2016) com mínimas alterações (Figura 3). As peles (1 kg) foram descongeladas, descamadas e cortadas em pedaços de 5 x 5 cm, lavadas com água destilada e imersas em 4 L de HCl 1 M por 1h sob agitação (100 rpm, 25°C) para desmineralização das peles. Em seguida as peles foram separadas da solução, lavadas até pH 7 e imersas em 4 L de NaOH 0,1 M sob agitação (100 rpm, 25°C) por 1 h para a remoção das proteínas não colagenosas. Em seguida as peles foram separadas, lavadas até pH 7 e imersas em 4 L de ácido acético 0,2 M sob agitação (100 rpm, 25°C) por 1 h visando a transformação do colágeno em gelatina. A solução contendo as peles foi neutralizada e aquecida a 60 °C por 2 horas sob agitação (200 rpm). A solução formada foi filtrada em papel de filtro (0,45 µm) e tratada com carvão ativado para desodorização e resina de troca iônica para a remoção de íons. Para tal, adicionou-se 10 g de carvão ativado à solução de gelatina e agitou-se por 2 minutos, seguindo uma centrifugação (15.635 g) para separação e posterior remoção do carvão. O processo foi repetido em três ciclos sucessivos. Em seguida, 500 g de resina catiônica Purolite C100 foi adicionada a solução de gelatina por 24 horas em dois ciclos sucessivos. A solução teve o pH ajustado para 6, foi filtrada (0,45 µm) e liofilizada.

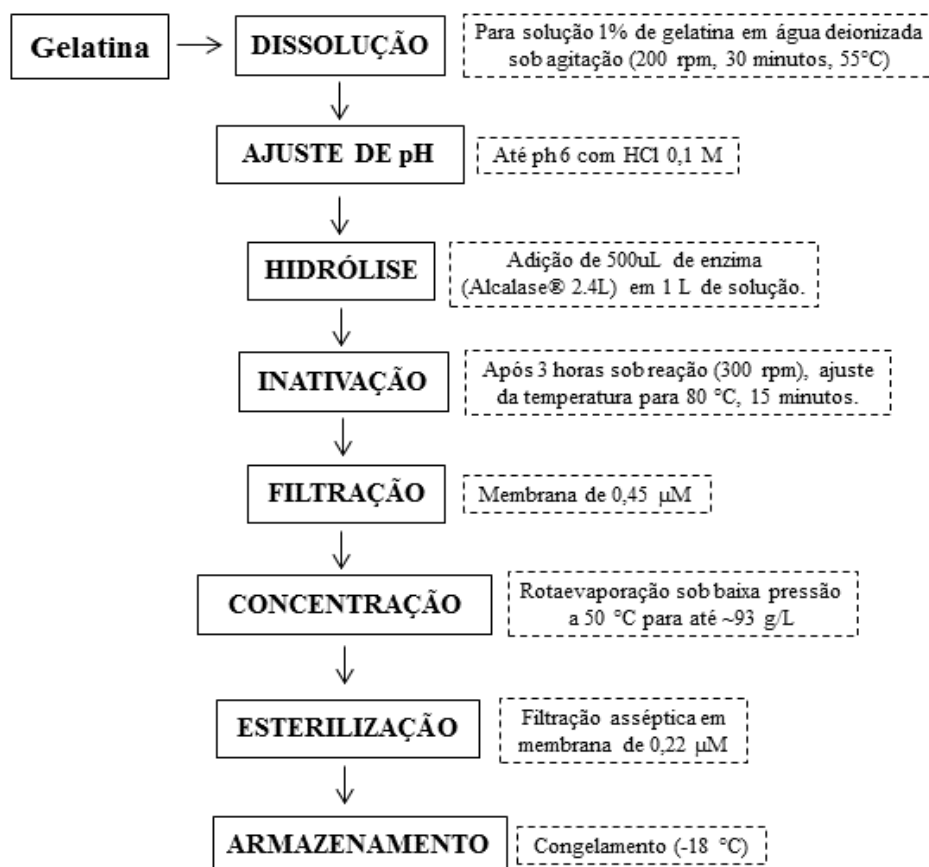
Figura 3 - Fluxograma de obtenção da gelatina (GPT)



4.1.2 Hidrolisado antioxidante (HA)

O hidrolisado antioxidante (HA) foi obtido através de hidrólise enzimática da gelatina de pele de tilápia (GPT) sob temperatura e pH controlados utilizando a protease Alcalase® 2.4L (cortesia da Novozymes®) conforme processo otimizado por Faria *et al.* (2015) (Figura 4). Para tal, 250 µL de enzima foi adicionado a 500 mL de uma solução de gelatina 1% (m/v), pH 6, sob agitação (300 rpm) por 3 horas a 55 °C. A hidrólise foi encerrada pelo aquecimento da solução a 80 °C por 15 minutos. O hidrolisado foi filtrado em membrana 0,45 µm, concentrado em rota-vapor para uma concentração de ~93 g/L (m/m) e finalmente filtrado em membrana 0,22 µm para esterilização, sendo posteriormente mantido a -18 °C até o uso.

Figura 4 - Fluxograma de obtenção do hidrolisado (HA)



4.1.3 Celulose bacteriana (CB)

Membranas de celulose bacteriana (CB) foram obtidas através do cultivo estático da bactéria *Komagataeibacter xylinus* 53582 em meio sintético caldo HS (HESTRIN e SCHRAMM, 1954) e suco integral de caju (Figura 5 e Figura 6).

Figura 5 - Fluxograma de obtenção da celulose bacteriana (CB)

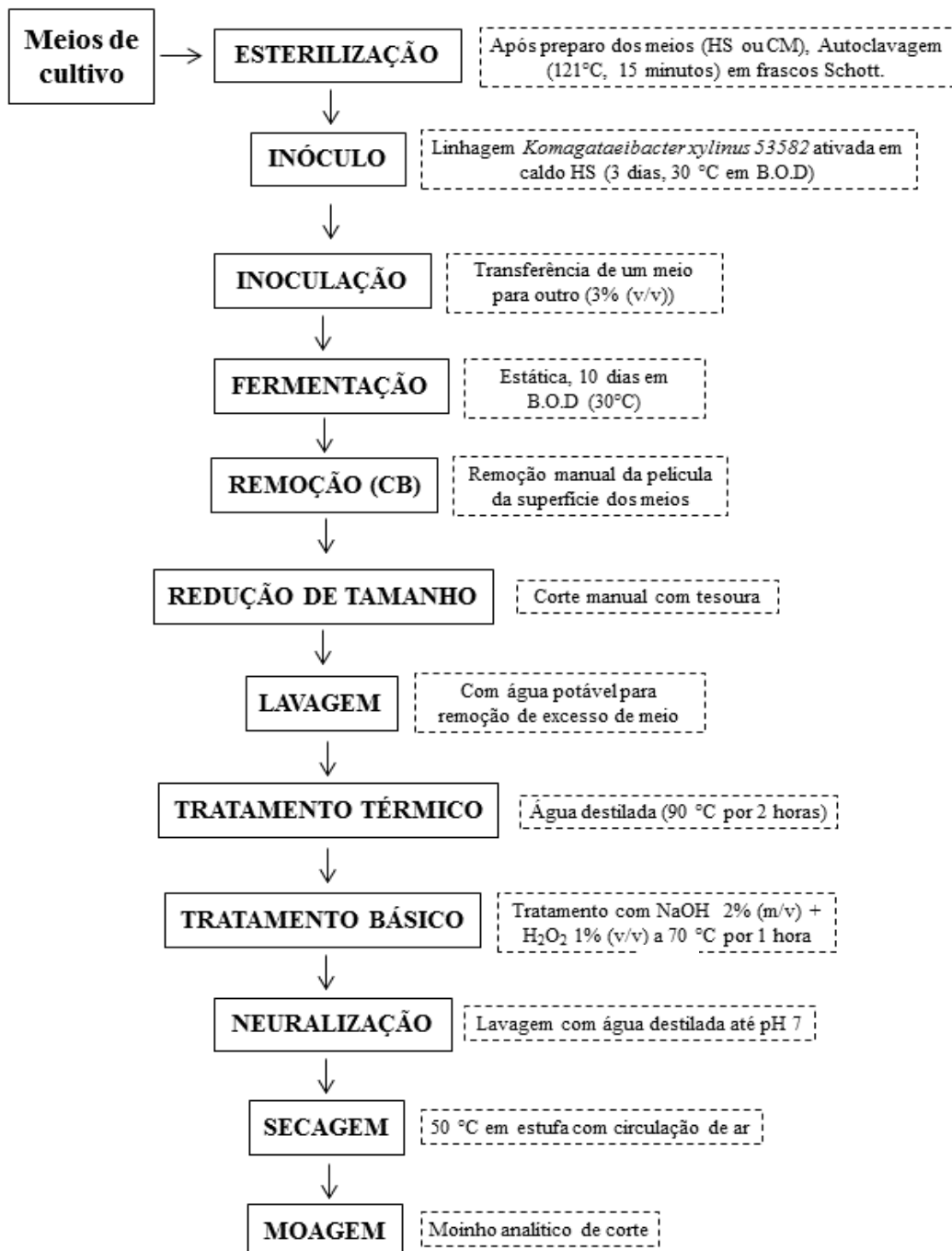
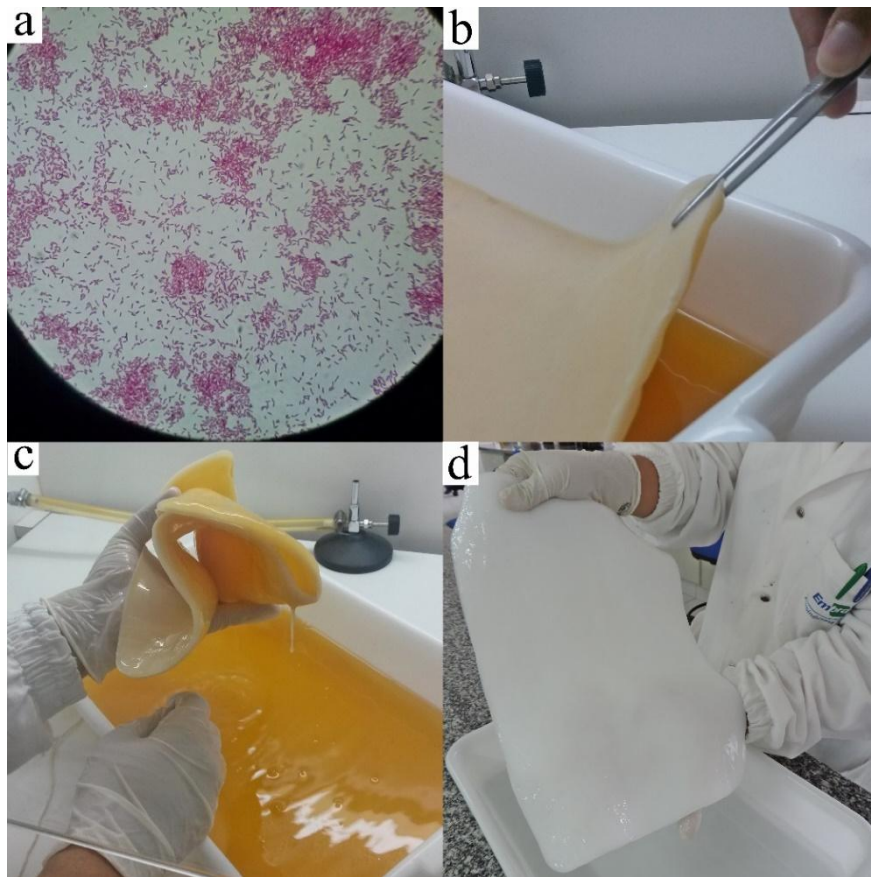


Figura 6 - Fotografias: (a) Coloração de Gram da bactéria, (b,c) Remoção da película do meio de cultivo após 10 dias, (d) Película de CB purificada pronta para uso.



A composição química dos meios de cultura para a obtenção da CB-HS (CB de meio sintético) e CB-CM (CB de suco de caju) é descrita na Tabela 2. O meio CM corresponde ao suco de caju integral esterilizado pH 6 e o meio HS corresponde ao meio desenvolvido em Hestrin e Schramm (1954).

O inóculo utilizado (3%, v/v) foi obtido após transferência da bactéria previamente mantida em meio ágar-HS para o meio caldo HS com incubação estática em B.O.D a 30 °C por 48 horas.

Os meios (HS e CM) inoculados com a bactéria foram submetidos a fermentação estática, incubados em B.O.D a 30 °C por 10 dias em recipientes de vidro de área ~537 cm² contendo 500 mL de meio. A qualidade do inóculo foi acompanhada por coloração de Gram para averiguação de possíveis contaminantes (Figura 6a).

Tabela 2 – Composição físico-química dos meios de cultura utilizados para a produção de celulose bacteriana (CB). CM: meio suco de caju integral pH 6. HS: Meio Hestrin e Schramm pH 6

	g/L	CM	HS
Açúcares totais		103,87*	20
<i>Glicose</i>		72,07*	20
<i>Frutose</i>		31,80*	0
Nitrogênio		0,44*	1,25
<i>Peptona de caseína</i>		0	5
<i>Extrato de levedura</i>		0	5
Ácido cítrico		2,6*	1,15
Fosfato de sódio		0	2,75

*Quantidade originalmente presente no suco integral de caju esterilizado

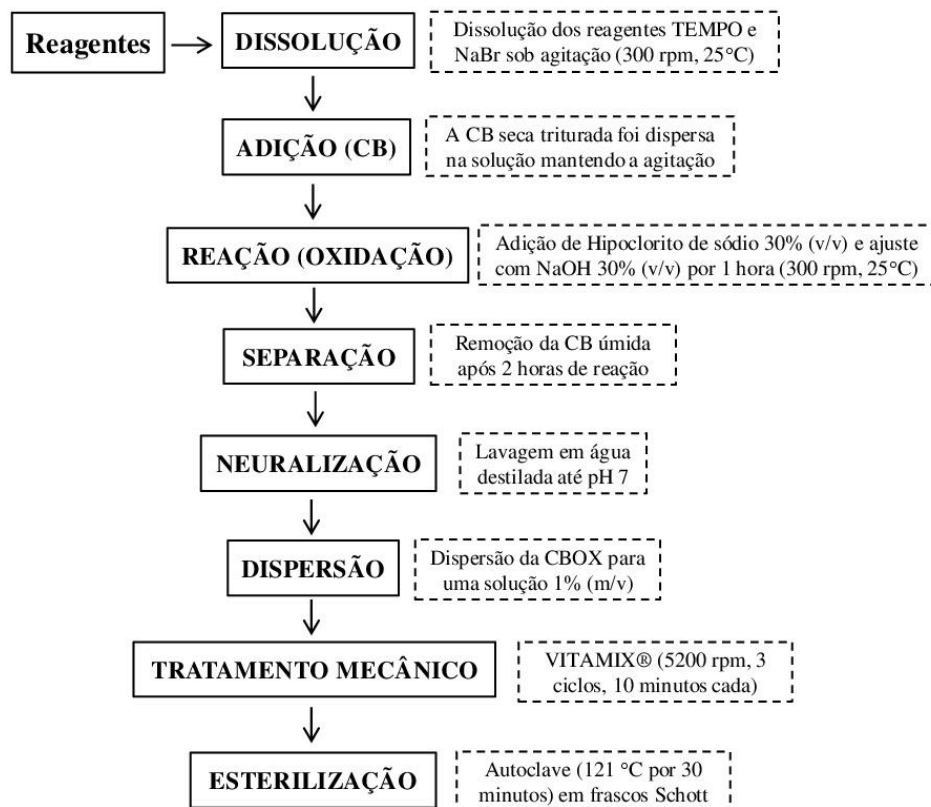
Após o tempo de fermentação as películas de CB foram removidas do meio (Figura 6b,c) e purificadas para remoção de células bacterianas e resíduos fermentativos por tratamento alcalino segundo Lima *et al.* (2008) com adaptações. As películas foram inicialmente cortadas em pedaços 3 x 3 cm, lavadas em água corrente e imersas em água destilada a 90 °C por 2 horas. Em seguida as películas imersas em solução de NaOH 2% (m/v) + H₂O₂ 1% (v/v) a 70 °C por 1 hora na proporção de ~300 g de CB úmida para 2 L de solução. Por fim, as películas foram lavadas em água até pH 7 (Figura 6d) e secas a 50 °C em estufa com circulação de ar. A eficiência do processo de purificação foi acompanhada por análise termogravimétrica (ATG) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (APÊNDICE A).

4.1.4 Celulose bacteriana oxidada (CBOX)

A Celulose bacteriana oxidada (CBOX) (Figura 8b) (Figura 7) foi obtida por oxidação mediada a TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl) oxidanyl) da CB seca triturada (Figura 8a). Para tal, as membranas puras de CB secas foram trituradas em moinho analítico de corte (Figura 7a). Em seguida procedeu-se a oxidação segundo (SAITO *et al.*, 2007) com adaptações. Para tal 0,16 g de TEMPO e 1 g de NaBr foi dissolvido em 500 mL de água seguindo a adição da 10 g de CB seca triturada e ajuste de volume para 970 mL. A reação se

iniciou pela adição de 30,8 mL de hipoclorito de sódio 30% (v/v) com manutenção do pH em 10 pela adição de NaOH 30% (m/v) por 2 horas a 25 °C sob agitação (300 rpm). Em seguida a CBOX em estado úmido foi separada por filtração, re-suspendida em água (para 1% m/m) e neutralizada por lavagem com água destilada.

Figura 7 - Fluxograma de obtenção da CB TEMPO-oxidada (CBOX) e da suspensão de CB nanofibrilada (CBNF)



4.1.5 Suspensão de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF)

As suspensões de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF) (Figura 8c) (Figura 7) foram obtidas após tratamento mecânico da CBOX 1% (m/m, em massa seca) em liquidificador de alta velocidade (VITAMIX® 5200 Standard - Getting Started) operando em três ciclos sucessivos de 10 minutos com pausa de 20 minutos (totalizando 30 minutos de operação) na velocidade máxima (5.200 rpm). As paragens (ciclos) objetivaram evitar o superaquecimento do sistema. As suspensões de CB nanofibrilada (CBNF) foram

esterilizadas em autoclave (121 °C por 30 minutos) e armazenadas antes da sua utilização. A CBNF de meio sintético foi denominada CBNF-HS e a CBNF de suco de caju CBNF-CM.

Figura 8 - Fotografias: (a) CB seca triturada, (b) CB oxidada, (c) Suspensão de CB de meio sintético nanofibrilada (CBNF-HS)



4.2 Estudo de desenvolvimento de filmes a base de celulose bacteriana nanofibrilada e hidrolisado (HA)

4.2.1 Obtenção dos filmes

Filmes antioxidantes a base de CBNF e HA foram obtidos por casting. Para tal, 400 mL da solução filmogênica contendo uma mistura em 1:1 (v/v) da suspensão de CBNF (1% m/v) e solução de HA foi seca a 50 °C estufa com circulação de ar após serem vertidas em placas de bandejas de polietileno (23 x 19 cm) recobertas com polipropileno. A mistura dos componentes foi feita sob agitação magnética (300 rpm) a 25 °C por 30 minutos. A solução de HA foi previamente composta pela diluição do hidrolisado concentrado (~90 g/L) em água a fim de se obter filmes com diferentes quantidades de HA.

Para a formulação dos filmes com plastificantes, 0,5 ou 1g de glicerol ou sorbitol foram dissolvidos em água ou na solução de HA antes de serem misturados com a suspensão de CBNF. Filmes de CB não oxidada (CB-HS e CB-CM), e os filmes de CBNF (CBNF-HS e CBNF-CM) foram utilizados como controle nos diferentes testes durante o estudo. A formulação dos diferentes filmes estudados é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos diferentes filmes secos formulados a base de CBNF

Filmes		Composição do filme seco (% , m/m de filme)						
		HA	CBNF	Plastificante	Proteína (%)	Fração < 100 kDa	Gelatina não hidrolisada (Fração > 100 kDa)	Impurezas não proteicas
Filmes antioxidantes sem plastificantes	HS ₂₅ HA ₇₅	75,0	25,0	0	66,3	51,1	15,2	8,7
	HS ₃₃ HA ₆₇	66,7	33,3	0	59,0	45,5	13,5	7,7
	HS ₄₀ HA ₆₀	60,0	40,0	0	53,0	40,9	12,1	7,0
	HS ₅₀ HA ₅₀	50,0	50,0	0	44,2	34,1	10,1	5,8
	HS ₅₇ HA ₄₃	42,9	57,1	0	37,9	29,2	8,7	5,0
	HS ₆₇ HA ₃₃	33,3	66,7	0	29,4	22,7	6,7	3,9
	HS ₈₃ HA ₁₇	16,7	83,3	0	14,8	11,4	3,4	1,9
	HS ₈₇ HA ₁₃	13,0	87,0	0	11,5	8,9	2,6	1,5
	HS ₉₁ HA ₉	9,1	90,9	0	8,0	6,2	1,8	1,1
	HS ₉₅ HA ₅	4,8	95,2	0	4,2	3,3	1,0	0,6
HS ₉₈ HA ₂	2,0	98,0	0	1,8	1,4	0,4	0,2	
Filmes apenas com plastificantes (controles)	HS ₆₇ S ₃₃	0	66,7	33,3	0	0	0	0
	HS ₆₇ G ₃₃	0	66,7	33,3	0	0	0	0
	CM ₆₇ S ₃₃	0	66,7	33,3	0	0	0	0
	CM ₆₇ G ₃₃	0	66,7	33,3	0	0	0	0
Filmes antioxidantes com plastificantes	HS ₄₄ HA ₄₄ S ₁₁	44,4	44,4	11,1	39,3	30,3	9,0	5,2
	HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	40,0	40,0	20,0	35,4	27,3	8,1	4,6
	HS ₄₄ HA ₄₄ G ₁₁	44,4	44,4	11,1	39,3	30,3	9,0	5,2
	HS ₄₀ HA ₄₀ G ₂₀	40,0	40,0	20,0	35,4	27,3	8,1	4,6
	CM ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	40,0	40,0	20,0	35,4	27,3	8,1	4,6
	HS ₅₀ HA ₂₅ S ₂₅	25,0	50,0	25,0	22,1	17,0	5,1	2,9
	HS ₃₃ HA ₅₀ S ₁₇	50,0	33,3	16,7	44,2	34,1	10,1	5,8
	HS ₂₉ HA ₅₇ S ₁₄	57,1	28,6	14,3	50,5	38,9	11,6	6,6

4.2.2 Efeito da quantidade de HA, tipo de plastificante e tipo de CB

Na primeira etapa do estudo avaliou-se a influência da concentração de HA nos filmes de CBNF-HS sobre a atividade antioxidante (Aox), na faixa de 2 a 75 g/L (m/m) de HA.

Em seguida avaliou-se o efeito da adição dos plastificantes (glicerol ou sorbitol) sobre a Aox de um filme com quantidade de HA definida selecionado na etapa anterior. As concentrações de plastificante avaliadas foram de 10 e 20% (m/m) na composição final do filme seco.

Por fim avaliou-se o efeito da substituição do tipo de celulose (CBNF-HS por CBNF-CM) sobre a atividade antioxidante de um filme com quantidade de HA e plastificante definido. Alguns filmes foram selecionados para caracterização quanto a aspectos físicos, químicos, morfológicos, estruturais e ópticos.

4.2.3 Ensaios de liberação de proteína dos filmes antioxidantes de CBNF-HS

4.2.3.1 Sistema

Uma massa de 0,5g de cada filme foi imersa em diferentes simulantes alimentares sob agitação (200 rpm), durante 3 horas nas temperaturas de 4 e 25 °C. O filme foi fracionado em pedaços de (2 x 2 cm) e contidos em uma rede metálica durante o ensaio. Uma alíquota de 50 µL de cada fluido foi removida do sistema em intervalos de tempo para quantificação de proteína. Os perfis de liberação de proteína foram plotados em porcentagem de proteína liberada em função do tempo. Estudou-se o comportamento de quatro filmes (HS₅₀HA₂₅S₂₅, HS₄₀HA₄₀S₂₀, HS₃₃HA₅₀S₁₇, HS₂₉HA₅₇S₁₄) contendo 25%, 40%, 50% e 57% de HA (m/m) respectivamente (Tabela 7).

Os simulantes alimentares utilizados nos testes (água destilada, ácido acético 3% (v/v), etanol 10% (v/v) e etanol 50% (v/v)) foram escolhidos baseados na Resolução nº 51 de 26/11/2010 / ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (D.O.U. 30/11/2010) e CELEX - Regulation (EC) No 66/2010 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2009 on the EU Ecolabel, para alimentos cárneos e cereais.

4.2.3.2 Caracterização dos filmes e fluidos após liberação

Determinou-se a massa seca do filme remanescente por secagem em estufa a 105 °C por 48 horas. A quantificação de proteína liberada em cada fluido foi determinada por leitura direta da alíquota diluída em microplaca para leitura a 230 nm (UV-Star® Microplate, 96 well, µClear®, clear - Greiner Bio-One) seguindo metodologia adaptada de Anthis e Clore, 2013 (ver item a seguir 4.2.3.2.1). Utilizou-se curva padrão a fim de correlacionar linearmente absorbância e concentração de HA, utilizando-se solução de HA de concentração proteica conhecida.

4.2.3.2.1 Adaptação metodológica

De acordo com Anthis e Clore (2013) há uma correlação linear entre a quantidade de proteína de uma amostra e a intensidade de absorvância lida a 205nm quando a amostra é diluída convenientemente e seguindo outras recomendações menores da metodologia. A quantidade de proteína foi determinada por regressão linear correlacionando a intensidade de absorvância a 230 nm e quantidade de proteína contida em HA (padrão) previamente caracterizado por Kjeldahl (KJELDAHL, 1883). Portanto substituiu-se a leitura a 205nm (cubeta) pela leitura a 230 nm em placas uma vez que se considerou não haver interferência comprimento de onda na quantificação de proteína para a amostra de hidrolisado deste trabalho. A quantidade de proteína determinada para o HA e suas frações nesses dois comprimentos de onda são comparadas na Tabela 4:

Tabela 4 – Quantidade de proteína no Hidrolisado bruto (HA) e frações

	Massa (%)	
	205 nm	230 nm
Hidrolisado Bruto	100,00	100,00
PA >10 kDa	31,37	32,14
PA <10 kDa	68,63	67,86
10kDa > PA >3kDa	22,11	21,48
PA <3 kDa	46,52	46,39

PA - Fração peptídica*

4.2.3.3 Modelagem

Foram testados vários modelos matemáticos para dissolução/liberação descritos em Costa *et al.* (2001) para descrever o fenômeno de transporte associado em cada perfil. O coeficiente de regressão (R^2) ajustado foi utilizado para avaliar a qualidade do ajuste dos perfis a cada modelo proposto. O ajuste seguiu a equação [1] onde: R^2_A é o coeficiente de regressão ajustado, n é número de pontos da curva, p o número de parâmetros do modelo e R^2 o coeficiente de regressão não ajustado.

$$R^2_A = 1 - (n - 1) / (n - p) * (1 - R^2) \quad [1]$$

Os parâmetros (constantes) de cada modelo foram determinados apenas para os modelos que descreveram os perfis de forma adequada ($R^2_A > 0,8$). Os modelos testados são descritos a seguir:

$$\text{Ordem zero: } Q_t = Q_0 + K_0 * t \quad [2]$$

$$\text{Primeira ordem: } \ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 * t \quad [3]$$

$$\text{Segunda ordem: } Q_t / [Q_\infty * (Q_\infty - Q_t)] = K_2 * t \quad [4]$$

$$\text{Quadrático: } Q_t = 100 * (K_3 * t^2 - K_4 * t) \quad [5]$$

$$\text{Hixson-Crowell: } Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_5 * t \quad [6]$$

$$\text{Weibull: } \log [1 - \ln (1 - (Q_t / Q_\infty))] = b * \log t - \log a \quad [7]$$

$$\text{Higuchi: } Q_t = K_H * t^{1/2} \quad [8]$$

$$\text{Baker-Lonsdale: } (3/2) * [1 - (-1 * (Q_t / Q_\infty))^{2/3}] - (Q_t / Q_\infty) = K_5 * t \quad [9]$$

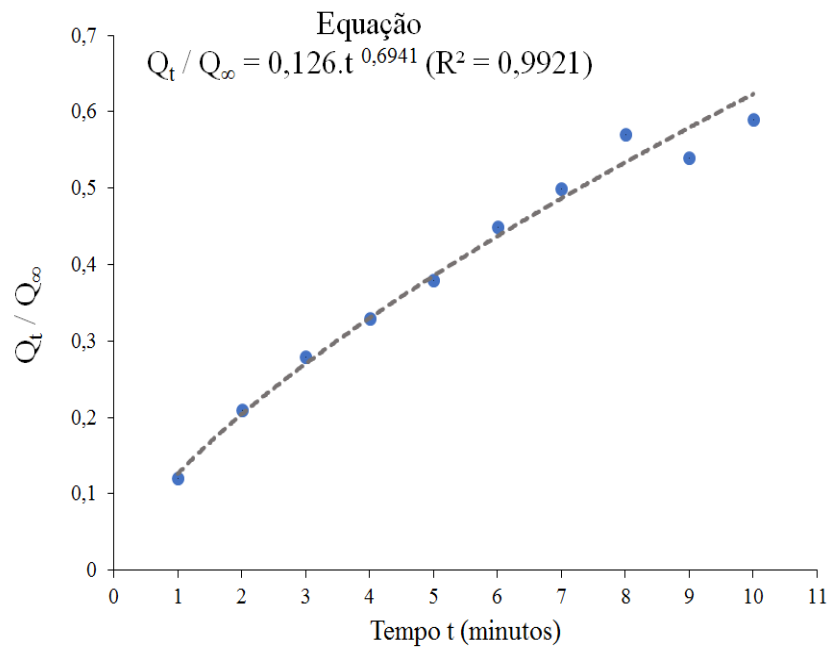
$$\text{Korsmeyer-Peppas: } Q_t / Q_\infty = K_k * t^n \quad [10]$$

Onde K_0 , K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , K_5 , b , a , K_H , K_5 , K_k e n são constantes relativas a cada modelo, Q_t é a massa de proteína liberada no tempo t , Q_0 é a massa de proteína no tempo 0 (considerou-se = 0 em todos os casos) e Q_∞ a quantidade de proteína liberada no tempo infinito (considerou-se a quantidade máxima liberada em todos os casos) e t o tempo.

4.2.3.3.1 Modelagem dos perfis de liberação pela equação de Korsmeyer-Peppas

Em cada sistema, após plotagem dos dados e ajuste do gráfico por função potência (em Microsoft Excel), foi obtida uma equação (exemplo : $y = 0,126.t^{0,6941}$ ($R^2 = 0,9921$)) (Figura 9). Os parâmetros " K_k " e " n " são obtidos automaticamente em comparação com a equação deste modelo ($Q_t / Q_\infty = K_k . t^n$). Neste modelo considera-se valores de até 0,6 para Q_t / Q_∞ para o ajuste. O coeficiente de regressão R^2 obtido é ajustado considerando $p = 2$ na equação 1.

Figura 9: Exemplo de plotagem de dados para o modelo de Korsmeyer-Peppas



4.3 Caracterização dos filmes antioxidantes de CBNF e seus componentes

4.3.1 Teor proteico do hidrolisado e frações

Para caracterizar o hidrolisado, o teor proteico e a atividade antioxidante (Aox) foram investigados. A quantidade de proteína total do hidrolisado foi quantificada pelo método de Kjeldahl (KJELDAHL, 1983) utilizando 5,5 como fator de conversão. A quantidade de gelatina não hidrolisada no HA foi estimada após fracionamento em membrana de 100 kDa conforme Faria *et al.* (2015). Considerou-se como fração proteica hidrolisada a fração mássica abaixo de 100 kDa contida no HA.

O hidrolisado bruto ajustado para concentração de ~90 g/L foi fracionado após centrifugação (10.000 rpm) em tubos Amicon Ultra 4 mL (Merck KGaA) de 10 kDa e 3 kDa e cada fração caracterizada quanto a atividade antioxidante (segundo a metodologia descrita no item 4.3.3) e teor proteico seguindo Anthis e Clore (2013) com leitura a 205 nm em cubeta de quartzo, usando o HA previamente caracterizado pelo método de Kjeldahl como padrão.

4.3.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (Aox) do hidrolisado bruto, das frações e dos filmes foi determinada pelo método de DPPH (YANG *et al.*, 2009). Para tal, 1,5 mL de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) 0,1 mM (em etanol 95%) foi adicionado a 1,5 mL da amostra líquida em ambiente escuro seguindo uma leitura da absorbância a 517 nm após 30 minutos.

Especificamente para os filmes a metodologia foi adaptada. Para tanto, ~9 mg de cada filme (cortados em pedaços de ~0,5x0,5 cm) foi imerso em 1,5 mL de água e submetido a agitação (120 rpm) por 20 minutos em shaker orbital. Após esse tempo seguiu-se a análise normalmente com a adição da solução de DPPH e leitura a 517 nm.

O valor de Aox (atividade antioxidante absoluta em %) foi calculado seguindo a equação 11 onde AA é a absorbância da amostra e Ab a absorbância do branco (água deionizada no lugar da amostra).

$$\text{Aox (\%)} = ((\text{Ab} - \text{AA}) / \text{Ab}) * 100 \quad [11]$$

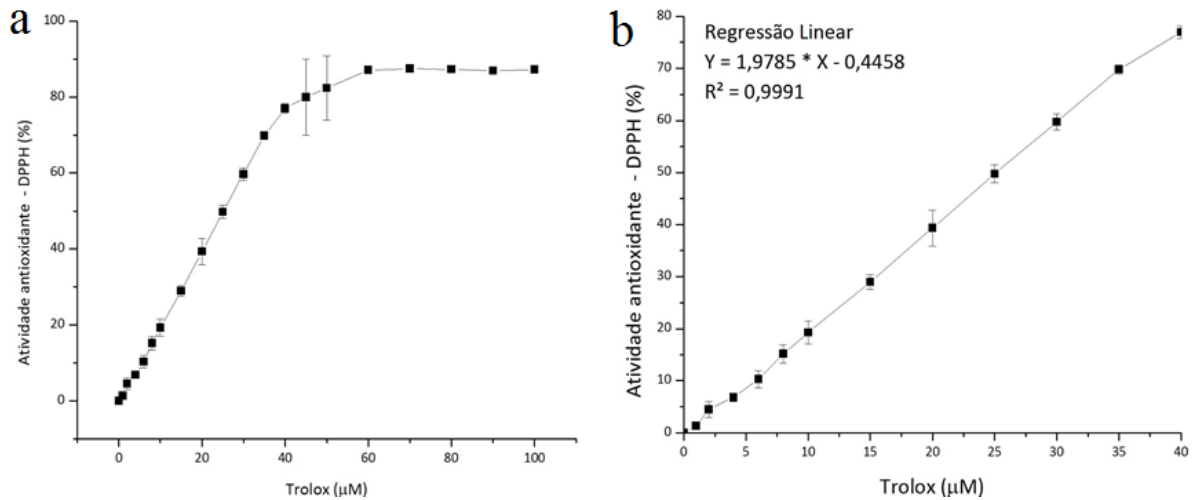
Solução de Trolox (0 a 40 μM em etanol 95%) foi utilizada como padrão para a determinação da atividade antioxidante em Trolox equivalente (Aox_{Teq}). A Aox_{Teq} foi determinada pela equação [12] onde Aox é a atividade antioxidante descrita na equação [11], P é a concentração de proteína da amostra e *a* e *b* os coeficientes angular e linear da regressão Aox (%) x Concentração de Trolox (R² = 0,9991) (Figura 10).

$$\text{Aox}_{\text{Teq}} (\mu\text{mols de Trolox/g de proteína}) = ((\text{Aox (\%)} / \text{P (g/L)}) - b) / a \quad [12]$$

Para a determinação da equação da reta considerou-se apenas o intervalo de 0 a 40 μM onde a curva apresenta linearidade. Acima disso há uma perda de atividade antioxidante associada a chegando a um máximo de 80% (Figura 10).

Para o HA e as frações (<10 kDa e <3 kDa) determinou-se a concentração de HA necessária para a redução da absorbância em 50% (EC₅₀) por interpolação linear após de curvas Aox (%) x Concentração de HA.

Figura 10–Atividade antioxidante do Trolox em função da concentração: (a) Até 100 μM , (b) Até 40 μM de Trolox.



4.3.3 Ensaios com células epiteliais do intestino

4.3.3.1 Cultivo celular

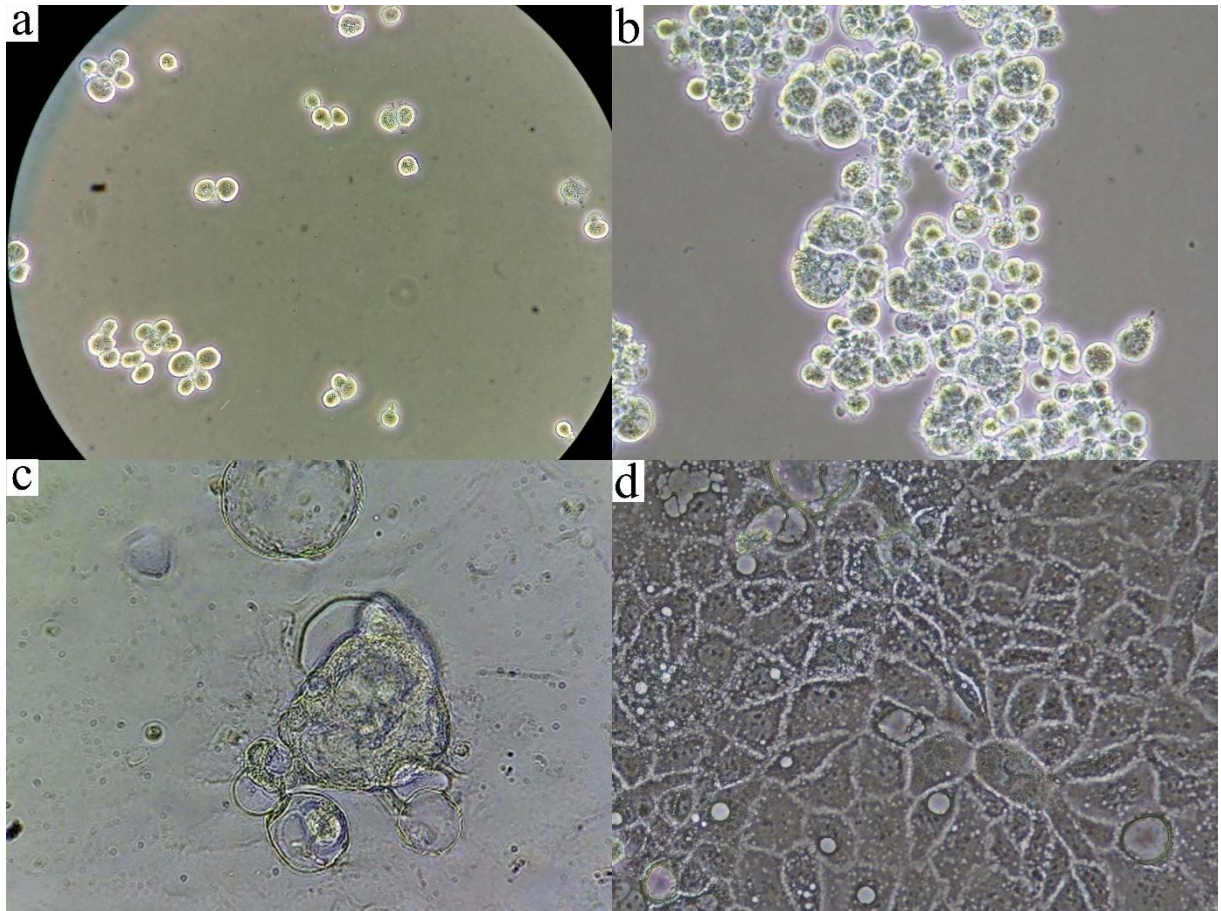
Células epiteliais derivadas de adenocarcinoma de cólon humano CACO-2 (ATCC, HTB-37) foram utilizadas nos testes sendo cultivadas em frascos T-75 contendo meio de cultura MEM (Minimum Essential Medium) suplementado com soro fetal bovino (20%), piruvato de sódio (0,11 g/L), aminoácidos não-essenciais (1%) e penicilina/estreptomicina (1%). As células foram mantidas em desenvolvimento sendo incubadas a 37 °C em atmosfera saturada de vapor de água com 5% CO_2 . Para os testes as células foram tripsinizadas e coradas com tripan-blue para contagem em câmara de Neubauer antes da semeadura. Imagens das células CACO-2 obtidas em microscópio óptico são apresentadas na Figura 11.

4.3.3.2 Citotoxicidade

A citotoxicidade das amostras foi determinada através da avaliação da viabilidade celular pelo método da resazurina (AHMED *et al.*, 1994; XU *et al.*, 2015; NOWAK *et al.*, 2017) após cultivo das células nas amostras diluídas em meio de cultura. Para tal, as células foram semeadas em microplaca de 96 poços (10^4 células por poço) e incubadas por 18 horas a 37 °C e 5% CO_2 para adesão. Para contagem celular utilizou-se o corante azul de tripano e câmara de Neubauer. Após adesão celular o meio foi removido e substituído pela amostra (200 μL

por poço) previamente diluída (10%, v/v) em meio de cultura adicionado de 10% de solução de resazurina 0,1 g/L. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas antes da leitura (intensidade de fluorescência: excitação a 560 nm e emissão a 590 nm).

Figura 11: Micrografias das células CACO-2: (a) Células não aderidas, (b,c) Células em desenvolvimento, (d) Células confluentes



Para o controle positivo utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) 40% (v/v) em meio. Meio de cultura não diluído e meio 90% (v/v) foram utilizados como controles negativos. Para cada condição, foi realizado um teste semelhante sem células chamado de branco.

As amostras avaliadas foram: filmes antioxidantes HS₄₀HA₄₀S₂₀ e CM₄₀HA₄₀S₂₀ (0,5 g/L), filmes controle sem hidrolisado (HS₆₇S₃₃ e CM₆₇S₃₃ - 0,3 g/L; CBNF-HS e CBNF-CM - 0,2 g/L), sorbitol (0,1 g/L) e hidrolisado (0,2 g/L), todas previamente preparadas em concentração 10x superiores às concentrações de trabalho citadas.

Para dissolução dos filmes em meio os mesmos foram dispersos em água milli-Q, homogeneizados em ultra-turrax (3000 rpm, 1 minuto, 30 °C), sonicados por 15 minutos (37 kHz e 104 W) e esterilizados em luz UV (30 minutos) antes da diluição com meio de cultura.

A viabilidade celular V_C (%) foi calculada conforme a equação [13] descrita a seguir:

$$V_C (\%) = ((FA - FA_b) / (F_{MC} - F_{MCb})) * 100 \quad [13]$$

Onde, FA é a intensidade de fluorescência do poço com células tratado com as amostras, FA_b é a intensidade de fluorescência do poço sem células tratado com as amostras, FMC é a intensidade de fluorescência do poço com células tratado com o meio de cultivo, FMC_b é a intensidade de fluorescência do poço sem células tratado com o meio de cultivo. A amostra analisada foi considerada tóxica quando apresentou viabilidade abaixo de 80%.

4.3.3.3 Atividade antioxidante intracelular

Avaliou-se a atividade antioxidante intracelular utilizando DCFH como indicador da presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, seguindo metodologia adaptada de Wan *et al.* (2015) e Yarnpakdee *et al.* (2015) e células CACO-2. As células foram semeadas conforme descrito no teste de toxicidade e tratadas com diferentes concentrações de hidrolisado (0,5 - 2,0 g/L) ou trolox 50 μ M. O nível de redução de ROS intracelular, nomeado aqui atividade antioxidante intracelular (AoxI) foi avaliado nas células com e sem estresse oxidativo. O estresse oxidativo foi induzido pela presença de AAPH 250 μ M nos tratamentos. A solução de DCFH-DA 10.000 μ M foi preparado em metanol e diluído na proporção de 1:100 antes do uso.

No teste, após adesão, as células foram tratadas por 2 e 18 horas com as amostras previamente diluídas (10%, v/v) em meio de cultura MEM sem soro fetal bovino. Em seguida o meio foi removido do poço, lavado com PBS 4% (m/v) e as células tratadas com DCFH-DA 100 μ M por uma hora. Em seguida o meio foi removido do poço, lavado com HBSS/HEPES/AAPH 250 μ M (tratamento indutor da produção de ROS) ou HBSS/HEPES (tratamento não indutor da produção de ROS). Seguiu-se a leitura da fluorescência por 90 minutos em intervalos de 5 minutos. O AAPH foi preparado em água ultrapura (Milli-Q) e diluído previamente em HBSS/HEPES na proporção de 1:100 para a concentração final citada.

A atividade antioxidante intracelular sem estresse oxidativo (AoxI (%)) e a atividade antioxidante intracelular após estresse oxidativo (AoxI_S (%)) foram determinadas conforme as equações [14] e [15] descritas a seguir:

$$\text{AoxI (\%)} = (1 - (A / A_{MC})) * 100 \quad [14]$$

$$\text{AoxI}_S (\%) = (1 - ((A_S - A) / (A_{MCS} - A_{MC}))) * 100 \quad [15]$$

Onde, A é a área da curva fluorescência x tempo do poço com células tratadas com a amostra sem AAPH, A_{MC} é a área da curva fluorescência x tempo do poço com células tratadas com meio de cultura sem AAPH, A_S é a área da curva fluorescência x tempo do poço com células tratadas com a amostra e AAPH, A_{MCS} é a área da curva fluorescência x tempo do poço com células tratadas com meio de cultura e AAPH. As áreas foram calculadas pelo método dos trapezoides.

Em paralelo realizou-se um teste de viabilidade como descrito anteriormente para as amostras de hidrolisado, trolox 50µM e AAPH 250µM.

4.3.4 Morfologia

Os filmes foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as suspensões de CBNF com detector STEM em MEV TESCAN Scanning Electron Microscope, sob voltagem (aceleração) de 15kV (Laboratório de Microscopia – Embrapa agroindústria tropical – Fortaleza, CE, Brasil). A amostra seca foi montada em stubs e coberta com ouro. Para as suspensões as amostras foram diluídas para 1,25 g/L e montadas em grids de TEM (microscopia eletrônica de transmissão) e visualizadas com ácido fosfotúngstico 1% como corante negativo.

O diâmetro da nano-fibra foi medido no software Image J program (National Institute of Health-NIH) escolhendo-se no mínimo 196 regiões da imagem. Para a obtenção de uma média de dimensão de fibra, cada imagem foi dividida em 196 partes (14 x 14) e tomada uma medida de cada parte (Figura 12). Para as regiões onde não foi possível visualizar as fibras, a medida foi substituída por outra em região vizinha. Exemplo de medições sendo feitas no software Image J. Considera-se a medida exibida em "lenght" para o comprimento (Figura 13). Em cada região uma fibra (ou mais) foi escolhida aleatoriamente.

Figura 12 – Exemplo de imagem para a medição da dimensão de fibra a partir de micrografia.

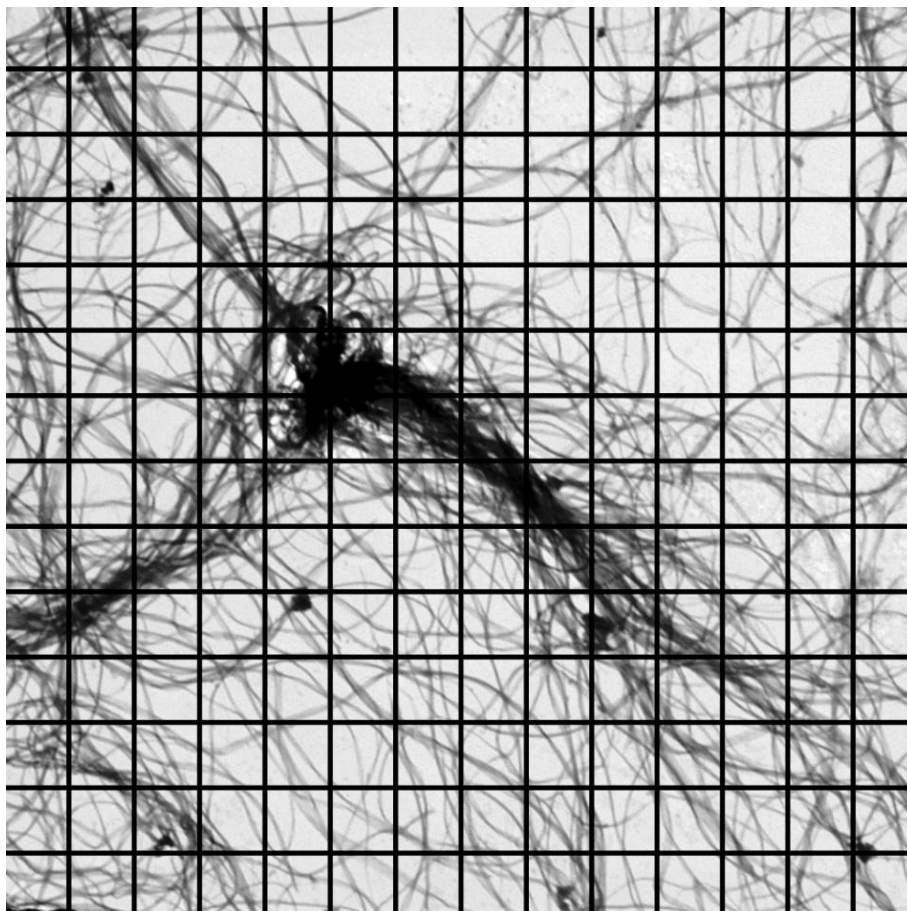
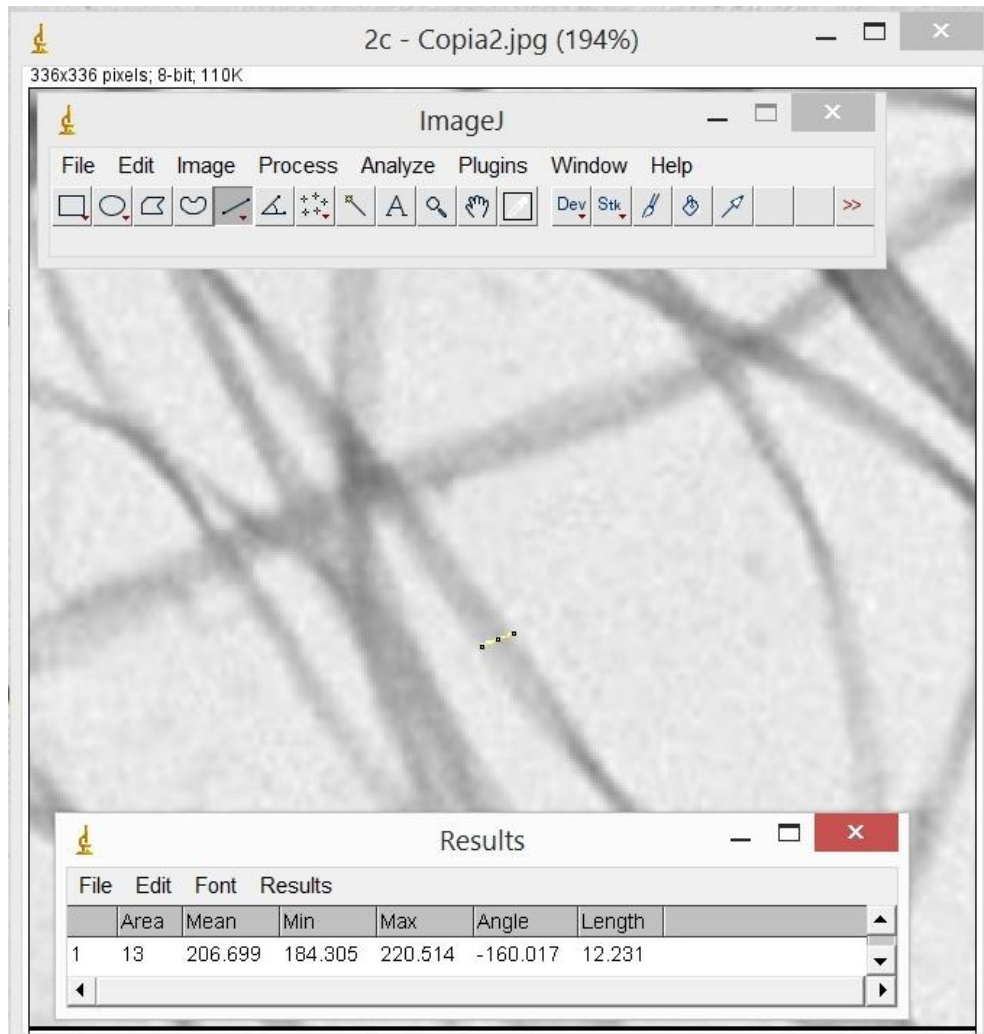


Figura 13 – Medidas sendo feitas em Image J Software



4.3.5 Análise térmica

A análise termogravimétrica (ATG) dos filmes e controles foi realizada em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TGA-50, conduzida no intervalo de 0 a 600 °C, na taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio a 40 mL/min e massa de amostra entre 9 e 11 mg. A estabilidade térmica dos filmes e controles foi avaliada pela análise dos valores de temperatura máxima de degradação (Pico de DTG - T_{max}), temperatura inicial de degradação (T_i) e temperatura final de degradação (T_f). As derivadas termogravimétricas foram tratadas por Smoothing (signal processing) com o software Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation).

4.3.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de resistência à tração (σ), alongação na ruptura (ε) e módulo elástico (ou módulo de Young) (E) foram determinadas de acordo com a norma ASTM D882-97 (ASTM, 1997). Os testes foram realizados em máquina universal de ensaios Emic DL-3000, com célula de carga de 100 N, separação inicial entre garras de 5 cm e velocidade de 10 mm/min. Utilizou-se corpos de prova em formato de gravata de 120 mm por 6,3 mm com gap inicial de 100 mm. As amostras foram mantidas em dessecador (50-55% com nitrato de magnésio) 48 horas antes dos testes. O módulo elástico foi calculado com os dados gráficos na região elástica de cada filme.

4.3.7 Difração de Raios-X

As análises de Difração de Raios-X foram conduzidas em difratômetro X'Pert³ Powder, PANalytical, Almelo, Netherlands com tubo de Cobre ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) a 45 kV e 40 mA. O intervalo angular (em 2θ) utilizado foi de 10 a 50° com uma velocidade de varredura de 0,5°/min. O índice de cristalinidade (I_C) foi calculado pelo método de Segal (SEGAL, 1959) seguindo a equação [16] descrita a seguir:

$$I_C (\%) = I_{002} / (I_{am} + I_{002}) \quad [16]$$

onde I_C (%) representa a fração cristalina em porcentagem, onde I_{002} é a intensidade máxima do pico de difração da parte cristalina do material, localizado no ângulo de $2\theta \sim 22,5^\circ$; I_{am} é a intensidade mínima do pico de difração da parte amorfa do material, localizado no ângulo de $2\theta \sim 18,0^\circ$. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Raios-X (LRX) da Universidade Federal do Ceará – UFC.

4.3.8 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente segundo método ASTM E96-05 (ASTM, 1989). Foram utilizadas células de permeação circulares com 49 mm de diâmetro e 13,2 mm de altura contendo 6 mL de água destilada. Os filmes em formato de disco foram selados no topo das células e dispostos em

dessecador vertical ARSEC DCV-040 com circulação de ar contendo sílica gel previamente seca em estufa (105°C por 24 horas). As células foram mantidas a 25 °C e 30% UR por 24 horas durante 8 pesagens (ocorridas em intervalos de 1 hora). O ganho de peso do filme foi plotado em função do tempo. As espessuras dos filmes foram determinadas utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo - Digimatic Micrometer - 0,001mm de resolução) com 8 medidas em diferentes locais do filme, utilizando-se a média para o cálculo da PVA.

4.3.9 Solubilidade

A solubilidade dos filmes foi determinada segundo Soni *et al.* (2016) com adaptações. Para tal, filmes de 2 x 2 cm foram secos em estufa (103 °C por 24 horas), pesados e imersos em água deionizada (50 mL) sob agitação (150 rpm) por 24 horas a 25 °C. A solução contendo o material resultante filtrada em papel de filtro (8 µm) o qual foi seco novamente em estufa nas mesmas condições descritas anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de massa.

4.3.10 Ângulo de contato

Os ângulos de contato foram medidos de acordo com a norma ASTM D-5725-99 (ASTM, 2008) para avaliar a hidrofobicidade dos filmes. Uma gota de água deionizada (3 µL) foi depositada sobre a superfície do filme seco com auxílio de uma seringa de 0,713 de diâmetro interno (Hamilton, Suíça) acoplada ao sistema de medida, a 25 °C (OCA 20, Dataphysics, Alemanha). As imagens foram capturadas logo após a formação da gota pela câmera CCD (resolução de 752 × 582 pixels) e processadas pelo software C20. O ângulo obtido na superfície do filme após depósito da gota de água foi calculado pelo software nos tempos 0, 30 e 120 segundos após o depósito da gota. Foram realizadas no mínimo 12 medidas (12 depósitos de gota) para cada amostra.

4.3.11 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho dos filmes foram obtidos no espectrômetro Cary 660 Agilent - Varian, equipado com um acessório de amostragem de reflexão total atenuada. O preparo das amostras (previamente secas a 50 °C em estufa) foi feito com KBr pulverizado. A

análise foi conduzida sob as seguintes condições: resolução de 4 cm^{-1} , faixa de absorção de $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ e 25 varreduras.

4.3.12 Cor e Transparência

A cor dos filmes foi medida em colorímetro Hunter Lab System, by a Chroma Meter CR-300 - Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan com resultados expressos nos parâmetros L^* , a^* e b^* .

A transparência dos filmes foi determinada de acordo com método proposto por Podshivalov *et al.* (2017), utilizando módulo sólido em espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50. Para tal cada filme foi submetido a leitura em 550 nm e a transparência foi determinada conforme a equação [17] onde T é a Transparência, A_{550} é a absorbância lida em 550 nm, e e a espessura do filme em mm.

$$T(n/a) = 1 / (A_{550} / e) \quad [17]$$

4.4 Análise estatística

Os dados foram comparados entre si por teste de variância (ANOVA) utilizando o software Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation). Utilizou-se o teste de tukey para avaliar a diferença significativa entre os tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do hidrolisado de gelatina de Pele de tilápia (HA)

5.1.1 Teor proteico e atividade antioxidante

A concentração máxima de proteína e a concentração de hidrolisado necessária para a redução da absorbância em 50% no teste de DPPH foram determinadas no hidrolisado bruto e nas frações de hidrolisados <10 kDa e <3 kDa (Tabela 5).

Tabela 5 – Teor proteico e atividade antioxidante do hidrolisado bruto e frações.

Hidrolisado	Teor Proteico (g/L)	Proporção em massa de proteína em relação ao hidrolisado bruto (% m/m)	EC ₅₀ (g/L)
Bruto	93,06 ± 0,02	100,00	38,66
<10 kDa	63,87 ± 0,02	68,63	25,07
<3 kDa	43,29 ± 0,02	46,52	32,97

EC₅₀: Concentração de hidrolisado necessária para a redução da absorbância em 50% no teste de DPPH

Aproximadamente 68% da massa proteica presente no hidrolisado bruto faz referência a moléculas menores que 10 kDa. Um menor EC₅₀ foi observado para a fração <10 kDa, indicando que esta fração possui maior capacidade antioxidante frente ao hidrolisado bruto e à fração <3 kDa. Logo, pode-se sugerir que os peptídeos de HA de maior atividade antioxidante possuem tamanho entre 3 e 10 kDa.

Com o aumento da concentração de proteína no hidrolisado observa-se um aumento na atividade antioxidante absoluta (Figuras 14a, 15a e 16a). Por outro lado, observa-se uma redução na atividade relativa (atividade por concentração de proteína) sugerindo que o aumento da concentração reduz a eficiência antioxidante (Figuras 14b, 15b e 16b). Tal fenômeno de perda de atividade pode estar relacionado com aglomerações moleculares entre os peptídeos bioativos e peptídeos ou outras moléculas sem atividade, fato que ocorre em altas concentrações para hidrolisados não puros.

Comparando a Aox na concentração máxima da fração <3 kDa (43,29 g/L) com as demais, a fração <10 kDa tem maior Aox (32,74 mM de Trolox) que a fração < 3 kDa (29,55 mM de Trolox) e o hidrolisado bruto (27,07 mM de Trolox) (Figura 17). As maiores Aox nesta fração complementam os dados de EC₅₀ e corroboram com dados da literatura que

sugerem que peptídeos de massa molecular abaixo de 5 kDa são os mais responsáveis por uma maior contribuição no efeito antioxidante em hidrolisados proteicos (HOWELL *et al.*, 2010).

Figura 14 - Atividade antioxidante do hidrolisado bruto em função da concentração de proteína: (a) Atividade absoluta, (b) Atividade relativa.

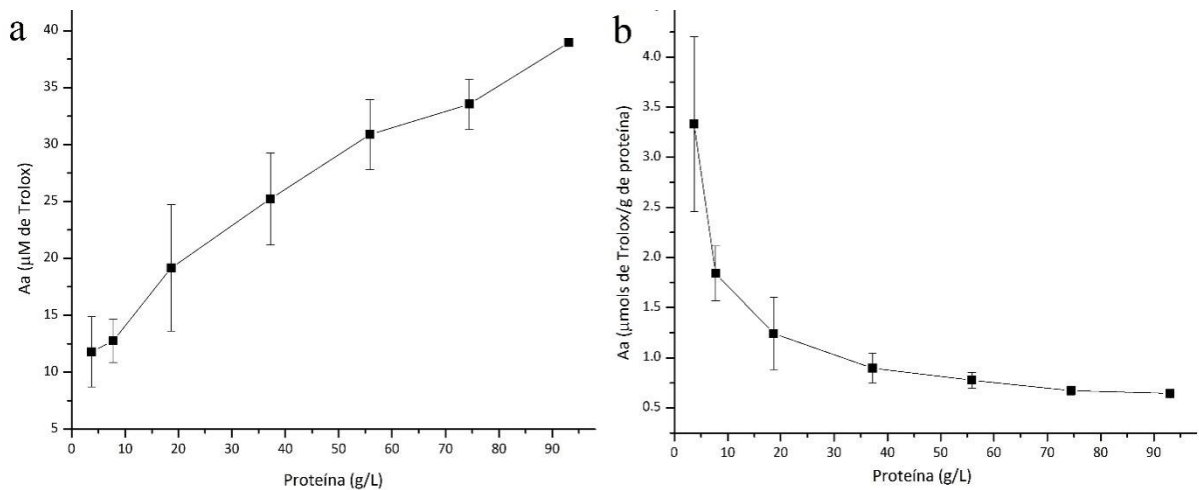


Figura 15 - Atividade antioxidante da fração < 10 kDa em função da concentração de proteína: (a) Atividade absoluta, (b) Atividade relativa.

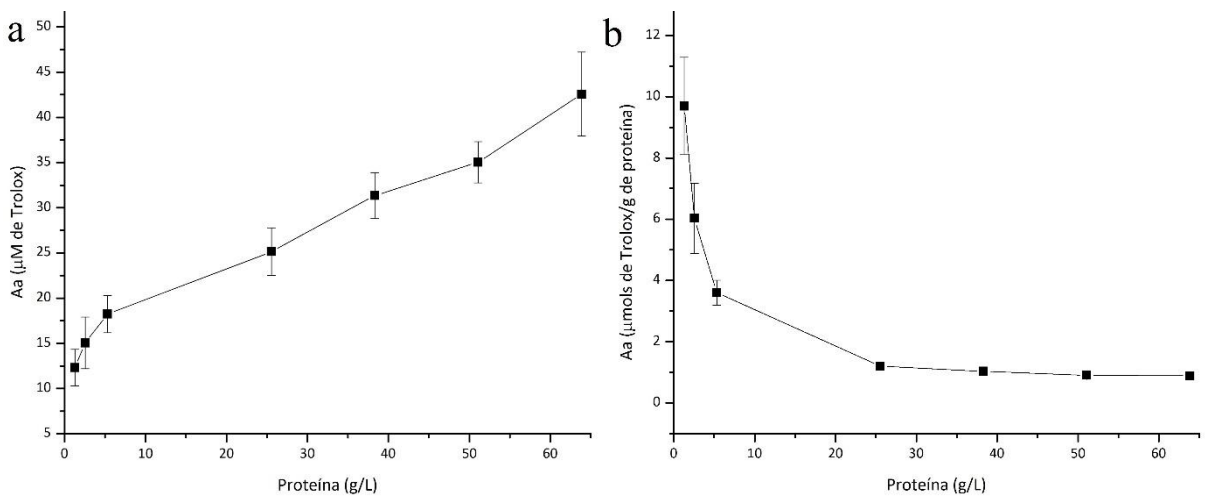


Figura 16 - Atividade antioxidante da fração < 3 kDa em função da concentração de proteína: (a) Atividade absoluta, (b) Atividade relativa.

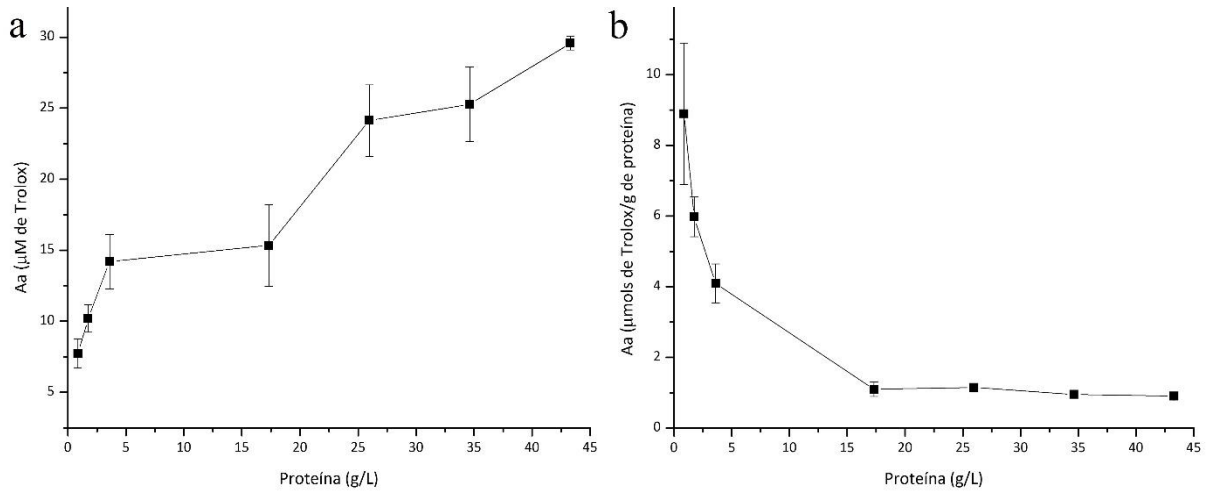
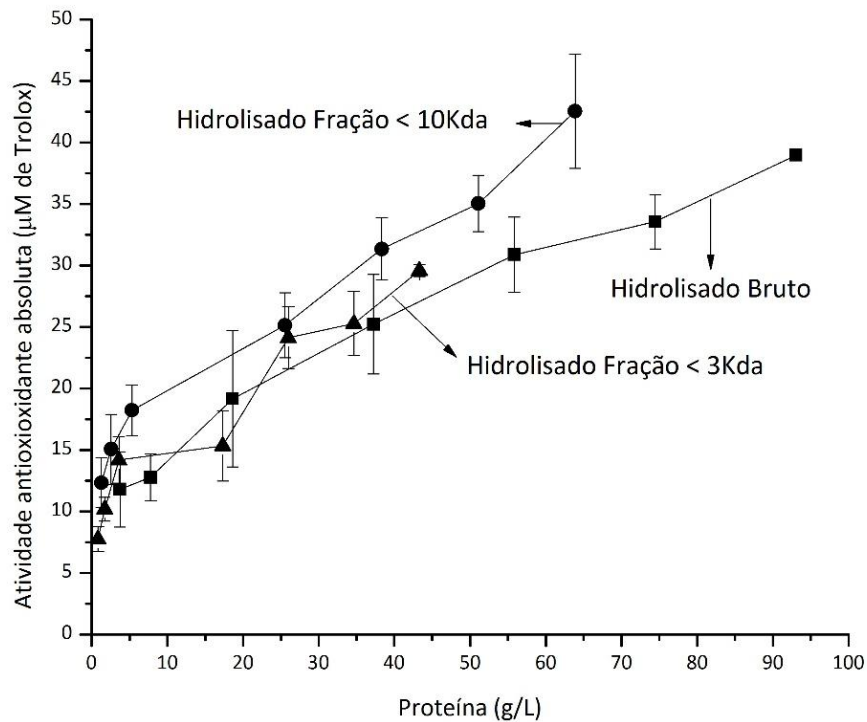


Figura 17 - Atividade absoluta do hidrolisado e as duas frações

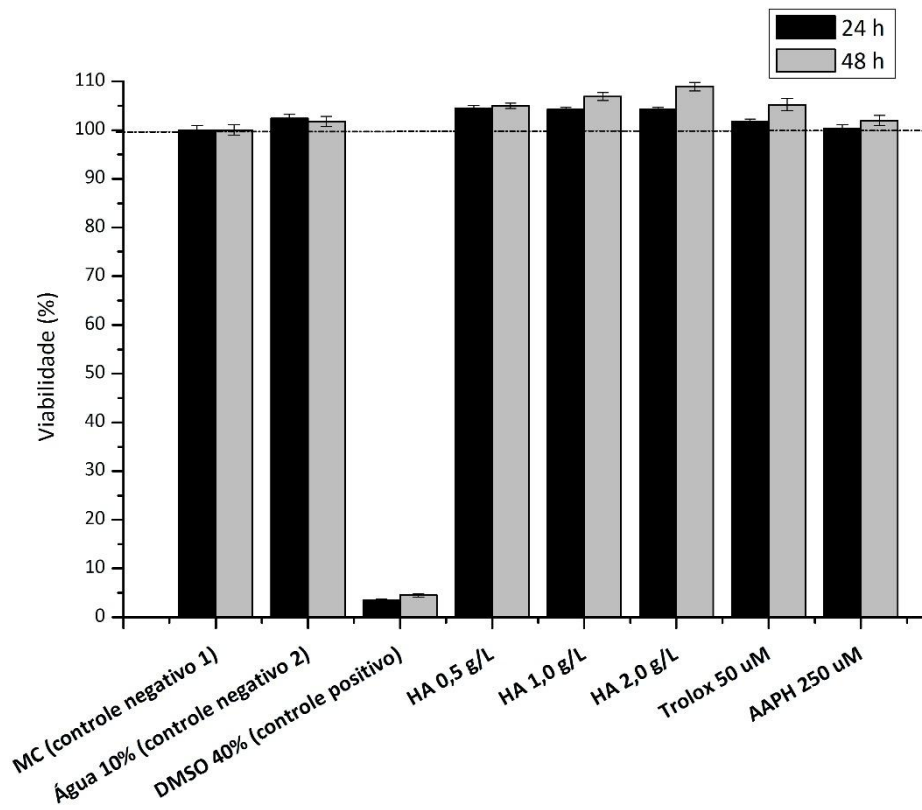


5.1.2 Citotoxicidade e atividade antioxidante intracelular do hidrolisado

Todas as amostras de hidrolisado testadas (0,5, 1 e 2 g/L) não afetaram o desenvolvimento das células CACO-2, sendo consideradas não tóxicas uma vez que exibiram viabilidade celular acima de 80% nos dois tempos estudados (24 e 48 horas), destacando-se o

fato de todas as viabilidades estarem acima de 100% (Figura 18). Neste tipo de teste uma amostra é considerada não tóxica quando apresenta viabilidade acima de 80%. O controle positivo de toxicidade apresentou valores em torno de 3% confirmando a morte das células na presença de um agente tóxico conhecido, dimetilsulfóxido (DMSO) 40% (v/v). Tal resultado indica que os resultados do teste de atividade antioxidante intracelular não foram influenciados por interferência do desenvolvimento celular anormal. A substância padrão Trolox e o AAPH (indutor de ROS - espécies reativas de oxigênio) não induziram toxicidade.

Figura 18 - Viabilidade celular das amostras do teste de potencial protetivo



Como o hidrolisado bruto não apresentou toxicidade e apresentou capacidade de sequestrar o radical livre \bullet DPPH, buscou-se avaliar se o mesmo apresentaria atividade antioxidante intracelular. O teste de atividade antioxidante intracelular fornece valores que indicam o nível de presença de ROS intracelular e informam sobre o nível de efeito protetivo a stress oxidativo que cada substância testada pode conferir nas células vivas em desenvolvimento normal.

Após duas horas de contato, observa-se que o hidrolisado apresentou atividade apenas nas células estressadas (AoxI₅) nas concentrações de 1 g/L e 2 g/L (Tabela 6). Quando em

contato por 18 horas observa-se atividade em todas as concentrações no ensaio com células não estressadas (AoxI), e apenas na maior concentração (2 g/L) para as células estressadas. Quanto ao controle positivo, foi observada atividade no tratamento com o trolox exceto em 18 horas de contato nas células estressadas, onde houve maior geração de ROS no sistema ($2,27 \cdot 10^6$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade antioxidante intracelular: (AoxI_s) Atividade em células estressadas, (AoxI) Atividade em células não estressadas

Tempo de contato (horas)		Atividade antioxidante				ROS (A _{fxi} ·10 ⁶)
		HA 0,5 g/L	HA 1 g/L	HA 2 g/L	Trolox 50 µM	MC
2	AoxI _s	0	59,77 ± 6,31	15,69 ± 1,9	25,53 ± 4,83	1,22
	AoxI	0	0	0	16,01 ± 5,09	0,53
18	AoxI _s	0	0	49,17 ± 5,19	0	2,27
	AoxI	25,49 ± 3,35	24,65 ± 4,68	19,39 ± 12,79	34,04 ± 1,09	1,62

A_{fxi} : Intensidade de formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) intracelular. Corresponde a área do gráfico "intensidade de fluorescência" (eixo y) x "tempo" (eixo x).

O hidrolisado apresenta capacidade de redução de formação de ROS intracelular com intensidade que varia dependendo da concentração e tempo de contato com as células. Na condição onde há menor formação de ROS (2 horas de contato com células não estressadas, AoxI) não houve atividade, exceto para o tratamento com o controle (Trolox 50µM).

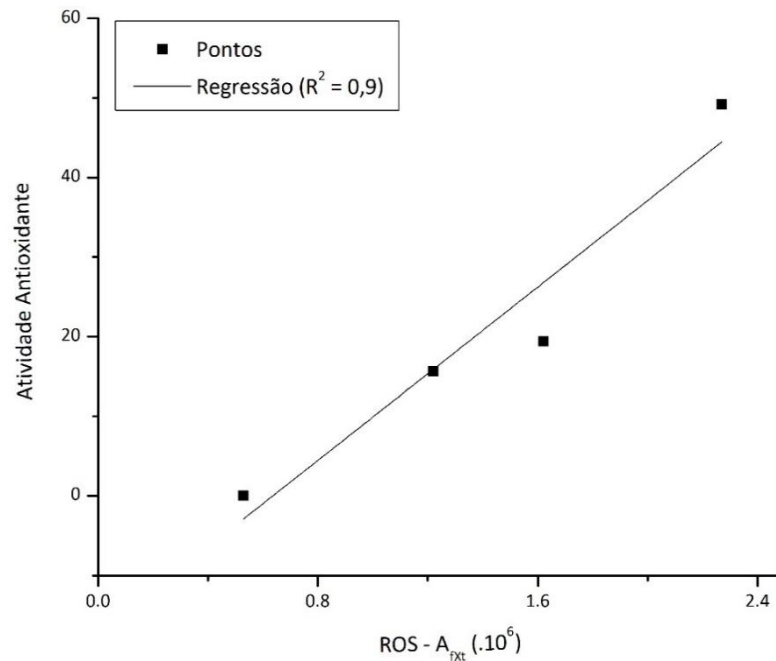
Nos tratamentos com o Trolox a Aox cresce com o aumento da concentração de ROS até o limite de 2,27 onde não se observa atividade. Neste caso a concentração de Trolox no sistema foi insuficiente para a captura de qualquer quantidade de ROS.

Na menor concentração de HA (0,5 g/L) houve atividade apenas no tratamento por 18 horas nas células não estressadas (AoxI). Na concentração de 1 g/L houve atividade nos sistemas com concentrações intermediárias de ROS (A_{fxi} ~1,2·10⁶ a ~1,6·10⁶). Na maior concentração de HA (2 g/L) a atividade aumentou com o aumento da quantidade de ROS gerada, com dados correlacionados linearmente por regressão ($R^2 = 0,9$) (Figura 19). Provavelmente há uma faixa limite tanto de concentração de hidrolisado como de ROS para que possa ser observado um efeito antioxidante.

Yarnpakdee *et al.* (2014) verificaram que o hidrolisado enzimático de gelatina de tilápia e frações promoveram uma redução na geração de ROS induzida por H₂O₂ e AAPH.

Nenhuma diferença significativa na viabilidade celular foi observada com a variação da concentração do hidrolisado nesse ensaio.

Figura 19: Relação linear entre quantidade de ROS e atividade antioxidante em ensaio utilizando células CACO-2.



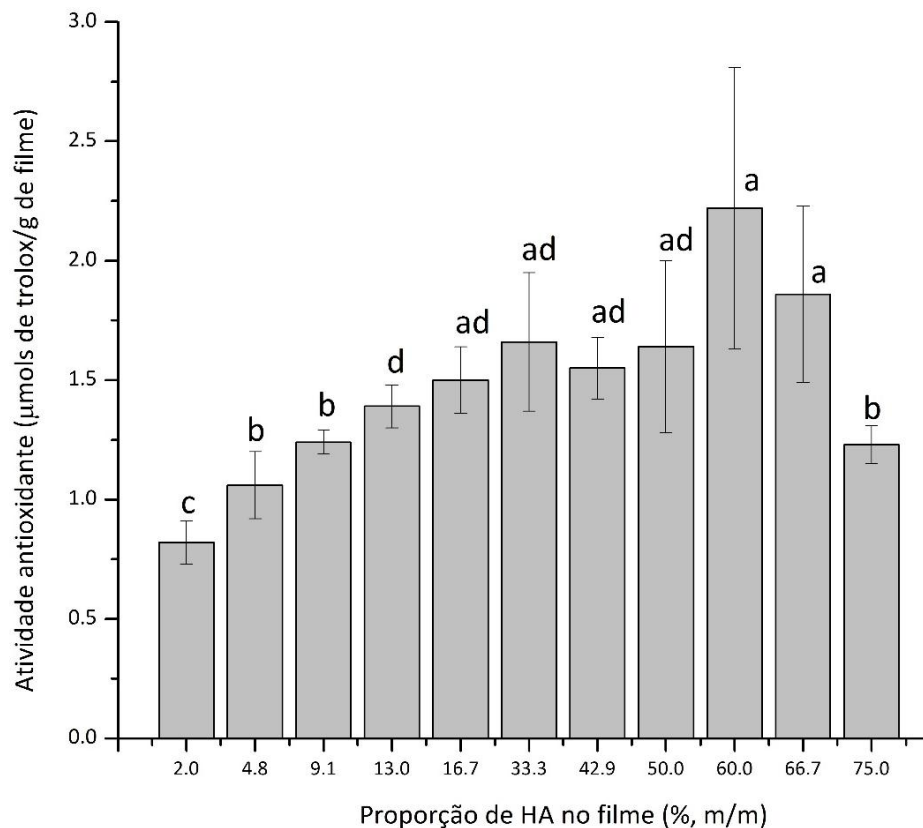
5.2 Filmes de CBNF e HA obtidos por casting

5.2.1 Efeito da quantidade de hidrolisado sobre a Atividade antioxidante (Aox)

Todas as formulações contendo as diferentes quantidades de HA na faixa estudada (2 a 75%) apresentaram atividade antioxidante (Figura 20).

A atividade aumentou com o incremento da quantidade de HA de 2 a 60% e decresceu nos filmes com 66,7 e 75% de HA. Apesar disso, a atividade relativa por mg de proteína (Figura 21) decresce com o aumento da quantidade de HA nos filmes, o mesmo fenômeno observado com o aumento da concentração de proteínas sobre a Aox do HA (item 5.1.1).

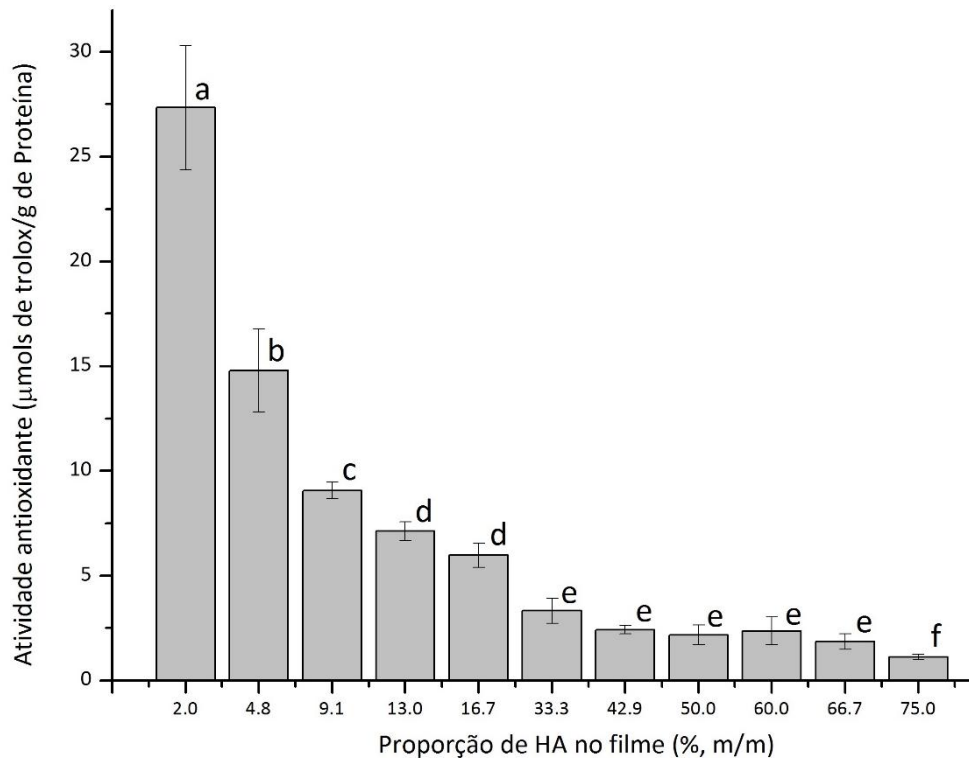
Figura 20 - Efeito da quantidade de hidrolisado sobre a atividade antioxidante dos filmes de CBNF-HS e HA



Valores com pelo menos uma letra em comum, não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$)

Supõe-se que tal fenômeno de perda de atividade relaciona-se à alta concentração de proteínas no HA que contribui para promover aglomerações do tipo peptídeo/peptídeo, peptídeo/celulose, peptídeo/polipeptídeo, peptídeo/gelatina pouco hidrolisada e peptídeo/gelatina. Assim, os peptídeos de menor massa molecular, mais importantes na contribuição do efeito antioxidante, estariam impedidos de capturar os radicais de forma eficiente já que, além de se difundirem no meio, teriam de ainda se liberar do aglomerado formado. Tal efeito é observado quando se compara o filme com 2 e 33% (m/m) de HA que apresenta uma quantidade ~16 vezes superior de HA enquanto que a atividade é apenas ~2 vezes maior. A quantidade de gelatina não hidrolisada nos filmes com maior proporção de HA afeta a velocidade com que os peptídeos são liberados em meio aquoso. O HA usado nesse estudo contém 23% m/m de gelatina não hidrolisada e diferentes proporções em massa de peptídeos de diferente massa molecular (item 5.1.1).

Figura 21 - Efeito da quantidade de hidrolisado sobre a atividade antioxidante dos filmes de CBNF-HS e HA: Atividade relativa à quantidade de proteína



Valores com pelo menos uma letra em comum, não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$)

Tal atividade é melhorada em todos os filmes exceto no filme com maior concentração de HA (75% m/m) quando se compara com os HA em solução na concentração de 10 g/L que apresenta Aox de 1,67 μmols de trolox/g de proteína. Tal fato confirma o efeito das aglomerações moleculares mencionadas anteriormente sobre a Aox e evidencia o efeito da celulose nanofibrilada como uma matriz auxiliadora na separação desses aglomerados.

Os filmes com quantidade de HA abaixo de 16,7% (m/m), tem atividade relativa por quantidade de proteína maior quando comparados com o hidrolisado bruto (Figura 21 e Figura 14). Tabata e Ikada (1998) mencionam que alguns estudos associam proteína com matrizes poliméricas a fim de aumentarem sua atividade biológica.

5.2.2 Efeito do tipo e quantidade de plastificante e tipo de CBNF sobre a atividade antioxidante

Todos os filmes não plastificados apresentaram aspecto quebradiço (exemplo em Figura 22a,b). Visando melhorar a flexibilidade e ductilidade dos filmes, a adição de dois

tipos de plastificantes (sorbitol ou glicerol) foram estudadas. Plastificantes são usualmente adicionados em filmes poliméricos uma vez que auxiliam na melhoria da plasticidade (CAO *et al.*, 2009). Na Figura 22 apresenta-se o aspecto visual de alguns exemplos de filmes não plastificados e plastificados. Inicialmente avaliou-se o efeito do tipo e quantidade de plastificante sobre a Aox do filme com 50% de HA e 50% de CBNF obtido na etapa anterior (item 5.2.1).

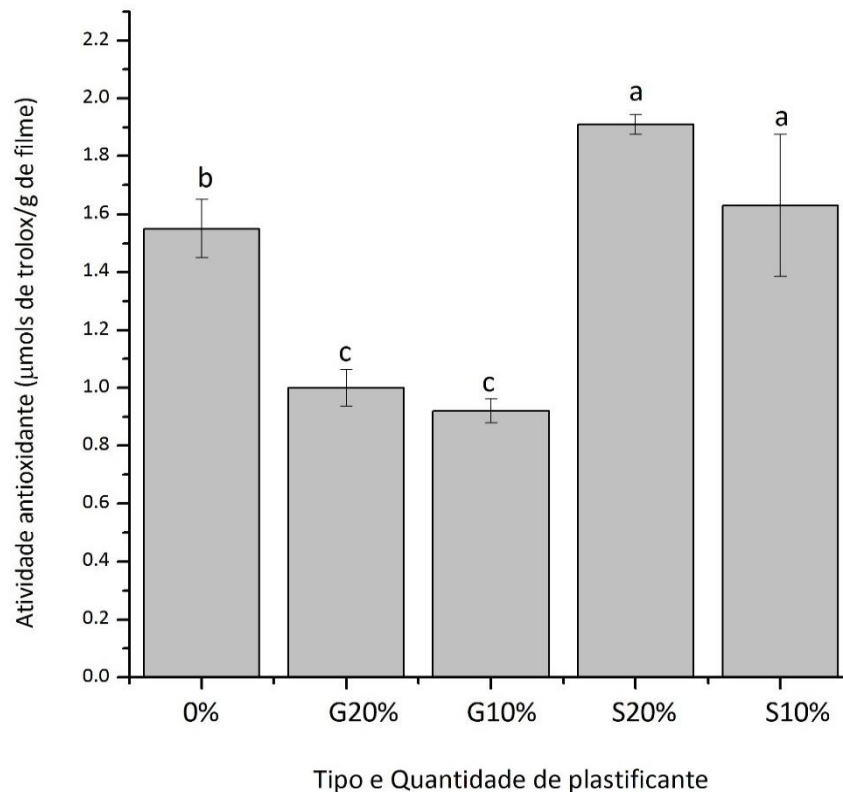
A adição de sorbitol nas duas concentrações estudadas (10 e 20%) não afetaram a Aox dos filmes enquanto que a adição de glicerol nas mesmas concentrações reduziu a Aox em 35% e 40% respectivamente (Figura 23). Ganiari *et al.* (2017) mencionam que a quantidade de plastificante pode afetar a atividade antioxidante do filme uma vez que a velocidade de liberação do composto pode ser afetada por diferenças na mobilidade das cadeias poliméricas.

Uma fotografia do filme de maior atividade, a saber HS₄₀HA₄₀S₂₀, é apresentada na Figura 22c. Os filmes com 10% de plastificantes ainda se mantiveram inadequados para o manuseio embora melhores que os filmes não plastificados.

Figura 22 – Fotografias: (a) Filme de CBNF-HS não plastificado, (b) Filme de CBNF-HS e HA não plastificado, (c) Filme de CBNF-HS e HA plastificado com sorbitol (HS₄₀HA₄₀S₂₀)



Figura 23 - Atividade antioxidante dos filmes de CBNF-HS e HA em função do tipo e quantidade de plastificante.



S20% (Filme com 20% (m/m) de Sorbitol), *S10%* (Filme com 10% (m/m) de Sorbitol), *G20%* (Filme com 20% (m/m) de Glicerol) e *G10%* (Filme com 20% (m/m) de Glicerol)
 Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$).

Plastificantes de baixa massa molecular como sorbitol e glicerol tem alta afinidade com a celulose (WELLISCH *et al.*, 1960) e capacidade de se inserirem facilmente entre suas cadeias. Tais plastificantes interagem por ligações de hidrogênio com a celulose de forma diferenciada. Comparando os dois tipos acredita-se que o sorbitol reduz possíveis interações moleculares envolvendo peptídeos (peptídeo/celulose ou peptídeo/proteína) aumentando a mobilidade dos peptídeos menores na estrutura, contribuindo assim para uma maior atividade antioxidante. Tais peptídeos de menor massa molecular provavelmente ficam livres mais facilmente sendo liberados em meio aquoso de forma mais efetiva. Thomazine *et al.* (2006), por exemplo, mencionam que plastificantes podem reduzir a interação proteína-proteína.

O filme contendo 20% de sorbitol e hidrolisado foi formulado utilizando CBNF de meio alternativo (CBNF-CM) e avaliado quanto a atividade antioxidante inicialmente. O filme composto por CBNF de meio alternativo suco de caju (CM₄₀HA₄₀S₂₀), apresentou Aox de $2,02 \pm 0,06$ µmols de trolox/ g de filme ($7,29 \pm 0,46$ µmols de trolox/g de proteína) não

diferindo significativamente da Aox do filme composto com CBNF-HS (de meio sintético) de Aox igual a $1,91 \pm 0,24$ μmols de trolox/ g de filme ($7,80 \pm 1,6$ μmols de trolox/ g de proteína). Dessa forma pode-se afirmar que a substituição do tipo de celulose bacteriana nanofibrilada não influenciou a Aox dos filmes nesta formulação.

Paralelamente ao desenvolvimento desses filmes, estudou-se de forma preliminar a incorporação do hidrolisado em membranas de CB e CB carboximetilada por adsorção, porém sem melhoras expressivas na atividade antioxidante do derivado quando comparado com os filmes de CBNF desenvolvidos aqui (APÊNDICE B). Estudou-se também a incorporação de nisina, um agente antimicrobiano natural, na formulação dos filmes de CBNF (APÊNDICE C).

5.3 Caracterização dos filmes de celulose bacteriana nanofibrilada, hidrolisado e celulosas bacteriana controle

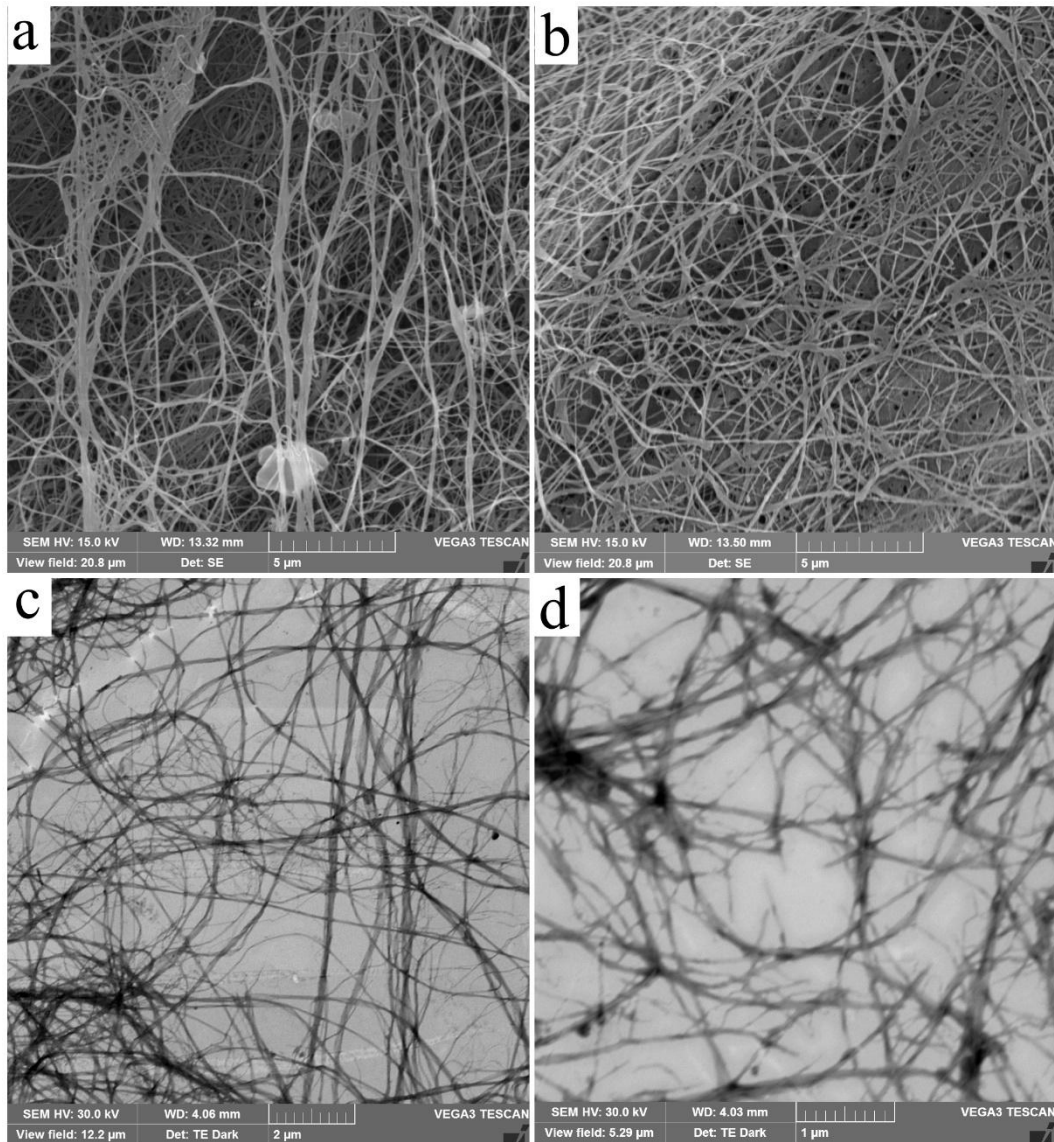
5.3.1 Morfologia das celulosas

As micrografias das membranas liofilizadas de CB-HS e CB-CM e das suspensões de CBNF-HS e CBNF-CM são apresentadas na Figura 24.

Nas duas suspensões (Figura 24c,d) as fibras estão menos aglomeradas quando comparadas com as fibras do material não tratado (celulosas liofilizadas - CB-HS e CB-CM) evidenciando a quebra ou separação das estruturas promovida pela combinação do tratamento oxidativo/mecânico (Figuras 24c,d).

A dimensão da nanofibra no filme de CB-HS e CB-CM variou de 48 nm a 286 nm e de 53 nm a 267 respectivamente, com maior número de fibras medindo $77 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ e $80 \text{ nm} \pm 9$. Tais valores estão em concordância com a literatura para a CB nativa (CHAWLA *et al.*, 2009). Durante a síntese de CB, fibras de CB de ~ 4 nm de espessura se aglomeram entre si formando várias fitas que medem de 40 a 70 nm que por sua vez geram estruturas fibrosas mais largas (IFUKU *et al.*, 2009). Após o tratamento oxidativo/mecânico houve uma redução na largura dessas fibras em mais de 50%, variando de 16 nm a 114 nm e de 18 nm a 115 nm, com maior número de fibras medindo $33 \text{ nm} \pm 9 \text{ nm}$ e $34 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ nas suspensões de CBNF-HS e CBNF-CM respectivamente.

Figura 24 - Micrografias das celulosas (controles): (a) MEV da CB-HS liofilizada, (b) MEV da CB-CM liofilizada, (c) MET da Suspensão de CBNF-HS, (d) MET da Suspensão de CBNF-CM

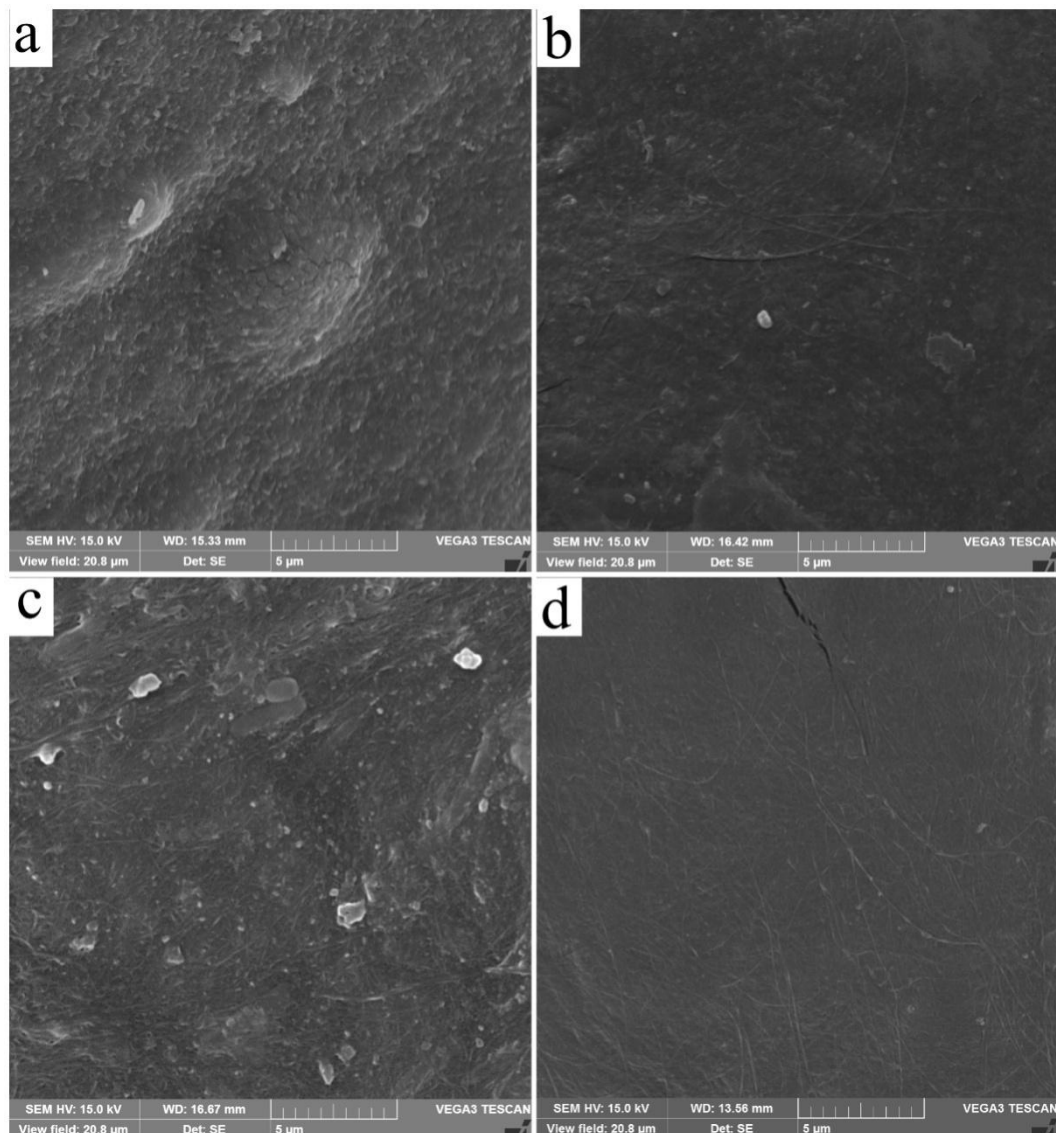


A redução das nanofibras após o tratamento mecânico relaciona-se com melhorias nas propriedades mecânicas do material produzido (LAVOINE *et al.*, 2012). Além disso, a desconstrução mecânica apresenta a vantagem de gerar um material fluido de maior versatilidade para aplicações em alimentos do que a membrana de CB.

5.3.2 Morfologia dos filmes de CBNF

Na Figura 25 são apresentadas as micrografias do filme controle unicamente composto por CBNF-HS, filme plastificado com sorbitol (HS₆₇S₃₃), filme com sorbitol e hidrolisado (HS₄₀HA₄₀S₂₀) e filme com hidrolisado e CBNF de meio alternativo (CM₄₀HA₄₀S₂₀).

Figura 25 - Micrografias (MEVs) dos filmes de CBNF: (a) CBNF-HS, (b) HS₆₇S₃₃, (c) HS₄₀HA₄₀S₂₀, (d) CM₄₀HA₄₀S₂₀



Todos os filmes apresentaram aspecto denso e estrutura compacta de modo que não foi possível a visualização nítida das nanofibras de celulose. A secagem a 50 °C promoveu a compactação da estrutura, conduzindo a formação de um filme menos poroso quando

comparado com as celuloses nanofibriladas (Figura 24a,b) em virtude da sobreposição das fibras durante a evaporação da água contida na suspensão.

A estrutura do filme HS₄₀HA₄₀S₂₀ aparenta ser menos homogênea quando comparadas com as demais apresentando aglomerados provavelmente relacionados com as estruturas proteicas (Figura 25c). Entretanto o filme de celulose obtida em meio alternativo CM₄₀HA₄₀S₂₀, composto pela mesma quantidade de proteína do HA apresenta aspecto mais homogêneo quando comparado com os demais (Figura 25d).

5.3.3 Análise térmica (ATG)

Os perfis termogravimétricos dos diferentes filmes estudados são apresentados nas Figuras 26 e 27. E as derivadas termogravimétricas são apresentadas nas Figuras 28 e 29. Na Tabela 7 são apresentadas as temperaturas iniciais (T_i), máximas (T_{max} - pico de DTG) e finais (T_f) de degradação.

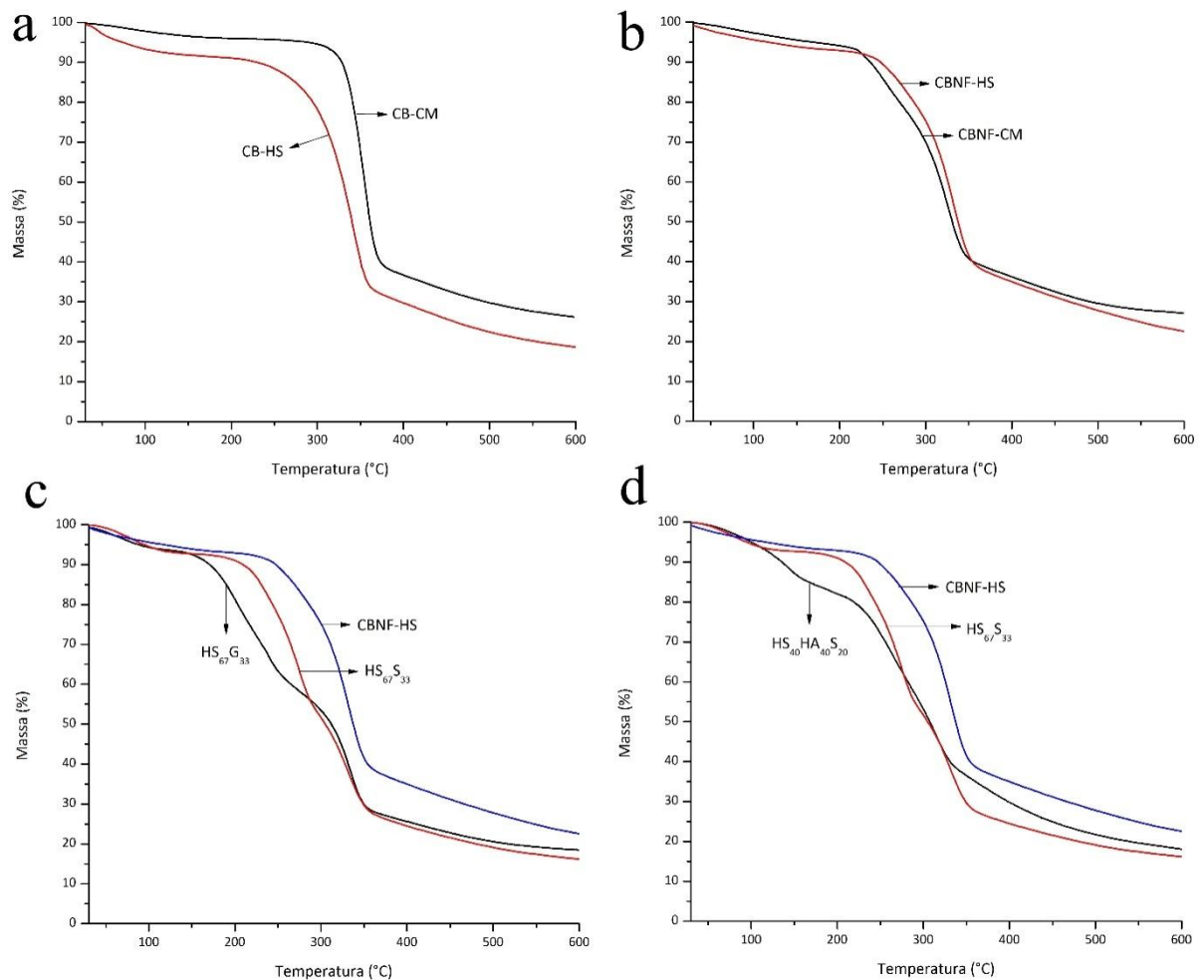
Tabela 7 - Perda de massa, picos de DTG e teor de cinzas dos filmes e controles

Material	Quantidade de Celulose (%)	Perda de massa de celulose			T _{max} - Pico de DTG (°C)	Cinzas (%)	
		T _i (°C)	T _f (°C)	Perda de massa de T _i a T _f (%)			
Compostos Controle	CB-HS	100	287	374	50,33	342	18,61
	CB-CM	100	326	388	53,2	355	26,12
	CBNF-HS	100	251	369	51,41	333	22,55
	CBNF-CM	100	245	363	52	326	27,03
	Sorbitol	0	234	386	96,95	303/365	0
	Glicerol	0	87-200*	310*	-	-	~15*
Hidrolisado (HA)	0	129	415	61,18	147/312	26,82	
Filmes apenas com plastificante	HS₆₇S₃₃	~67	221	366	60,81	330/274/231	16,07
	HS₆₇G₃₃	~67	172	363	61,77	333/239/201	18,45
	CM₆₇S₃₃	~67	185	365	64,85	274/332	16,07
Filmes antioxidantes	HS₄₀HA₄₀S₂₀	40	206	340	43,55	314/255/145	17,98
	CM₄₀HA₄₀S₂₀	40	256	378	54,12	347/287	21,55

*faixa de valores obtida após análise dos seguintes trabalhos: Ciriminna *et al.*, 2014; Yunos *et al.*, 2011; Cerqueira *et al.*, 2012 e Chagas (2006).

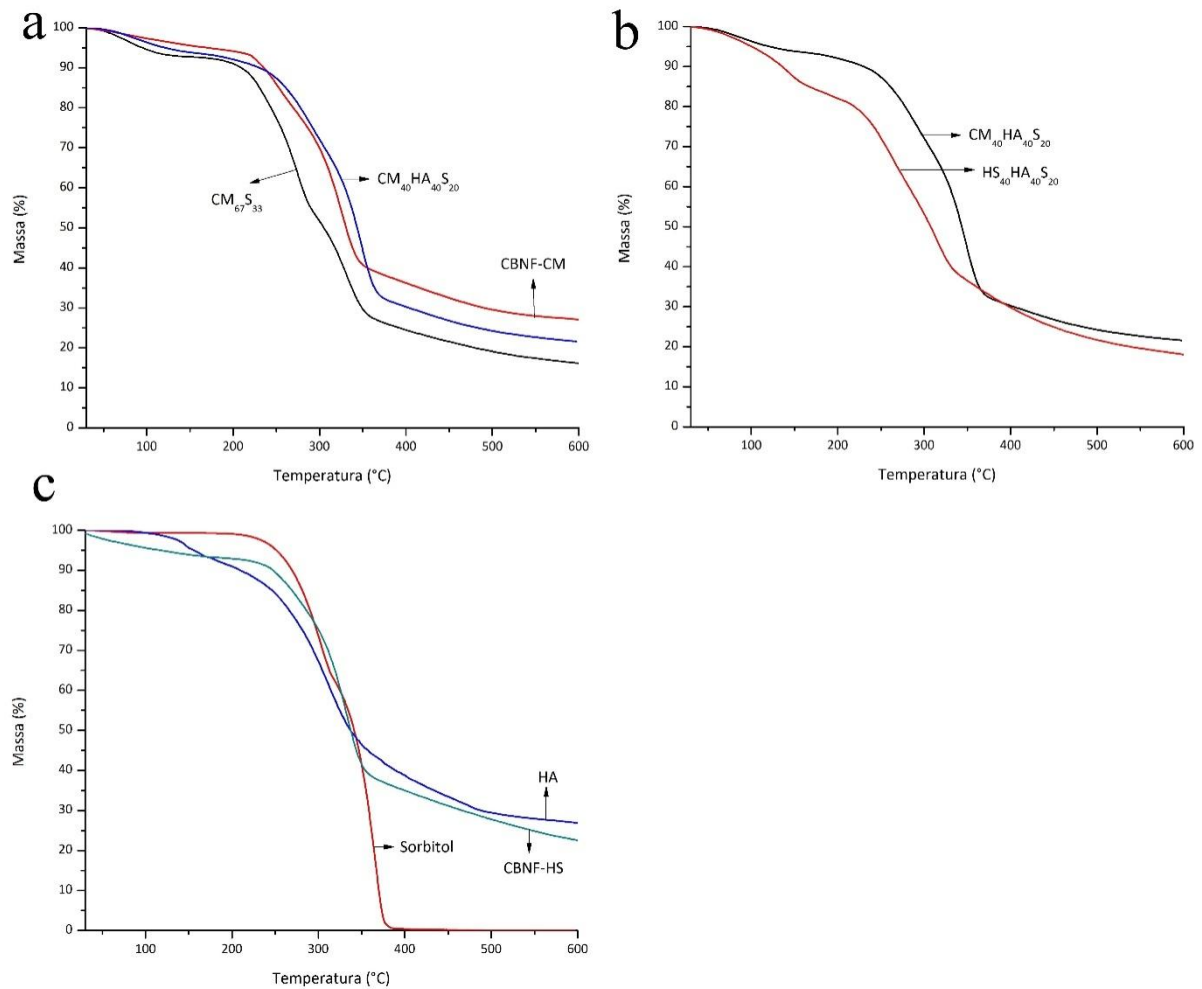
O perfil termogravimétrico dos filmes de CB-HS, CB-CM, CBNF-HS e CBNF-CM exibem similaridades entre si e características típicas de perfis de CB relatados na literatura (CAMPANO *et al.*, 2016). As temperaturas T_i , T_{max} e T_f dos filmes CBNF-HS e CBNF-CM são inferiores quando comparadas com as celuloses controle não oxidadas CB-HS e CB-CM, respectivamente. Tal perda de estabilidade foi observada em trabalhos e relaciona-se com o tratamento de oxidação mediada a TEMPO (FUKUZUMI *et al.*, 2009; FUKUZUMI *et al.*, 2010).

Figura 26 - Perfis de degradação térmica: Celuloses não tratadas, (b) Celuloses nanofibriladas, (c) Efeito da adição dos plastificantes sorbitol e glicerol em CBNF-HS (d) Efeito da adição de sorbitol e hidrolisado em CBNF-HS



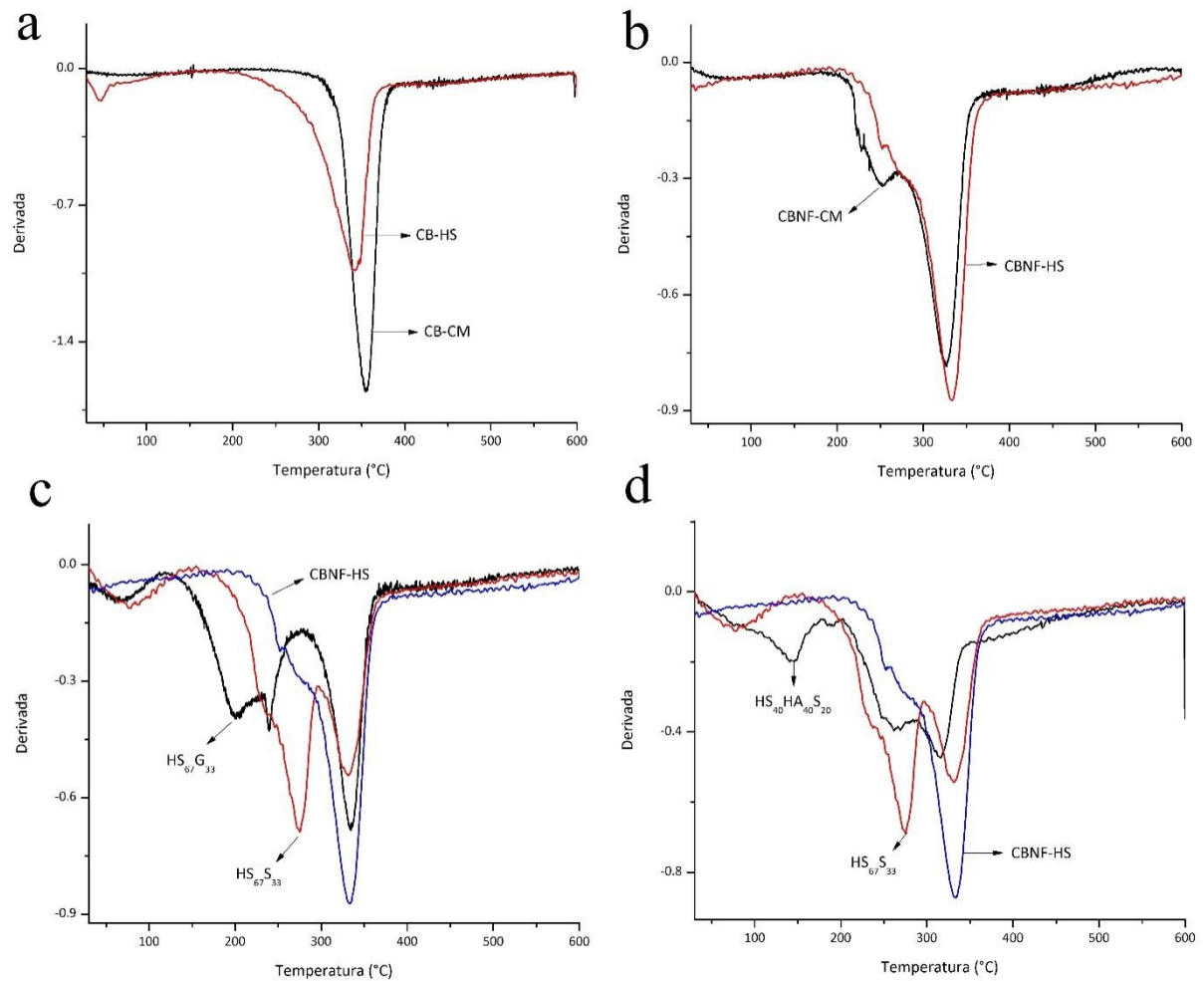
Comparando as celuloses não tratadas observa-se que a CB-CM se destaca como sendo um material termicamente mais estável (Figura 26a e 28a), entretanto isso não influenciou a estabilidade da suspensão de nanofibras obtidas com esse material (Figura 26b e 28b).

Figura 27 - Perfis de degradação térmica: (a) Efeito da adição do sorbitol e hidrolisado em CBNF-CM, (b) Efeito do tipo de CBNF no filme antioxidante com 20% de sorbitol, (c) Componentes do filme HS₄₀HA₄₀S₂₀ separadamente



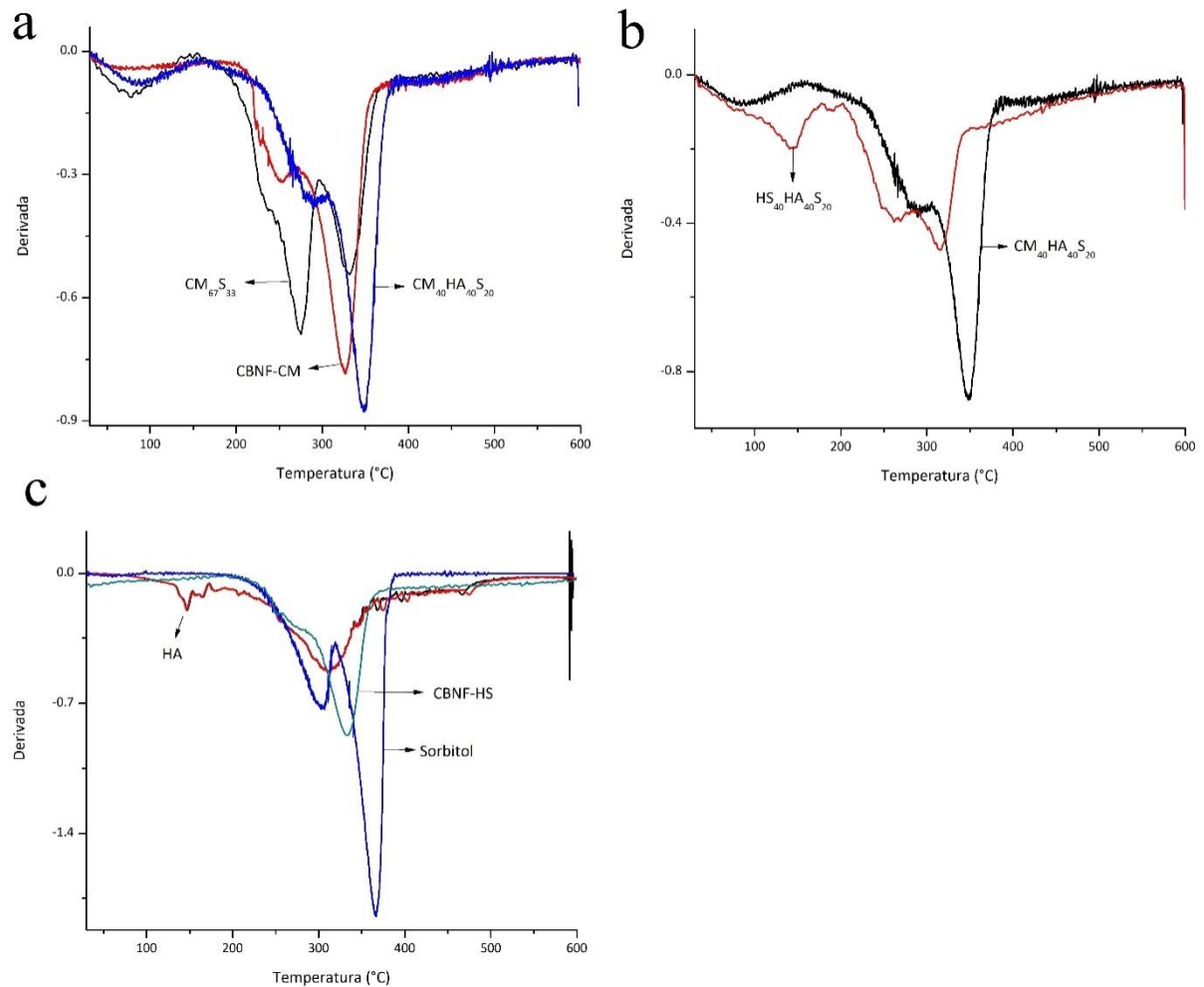
O teor de cinzas dos dois tipos de CBNF são maiores quando comparados com as celuloses não tratadas, evidenciado a inserção de carboxilato de sódio na estrutura da celulose durante a reação de oxidação mediada a TEMPO. Embora as duas amostras de celulose tenham sido tratadas em condições reacionais semelhantes, possíveis diferenças na estrutura original do material podem ter conduzido a uma mudança nas características finais da suspensão. De fato, o filme de CBNF-CM é um pouco menos estável que o filme de CBNF-HS uma vez que a T_i reduz de 234 °C para 230 °C e o pico de DTG de 333 °C a 326 °C. Além disso, a CBNF-CM contém uma quantidade maior de cinzas que pode estar relacionada a um maior grau de oxidação deste material.

Figura 28 - Derivadas termogravimétricas: (a) Celuloses não tratadas, (b) Celuloses nanofibriladas, (c) Efeito da adição dos plastificantes sorbitol e glicerol em CBNF-HS (d) Efeito da adição de sorbitol e hidrolisado em CBNF-HS



Após a adição do hidrolisado (HA) no filme HS₆₇S₃₃ há uma redução na estabilidade térmica quando comparado com os controles (CBNF-HS e sorbitol) (Figura 20d e 22d). O HA apresenta menor T_i (129 °C) quando comparado com os outros materiais isolados e influenciou de forma mais expressiva na estabilidade do filme composto. Ainda assim o filme antioxidante HS₄₀HA₄₀S₂₀ exibe alta estabilidade (T_i de 206 °C) podendo assim ser aplicado como revestimento em produtos que não venham a sofrer tratamento posterior em altas temperaturas. Filmes antioxidantes geralmente são aplicados em alimentos cárneos (processados ou não) ou amêndoas (KARRE *et al.*, 2013) como tecnologia final, dispensando um tratamento posterior.

Figura 29 - Derivadas termogravimétricas: (a) Efeito do sorbitol e hidrolisado em CBNF-CM, (b) Efeito do tipo de CBNF no filme antioxidante com 50% de sorbitol, (c) Componentes do filme HS₄₀HA₄₀S₂₀ separadamente



Não houve redução da estabilidade térmica do filme composto por celulose nanofibrada alternativa (CBNF-CM) após adição do hidrolisado (Figura 21a e 23a). A substituição do tipo de CBNF na composição do filme antioxidante não comprometeu as propriedades térmicas destacando-se o fato que o filme com CBNF alternativa apresenta melhor estabilidade (Figura 21b e 23b). Fukuzumi *et al.* (2009) e Fukuzumi *et al.* (2010) observaram que filmes puros de nanofibras de celulose TEMPO-oxidadas apresentam T_i na faixa de 200 °C a 222 °C. Neste trabalho os filmes de CBNF obtidos apresentam valores dentro dessa faixa ($T_i=215$ °C e $T_i=216$ °C para CBNF-HS e CBNF-CM respectivamente). Os filmes antioxidantes deste trabalho apresentam $T_i=206$ e $T_i=256$ para HS₄₀HA₄₀S₂₀ e CM₄₀HA₄₀S₂₀ respectivamente, sendo o filme com CBNF de meio alternativo superior.

5.3.4 Propriedades mecânicas e Raios-X

Alguns filmes foram selecionados para avaliação de três propriedades mecânicas, (E = Módulo de Young ou Módulo de elasticidade, σ = tensão, ε = alongação na ruptura) todos plastificados na proporção de 50% em massa relativa a quantidade de CBNF. Os filmes controles CB-HS, CBNF-HS, CB-CM e CBNF-CM são quebradiços o que impossibilitou uma possível análise. As propriedades mecânicas são apresentadas na Tabela 8

Tabela 8 - Propriedades mecânicas (E = Módulo de Young (Módulo de elasticidade), σ = tensão, ε = alongação na ruptura) e índice de cristalinidade - I_C (%) dos filmes.

Difratômetros em APÊNDICE D.

	Filme	E (GPa)	σ (MPa)	ε (%)	I_C (%)
Filmes controle	CB-HS		*		88,55
	CBNF-HS		**		84,85
	CB-CM		*		80,56
	CBNF-CM		**		85,24
Filmes apenas com plastificantes	HS ₆₇ S ₃₃	1,42 ^a ± 0,13	87,04 ^a ± 12,70	12,47 ^a ± 1,87	82,01
	HS ₆₇ G ₃₃	1,02 ^b ± 0,11	78,43 ^a ± 10,02	17,11 ^b ± 2,29	83,23
	CM ₆₇ S ₃₃	n.d	n.d	n.d	84,16
	CM ₆₇ G ₃₃	n.d	n.d	n.d	82,80
	HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	0,57 ^c ± 0,05	26,27 ^b ± 3,75	9,60 ^a ± 1,09	75,75
Filmes antioxidantes	CM ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	0,50 ^c ± 0,07	45,72 ^c ± 7,71	30,40 ^c ± 7,49	82,15
	HS ₅₀ HA ₂₅ S ₂₅	0,86 ^d ± 0,25	34,51 ^c ± 8,43	10,55 ^a ± 5,19	81,29
	CM ₅₀ HA ₂₅ S ₂₅	n.d	n.d	n.d	78,32
	HS ₃₃ HA ₅₀ S ₁₄	n.d	n.d	n.d	78,04
	HS ₂₉ HA ₅₇ S ₁₇	n.d	n.d	n.d	75,16

Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$).

** - Filmes quebradiços após corte do corpo de prova impossibilitaram o ensaio*

*** - Filmes quebradiços ao manuseio impossibilitaram o ensaio*

n.d - propriedades não determinadas

A tensão máxima coincidiu com a tensão de ruptura para todas as amostras analisadas. Comparando os filmes de CBNF plastificados, observa-se que embora o filme com glicerol promova um maior poder plastificante (já que a alongação é ~37% superior), o módulo de Young é ~28% menor. Os dois filmes (HS₆₇S₃₃ e HS₆₇G₃₃) não diferem estatisticamente

quanto à tensão apresentando valor médio de ~82 MPa. Ganiari *et al.* (2017) menciona que a adição de agentes plastificantes a filmes comestíveis é necessária para superar a fragilidade do filme causada pelas altas forças intermoleculares. Plastificantes como o glicerol reduzem essas forças aumentando assim a mobilidade das cadeias poliméricas, melhorando assim a flexibilidade e a extensibilidade.

Tais filmes apresentam maior tensão quando comparados com outros filmes estudados como: polietileno (PAIVA *et al.*, 2006), alginato/CNF (DEEPA *et al.*, 2016), amido (MORENO *et al.*, 2015; PIÑEROS *et al.*, 2017; YUNOS *et al.*, 2011), carragenana (FARHAN e HANI, 2007), e gelatina de pele de peixe (TONGNUANCHAN *et al.*, 2015; TONGNUANCHAN *et al.*, 2012).

Após a adição do hidrolisado nos filmes de CBNF-HS houve uma redução no módulo de elasticidade em ~60% e tensão em ~70%, mantendo a elongação sem diferença significativa. O filme com hidrolisado e CBNF-CM destaca-se por apresentar maior tensão (~74% superior) e elongação (~216% superior) quando comparado com o filme de meio sintético (HS₄₀HA₄₀S₂₀). Tal melhora pode estar relacionada com modificações na organização estrutural promovida pela CBNF-CM, direcionando a um aumento no efeito plastificante e resistência.

Com relação ao filme antioxidante contendo uma quantidade 50% menor de HA (HS₅₀HA₂₅S₂₅) foram observadas melhoras nas propriedades saber: um aumento de ~50% no módulo de Young e de ~31% na tensão quando comparado com o filme com maior quantidade de HA (HS₄₀HA₄₀S₂₀).

Comparando os valores de tensão com a literatura observa-se que o filme antioxidante de meio alternativo (CM₄₀HA₄₀S₂₀) apresenta maior valor do que filmes de polietileno, quitosana, amilose, amilopectina, PCL (Policaprolactona), PHB (Poli-3-hidroxibutirato) e PHBV (Poli-hidroxibutirato-co-valerato) (PAIVA e MORALES *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2001; SONI *et al.*, 2016; CERQUEIRA *et al.*, 2012; RINDLAV *et al.*, 1998).

A literatura mostra resultados divergentes quando estuda a incorporação de proteínas ou peptídeos em filmes poliméricos. Em alguns trabalhos a adição de proteínas contribui para uma redução na resistência devido às baixas propriedades coesivas do tipo de polímero utilizado (PEI *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2009). Entretanto, peptídeos podem também exibir efeito plastificante (NUANMANO *et al.*, 2015), fato não observado nesse trabalho. De acordo com Han e Gennadios (2005) filmes com tensão 10-100 MPa e elongação 10-100% são classificados como filmes bons para essas propriedades.

As propriedades mecânicas de compósitos/filmes poliméricos variam bastante em função do tipo ou quantidade de polímero (PORTO *et al.*, 2007; CHAMBI *et al.*, 2011), plastificante (YUNOS *et al.*, 2009; NUR HANANI *et al.*, 2013; CAO *et al.*, 2009), agente reticulante (PORTO *et al.*, 2007), material de reforço (SONI *et al.*, 2016; DEEPA *et al.*, 2016; BILBAO *et al.*, 2011), substância funcional (MORENO *et al.*, 2015; KRISTO *et al.*, 2008) ou tipo de tratamento químico ou físico (RODIONOVA *et al.*, 2012).

Fukuzumi *et al.* (2009) verificou que filmes de CBNF apresentam tensão, módulo de elasticidade e alongação na faixa de 222-233 MPa, 6,2 a 6,9 GPa e 7 a 7,6% respectivamente em função do tipo de celulose vegetal processada. Comparando com este trabalho apenas na alongação obteve-se valores superiores, provavelmente devido a presença dos plastificantes nos filmes. Rivero *et al.* (2010) observaram em filmes de gelatina que a tensão é reduzida e a alongação aumentada com o aumento da quantidade de glicerol nesse filme. O Módulo de Young pode variar bastante em função principalmente do tipo de polímero estudado (KRISTO *et al.*, 2008; DEEPA *et al.*, 2016; PIÑEROS *et al.*, 2017; FARHAN *et al.*, 2017; YUNOS *et al.*, 2011; MORENO *et al.*, 2015; SYVERUD *et al.*, 2009; CSISZÁR *et al.*, 2017; MARINELLI *et al.*, 2008; SANCHEZ *et al.*, 2010; TONGNUANCHAN *et al.*, 2015; TONGNUANCHAN *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2009; PORTO 2007; CARVALHO *et al.*, 2004; CHAMBI *et al.*, 2011; BILBAO *et al.*, 2011; RODIONOVA *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2001; PAIVA *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2012).

A incorporação de nanofibras de celulose são frequentemente relatadas como uma forma de melhorar as propriedades mecânicas de filmes poliméricos não celulósicos ou celulósicos (DEEPA *et al.*, 2016) devido as características intrínsecas deste material (RODIONOVA *et al.*, 2012). Filmes com menor quantidade de CBNF podem apresentar propriedades mecânicas reduzidas quando comparados com outros com maior quantidade de CBNF. Neste trabalho a CBNF foi o material que mais contribuiu para a manutenção das propriedades mecânicas do compósito antioxidante.

Com relação ao índice de cristalinidade (I_c), todos os filmes apresentam alta cristalinidade, característica típica da presença de celulose bacteriana (CAMPANO *et al.*, 2016). A fração cristalina da celulose é pouco afetada pela oxidação mediada a TEMPO o que explica essas pequenas diferenças quando compara-se as celuloses não tratadas com as celuloses nanofibriladas de ambos os meios (SAITO e ISOGAI, 2004).

No filme $HS_{40}HA_{40}S_{20}$ houve uma redução no I_C de ~83% para ~75%, quando comparado com os seus controles ($HS_{67}S_{33}$ e CBNF-HS) e no filme $CM_{40}HA_{40}S_{20}$ essa redução foi menos expressiva (~84% para ~82%).

Filmes de gelatina apresentam baixa cristalinidade (KI *et al.*, 2005) e hidrolisados de gelatina mantêm essa característica devido à sua organização estrutural. Hidrolisados perdem a capacidade de gelificação devido à quebra das ligações peptídicas e redução do comprimento das cadeias (ZHONGKAI *et al.*, 2006). Os plastificantes estudados (sorbitol ou glicerol) não influenciaram na cristalinidade dos filmes de CBNF-HS que apresentaram valor médio de ~83%.

5.3.5 Solubilidade, Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e Ângulo de contato

Na Tabela 9 são apresentados os resultados para solubilidade e PVA dos diferentes filmes estudados. O filme plastificado $HS_{67}S_{33}$ apresenta solubilidade próxima à quantidade de sorbitol adicionada no filme, indicando que o mesmo foi completamente solubilizado durante o ensaio. Comportamento semelhante foi observado quando o hidrolisado (HA) foi adicionado no filme contendo sorbitol. A solubilidade desse filme foi semelhante à soma da quantidade de sorbitol e HA adicionada. Defato, o sorbitol e o hidrolisado de gelatina são compostos solúveis em água.

O filme antioxidante composto por CBNF de meio alternativo ($CM_{40}HA_{40}S_{20}$) apresentou uma solubilidade superior (~78%) quando comparado com o filme de meio sintético $HS_{40}HA_{40}S_{20}$ (~60%) devido a presença da CBNF-CM. Nesses filmes sem HA observa-se esse aumento na solubilidade (de ~34 para ~69) sugerindo que o aumento nessas solubilidades estejam relacionados com a presença da CBNF-CM.

Deepa *et al.* (2016) mencionam que a intensidade das ligações de hidrogênio entre os componentes de um compósito pode influenciar a solubilidade e resistência a água. Em geral a celulose oxidada a TEMPO pode apresentar solubilidade que varia em função do grau de oxidação não sendo possível obter um material completamente solúvel (SAITO e ISOGAI, 2004).

Tabela 9 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade dos filmes antioxidantes e controles

	Filme	Solubilidade (%)	PVA (g.mm/kPa.h.m ²)
Filmes	CB-HS	0,00 ^e ± 0,00	0,72 ^a ± 0,08
controle	CB-CM	0,00 ^e ± 0,00	n.d
	CBNF-HS	0,00 ^e ± 0,00	0,48 ^b ± 0,03
	CBNF-CM	69,12 ^a ± 4,10	*
Filmes apenas	HS₆₇S₃₃	34,68 ^c ± 6,10	0,93 ^{ac} ± 0,08
com	HS₆₇G₃₃	69,58 ^{ab} ± 5,95	1,00 ^{cd} ± 0,12
plastificantes	CM₆₇S₃₃	46,03 ^c ± 3,10	n.d
Filmes	HS₄₀HA₄₀S₂₀	59,54 ^d ± 3,50	1,54 ^e ± 0,08
antioxidantes	CM₄₀HA₄₀S₂₀	78,46 ^{ab} ± 7,00	1,58 ^e ± 0,14
	HS₅₀HA₂₅S₂₅	58,92 ^d ± 4,54	1,17 ^d ± 0,09
	HS₃₃HA₅₀S₁₇	77,44 ^{ab} ± 4,28	n.d
	HS₂₉HA₅₇S₁₄	84,32 ^b ± 6,02	n.d

Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$).

** - filme quebradiço impossibilitou a análise*

n.d - não determinado

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) do filme de CB-HS é superior quando comparada com o filme de CBNF-HS, indicando que a desconstrução mecânica aliada à secagem foi eficiente para na formação de uma matriz menos permeável a água provavelmente devido a uma redução na porosidade. A literatura mostra que filmes de CB obtidos por cultivo estático tem alta porosidade (ASHJARAN *et al.*, 2013; ESA *et al.*, 2014).

Observa-se também um aumento de ~100% na PVA quando sorbitol ou glicerol são adicionados no filme de CBNF-HS, uma vez que tais plastificantes são bastante hidrofílicos (NUANMANO *et al.*, 2015). Tais plastificantes apresentam alta capacidade de interagirem com água por ligações de hidrogênio devido a presença de várias hidroxilas em sua estrutura. Além disso, devido a baixa massa molecular, eles podem se dispersar facilmente entre as cadeias de celulose contribuindo assim para um aumento da adsorção, difusão e retenção de água aumentando assim os valores de PVA (SALGADO *et al.*, 2011; SOTHORNVIT *et al.*, 2000). Tal resultado é amplamente observado na literatura quando se estuda a incorporação desses plastificantes em diversos tipos de polímeros (CSISZÁR *et al.*, 2017; THOMAZINE *et al.*, 2006; FARHAN e HANI, 2017; NUANMANO *et al.*, 2015).

Ganiari *et al.* (2017) menciona que filmes plastificados com sorbitol tem a permeabilidade ao vapor de água (PVA) afetada devido a redução nas forças intermoleculares. De forma geral ao se incorporar substâncias hidrofílicas há um aumento na PVA. Entretanto, Dicastillo *et al.* (2012) considera que para o caso do ácido ascórbico e ferúlico, a alta afinidade desses compostos com a água direciona a uma redução na PVA.

Após a adição do hidrolisado no filme com sorbitol (HS₄₀HA₄₀S₂₀) observa-se um aumento de ~230% e ~100% na PVA quando se compara com os filmes controle (CBNF-HS e HS₆₇S₃₃). Na formulação com uma quantidade menor de hidrolisado (HS₅₀HA₂₅S₂₅) a PVA foi reduzida em 24%.

A literatura menciona que proteínas e seus derivados, principalmente peptídeos de baixamassa molecular apresentam características hidrofílicas e capacidade de retenção de água já que contém grupos polares (-COOH, -NH₂ e -OH) em suas estruturas químicas.

O aumento da PVA, em função da presença de proteínas em filmes poliméricos, foi observado na literatura por Ferreira *et al.* (2009) ao estudar filmes de quitosana e por Hermansyah *et al.* (2013) em filmes de gelatina. Chen *et al.* (2013) observaram um aumento da capacidade de reidratação de filmes de CB incorporados de gelatina hidrolisada. Com relação ao tipo de celulose, a substituição de CBNF-HS por CBNF-CM não afetou a PVA dos filmes antioxidantes na formulação testada.

Na literatura a PVA de compósitos poliméricos varia bastante em função do tipo de polímero (APÊNDICE M). Polímeros naturais tendem a apresentar maior PVA quando comparados com polímeros sintéticos. Filmes com PVA na faixa de 0,041 a 0,41 g.mm/kPa.h.m² são considerados filmes de alta permeabilidade (HAN *et al.*, 2005). A PVA dos filmes antioxidantes desde trabalho é aceitável (valor igual ou inferior) quando comparados com outros polímeros estudados.

Filmes plastificados com sorbitol tem PVA variando bastante em função da matriz embora a maioria dos trabalhos reportam valores inferiores a ~4 g.mm/kPa.h.m². A PVA de filmes de gelatina pode ser reduzida ou aumentada dependendo da quantidade de glicerol adicionada no filme (RIVERO *et al.*, 2010). Avena *et al.* (2006) observaram que filmes de gelatina não plastificados apresentam PVA na faixa de 0,63 a 1,88 g.mm/kPa.h.m² em função do tipo de gelatina. Os filmes de gelatina de menor PVA são menos hidrofílicos uma vez que apresentam quantidades menores de prolina e hidroxiprolina quando comparadas com os filmes de maior PVA. Em filmes de gelatina plastificados, Santos *et al.* (2014) observaram uma PVA de 2,2 a 2,5 g.mm/kPa.h.m e Hanani *et al.* (2013) uma PVA de 1,66 a 1,95

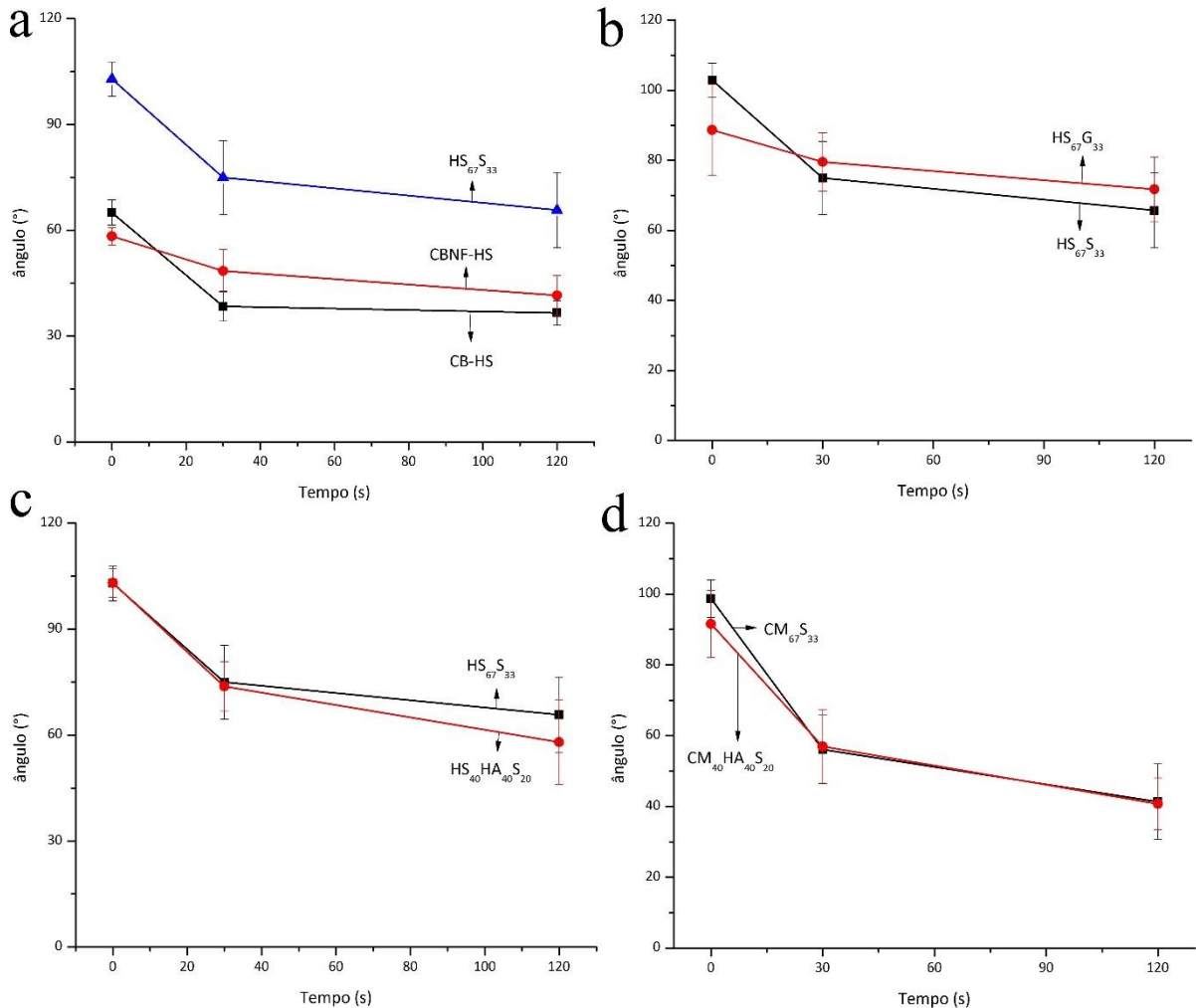
g.mm/kPa.h.m² em filmes com glicerol. Entretanto Thomazine *et al.* (2006) observaram valores menores (0,53 a 0,66 g.mm/kPa.h.m²) quando plastificados com sorbitol. Filmes de gelatina hidrolisada de pescado e glicerol tem valor de PVA próximo ao mesmo filme com gelatina não hidrolisada confirmando a proximidade desses dois tipos de materiais para essa propriedade (HOQUE *et al.*, 2011).

Com relação às análises de ângulo de contato (Figuras 30 e 31), os ângulos medidos ficaram abaixo de 90 ° poucos segundos após o depósito da gota. Após o depósito da gota em superfícies poliméricas ângulos abaixo de 90 ° indicam hidrofílicidade quando usa-se água na análise (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

O filme de CB-HS apresenta valores de ângulo de contato próximos ao filme de CBNF (Figura 30a). Com relação a adição de sorbitol ou glicerol no filme de CBNF-HS, houve um aumento no ângulo de contato (Figura 30b). Embora tal resultado sugira que os filmes plastificados sejam superficialmente mais hidrofóbicos, tal fato não concorda com alguns trabalhos onde observa-se que plastificantes hidrofílicos tendem a aumentar a hidrofílicidade de filmes poliméricos pelos motivos já explicados na sessão de PVA. Entretanto alguns autores observaram que a adição de plastificantes pode tornar o filme mais hidrofóbico devido a redução na quantidade de hidroxilas disponíveis do polímero, uma vez que o plastificante tem alta afinidade com elas (CAO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2014)

Outro aspecto é que o espalhamento da gota na superfície não é influenciado unicamente pela estrutura química, mas pela porosidade e estrutura organizacional do polímero. A gota formada nem sempre permanece na superfície do filme uma vez que filmes poliméricos podem sofrer inchamento com a penetração de água na estrutura e filmes de nanofibras de celulose apresentam essa capacidade (CERQUEIRA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 1999; BERENS e HOPFENBERG *et al.*, 1978; RITGER e PEPPAS, 1987; UETANI *et al.*, 2012). Filmes com plastificantes podem ser menos porosos uma vez que tais substâncias se acomodam entre as cadeias de celulose preenchendo os espaços vazios.

Figura 30 - Ângulo de contato: (a) CB, CBNF-HS e HS₆₇S₃₃, (b) Filmes de CBNF-HS plastificados com glicerol ou sorbitol, (c) Efeito do hidrolisado no filme de HS₆₇HA₃₃,(d) Efeito do HA no filme CM₆₇HA₃₃.

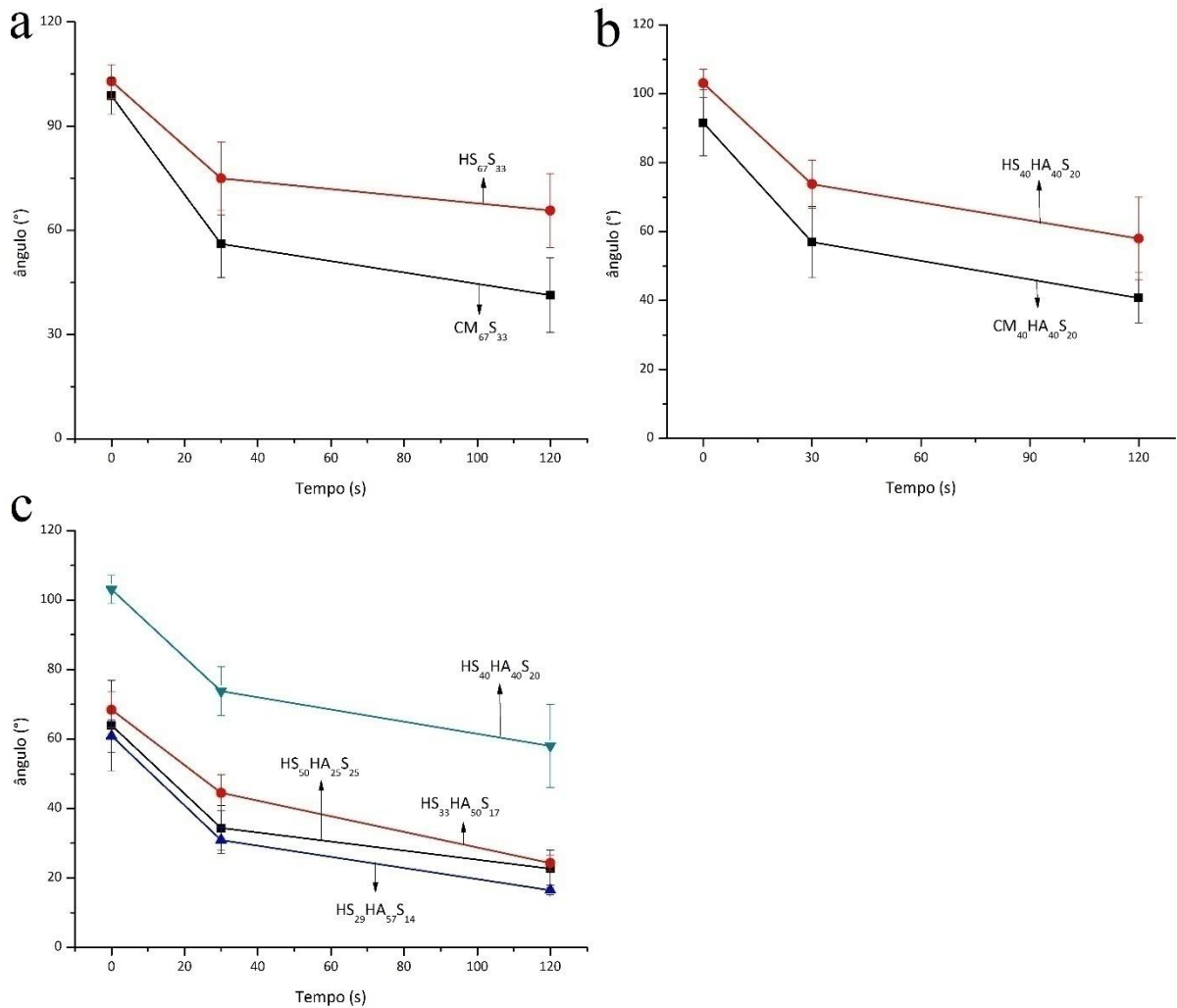


Dados de ângulo de contato para o filme de CBNF-CM não plastificado não pode ser obtido devido a sua superfície irregular.

Com relação a adição do hidrolisado, não houve diferença significativa nos ângulos quando comparados com os filmes controle (apenas com plastificantes) tanto no filme com CBNF de meio sintético como no filme com CBNF de meio CM (Figura 30c,d). Variando a quantidade de hidrolisado no filme com sorbitol observa-se que o filme HS₄₀HA₄₀S₂₀ é menos hidrofílico que os demais (Figura 31c).

Comparando os filmes de diferentes celuloses plastificados com sorbitol observa-se que o filme com CBNF-CM é mais hidrofílico superficialmente (Figura 31a). O mesmo acontece nesses filmes após a adição do hidrolisado onde o filme CM₄₀HA₄₀S₂₀ é mais hidrofílico (Figura 31b).

Figura 31 - Ângulo de contato: (a) Efeito do tipo de CBNF nos filmes com sorbitol, (b) Efeito do tipo de CBNF nos filmes com HA e sorbitol, (c) Efeito da quantidade de HA no filme HS₆₇HA₃₃.



A análise termogravimétrica das suspensões sugere que a CBNF-CM tenha um grau de oxidação um pouco superior o que pode explicar a maior hidrofobicidade desse material. A estabilidade térmica e a cristalinidade dos materiais originais CB-HS e CB-CM são diferentes e deram origem a materiais com diferentes graus de oxidação.

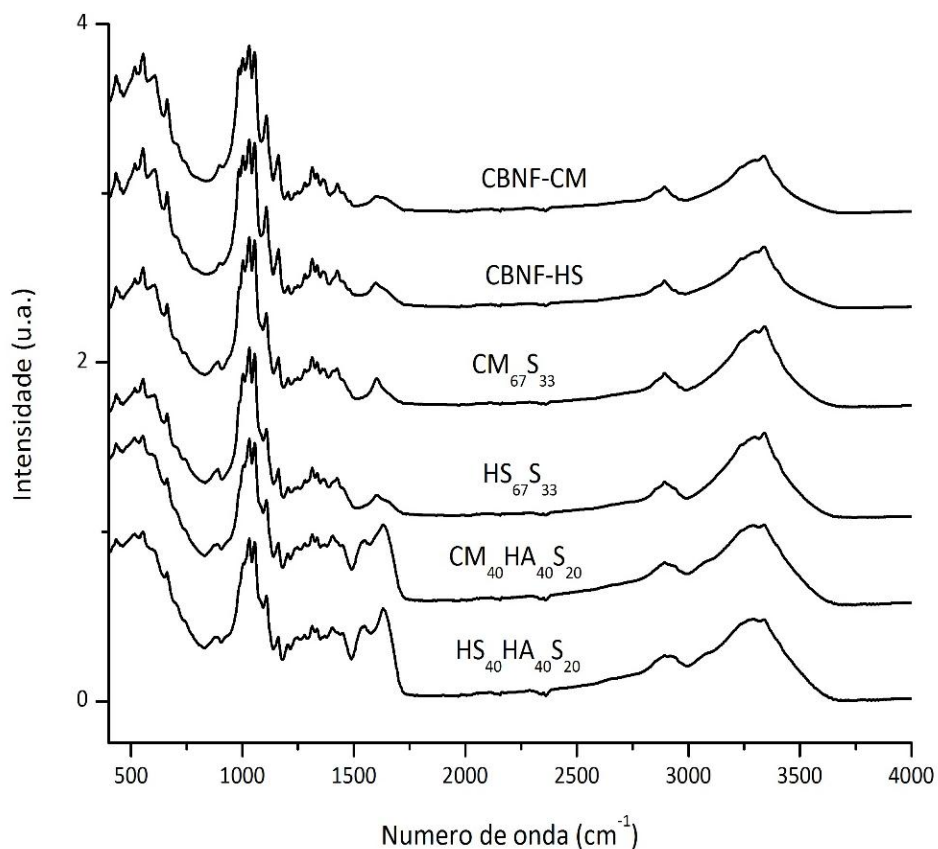
Na literatura os ângulos de contato de diversos polímeros são na maioria dos casos menores que 90° exceto quando se adicionam substâncias hidrofóbicas contendo óleos por exemplo. Os valores variam bastante dependendo do tipo de polímero: amido (39° a 53°), Galactomanana (68°), CB carboximetilada (8°), CB (41° a 85°), CB fibrilada (11°), CB/arabinogalactana/xiloglucana (42° a 70°), CB/lecitina (58° a 70°) (LUCYSZYN *et*

al.2016; PIÑEROS *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). O tipo de peptídeo incorporado em uma matriz polimérica pode reduzir a hidrofiliicidade do filme (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017), em contraponto com o presente trabalho.

5.3.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros são apresentados nas Figuras 32 e 33

Figura 32 - Espectros de FTIR - 400 a 4000 cm^{-1}

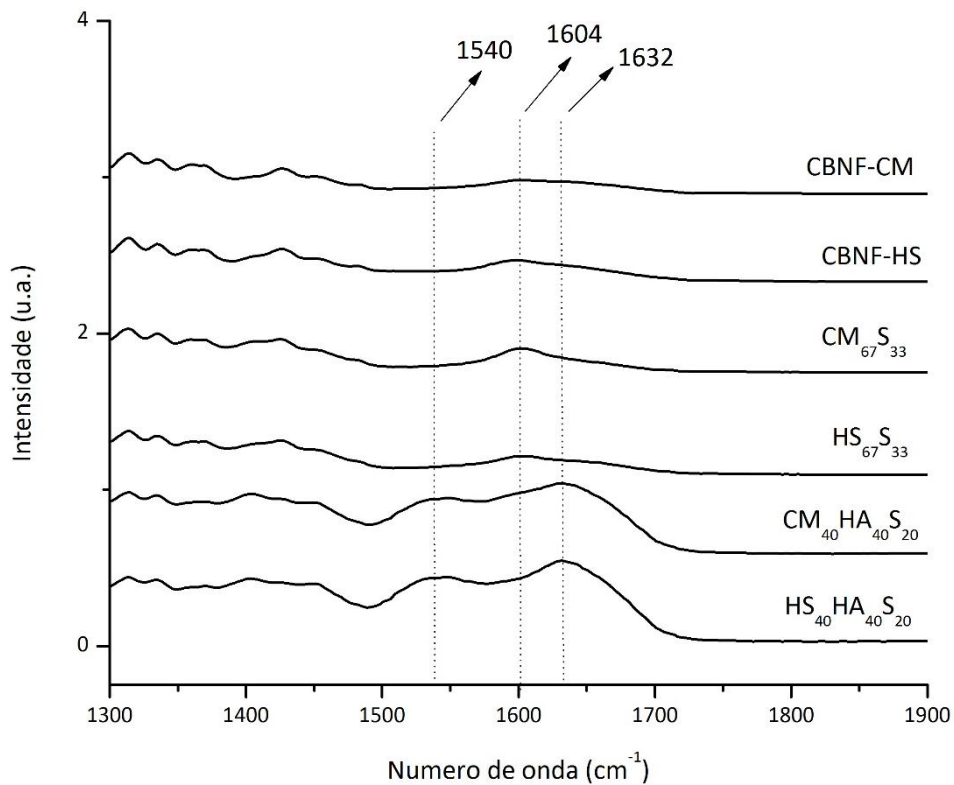


Todos os espectros exibem bandas referentes a vibrações típicas naturalmente presentes na celulose (Figura 32) a saber: alongamento da ligação O-H (3345 cm^{-1}), alongamento assimétrico de CH_2 (2920 cm^{-1} to 2850 cm^{-1}), deformação angular assimétrica de ligação C-H (1426 cm^{-1}), deformação angular simétrica de ligação C-H (1360 cm^{-1} to 1378 cm^{-1}), alongamento assimétrico de ligação glicosídica C-O-C (1160 cm^{-1}), alongamento de

ligações C-OH e C-C-OH de álcool primário e secundário respectivamente (1107 cm^{-1} and 1055 cm^{-1}), flexão de ligação C-H ou alongamento de CH_2 (900 cm^{-1}), e flexão fora do plano de O-H (665 cm^{-1}) (GEA *et al.*, 2011).

Foram observadas nos filmes com hidrolisado bandas no intervalo de aproximadamente $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ referentes a nitrogênio e estruturas proteicas (alongamento de C=O em amidas tipo I (1632 cm^{-1}) e deformação angular em amidas tipo II (1540 cm^{-1}). A banda 1604 cm^{-1} (alongamento de C=O em COO-Na) no filme $\text{CM}_{67}\text{S}_{33}$ é ligeiramente mais intensa do que nos demais provavelmente devido a maior quantidade de CBNF no filme ou ao um maior grau de oxidação desse material (WU *et al.*, 2017).

Figura 33 - Espectros de FTIR - $1300\text{ a }1900\text{ cm}^{-1}$



5.3.7 Cor e transparência

Na Tabela 10 são apresentados os resultados da análise de cor e transparência de alguns filmes.

Tabela 10 - Cor e transparência de alguns filmes antioxidantes e controles

Filmes	Transparência		Cor	
	n/a	L^*	a^*	b^*
CB-HS	0,31 ^a ± 0,02	89,71 ^{ab} ± 0,2	4,93 ^{ab} ± 0,04	7,15 ^a ± 0,22
CBNF-HS	0,18 ^b ± 0,00	90,39 ^a ± 0,01	4,73 ^{ac} ± 0,08	6,73 ^a ± 0,43
HS ₆₇ S ₃₃	0,62 ^c ± 0,01	90,12 ^a ± 0,36	4,56 ^c ± 0,08	7,28 ^a ± 1,08
CM ₆₇ S ₃₃₃	0,83 ^d ± 0,02	90,03 ^a ± 0,12	4,24 ^d ± 0,07	6,93 ^a ± 0,51
HS ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	1,02 ^c ± 0,02	88,99 ^b ± 0,82	5,05 ^b ± 0,23	10,69 ^b ± 2,57
CM ₄₀ HA ₄₀ S ₂₀	1,00 ^c ± 0,03	87,74 ^c ± 1,03	4,76 ^a ± 0,11	12,33 ^b ± 1,86

Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,05$)

Os filmes plastificados HS₆₇S₃₃ e CM₆₇S₃₃ assim como os filmes com hidrolisado (HS₄₀HA₄₀S₂₀ e CM₄₀HA₄₀S₂₀) apresentaram maior transparência quando comparados com o filme controle (BCNF-HS) provavelmente devido a menor quantidade de celulose presente nesses filmes. O filme de CBNF puro apresenta baixa transparência (0,18) quando comparado com os demais. Nos filmes plastificados, o sorbitol se insere entre os espaços vazios das fibras de celulose influenciando diretamente na reflexão da luz, conduzindo a um aumento na transparência do filme. Os filmes HS₄₀HA₄₀S₂₀ e CM₄₀HA₄₀S₂₀ não diferem estatisticamente quanto à transparência, sendo mais transparentes que os filmes controles HS₆₇S₃₃ e CM₆₇S₃₃.

Com relação à cor, os filmes antioxidantes apresentaram maior valor no parâmetro b^* (faixa de azul a amarelo) e por isso são mais amarelados quando comparados com os outros filmes sem HA. Com relação aos parâmetros L^* (luminosidade) e a^* (faixa de verde a vermelho) os filmes apresentam valores próximos. O hidrolisado conferiu mudança de cor devido à presença de impurezas lipídicas, pigmentos, caramelização de açúcares e reação de Maillard (SAMARANAYAKA *et al.*, 2011). A reação de Maillard confere uma cor amarelado/creme ao hidrolisado devido a formação de melanoidinas oriundas da reação entre grupos carbonila de compostos resultantes de oxidação lipídica (aldeídos e cetonas) e grupos amino de aminoácidos ou peptídeos livres (SCHMID *et al.*, 2013).

Os valores de luminosidade (L^*) estão próximos a outros trabalhos que estudaram filmes poliméricos e observaram valores variando de 75 a 95 em filmes compósitos de: gelatina/açúcares (HAZAVEH *et al.*, 2015); alginato (RHIM *et al.*, 2014), carragenana (FARHAN e HANI *et al.*, 2017); hidrolisados de plasma bovino/proteína de soja isolada (SALGADO *et al.*, 2011); quitosana/extrato aquoso de chá verde (SIRIPATRAWAN *et*

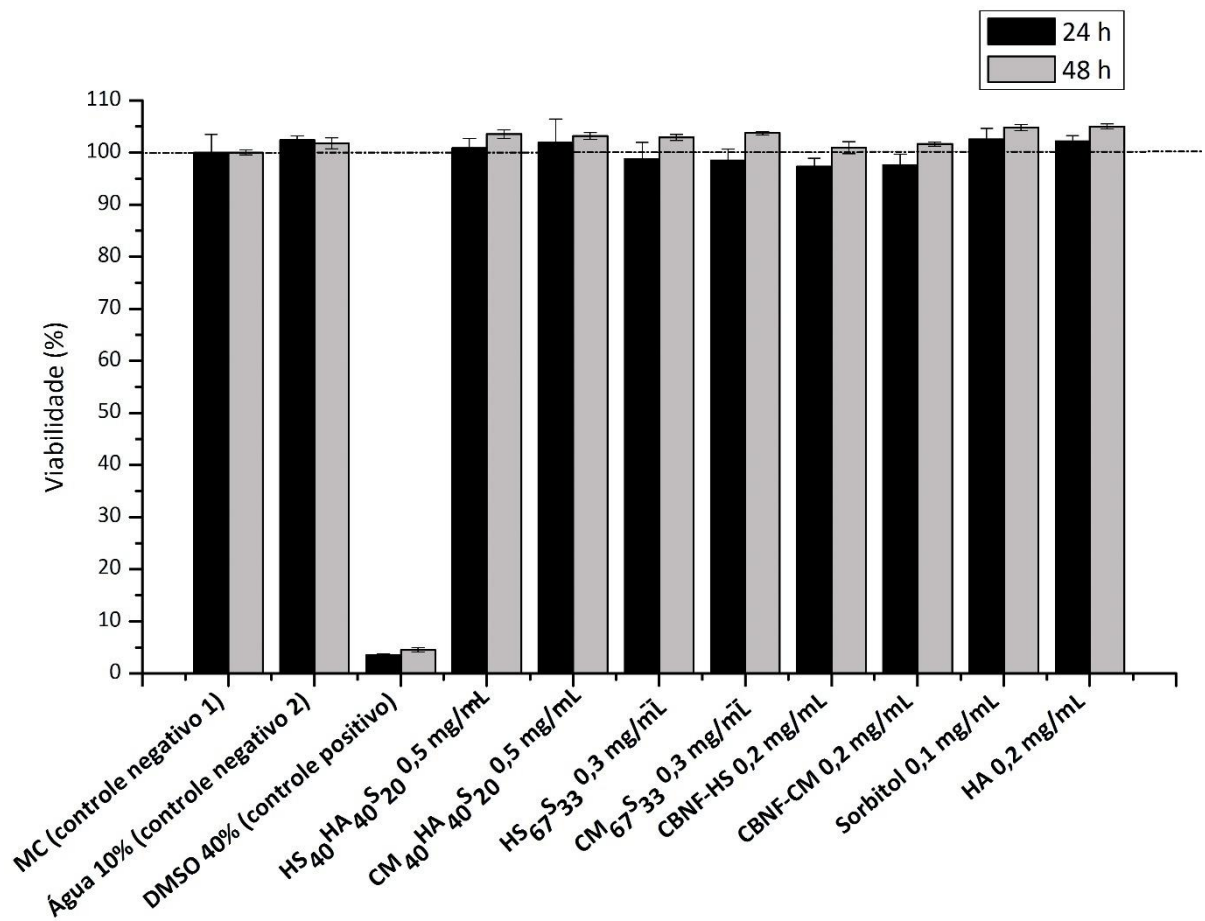
al.,2010) e gelatina/lactose/glicerol (ETXABIDE *et al.*, 2015). O filme HS₄₀HA₄₀S₂₀ não apresenta comprometimento visual que o impeça uma possível aplicação. O hidrolisado deste estudo apresenta a vantagem de não ter capacidade de interferir na cor do produto final como acontece com muitos outros antioxidantes naturais já estudados (KARRE *et al.*, 2013).

5.3.8 Citotoxicidade *in vitro*

Neste trabalho os filmes antioxidantes e seus componentes analisados de forma separada (CBNF, sorbitol e hidrolisado) não afetaram o desenvolvimento das células CACO-2 nos dois tempos analisados e indicam que os filmes desenvolvidos neste trabalho são seguros em termos toxicológicos (Figura 34).

A biocompatibilidade de diferentes materiais é frequentemente avaliada utilizando metodologias *in vitro* onde se mede a viabilidade celular através da avaliação da atividade metabólica, grau de proliferação ou taxa de morte de células animais em contato com as amostras a serem investigadas em tempos pré-definidos (GOSSLAU, 2017). No método que utiliza o corante Resazurina, células ativas em desenvolvimento metabólico normal reduzem a resazurina não fluorescente em resofurina, um pigmento fluorescente. Considera-se que a quantidade de resofurina produzida é proporcional ao número de células viáveis (NOCIARI *et al.*, 1998). Embora trabalhos já indiquem que a celulose nanofibrilada não apresente toxicidade, alguns autores consideram que os estudos devam avançar em número antes de uma conclusão definitiva (LAVOINE *et al.*, 2012).

Figura 34 - Viabilidade celular dos filmes de CBNF e controles

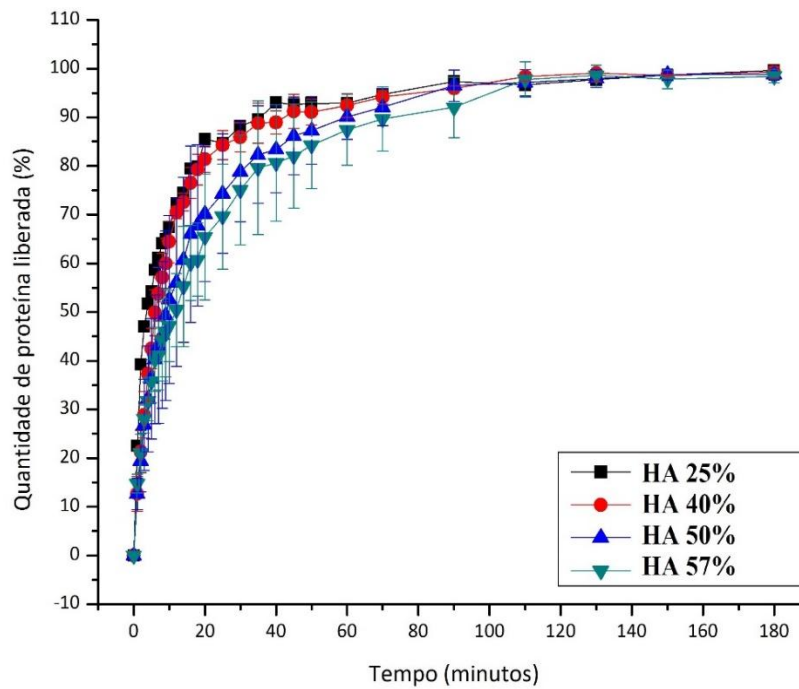


5.4 Ensaios de Liberação de proteínas dos filmes antioxidantes

5.4.1 Perfis de liberação

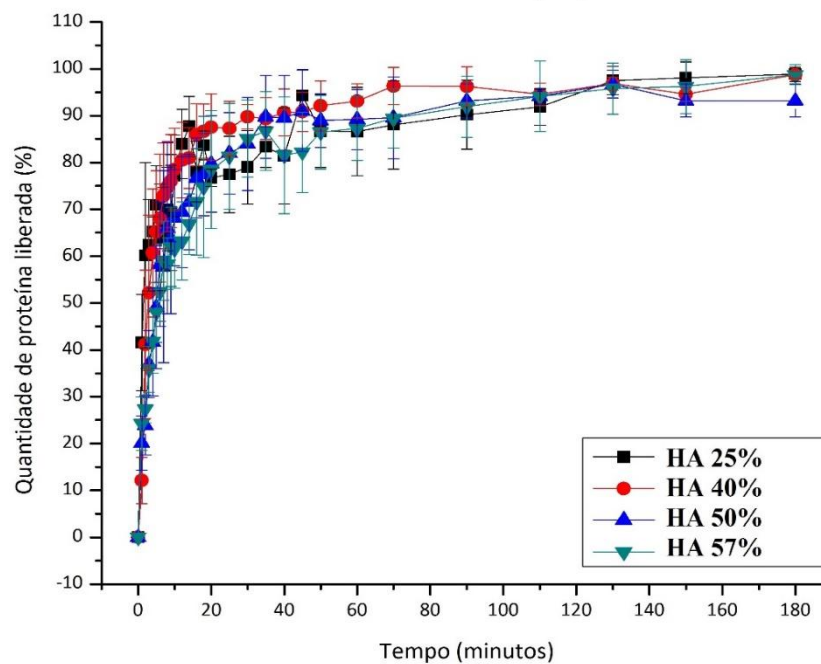
Os perfis de liberação a 25 °C são apresentados nas Figuras 35, 36, 37 e 38 e os perfis a 4 °C nas Figuras 39, 40, 41 e 42 para cada fluido separadamente. A quantidade de proteína liberada em 20 minutos e em 3 horas são apresentadas nas Tabelas (11, 12, 13 e 14). O tempo no qual é liberado 50% da massa (t_{50}) contida nos filmes é apresentado na Tabela 15.

Figura 35 – Perfis de liberação em água a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



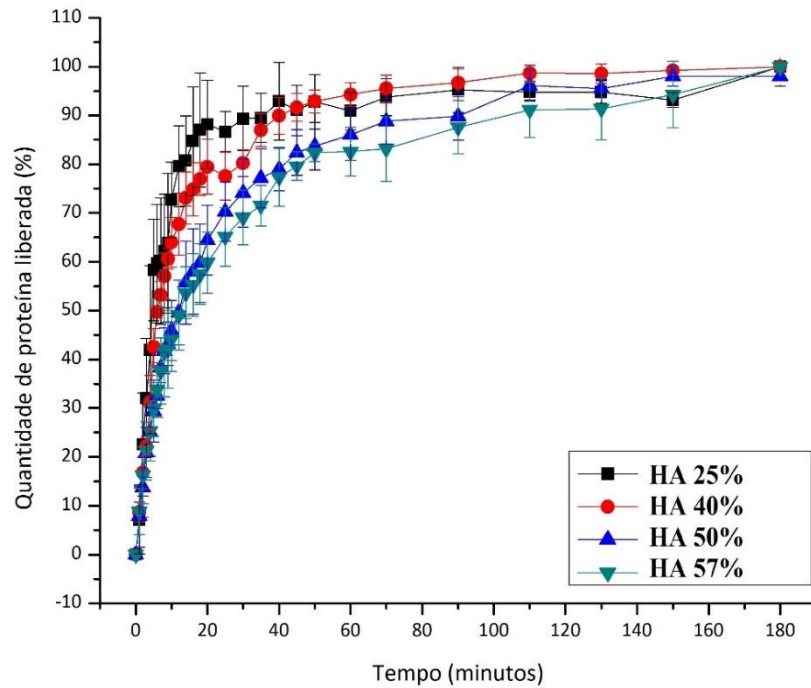
HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 36 – Perfis de liberação em ácido acético 3% (v/v) a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



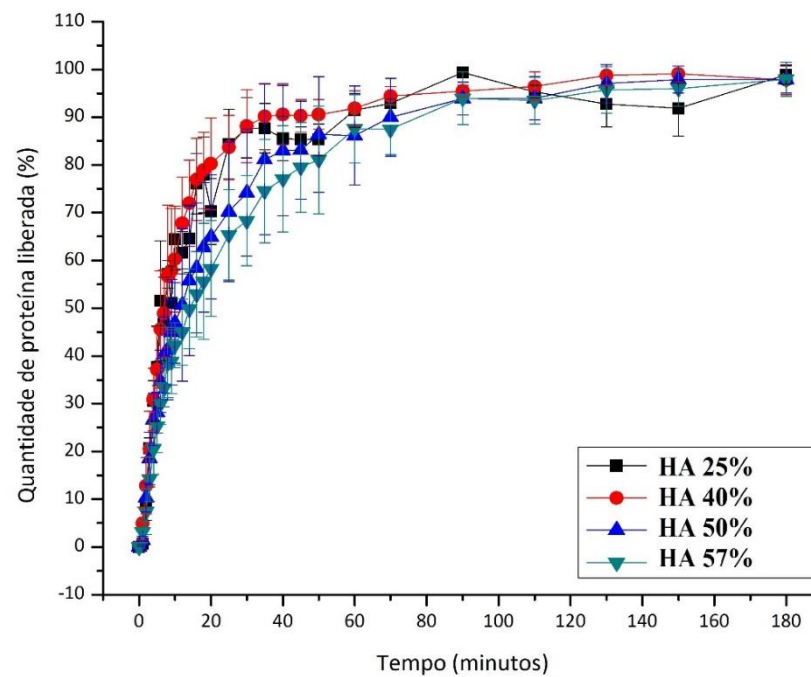
HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 37 – Perfis de liberação em Etanol 10% (v/v) a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



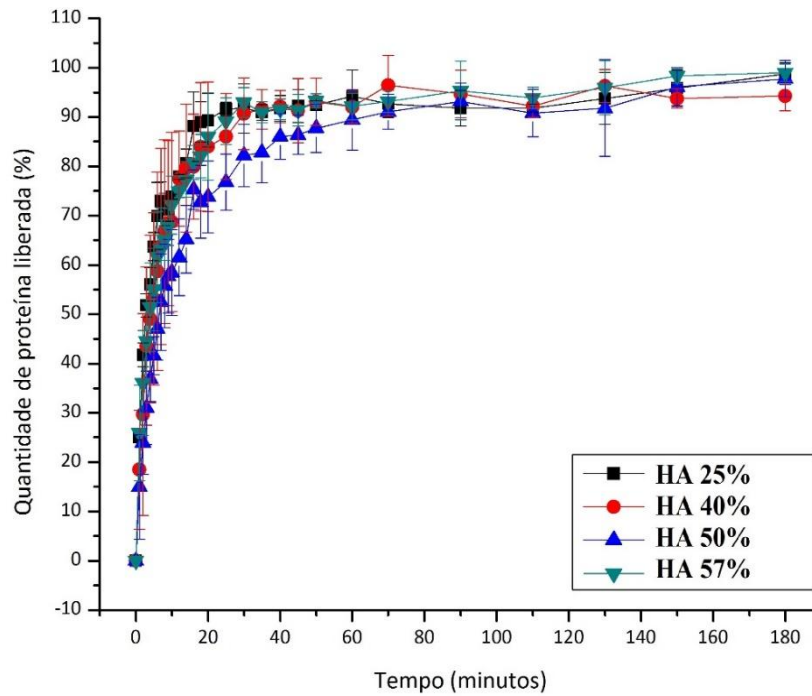
HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 38 – Perfis de liberação em Etanol 50% (v/v) a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



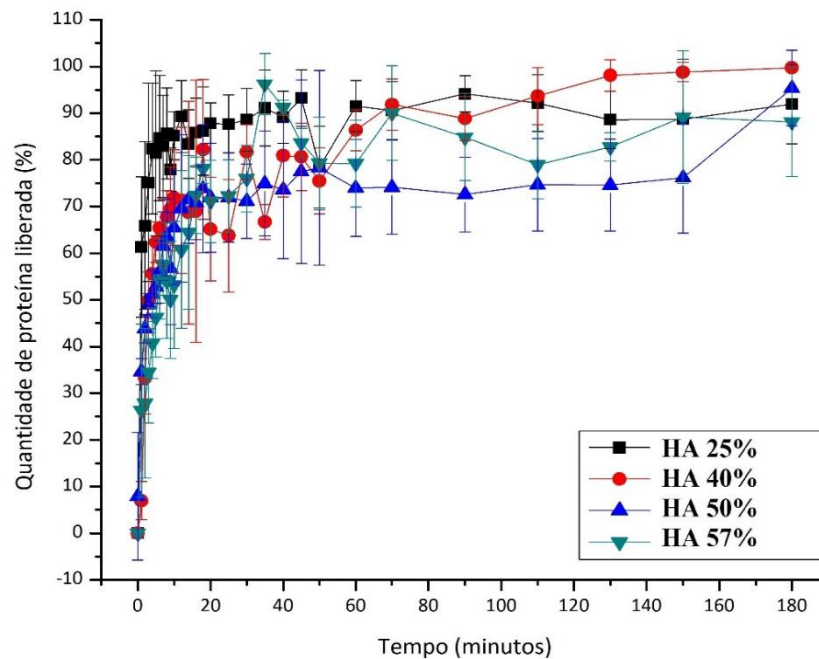
HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 39 – Perfis de liberação em água a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



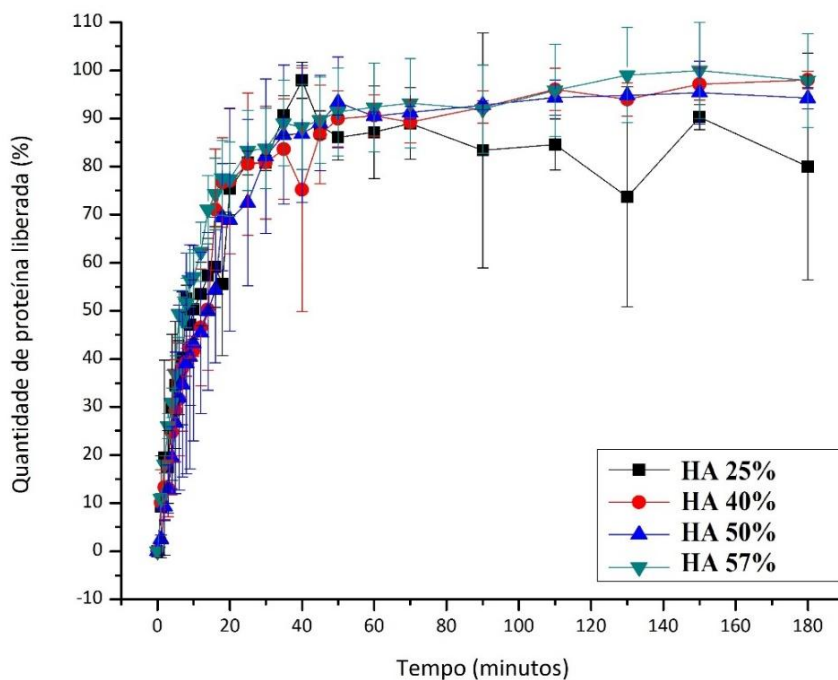
HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 40 – Perfis de liberação em ácido acético 3% (v/v) a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



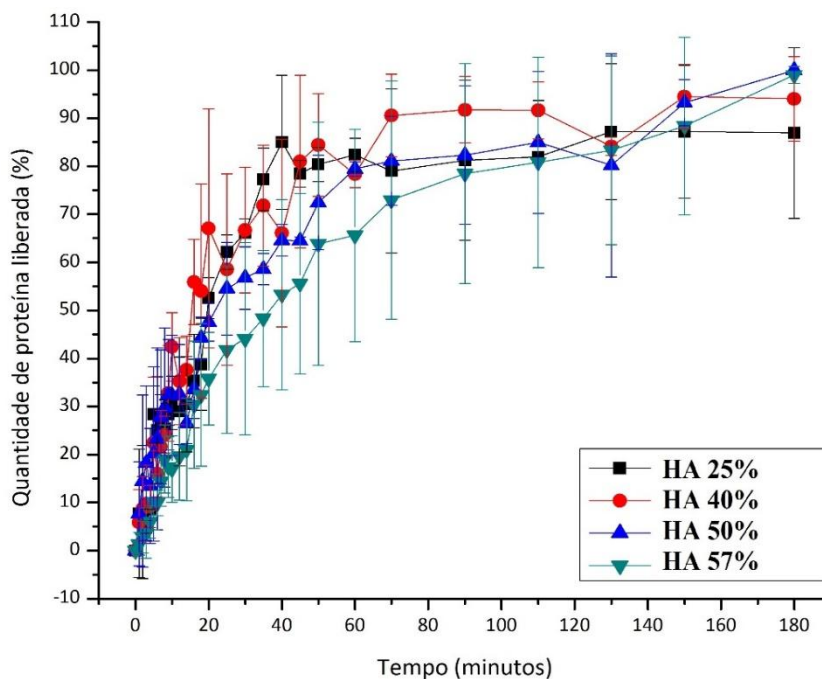
HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 41 – Perfis de liberação em etanol 10% (v/v) a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 42 – Perfis de liberação em etanol 50% (v/v) a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado no filme de CBNF-HS, HA e sorbitol



HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Tabela 11 - Quantidade de proteína liberada dos filmes antioxidantes de CBNF-HS, HA e sorbitol após 20 minutos a 25 °C

Fluido	Quantidade liberada (%) - Ensaio a 25 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	85,46 ± 5,49	81,33 ± 2,59	70,14 ± 13,93	65,40 ± 12,94
Ácido acético 3% (v/v)	76,72 ± 1,86	87,53 ± 7,06	79,72 ± 10,30	78,45 ± 12,59
Etanol 10% (v/v)	88,14 ± 9,04	79,47 ± 5,58	64,42 ± 7,15	59,84 ± 6,30
Etanol 50% (v/v)	70,23 ± 6,95	80,21 ± 9,6	64,95 ± 13,00	58,29 ± 10,00

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela 12 - Quantidade de proteína liberada dos filmes antioxidantes de CBNF-HS, HA e sorbitol após 20 minutos a 4 °C

Fluido	Quantidade liberada (%) - Ensaio a 4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	89,34 ± 5,44	83,94 ± 13,13	73,79 ± 7,28	86,00 ± 8,89
Ácido acético 3% (v/v)	87,84 ± 4,34	65,16 ± 11,13	71,88 ± 11,71	71,08 ± 8,79
Etanol 10% (v/v)	75,33 ± 5,33	76,97 ± 15,11	68,88 ± 23,17	77,34 ± 7,73
Etanol 50% (v/v)	52,54 ± 4,28	67,03 ± 24,84	47,51 ± 3,95	35,78 ± 9,66

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela 13 - Quantidade de proteína liberada dos filmes de CBNF-HS, HA e sorbitol no tempo final (3 horas) a 25 °C

Fluido	Quantidade liberada (%) - Ensaio a 25 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	99,63 ± 0,65	98,62 ± 1,59	95,80 ± 4,55	98,42 ± 1,4
Ácido acético 3% (v/v)	98,83 ± 1,49	99,07 ± 0,88	95,16 ± 8,38	98,75 ± 2,17
Etanol 10% (v/v)	100,00 ± 1,50	99,94 ± 0,11	93,58 ± 1,67	100,00 ± 1,50
Etanol 50% (v/v)	97,87 ± 2,52	97,81 ± 3,18	79,93 ± 5,87	97,91 ± 3,59

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela 14 - Quantidade de proteína liberada dos filmes de CBNF-HS, HA e sorbitol no tempo final (3 horas) a 4 °C

Fluido/ HA %	Quantidade liberada (%) - Ensaio a 4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	98,74 ± 2,19	94,26 ± 3,00	97,72 ± 2,68	98,99 ± 1,74
Ácido acético 3% (v/v)	91,90 ± 8,44	99,21 ± 1,06	95,34 ± 8,07	88,12 ± 11,68
Etanol 10% (v/v)	79,99 ± 23,55	96,86 ± 2,71	94,18 ± 2,18	97,87 ± 1,50
Etanol 50% (v/v)	86,92 ± 17,77	90,77 ± 9,67	100 ± 1,50	99,00 ± 1,74

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela 15 - Tempo no qual é liberado 50% da massa (t₅₀) de proteína contida nos filmes de CBNF-HS, HA e sorbitol. Estimado por interpolação linear.

Fluido	t ₅₀ (min) - 25 °C				t ₅₀ (min) - 4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	3,69	8,80	10,58	11,03	2,91	5,01	6,97	4,05
Ácido acético 3% (v/v)	2,73	6,01	6,01	5,27	2,31	9,17	3,01	6,63
Etanol 10% (v/v)	4,52	7,32	12,57	12,58	11,04	13,42	11,94	7,48
Etanol 50% (v/v)	6,65	7,58	12,41	15,53	19,63	25,60	23,73	43,99

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Os perfis de liberação de proteína dos filmes apresentam variações em termos de velocidade de liberação dependendo da quantidade inicial de HA no filme (25, 40, 50 e 57%), tipo de fluido ou temperatura.

No tempo final (3 horas), ~80 a 100% do total de proteína contida nos filmes foi liberada destacando-se o fato de que 95% do total foi liberado na maioria dos ensaios (Tabela 13 e 14). A maior velocidade de liberação ocorre nos primeiros 20 minutos onde uma quantidade de ~35 a 90% de proteína é liberada dependendo da condição estudada. Nos primeiros 20 minutos e em t₅₀ (tempo no qual é liberada 50% da quantidade inicial de proteína) é possível avaliar melhor a velocidade de liberação dos sistemas. Para todos os filmes em Etanol 50% (v/v) a 4 °C é liberada uma quantidade inferior de proteína após 20 minutos quando comparado com os processos a 25 °C. Para os outros fluidos não há reduções expressivas na quantidade liberada em função da temperatura.

Em 25 °C há uma redução na quantidade liberada com o aumento da quantidade de proteína em água, Etanol 10% (v/v) e Etanol 50% (v/v). Em 4 °C essa redução ocorre de

forma menos expressiva em água e ácido acético, porém mais acentuada em Etanol 50% (v/v). Comparando as temperaturas, a liberação ocorre de forma mais lenta a 4 °C em Etanol 50% (v/v) para todos os filmes e varia em função da quantidade de HA nos outros fluidos estudados.

Analisando o t_{50} a 4 °C observa-se uma liberação mais lenta em Etanol 50% (v/v) e Etanol 10% (v/v) e mais rápida em água e ácido acético 3%. Em 25 °C a liberação em ácido acético 3% é mais rápida em todos os filmes. De forma geral considera-se que os sistemas são de liberação rápida de forma que a temperatura não influencia de forma expressiva na velocidade.

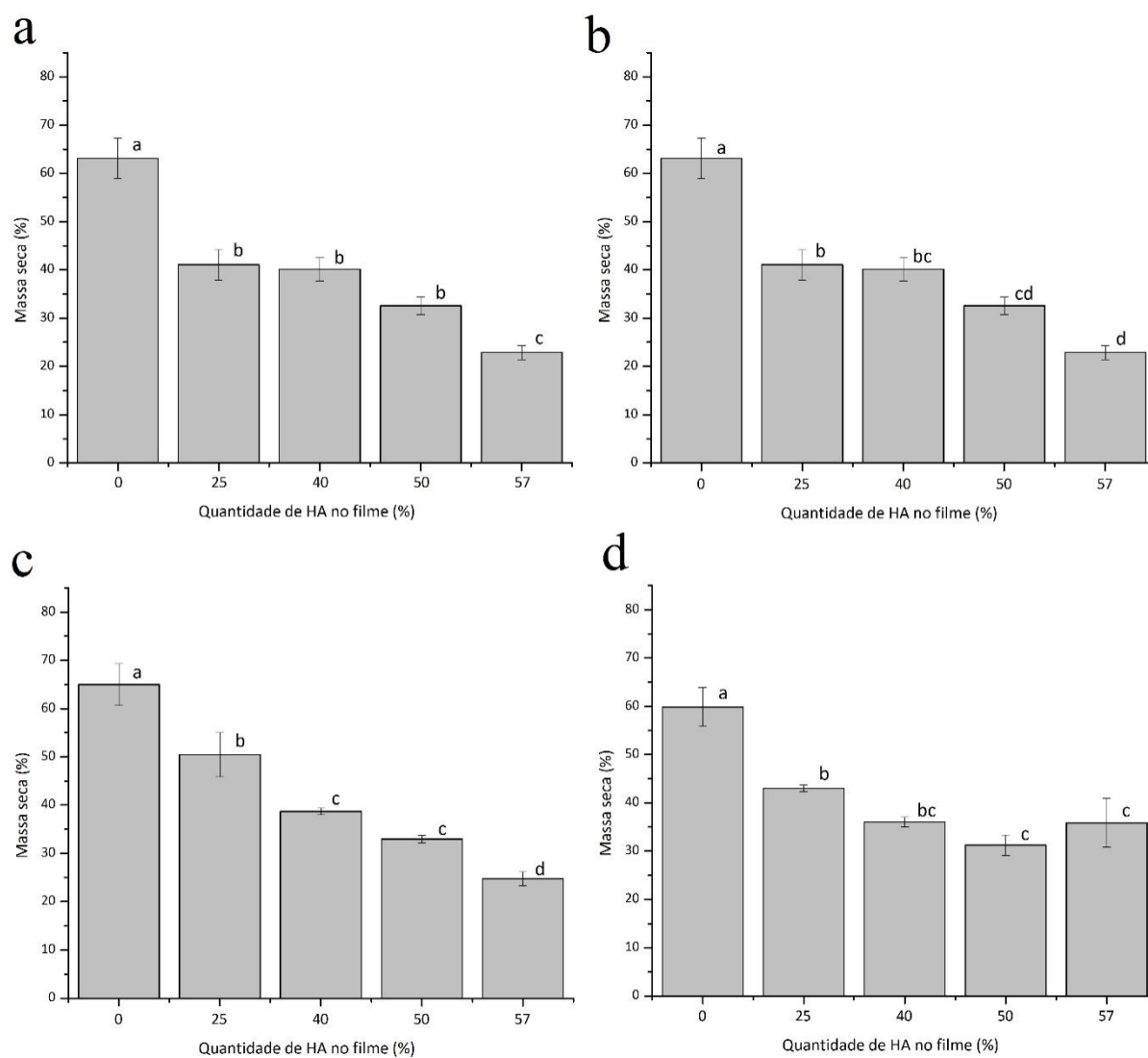
5.4.2 Massa seca dos filmes após liberação

A massa seca dos filmes após processo de liberação é apresentada nas Figuras 43 e 44. A massa seca foi reduzida com o aumento da quantidade de HA nos filmes em todas as condições estudadas em virtude da alta solubilidade do HA nos diferentes fluidos. Os valores de massa seca dos filmes controles são próximos a quantidade inicial de CBNF-HS contida nos filmes (66,7%), evidenciando uma solubilidade quase completa do sorbitol contido neles.

Em Etanol 50% (v/v), ~40% do filme foi solubilizado evidenciando uma possível perda de ~10% de CBNF-HS durante o processo. Nos outros fluidos a solubilidade variou de ~35 a ~37%, indicando uma perda menor (~2,5 a ~6%). O mesmo acontece para os filmes com HA, entretanto neste caso os filmes do sistema a 4 °C foram menos solúveis quando comparados com os filmes a 25 °C. Nessa temperatura o filme controle em ácido acético 3% teve menor solubilidade (~20%).

Além da aplicação como revestimento, filmes com essa margem de solubilidade podem ser incorporados na estruturação de produtos cárneos como frango desfiado armazenado de 0 a 3°C e filé de salmão congelado (KANATT e CHAWLA, 2018; SATHIVEL, 2005)

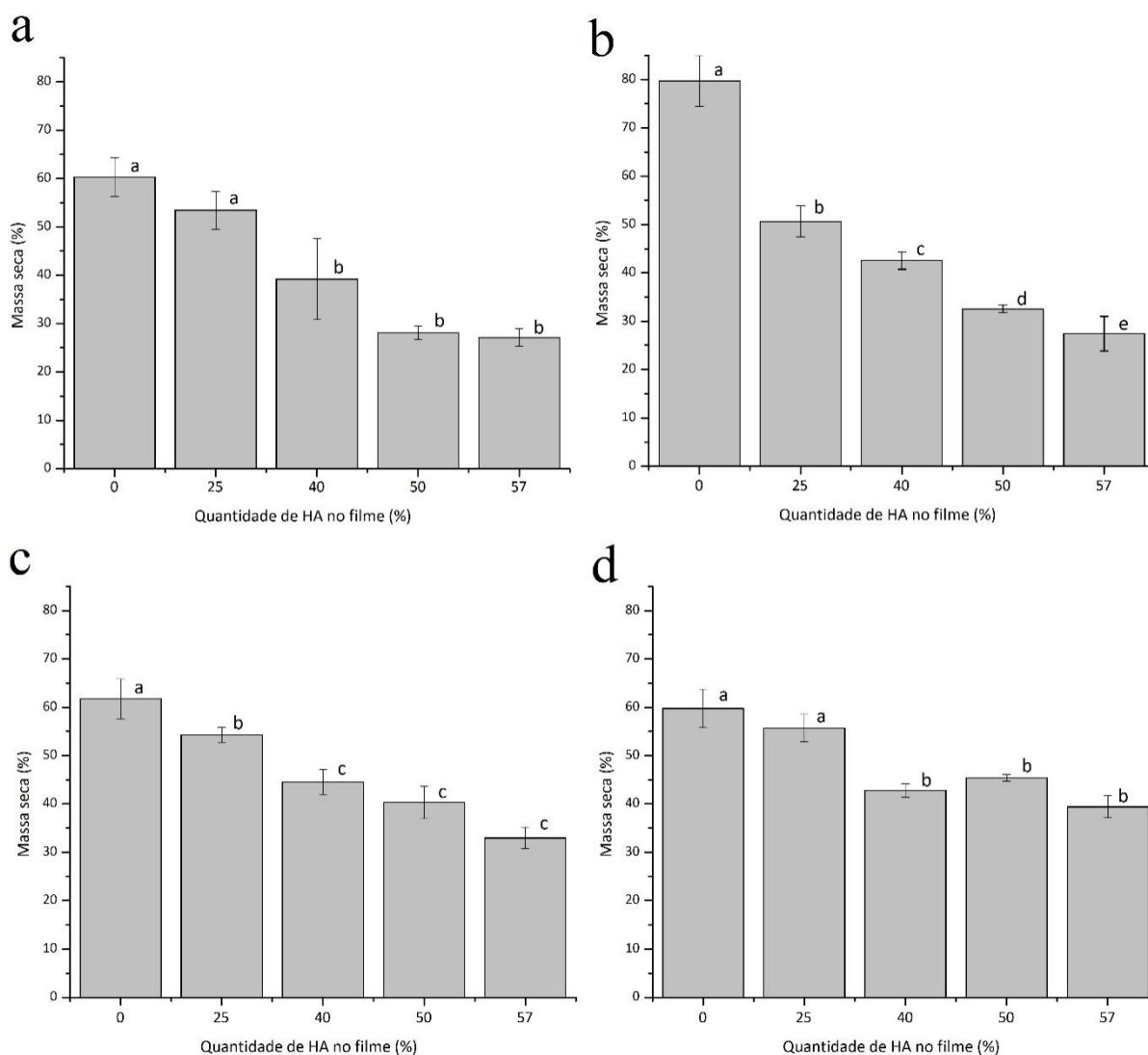
Figura 43 – Massa seca dos filmes após processo de liberação a 25 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado nos filmes de CBNF-HS, HA em: (a) Água, (b) Acético, (c) Etanol 10% (v/v), (d) Etanol 50% (v/v)



*Letras iguais em cada fluido não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$) com a variação de HA (%)

HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Figura 44 – Massa seca dos filmes após processo de liberação a 4 °C - Efeito da quantidade de hidrolisado nos filmes de CBNF-HS, HA em: (a) Água, (b) Acético, (c) Etanol 10% (v/v), (d) Etanol 50% (v/v)



*Letras iguais em cada fluido não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$) com a variação de HA (%)

HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

5.4.3 Modelagem da liberação de proteína

Para a modelagem, inicialmente cada perfil foi analisado quanto ao ajuste nos diferentes modelos descritos na metodologia. Os coeficientes de regressão (R^2) de alguns modelos estudados são apresentados no APÊNDICE E. Os demais modelos tiveram valores de $R^2 = 0$ ou < 0 e por isso não se exibiu em Tabelas. Apenas o modelo Korsmeyer-Peppas foi adequado para a descrição da maioria dos ensaios (Tabela 16).

Tabela 16 - Coeficientes de regressão ajustados para modelo de Korsmeyer-Peppas

Fluido/ HA %	25 °C				4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	<i>0,91</i>	<i>0,99</i>	<i>0,99</i>	<i>0,98</i>	<i>0,95</i>	0,88	<i>0,97</i>	<i>0,97</i>
Ácido Acético 3% (v/v)	0,84	<i>0,97</i>	<i>0,94</i>	<i>0,97</i>	0,78	0,82	<i>0,90</i>	<i>0,95</i>
Etanol 10% (v/v)	<i>0,92</i>	<i>0,99</i>	<i>0,96</i>	<i>0,98</i>	0,87	<i>0,92</i>	<i>0,94</i>	<i>0,99</i>
Etanol 50% (v/v)	<i>0,91</i>	<i>0,97</i>	<i>0,90</i>	<i>0,96</i>	0,87	0,80	<i>0,96</i>	<i>0,94</i>

HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

Através do modelo ajustado de Korsmeyer-Peppas é possível fazer uma classificação que visa caracterizar os mecanismos de transporte associados em cada sistema. Na Tabela 17 é apresentada a classificação e o expoente n de cada sistema. Os dados experimentais da modelagem pela equação de Korsmeyer-Peppas são apresentados no APÊNDICE F.

Tabela 17 - Classificação do mecanismo de transporte e expoente de liberação (n) - Modelo de Korsmeyer-Peppas: F (Difusão Fickiana, $n=0,5$), A (Transporte Anômalo, $0,5 < n < 1$), C (Caso-II, $n=1$), S (Super Caso II, $n > 1$) e N (sem classificação, $n < 0,5$)

Fluido	25 °C				4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	F (0,50)	A (0,61)	A (0,62)	F (0,50)	A (0,57)	A (0,78)	A (0,72)	F (0,49)
Ácido Acético 3% (v/v)	S (2,06)	A (0,84)	A (0,58)	N (0,44)	N (0,39)	A (0,87)	N (0,25)	A (0,65)
Etanol 10% (v/v)	S (1,31)	A (0,74)	C (0,95)	A (0,70)	C (0,96)	S (1,49)	S (1,20)	A (0,73)
Etanol 50% (v/v)	S (1,68)	S (1,12)	S (1,50)	C (1,01)	S (1,17)	A (0,53)	A (0,88)	S (1,14)

HA 25% ($HS_{50}HA_{25}S_{25}$), HA 40% ($HS_{40}HA_{40}S_{20}$), HA 50% ($HS_{33}HA_{50}S_{17}$), HA 57% ($HS_{29}HA_{57}S_{14}$)

*Para a classificação Caso-II e difusão Fickiana os valores de n foram aproximados até uma diferença de 5%.

Na equação de Korsmeyer-Peppas (equação 10), K_k é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo de liberação e o expoente n , varia de acordo com o mecanismo de liberação. Para $n=0,5$ a liberação é controlada por difusão, podendo-se aplicar a lei de Fick. Para $n=1$ a liberação é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas que resulta no intumescimento do polímero e são independentes do tempo (Caso-II). Já no perfil anômalo há contribuição do transporte Fickiano e não-Fickiano (Anômalo) ocorrendo quando n assume valores entre 0,5 e 1 (JANTRAWUT *et al.*, 2017;

ARORA *et al.*, 2011; RITGER e PEPPAS *et al.*, 1987; PEPPAS *et al.*, 1989; PEPPAS *et al.*, 2000).

Observa-se que apenas três sistemas, todos em água, foram classificados como "Difusão Fickiana" a saber: filme HS₅₀HA₂₅S₂₅ a 25 °C, HS₂₉HA₅₇S₁₄ a 25 °C e HS₂₉HA₅₇S₁₄ a 4 °C. Em ácido acético alguns sistemas apresentaram valores de $n < 0,5$ e, portanto, sem classificação (filme HS₂₉HA₅₇S₁₄ a 25 °C, HS₅₀HA₂₅S₂₅ a 4 °C e filme HS₃₃HA₅₀S₁₇ a 4 °C). Apenas 3 sistemas foram classificados como Case-II (HS₃₃HA₅₀S₁₇ em Etanol 10% (v/v) a 25 °C, HS₅₀HA₂₅S₂₅ em Etanol 10% (v/v) a 4 °C e HS₂₉HA₅₇S₁₄ em Etanol 50% (v/v) a 25 °C). O tipo de liberação depende especificamente da temperatura, do tipo de fluido e da quantidade de hidrolisado incorporado ao filme.

Os resultados deste trabalho estão em concordância com a literatura para o fato de que de forma geral em filmes poliméricos o mecanismo de liberação é complexo não sendo regido unicamente por difusão (Fickiana) mas por fenômenos de relaxação, inchamento/entumescimento polimérico, erosão e tensões (SIEPMANN *et al.*, 2012; JACQUES *et al.*, 1974). Dessa forma a lei de Fick não se aplica para descrever liberações nessas matrizes. O modelo Korsmeyer-Peppas é semi-empírico e considerado mais adequado que alguns modelos empíricos uma vez que através dele é possível identificar a influência de um fenômeno não-Fickiano associado (RITGER e PEPPER *et al.*, 1987).

6 CONCLUSÕES

Filmes antioxidantes comestíveis atóxicos, resistentes e transparentes podem ser obtidos pela combinação entre celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF), hidrolisado de gelatina de pele de tilápia (HA) e plastificante.

Nos filmes não plastificados de CBNF e HA obtidos por casting, a Aa cresce com aumento da quantidade de HA no filme até o limite de 60% (m/m). O filme contendo sorbitol (20%) e HA (40%) tem Aa superior ao filme com glicerol e ao filme não plastificado.

Filmes de CBNF e sorbitol apresentam melhor estabilidade térmica, maior módulo de elasticidade e menor solubilidade que os filmes com glicerol. A adição de HA em 40% nos filmes de CBNF plastificados com sorbitol (20%) reduziu a estabilidade térmica, tensão, módulo de elasticidade, cristalinidade e luminosidade dos filmes; aumentou a permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, transparência e cor amarelada (b^*); mantendo inalterado os ângulos de contato e a alongação.

A utilização do suco de caju como meio alternativo para a produção de CBNF é uma oportunidade quando envolvido na estruturação de sistemas de liberação rápida de compostos antioxidantes naturais a partir de uma matriz solúvel. A suspensão de nanofibras obtida a partir de CB desse meio alternativomelhorou as propriedades do filme contendo sorbitol e HA quando comparado com o filme obtido com a suspensão CBNF de meio sintético HS quanto as propriedades de tensão, alongação, estabilidade térmica e grau de cristalinidade. Tais filmes não diferiram quanto às propriedades de atividade antioxidante, cor, transparência, permeabilidade ao vapor de água e módulo de elasticidade.

A liberação de proteína dos filmes de CBNF e HA ocorre de forma rápida em fluidos simulantes com predominância de mecanismos de transporte não Fickiano associado em cada perfil. A liberação de proteína ocorre de forma mais lenta no sistema a 4 °C/etanol 50% para todos os filmes com diferentes quantidades de HA. Nos outros fluidos (água, ácido acético 3% e etanol 10%), tal velocidade varia em função da quantidade de HA.

Os filmes antioxidantes assim como os componentes analisados separadamente não apresentam toxicidade nem afetam o desenvolvimento das células epiteliais do intestino CACO-2. O hidrolisado antioxidante de gelatina de pele de tilápia apresenta atividade antioxidante intracelular quando em contato com células epiteliais do intestino humano (*in vitro*) tendo assim potencial a formulação de produtos funcionais. O HA na concentração de 2 g/L reduz o stress oxidativo de células CACO-2 tendo portanto, um efeito antioxidante *in*

vitro que varia em função da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) contidas no sistema.

Os filmes antioxidantes desenvolvidos neste trabalho tem potencial para aplicação em produtos cárneos resfriados ou congelados.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar o potencial de aplicabilidade dos filmes de CBNF e HA desenvolvidos neste trabalho em filés de pescado;
- Estudar o efeito de frações de HA sobre a atividade antioxidante e propriedades ópticas e de barreira de filmes a base de CBNF e HA;
- Avaliar a estabilidade a estocagem dos filmes de CBNF e HA desenvolvidos neste trabalho;
- Estudar a incorporação de antimicrobianos nos filmes de CBNF e HA desenvolvidos neste trabalho;
- Estudar o efeito da CBNF obtida de CB oriunda de diversas fontes alternativas sobre as propriedades de filmes a base de CBNF e HA.

REFERÊNCIAS

- ABAD, J.; CHAMORRO, S. V.; CATRO, A.; VASCO, C. Study of the effect of the combination of two nonconventional treatments, gamma irradiation and the application of an edible coating, on the postharvest quality of tamarillo (*Solanum betaceum Cav.*) fruits. **Food Control**, 2016.
- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 4, p. 847–853, 2012.
- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 343–350, 2012.
- ABEER, M. M. et al. Synthesis of a novel acrylated abietic acid-g-bacterial cellulose hydrogel by gamma irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 505–512, 2014.
- ABREU, D. A. P. et al. Lipid damage during frozen storage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in active packaging film containing antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 315–320, 2011.
- ABREU, D. A. P. et al. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (*from barley husks*) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1277–1282, 2010.
- ABREU, D. A. P. et al. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p. 50–55, 2011.
- ABREU, D. A. P.; RODRIGUEZ, K. V.; CRUZ, J. M. Extraction, purification and characterization of an antioxidant extract from barley husks and development of an antioxidant active film for food package. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 134–141, 2012.
- ACEVEDO, A. F; FORTUNY, R. S; BELLOSO, O. M. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 60, p. 12–22, 2017.
- AGUIRRE, J. A. J. et al. Effects of a natural bioactive coating on the quality and shelf life prolongation at different storage conditions of avocado (*Persea americana Mill.*) cv. Hass. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 14, p. 102–107, 2017.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.

- AHN, J.; GRUN, I. U.; FERNANDO, L. N. Antioxidant Properties of Natural Plant Extracts Containing Polyphenolic Compounds in Cooked Ground Beef. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1364–1369, 2002.
- AHN, J.; GRÜN, I. U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 7–14, 2007.
- AKDUMAN, B. et al. Reversible Immobilization of Urease by Using Bacterial Cellulose Nanofibers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 2285–2294, 2013.
- AKHTAR, M. J. et al. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1150–1158, 2012.
- ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. Immobilization of bioactive compounds in *Cassia grandis* galactomannan-based films: Influence on physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 727–735, 2017.
- ALENISAN, M. A. et al. Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**, v. 24, n. 1, p. 101–106, 2017.
- ALP, E.; AKSU, M. İ. Effects of water extract of *Urtica dioica* L. and modified atmosphere packaging on the shelf life of ground beef. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 468–473, 2010.
- ALVAREZ, O. M.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, v. 73, p. 204–212, 2015.
- AMBIGAIPALAN, P.; AL-KHALIFA, A. S.; SHAHIDI, F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. **Journal of Functional Foods**, 2015.
- AMBIGAIPALAN, P.; SHAHIDI, F. Date seed flour and hydrolysates affect physicochemical properties of muffin. **Food Bioscience**, v. 12, p. 54–60, 2015.
- AMIN, M. C. I. M.; ABADI, A. G.; KATAS, H. Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 180–189, 2014.
- AMNUAIKIT, T. et al. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. **Medical Devices: Evidence and Research**, v. 4, p. 77–81, 2011.
- ANTHIS, N. J.; CLORE, G. M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 22, n. 6, p. 851–852, 2013.

ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 550–556, 2011.

ARIHARA, K. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 219–229, 2006.

ARORA, G. et al. Formulation and evaluation of controlled release matrix mucoadhesive tablets of domperidone using *Salvia plebeian* gum. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 3, p. 163, 2011.

ASTM. **Annual book of American Standard Testing Methods**. Standard Test Method for Surface Wettability and Absorbency of Sheeted Materials Using an Automated Contact Angle Tester (Withdrawn 2010) D-5725-99. Philadelphia, 2008

ASTM. **Annual book of American Standard Testing Methods**. Standard test methods for water vapor transmission of materials E96-80. Philadelphia, 1989

ASTM. **Annual book of American Standard Testing Methods**. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D882. Philadelphia. p. 162–170., 1997

ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 678–687, 2010.

ATARÉS, L.; MASIÁ, R. P.; CHIRALT, A. The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 649–656, 2011.

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

ATEF, M.; MAHDI OJAGH, S. Health benefits and food applications of bioactive compounds from fish byproducts: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 673–681, 2017.

AVENA, R. J. B.; OLSEN, C. W.; OLSON, D.A; CHIOU, B.; YEE, E.; BECHTEL, P. J.; MCHUGH, T. H. Water Vapor Permeability of Mammalian and Fish Gelatin Films. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. E202-E207, 2006.

AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1240–1253, 2009.

AZEREDO, H. M. C. et al. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. 31–35, 2009.

AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 109–122, 2016.

BÄCKDAHL, H.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Observations on bacterial cellulose tube formation for application as vascular graft. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 1, p. 14–21, 2011.

BAE, S. O.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 45–51, 2005.

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 5, p. 1366–1371, 2004.

BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Development of microfluidization methods for efficient production of concentrated nanoemulsions: Comparison of single- and dual-channel microfluidizers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 466, p. 206–212, 2016.

BAI, X. et al. An immunoregulatory peptide from tsetse fly salivary glands of *Glossina morsitans morsitans*. **Biochimie**, v. 118, p. 123–128, 2015.

BAKSHPOUR, M. et al. Surface imprinted bacterial cellulose nanofibers for hemoglobin purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 453–459, 2017.

BALDWIN, E. A.; HAGENMAIER, R. D.; BAI, J. **Edible coatings and films to improve food quality**. CRC Press, 2012.

BALDWIN, E. A. **Edible coatings and films to improve food quality, second edition**. CRC Press, 2016.

BAÑÓN, S. et al. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. **Meat Science**, v. 77, n. 4, p. 626–633, 2007.

BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, n. 1, p. 147–152, 2003.

BAUER, A. K. et al. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, v. 169, n. 1, p. 1–15, 2001.

BERENS, A. R.; HOPFENBERG, H. B. Diffusion and relaxation in glassy polymer powders: 2. Separation of diffusion and relaxation parameters. **Polymer**, v. 19, n. 5, p. 489–496, 1978.

BESBES, I.; ALILA, S.; BOUFI, S. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 975–983, 2011.

BETIKU, E.; EMEKO, H. A.; SOLOMON, B. O. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. **Heliyon**, v. 2, n. 2, 2016.

- BIFANI, V. et al. Effects of murta (*Ugni molinae Turcz*) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 1473–1481, 2007.
- BILBAO, C. S.; BRAS, J.; WILLIAMS, t.; SÉNECHAL, T. HPMC reinforced with different cellulose nano-particles. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1549–1557, 2011.
- BILGI, E. et al. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 90, p. 2–10, 2016.
- BISKIN, S. et al. A new graft material for myringoplasty: bacterial cellulose. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 11, p. 3561–3565, 2016.
- BISWAS, A. K. K.; KESHRI, R. C. C.; BISHT, G. S. S. Effect of enrobing and antioxidants on quality characteristics of precooked pork patties under chilled and frozen storage conditions. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 733–741, 2004.
- BOLUMAR, T.; ANDERSEN, M. L.; ORLIEN, V. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1406–1412, 2011.
- BOLUMAR, T. et al. Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 7, p. 26–33, 2016.
- BORZANI, W.; DE SOUZA, S. J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1271–1272, 1995.
- BOUGATEF, A. et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1198–1205, 2009.
- BROWN, A. J. XLIII. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v. 49, n. 0, p. 432–439, 1886.
- BUDHIONO, A. et al. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 2, p. 137–143, 1999.
- BULDUM, G.; BISMARCK, A.; MANTALARIS, A. Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 2, p. 265–279, 2018.
- BUSUIOC, C. et al. Fabrication of 3D calcium phosphates based scaffolds using bacterial cellulose as template. **Ceramics International**, v. 42, n. 14, p. 15449–15458, 2016.
- ÇAKAR, F. et al. Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 35–40, 2014.

ÇAKAR, F. et al. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 7–13, 2014.

CAMPANO, C. et al. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 57–91, 2016.

CAO, L.; LIU, W.; WANG, L. Developing a green and edible film from Cassia gum: The effects of glycerol and sorbitol. **Journal of Cleaner Production**, v. 175, p. 276–282, 2018.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 729–735, 2009.

CARNEIRO, M. J. M. **Produção e caracterização de celulose bacteriana obtida a partir do suco de caju**. [s.l.] Universidade Federal Do ceará, 2015.

CARREIRA, P. et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354–7360, 2011.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717–726, 2004.

CERQUEIRA, M. A. et al. Use of Electrospinning to Develop Antimicrobial Biodegradable Multilayer Systems: Encapsulation of Cinnamaldehyde and Their Physicochemical Characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 11, p. 1874–1884, 2016.

CERQUEIRA, M. A. et al. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 175–184, 2012.

CERQUEIRA, M. A. et al. Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: Functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. **Food Research International**, v. 43, n. 8, p. 2031–2038, 2010.

CERQUEIRA, M. A. et al. Effects of Interactions between the Constituents of Chitosan-Edible Films on Their Physical Properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 8, p. 3181–3192, 2012.

CERQUEIRA, M. A. P. R. et al. **Edible food packaging: materials and processing technologies**, 2016.

CHAGAS, B. et al. Hydrolysed soy molasses as nutrient source for bacterial cellulose production. **IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. 2017.

CHAGAS, C. M. A. et al. Dextranucrase production using cashew apple juice as substrate: effect of phosphate and yeast extract addition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 3, p. 207–215, 2007.

CHAMBI, H. N. M.; GROSSO, C. R. F. Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradable films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 739–746, 2011.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications Prashant. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, C. et al. Synthesis and characterization of hydroxypropyl cellulose from bacterial cellulose. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 32, n. 4, p. 439–448, 2014.

CHEN, H.H. H. et al. Modifying bacterial cellulose with gelatin peptides for improved rehydration. **Cellulose**, v. 20, n. 4, p. 1967–1977, 2013.

CHEN, J.; PARK, H.; PARK, K. Synthesis of superporous hydrogels: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 44, n. 1, p. 53–62, 1999.

CHEN, S. et al. Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2, p. 1355–1359, 2009.

CHEUNG, I. W. Y.; LICEAGA, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Pacific Hake (*Merluccius Productus*) Hydrolysates as Cryoprotective Agents in Frozen Pacific Cod Fillet Mince. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 8, p. C588–C594, 2009.

CHI, C.F. et al. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 301–313, 2015.

CHI C. F.; HU F. Y.; WANG B; REN X. J.; DENG S. G.; WU C. W. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle. **Food Chemistry**, v. 73, p. 124–129, 2015.

CHI, C.F. et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. **Food Research International**, v. 168, p. 662–667, 2014.

CHI, C.-F. et al. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 1–10, 2015.

CHO, S. M.; GU, Y. S.; KIM, S. B. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 2, p. 221–229, 2005.

CHOI, H.; LEE, D. G. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 6–7, p. 479–486, 2012.

- CHOULITOU, E. et al. Edible coating enriched with rosemary extracts to enhance oxidative and microbial stability of smoked eel fillets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 12, n. December 2016, p. 107–113, 2017.
- COLINDRES, P.; SUSAN BREWER, M. Oxidative stability of cooked, frozen, reheated beef patties: effect of antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 5, p. 963–968, 2011.
- COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 90–103, 2007.
- CONLON, J. M. et al. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. **Peptides**, v. 57, p. 67–77, 2014.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.
- COSTA, T. S. A. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1075–1080, 2004.
- CSISZÁR, E.; NAGY, S. A comparative study on cellulose nanocrystals extracted from bleached cotton and flax and used for casting films with glycerol and sorbitol plasticisers. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 740–749, 2017.
- DASHIPOUR, A. et al. Physical, Antioxidant and Antimicrobial Characteristics of Carboxymethyl Cellulose Edible Film Cooperated with Clove Essential Oil. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 16, n. 8, p. 34–42, 2014.
- DEEPA, B. et al. Biodegradable Nanocomposite Films Based on Sodium Alginate and Cellulose Nanofibrils. **Materials** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 1, 2016.
- DENISOV, E. T.; AFANAS'EV, I. B. **Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology**, 2005
- DICASTILLO, C. L. et al. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1376–1384, 2012.
- DICASTILLO, C. L. et al. Development of New Antioxidant Active Packaging Films Based on Ethylene Vinyl Alcohol Copolymer (EVOH) and Green Tea Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7832–7840, 2011.
- DICASTILLO, C. et al. Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1052–1060, 2016.

DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DOURADO, F.; GAMA, M.; RODRIGUES, A. C. A Review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 543–553, 2017.

DROZD, R. et al. The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 462–470, 2018.

DUARTE, E. B. et al. Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites from agroindustrial wastes. **Cellulose**, v. 22, n. 5, p. 3177–3187, 2015.

DUFRESNE, A. Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 29, p. 1–8, 2017.

EASTOE, J. E. The amino acid composition of fish collagen and gelatin. **The Biochemical Journal**, v. 65, n. 2, p. 363–368, 1957.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Italian Oral Surgery**, v. 2, p. 113–119, 2014.

ESTACA, G. J. et al. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 1, p. 78–85, 2009.

ESTACA, J. G. et al. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 18–25, 2009.

ESTACA, J. G. et al. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 511–520, 2007.

ETXABIDE, A. et al. Improvement of barrier properties of fish gelatin films promoted by gelatin glycation with lactose at high temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 315–321, 2015.

EVANS, B. R. et al. Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 7, p. 917–923, 2003.

FAN, X. et al. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1068–1072, 2016.

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

FARIA, L. R. F. et al. Efeito das condições de reação na obtenção de hidrolisado de gelatina de tilápia com atividade antioxidante. **XX Simpósio nacional de bioprocessos**. 2015

FERREIRA, C. O. et al. Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 807–813, 2009.

FIJAŁKOWSKI, K. et al. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 322–328, 2016.

FLOREA, M. et al. Genome sequence and plasmid transformation of the model high-yield bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582. **Scientific reports**, v. 6, p. 23635, 2016.

FONTES, C. P. M. L. et al. Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 4, p. 493–499, 2009.

FONTES, C. P. M. L. et al. Substitution of yeast extract by ammonium sulfate for mannitol production in cashew apple juice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 69–75, 2013.

FORESTI, M. L.; VÁZQUEZ, A.; BOURY, B. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 447–467, 2017.

FREITAS DE OLIVEIRA, D. W. et al. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34–43, 2013.

FUKUZUMI, H. et al. Transparent and High Gas Barrier Films of Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 162–165, 2009.

FUKUZUMI, H. et al. Thermal stabilization of TEMPO-oxidized cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 9, p. 1502–1508, 2010.

GANIARI, S.; CHOULITOU, E.; OREOPOULOU, V. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, p. 70–82, 2017.

GAO, C. et al. Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising ϵ -polylysine nanocoatings. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 204–211, 2014.

GAO, M. et al. Rationally designed macrocyclic peptides as synergistic agonists of LPS-induced inflammatory response. **Tetrahedron**, v. 70, n. 42, p. 7664–7668, 2014.

GARCÍA, M. A. et al. Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**.v. 3, n. 4, p. 391–397, 2002.

GEA, S. et al. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105–9110, 2011.

GEMILI, S.; YEMENICIOĞLU, A.; ALTINKAYA, S. A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 453–462, 2009.

GENSKOWSKY, E. et al. Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1057–1062, 2015.

GEORGE, J. et al. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 50–57, 2011.

GIMÉNEZ, B. et al. Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 5, p. 1322–1327, 2009.

GOMES, F. P. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205–211, 2013.

GONZALEZ, N. M. T. et al. Qualitative effects of fresh and dried plum ingredients on vacuum-packaged, sliced hams. **Meat Science**, v. 83, n. 1, p. 74–81, 2009.

GOSSLAU, A. Assessment of food toxicology. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 3, p. 103–115, 2016.

GRAÜ, M. A. R.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 10, p. 438–447, 2009.

GUPTA, S. et al. Prediction of anti-inflammatory proteins/peptides: an insilico approach. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 7, 2017.

HAN, J. H.; GENNADIOS, A. Edible films and coatings. A review. **Innovations in Food Packaging**, p. 239–262, 2005.

HAN, S.; CHEN, W.; WANG, H. History Based User Interest Modeling in WWW Access. **Human-Computer Interaction. HCI Intelligent Multimodal Interaction Environments**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 308–312, 2007

HAN, Y. et al. Biosynthesis of Low Relative Molecular Mass Bacterial Cellulose in Presence of D-xylose. **Asian Journal of Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 99–103, 2016.

HAYES, J. E. et al. Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. **Meat Science**, v. 84, n. 4, p. 613–620, 2010.

HAZAVEH, P.; MOHAMMADI NAFCHI, A.; ABBASPOUR, H. The effects of sugars on moisture sorption isotherm and functional properties of cold water fish gelatin films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 370–376, 2015.

HERMANSYAH, H. et al. Preparation of the Edible Biocomposite Film Gelatin/Bacterial Cellulose Microcrystal (BCMC): Variation of Matrix Concentration, Filler, and Sonication Time. **Advanced Materials Research**, v. 789, p. 287–293, 2013

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **The Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.

HONORATO, T. L.; RODRIGUES, S. Dextranucrase Stability in Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 105–110, 2010.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 82–90, 2011.

HOWELL, N. K.; KASASE, C. Bioactive Peptides and Proteins from Fish Muscle and Collagen. **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, p. 203–223, 2010.

HSIEH, Y.C. et al. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**, v. 15, n. 4, p. 507–513, 2008.

IFUKU, S. et al. Surface Modification of Bacterial Cellulose Nanofibers for Property Enhancement of Optically Transparent Composites: Dependence on Acetyl-Group DS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1973–1978, jun. 2007.

IFUKU, S. et al. Synthesis of Silver Nanoparticles Templated by TEMPO-Mediated Oxidized Bacterial Cellulose Nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 9, p. 2714–2717, 2009.

ISHIHARA, M. et al. Utilization of d-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 986–991, 2002.

ISLAM, M. U. et al. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1166–1173, 2017.

ISOGAI, A. et al. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71–85, 2011.

ISOGAI, T.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Wood cellulose nanofibrils prepared by TEMPO electro-mediated oxidation. **Cellulose**, v. 18, n. 2, p. 421–431, 2011.

İZCI, L.; ŞİMŞEK, O. Determination of quality properties of meagre (*Argyrosomus regius*) fillets coated with chitosan-based edible films. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, p. e12386, 2018.

JACQUES, C. H. M.; HOPFENBERG, H. B.; STANNETT, V. Super Case II Transport of Organic Vapors in Glassy Polymers. In: **Permeability of Plastic Films and Coatings**. Boston, MA: Springer US, p. 73–86, 1974

JAMILAH, B.; HARVINDER, K. G. Properties of gelatins from skins of fish - Black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). **Food Chemistry**, 2002.

JANPETCH, N.; SAITO, N.; RUJIRAVANIT, R. Fabrication of bacterial cellulose-ZnO composite via solution plasma process for antibacterial applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 335–344, 2016.

JANTRAWUT, P. et al. Effect of Plasticizer Type on Tensile Property and In Vitro Indomethacin Release of Thin Films Based on Low-Methoxyl Pectin. **Polymers**, v. 9, n. 7, p. 289, 2017.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, n. 1, p. 45-50, 2005.

JEMIL, I. et al. A peptidomic approach for the identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in sardinelle protein hydrolysates fermented by *Bacillus subtilis* A26 and *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **Food Research International**, v. 89, parte 1, p. 347-458, 2016.

JIANG, F. et al. Bacterial cellulose nanofibrous membrane as thermal stable separator for lithium-ion batteries. **Journal of Power Sources**, v. 279, p. 21–27, 2015.

JIMÉNEZ, A. et al. Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 3, p. 695–702, 2013.

JIPA, I. M.; STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M. Controlled release of sorbic acid from bacterial cellulose based mono and multilayer antimicrobial films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 400–406, 2012.

JONGBERG, S. et al. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 276–283, 2011.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2015.

- JUNCU, G. et al. Drug release kinetics from carboxymethylcellulose-bacterial cellulose composite films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 2, p. 485–492, 2016.
- JUNG, D. C. C. et al. Inhibition of pork and fish oxidation by a novel plastic film coated with horseradish extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 856–861, 2009.
- KANATT, S. R.; CHAWLA, S. P. Shelf life extension of chicken packed in active film developed with mango peel extract. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, 2018.
- KARAMAN, O. et al. Synergistic Effect of Cold Plasma Treatment and RGD Peptide Coating on Cell Proliferation over Titanium Surfaces. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 13–24, 2018.
- KARGARZH, H. et al. Recent developments on nanocellulose reinforced polymer nanocomposites: A review. **Polymer**, v. 132, p. 368–393, 2017.
- KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 563–576, 2009.
- KARNJANAPRATUM, S.; BENJAKUL, S. Antioxidative gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin as affected by prior autolysis. **International Aquatic Research**, v. 7, n. 2, p. 101–114, 2015.
- KARNJANAPRATUM, S.; BENJAKUL, S. Cryoprotective and antioxidative effects of gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin. **International Journal of Refrigeration**, v. 49, p. 69–78, 2015.
- KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, n. 2, p. 220–227, 2013.
- KAWEE, N.; LAM, N. T.; SUKYAI, P. Homogenous isolation of individualized bacterial nanofibrillated cellulose by high pressure homogenization. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 394–401, 2018.
- KHAN, A. et al. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 124–129, 2015.
- KHOSRAVI, S. et al. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 858–868, 2015.
- KI, C. S. et al. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. **Polymer**, v. 46, n. 14, p. 5094–5102, 2005.
- KIM, D.Y.; NISHIYAMA, Y.; KUGA, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 9, n. 3/4, p. 361–367, 2002.

KIZILTAS, E. E. et al. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 131–138, 2015.

KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. **Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 22, n. 1, p. 366–382, 1883.

KONG, X. et al. Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 2, p. 511–517, 2008.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 3, p. 373–386, 2008.

KRYSTYNOWICZ, A. et al. Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices. **Progress in Biotechnology**, v. 17, p. 323–327, 2000.

KUI ZENG, S. et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 879–883, 2009.

KULKARNI, S. et al. Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked, frozen, re-heated beef sausage model system. **Meat Science**, v. 88, n. 1, p. 139–144, 2011.

KUROSUMI, A. et al. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333–335, 2009.

LANDIM, A. P. M. et al. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polímeros**, v. 26, n. spe, p. 82–92, 2016.

LAVOINE, N. et al. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydr Polym**, v. 90, n. 2, p. 735–764, 2012.

LENG, Q. et al. Silver adducts of four-branched histidine rich peptides exhibit synergistic antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 957–962, 2016.

LI, J. et al. Mechanical properties of cyanate ester/epoxy nanocomposites modified with plasma functionalized MWCNTs. **Composites Science and Technology**, v. 90, p. 166–173, 2014.

LI, Z. et al. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 115–119, 2015.

LIANG ZHUANG, Y.; PING SUN, L. Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. C483–489, 2011.

LIEBNER, F. et al. Aerogels from unaltered bacterial cellulose: application of scCO₂ drying for the preparation of shaped, ultra-lightweight cellulosic aerogels. **Macromolecular bioscience**, v. 10, n. 4, p. 349–352, 2010.

LIMA, H. L. S. et al. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Using Sisal Juice - An Agroindustry Waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 671–680, 2017.

LIMA, H. L. S. **Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana**. 87f. 2014. Dissertação (Mestrado em processos químicos e bioquímicos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

LIMA, L. R. et al. Cellulose nanocrystals from bacterial cellulose. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140–1147, 2015.

LIN, D. et al. Physical properties of bacterial cellulose aqueous suspensions treated by high pressure homogenizer. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 435–442, 2015.

LIN, D. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113–119, 2014.

LIN, J. B.; POH, S.; PANITCH, A. Controlled release of anti-inflammatory peptides from reducible thermosensitive nanoparticles suppresses cartilage inflammation. **Nanomedicine**, v. 12, n. 7, p. 2095–2100, 2016.

LIN, K. W.; LIN, H. Y. Quality Characteristics of Chinese-style Meatball Containing Bacterial Cellulose (Nata). **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, p. SNQ107--SNQ111, 2006.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014.

LIN, Q. et al. Protein adsorption behaviors of carboxymethylated bacterial cellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 264–269, 2015.

LIN, S. BIN; CHEN, L. C.; CHEN, H. H. Physical characteristics of surimi and bacterial cellulose composite gel. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 4, p. 1363–1379, 2011.

LIN, S. BIN et al. Adding enzymatically modified gelatin to enhance the rehydration abilities and mechanical properties of bacterial cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2195–2203, 2009.

LIN, S.B. BIN et al. The bioactive composite film prepared from bacterial cellulose and modified by hydrolyzed gelatin peptide. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 10, p. 1428–1438, 2015.

LIN, S. P. et al. Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 367–377, 2016.

LIN, S.-P. et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 2013.

LIN, S. et al. Antioxidant activity improvement of identified pine nut peptides by pulsed electric field (PEF) and the mechanism exploration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 366–372, 2017.

LIU, R. et al. A flexible polyaniline/graphene/bacterial cellulose supercapacitor electrode. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 857–864, 2017.

LÓPEZ, M. M. et al. Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Carvacrol. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13735–13753, 2013.

LU, L. et al. Targeted low-dose TNF α delivered by TCP-1 peptide exerts differential synergistic effects on anti-cancer actions of chemotherapeutic drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 475–481, 2018.

LUCYSZYN, N. et al. Physicochemical and in vitro biocompatibility of films combining reconstituted bacterial cellulose with arabinogalactan and xyloglucan. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 889–898, 2016.

LUDDEE, M. et al. Particle size of ground bacterial cellulose affecting mechanical, thermal, and moisture barrier properties of PLA/BC biocomposites. **Energy Procedia**, v. 56, p. 211–214, 2014

LUO, H. et al. Constructing a highly bioactive 3D nanofibrous bioglass scaffold via bacterial cellulose-templated sol-gel approach. **Materials Chemistry and Physics**, v. 176, p. 1–5, 2016.

LUO, H. et al. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 143, n. 1, p. 373–379, 2013.

LUVIELMO, M. DE M.; LAMAS, V. S. Revestimentos comestíveis em frutas Edible coating in fruits. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2012.

LV, X. et al. Bacterial Cellulose-Based Biomimetic Nanofibrous Scaffold with Muscle Cells for Hollow Organ Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 1, p. 19–29, 2016.

MAHBOOB, S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4296–4305, 2015.

MANSOUR, E. H.; KHALIL, A. H. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 135–141, 2000.

- MAO, Q.; FELL, C. J.; SCULLY, A. D. Self-assembled nano-phase particles for enhanced oxygen barrier coatings on polymeric materials. **Progress in Organic Coatings**, v. 76, n. 1, p. 51–59, 2013.
- MARCELA, G. M. et al. Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Effects of Three Peptide Fractions of Germinated Soybeans on Breast and Cervical Cancer Cell Lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 368–374, 2016.
- MARCOS, B. et al. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 1, n. 2, p. 140–150, 2014.
- MARINELLI, A. L. et al. Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais naturais da biodiversidade: uma contribuição para a sustentabilidade amazônica. **Polímeros**, v. 18, n. 2, p. 92–99, 2008.
- MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220–227, 2012.
- MATSUI, R. et al. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. **Food Chemistry**, v. 245, p. 750–755, 2018.
- MAYACHIEW, P.; DEVAHASTIN, S. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 594–601, 2010.
- MCMILLIN, K. W. Advancements in meat packaging. **Meat Science**, v. 132, p. 153–162, 2017.
- MENDIS, E. et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, 2005.
- MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005.
- MOHAMMADI AZAD, Z. et al. *In vitro* synergistic effects of a short cationic peptide and clinically used antibiotics against drug-resistant isolates of *Brucella melitensis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 919–926, 2017.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; DOOSTHOSEINI, K.; AZIN, M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (bc) production by *gluconacetobacter xylinus* (ptcc 1734). **Cellulose Chem. Technol**, v. 49, p. 5–6, 2015.

- MOOSAVI-NASAB, M. et al. Fermentative Production and Characterization of Carboxymethyl Bacterial Cellulose Using Date Syrup. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 4, n. 8, 2010.
- MORAES, D. A. **Otimização da produção de nisina em meio sintético**.2002. 161f. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos). Universidade de São Paulo. Faculdade de ciências farmacêuticas. São Paulo, 2008
- MORENO, O.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 353–364, 2015.
- MUHAMAD, I. I.; PA'E, N.; ZAHAN, K. A. Sustainable and Economical Production of Biocellulose from Agricultural Wastes in Reducing Global Warming and Preservation of the Forestry. **Sustainable Economic Development**, p. 141-154, 2017.
- MUHALDIN, B. J. et al. Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. **Food Control**, v. 59, p. 27–30, 2016.
- MUXIKA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358–1368, 2017.
- NAGAI, T.; SUZUKI, N. Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 277–281, 2000.
- NALINANON, S. et al. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1354–1362, 2011.
- NASRI, M. Chapter Four – Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 81, p. 109–159, 2017.
- NEERA; RAMANA, K. V.; BATRA, H. V. Occurrence of Cellulose-Producing *Gluconacetobacter spp.* in Fruit Samples and Kombucha Tea, and Production of the Biopolymer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 4, p. 1162–1173, 2015.
- NERÍN, C. et al. Stabilization of Beef Meat by a New Active Packaging Containing Natural Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7840–7846, 2006.
- NEVES, A. C. et al. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 218, 2017.
- NGO, D.-H. H. et al. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 2, p. 107–117, 2010.

- NGUYEN, V. T. T.; GIDLEY, M. J. J.; DYKES, G. A. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 471–478, 2008.
- NIKOO, M.; BENJAKUL, S.; XU, X. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. **Food Chemistry**, v. 181, p. 295–303, 2015.
- NOCIARI, M. M. et al. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 213, n. 2, p. 157–167, jun. 1998.
- NORAJIT, K.; KIM, K. M.; RYU, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377–384, 2010.
- NOWAK, A. et al. Ellagitannins from *Rubus idaeus*L. Exert Geno- and Cytotoxic Effects against Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 14 p. 2947–2955, 2017.
- NUANMANO, S.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S. Potential use of gelatin hydrolysate as plasticizer in fish myofibrillar protein film. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 61–68, 2015.
- NUÑEZ DE GONZALEZ, M. T. et al. Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 997–1004, 2008.
- HANANI, Z. A. N. et al. Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 264–269, 2013.
- OCHIAI, A. et al. Rice Bran Protein as a Potent Source of Antimelanogenic Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 10, p. 2545–2551, 2016.
- MÉNDEZ, C. E. O. et al. Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Biotechnology**, v. 240, p. 76-84, 2016.
- OGATA, S. et al. Drag Reduction of a Pipe Flow Using Nata de Coco Suspensions. **Advances in Mechanical Engineering**, v. 14, p. 1-8, 2015.
- OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5598–5605, 2004.
- PÄÄKKÖ, M. et al. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.

- PADRÃO, J. et al. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 126–140, 2016.
- PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; GUIMARÃES, T. R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros**, v. 16, n. 2, p. 136–140, 2006.
- PANAGOPOULOU, E. et al. Olive oil emulsions formed by catastrophic phase inversion using bacterial cellulose and whey protein isolate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 486, p. 203–210, 2015.
- PARK, K.-J.; HYUN, C.-K. Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 5, p. 633–638, 2002.
- PARK, S. Y. et al. Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 88–95, 2016.
- PARK, S.-I.; KIM, J.-W.; YOEO, S. M. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 52, n. 1, p. 98–106, 2015.
- PASTOR, C. et al. Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 272–280, 2013.
- PAXIMADA, P. et al. Effect of bacterial cellulose addition on physical properties of WPI emulsions. Comparison with common thickeners. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 245–254, 2016.
- PAXIMADA, P. et al. Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 225–232, 2016.
- PECORARO, É. et al. Chapter 17 - Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 369–383, 2007.
- PEI, Y. et al. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1752–1760, 2013.
- PENG, Y.; WU, Y.; LI, Y. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 282–289, 2013.
- PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.
- PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

- PEREIRA, F. V. et al. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1209–1219, 2014.
- ESPITIA, P. J. P. et al. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 187–204, 2012.
- PIHLANTO, A.; HANNU, K.; ANNE, P. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945–960, 2006.
- PIÑEROS, D. H. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, 2017.
- PODSHIVALOV, A. et al. Gelatin/potato starch edible biocomposite films: Correlation between morphology and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1162–1172, 2017.
- PORTO, L. C. **Filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico): efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água.** 2017. 81f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2007.
- POURJAVAHER, S. et al. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 193–201, 2017.
- PU, C.; TANG, W. Affinity and selectivity of anchovy antibacterial peptide for *Staphylococcus aureus* cell membrane lipid and its application in whole milk. **Food Control**, v. 72, p. 153–163, 2017.
- QIAN, Z. J.; JUNG, W.K.; KIM, S.K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1690–1698, 2008.
- QIN, Y. Y. et al. Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1471–1479, 2015.
- RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUES, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5574–5580, 2009.
- RAGAERT, K.; DELVA, L.; VAN GEEM, K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. **Waste Management**, v. 69, p. 24–58, 2017.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RDC. Brasil. **Resolução RDC nº259** de 2002, Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da União, Brasília. 2002.

REIS, L. C. B. et al. Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 382–391, 2015.

REN, J. et al. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 727–736, 2008.

REN, Y. et al. Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (*Buthus martensii Karsch*) protein. **Food Research International**, v. 64, p. 931–938, 2014.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 323–330, 2004.

RINDLAV, A. W. et al. Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2–3, p. 217–224, 1998.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23–36, 1987.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 369–375, 2010.

RODIONOVA, G.; ERIKSEN, Ø.; GREGERSEN, Ø. TEMPO-oxidized cellulose nanofiber films: effect of surface morphology on water resistance. **Cellulose**, v. 19, n. 4, p. 1115–1123, 2012.

RODIONOVA, G. et al. Mechanical and oxygen barrier properties of films prepared from fibrillated dispersions of TEMPO-oxidized Norway spruce and Eucalyptus pulps. **Cellulose**, v. 19, n. 3, p. 705–711, 2012.

ROMAN, M. Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review. **Industrial Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25–33, 2015.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y. Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 545–557, 2015.

ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 82–88, 2001.

RYZHAK, A. P. et al. The antiatherosclerotic effects of a geroprotector peptide. **Advances in Gerontology**, v. 2, n. 4, p. 332–335, 2012.

SABAGHI, M. et al. Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 224–228, 2015.

SACUI, I. A. et al. Comparison of the Properties of Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Isolated from Bacteria, Tunicate, and Wood Processed Using Acid, Enzymatic, Mechanical, and Oxidative Methods. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6127–6138, 2014.

GALOOYAK, S. S. ; DABIR, B.; ZOLFAGHARI, M. An innovative numerical approach for simulation of emulsion formation in a Microfluidizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 487, p. 169–179, 2015.

SAITO, T. et al. TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1983–1989, 2004.

SAITO, T. et al. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2485–2491, 2007.

SAITO, T. et al. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 1687–1691, 2006.

SAITO, T. et al. Self-aligned integration of native cellulose nanofibrils towards producing diverse bulk materials. **Soft Matter**, v. 7, n. 19, p. 8804–8809, 2011.

SALGADO, P. R. et al. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1433–1440, 2011.

SALGADO, P. R. et al. Edible films and coatings containing bioactives. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 86–92, 2015.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.

SAMPAIO, A. P. C. et al. Life cycle assessment from early development stages: the case of gelatin extracted from tilapia residues. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 22, n. 5, p. 767–783, 2017.

- SANCHEZ, E. M. S. et al. Compósito de resina de poliéster insaturado com bagaço de cana-de-açúcar: influência do tratamento das fibras nas propriedades. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 194–200, 2010.
- SANCHO, S. DE O. et al. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 878–882, 2007.
- SANTOS, S. M. et al. Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration. Part II: application on real samples. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 3, p. 1553–1561, 2016.
- SANTOS, N. A. F. et al. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon**, 2015.
- SATHIVEL, S. Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets During Frozen Storage. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 8, p. 455–459, 2005.
- SOUZA, M. V. N. Utilização do TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) na oxidação de álcoois primários e secundários. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 287–292, 2004.
- SCHLUFTER, K.; HEINZE, T. Carboxymethylation of Bacterial Cellulose. **Macromolecular Symposia**, v. 294, n. 2, p. 117–124, 2010.
- SCHMID, M. et al. Effects of Hydrolysed Whey Proteins on the Techno-Functional Characteristics of Whey Protein-Based Films. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 927–940, 2013.
- SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 3. Substrates and inhibitors. **The Biochemical journal**, v. 67, n. 4, p. 669–679, 1957.
- SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of general microbiology**, v. 11, n. 1, p. 123–129, 1954.
- SEE, S. F. et al. Physicochemical properties of gelatins extracted from skins of different freshwater fish species. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 809–816, 2010.
- SETRERRAHMANE, S. et al. Novel production method of innovative antiangiogenic and antitumor small peptides in *Escherichia coli*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 11, p. 3207–3220, 2017.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 639–644, 2006.
- SHAH, M. A.; BOSCO, S. J. D.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, n. 1, p. 21–33, 2014.

- SHAH, N. et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.
- SHENOY, D. et al. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4107–4111, 2011.
- SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014.
- SHIMIZU, M. Food-derived peptides and intestinal functions. **BioFactors**, v. 21, n. 1–4, p. 43–47, 2004.
- SIEPMANN, J. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 163–174, 2012.
- SILA, A.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. **A review Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 10-26, 2016.
- SILVA, W. A. et al. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 4, p. 200–216, 2013.
- SILVEIRA, M. S. et al. Cashew Apple Juice as Substrate for Lactic Acid Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 947–953, 2012.
- SINGH, S. et al. Carnauba wax-based edible coating enhances shelf-life and retain quality of eggplant (*Solanum melongena*) fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 420–426, 2016.
- SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 728-765, 2010.
- SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 425–432, 2009.
- SIQUEIRA, G. et al. Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fiber. **Cellulose**, v. 17, n. December 2010, p. 1147–1158, 2011.
- SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 770–775, 2010.
- SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102–108, 2012.

- SONI, B. et al. Transparent bionanocomposite films based on chitosan and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers with enhanced mechanical and barrier properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 779–789, 2016.
- SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Water Vapor Permeability and Solubility of Films from Hydrolyzed Whey Protein. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 700–703, 2000.
- STOICA-GUZUN, A. et al. Box-Behnken experimental design for chromium(VI) ions removal by bacterial cellulose-magnetite composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1062–1072, 2016.
- SUÁREZ, G. M. J. et al. In vitro antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities of collagen hydrolysates of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproducts. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 421–427, 2015.
- SUN, J. et al. Pancreatic β -Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota. **Immunity**, v. 43, n. 2, p. 304–317, 2015.
- SUN, L.; ZHANG, Y.; ZHUANG, Y. Antiphotobleaching effect and purification of an antioxidant peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) gelatin peptides. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 154–162, 2013.
- SYVERUD, K.; STENIUS, P. Strength and barrier properties of MFC films. **Cellulose**, v. 16, n. 1, p. 75–85, 2009.
- TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 287–301, 1998.
- TAVASSOLI-KAFRANI, E.; SHEKARCHIZADEH, H.; MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 360–374, 2016.
- TERCJAK, A. et al. Nano- and Macroscale Structural and Mechanical Properties of in Situ Synthesized Bacterial Cellulose/PEO- *b*-PPO- *b*-PEO Biocomposites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 7, p. 4142–4150, 2015.
- TERCJAK, A. et al. Switchable photoluminescence liquid crystal coated bacterial cellulose films with conductive response. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 188–197, 2016.
- THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. E172–E176, 2006.
- TINGAUT, P.; ZIMMERMANN, T.; LOPEZ-SUEVOS, F. Synthesis and Characterization of Bionanocomposites with Tunable Properties from Poly(lactic acid) and Acetylated Microfibrillated Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 2, p. 454–464, 2010.

- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1571–1579, 2012.
- TONGNUANCHAN, P. et al. Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 248–259, jun. 2015.
- TROVATTI, E. et al. Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n.3, p. 1417-1420, 2011.
- TSALAGKAS, D. et al. Fabrication of bacterial cellulose thin films self-assembled from sonochemically prepared nanofibrils and its characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 28, p. 136–143, 2016.
- UDENIGWE, C.; ROUVINEN-WATT, K. The Role of Food Peptides in Lipid Metabolism during Dyslipidemia and Associated Health Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9303–9313, 2015.
- UETANI, K.; YANO, H. Zeta Potential Time Dependence Reveals the Swelling Dynamics of Wood Cellulose Nanofibrils. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 818–827, 2012.
- ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 2016.
- VALDÉS, A. et al. Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. **Frontiers in chemistry**, v. 2, p. 6, 2014.
- VALERO, D. et al. Effects of alginate edible coating on preserving fruit quality in four plum cultivars during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 1–6, 2013.
- VAN DAELE, Y. et al. Characterization and supramolecular architecture of the cellulose-protein fibrils in the tunic of the sea peach (*Halocynthia papillosa*, Ascidiacea, Urochordata). **Biology of the Cell**, v. 76, p. 87–96, 1992.
- VASCONCELOS, N. F. **Nanocristais de celulose bacteriana carboximetilada como poliânion na preparação de complexo polieletrólítico**. 2015. 126f. Dissertação (Mestrado em química). Tese. Universidade Federal do Ceará, 2015.
- VASCONCELOS, N. F. et al. Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425–431, 2017.
- VAZQUEZ, A. et al. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013.

- VÉLIZ, D. S. et al. On the non-linear attachment characteristics of blood to bacterial cellulose/kaolin biomaterials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.116, p. 176-182, 2014.
- VITAL, A. C. P. et al. Effect of Edible and Active Coating (with Rosemary and Oregano Essential Oils) on Beef Characteristics and Consumer Acceptability. **Plos One**, v. 11, n. 8, p. e0160535, 2016.
- VOLPE, M. G. et al. Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 615–622, 2015.
- WAN, H. et al. A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. **Food Chemistry**, v. 175, p. 601–608, 2015.
- WANG, S. et al. Influence of urea and glycerol on functional properties of biodegradable PVA/xylan composite films. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 495–505, 2014.
- WATANABE, K. et al. Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187–200, 1998.
- WELLISCH, E. et al. Interaction of cellulose with small molecules. Glycerol and ethylene carbonate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 3, n. 9, p. 331–337, 1960.
- WESSLING, C. et al. Mobility of alpha-tocopherol and BHT in LDPE in contact with fatty food simulants. **Food additives and contaminants**, v. 15, n. 6, p. 709–715, 1998.
- WU, H. et al. Fabrication and investigation of a biocompatible microfilament with high mechanical performance based on regenerated bacterial cellulose and bacterial cellulose. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 516–524, 2017.
- XIANG, N. et al. Methodology for identification of pore forming antimicrobial peptides from soy protein subunits β -conglycinin and glycinin. **Peptides**, v. 85, p. 27–40, 2016.
- XIE, H.; WEI, J.; QIN, Q. Antiviral function of Tachyplesin I against iridovirus and nodavirus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 96–102, 2016.
- XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1–7, 2015.
- YAMADA, Y. et al. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 849–859, 2012.
- YANG, J. I. I. et al. Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1152–1157, 2009.

YANG, J.-I. et al. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 128–136, 2008.

YAO, W. et al. In vitro enzymatic conversion of γ -aminobutyric acid immobilization of glutamate decarboxylase with bacterial cellulose membrane (BCM) and non-linear model establishment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4, p. 258–264, 2013.

YARNPAKDEE, S. et al. Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H_2O_2 and AAPH. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6194–6205, 2015.

YOSHIMURA, K. et al. Physical properties of shark gelatin compared with pig gelatin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 26, p. 2023–2027, 2000.

YOSHINO, A. et al. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6116–6122, 2013.

YOUSEFI, H. et al. Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers/ground cellulose nanofibers of canola straw. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 732–737, 2013.

YUAN, G. et al. Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11034–11045, 2015.

YUNOS, M. Z. B.; RAHMAN, W. A. W. A. Effect of Glycerol on Performance Rice Straw/Starch Based Polymer. **Journal of Applied Sciences**, v. 11, n. 13, p. 2456–2459, 2011.

ZAFAR, R. et al. Polysaccharide based bionanocomposites, properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1012–1024, 2016.

ZANG, S. et al. Ordered manufactured bacterial cellulose as biomaterial of tissue engineering. **Materials Letters**, v. 128, p. 314–318, 2014.

ZENG, X.; SMALL, D. P.; WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 506–513, 2011.

ZHANG, J. et al. Immobilization of lecithin on bacterial cellulose nanofibers for improved biological functions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 91, p. 100–107, 2015.

ZHANG, R. et al. Antioxidant and hypoglycaemic effects of tilapia skin collagen peptide in mice. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 10, p. 2157–2163, 2016.

ZHANG, S. B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 202, p. 1–8, 2016.

ZHAO, H. et al. Characterization of a bioactive peptide with cytomodulatory effect released from casein. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 2, p. 315–322, 2014.

ZHAO, Q. Y. et al. Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 778–784, 1996.

ZHONGKAI, Z.; GUOYING, L.; BI, S. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, p. 23, 2006.

APÊNDICE A - PURIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

Para a avaliação da qualidade do método de purificação realizou-se análises CB de ATG (análises termograviméticas) (Figura A1) e FTIR (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) (Figura A2). No ATG de películas puras é comum o aparecimento de apenas um evento de degradação que ocorre em $T_i \sim 260 \text{ }^\circ\text{C}$ e $T_{\text{máx}} \sim 330 \text{ }^\circ\text{C}$. No FTIR películas de CB impuras é comum o aparecimento de banda intensa em 1632 cm^{-1} referentes a impurezas de origem protéicas oriundas do meio de cultivo ou biomassa bacteriana.

Figura A1 - Perfil termogravimétrico típico de películas de CB puras e impuras

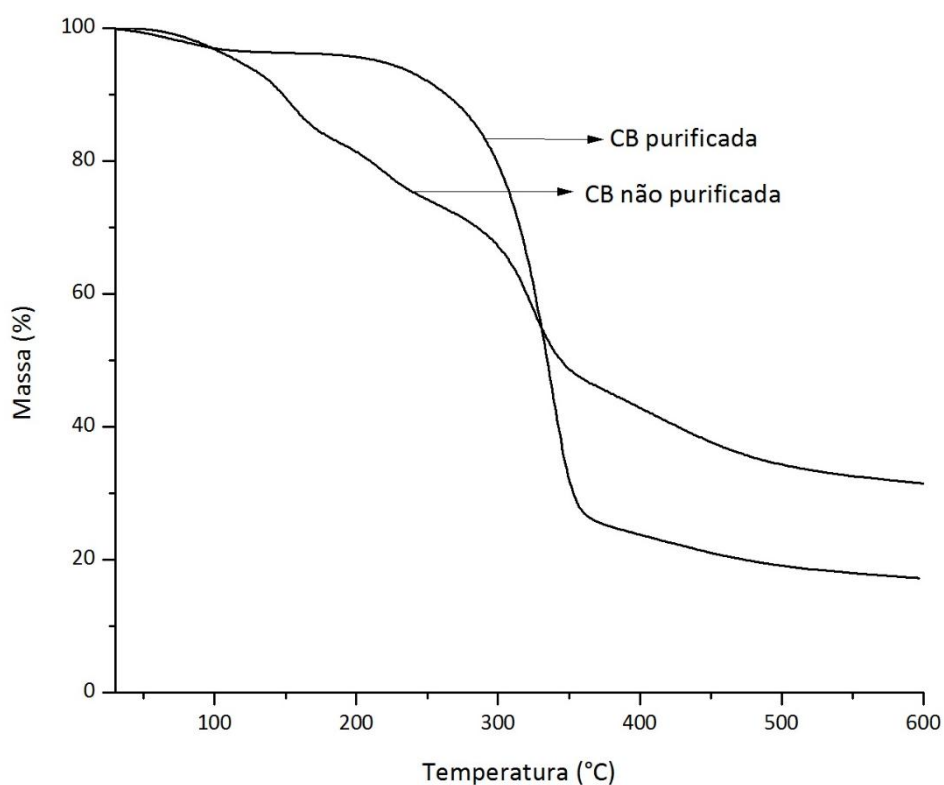
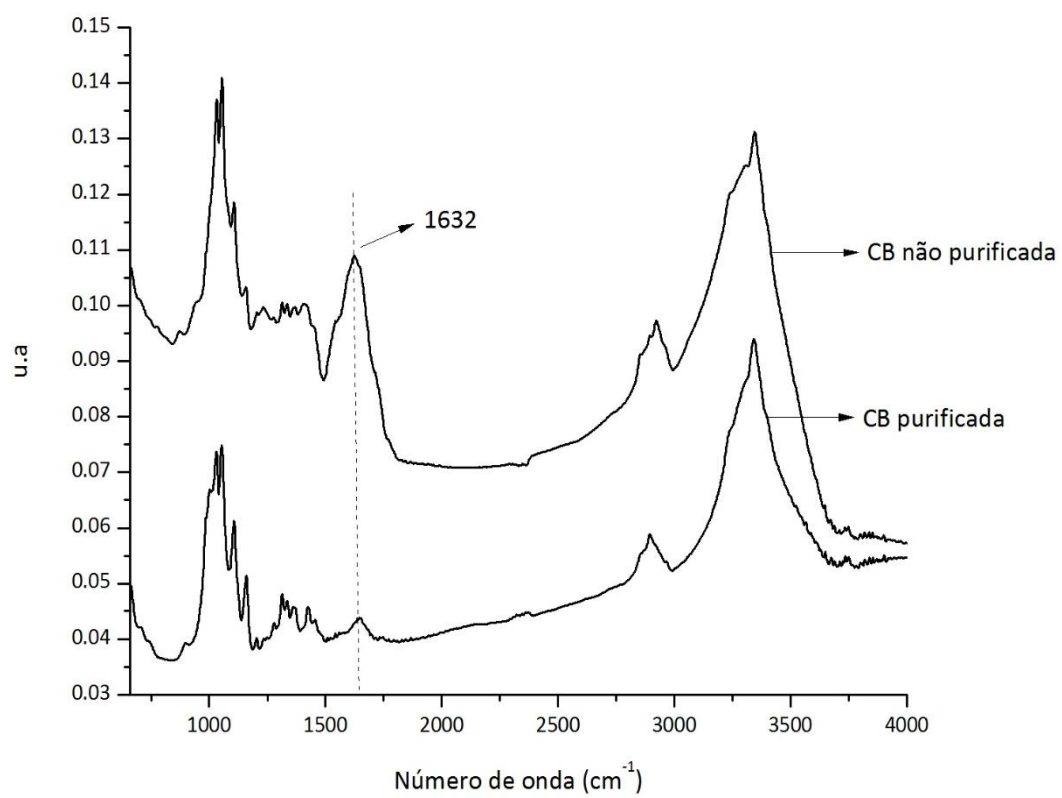


Figura A2 - FTIR típico de películas de CB puras e impuras

APÊNDICE B - OBTENÇÃO DE IMOBILIZADO ANTIOXIDANTE DE CB OU CBCXM OBTIDOS POR ADSORÇÃO

1. Objetivo

Avaliar o efeito do tempo de adsorção e da concentração inicial de hidrolisado (HA) sobre a atividade antioxidante (Aox) em três matrizes de celulose bacteriana (CB) a saber: CB liofilizada, CB úmida, CB carboximetilada. A obtenção dos materiais não descritos neste apêndice seguiu a metodologia descrita anteriormente.

2. Metodologia

2.1 Membrana de celulose bacteriana carboximetilada (CBCXM)

A metodologia para a obtenção de membranas de celulose bacteriana carboximetilada (CBCXM) (FiguraA1d) foi adaptada de várias metodologias (SCHLUFTER *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015). Para tal, 10 películas úmidas de CB-HS de área $\sim 28 \text{ cm}^2$ foram cortadas em quatro partes iguais cada (totalizando 40 pedaços, 1,36 g de CB em massa seca) e imersas em álcool isopropílico sob agitação (100 rpm). Inicialmente adicionou-se por gotejamento 400 mL NaOH 30% ao sistema durante uma hora (vazão de 0,4 L/h). Em seguida adicionou-se 130g de ácido monocloracético (previamente diluído em 500mL de álcool isopropílico) por gotejamento ao sistema previamente ajustado para 60 °C, durante 1 hora (vazão de 0,5 L/h). Após isso o sistema manteve-se sob agitação por 2 h. A reação foi finalizada pela remoção das películas da solução e posterior imersão em água e neutralização. As películas carboximetiladas neutras foram armazenadas sob refrigeração por até 48 horas antes da realização dos testes.

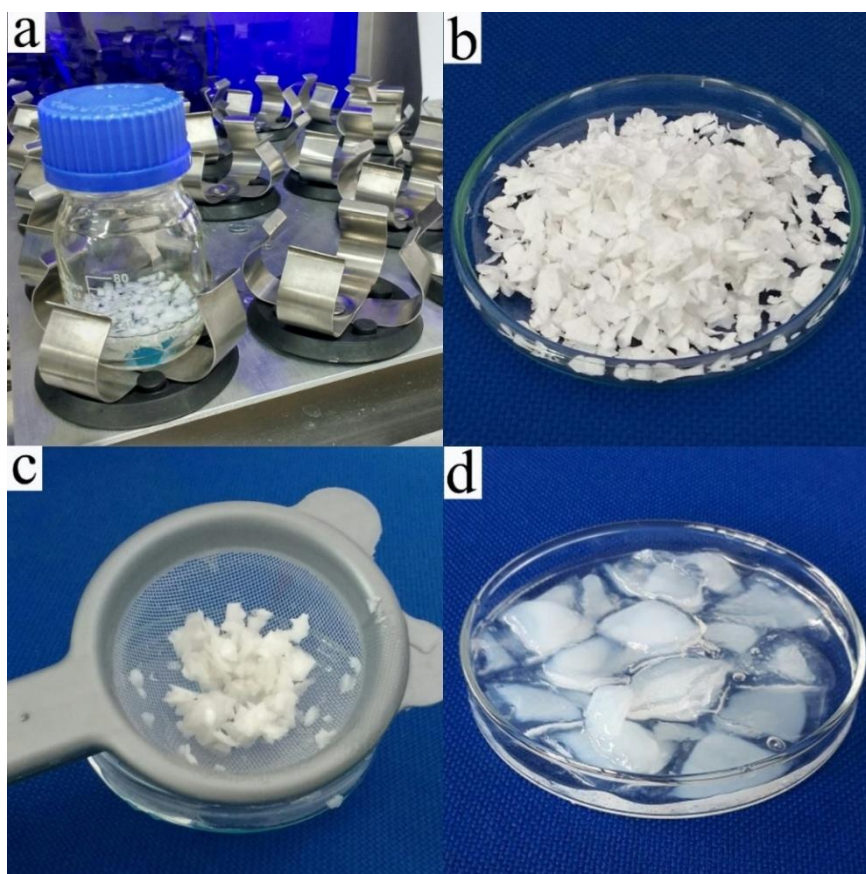
2.2 Estudo de Adsorção de HA em membranas de CB e CBCXM

Para incorporação de HA em membranas de CB por adsorção utilizou-se a técnica de banho-finito sob agitação e temperatura controladas (150 rpm, 27 °C) em frascos Schott de 100 mL com 20 mL de HA ajustado para diferentes concentrações e pH (FiguraA1a). Após cada tempo de adsorção, separou-se o sobrenadante e as películas foram com água deionizada para a remoção dos peptídeos não aderidos na matriz antes da análise de atividade antioxidante.

Para a lavagem as películas foram mergulhadas em 50 mL de água por 3 vezes sucessivas (FiguraA1c).

Num teste preliminar, visando ajustes de tempo, pH e concentração em testes futuros, avaliou-se o efeito da concentração de HA (5 e 10 g/L, m/v, pH 5), acompanhando a cinética de adsorção através dos tempos de 0,25, 1, 6, 18 e 24 horas, sobre a atividade antioxidante do imobilizado (CB+HA). A CB liofilizada (tipo 2 cortada em pedaços de 9 mm²) foi utilizada como adsorvente na proporção de 100 mg de CB seca por sistema(FiguraA1b).

Figura B1: (a) Sistema de agitação para adsorção, (b) Películas de CB liofilizadas cortadas em pedaços, (c) Películas separadas do hidrolisado após tempo de adsorção, (d) Películas de CB Carboximetilada cortadas em pedaços.



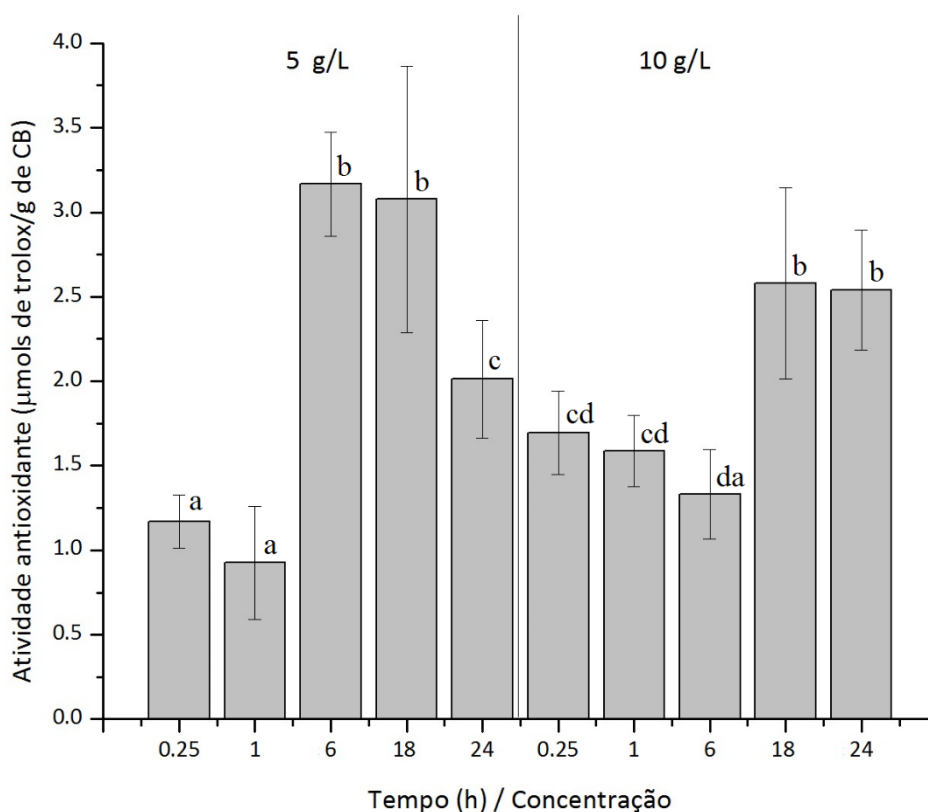
Posteriormente avaliou-se o efeito da concentração de HA (1; 5 e 20 g/L, m/v) e do pH (3 e 7), acompanhando a cinética de adsorção nos tempos de 0,25, 1, 6 e 24 horas, sobre a atividade antioxidante do imobilizado (CB+HA). Neste estudo, utilizou-se CB-HS e CB-HS carboximetilada (CBCXM) como adsorvente, todas em estado úmido na proporção de 100 mg

(em peso seco) por sistema cortadas em pedaços de 5 cm². A massa seca dos adsorventes foi Determinadapreviamente por secagem em estufa (105 °C, 25 horas) de uma amostra de película úmida onde estabeleceu-se uma relação massa seca por massa úmida para cada tipo (CB-HS ou CBCXM).

3. Resultados

Inicialmente avaliou-se o efeito do tempo de adsorção e da concentração inicial de HA (hidrolisado bruto) sobre a atividade antioxidante do imobilizado HA/CB-HS liofilizada.

FiguraB2 - Atividade antioxidante do imobilizado CB-HS liofilizada/HA obtido por adsorção em pH 5 do HA – Efeito do tempo de contato e concentração de HA



Letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,1$)

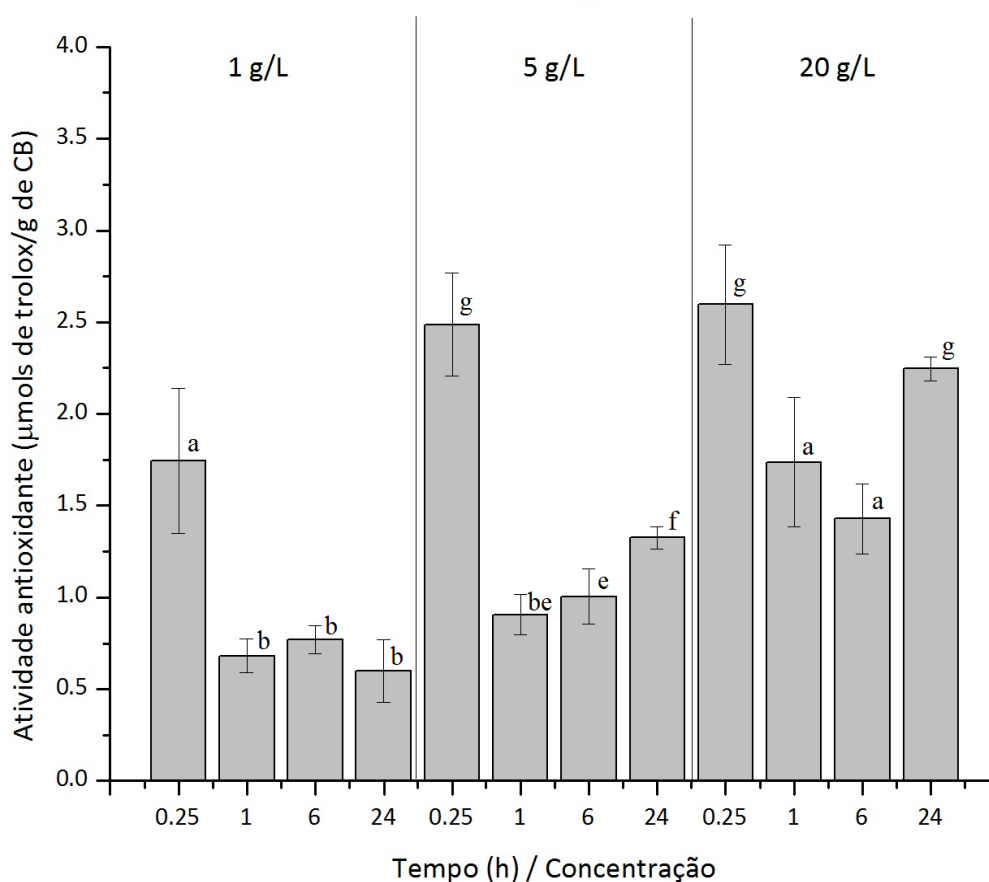
O valor do pH de imobilização escolhido para o primeiro teste foi 5, pH natural do hidrolisado após sua obtenção. As maiores atividades no derivado CB/HA (~3,2 µmols de trolox/g de CB) foram obtidas nos tempos de 6 e 18 horas na concentração de 5 g/L e 18 e 24

horas na concentração de 10 g/L (Figura 8).

Sendo a liofilização um processo que aumenta custos e pensando na simplificação do processo, na segunda etapa avaliou-se o efeito da CB em estado úmido. No estudo com membranas de CB carboximetilada de meio sintético (CBCXM-HS) objetivou-se a obtenção de melhores resultados, uma vez que a literatura aponta para a funcionalização química como uma forma de melhorar a capacidade de adsorção desse tipo de matriz polimérica (LIN *et al.*, 2015).

As atividades antioxidantes nas matrizes úmidas em função da concentração, pH e tempo são apresentadas nas Figuras 9,10,11 e 12.

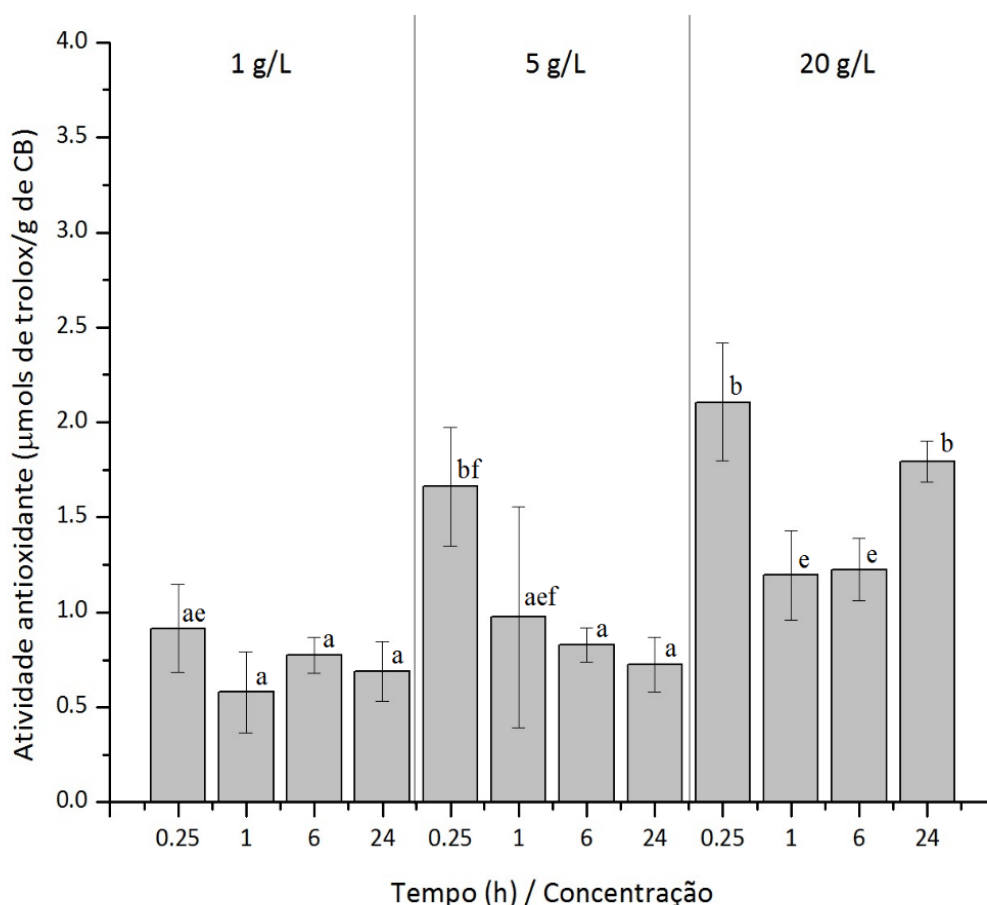
Figura B3 – Atividade antioxidante do imobilizado CB-HS úmida /HA – Adsorção em pH 3 e efeito da concentração de HA



Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$)

Na matriz CBCXM-HS a maior atividade (3,51 μmols de trolox/g de CB) foi obtida em pH 3, concentração inicial de hidrolisado (C_i) de 20 g/L e tempo de 6 e 24 horas de contato. Comparando com o pH 7, as atividades são estatisticamente maiores apenas em $C_i=20$ g/L em todos os tempos e em $C_i=5$ g/L em 15 minutos. Na matriz CB-HS a maior atividade (2,49 μmols de trolox/g de CB) foi obtida em pH 3, $C_i= 5$ e 20 g/L e tempo de 15 minutos. Comparando com os sistemas em pH 7, as atividades são estatisticamente maiores apenas em $C_i=1$ g/L por 15 minutos, $C_i=5$ g/L em 15 minutos e 14horas e $C_i=20$ g/L em 24 horas. Comparando esses dois tipos de matrizes nos dois pHs estudados, as maiores atividades foram obtidas em CBCXM na maior concentração (20 g/L) nos tempos de 24 ou 6 horas.

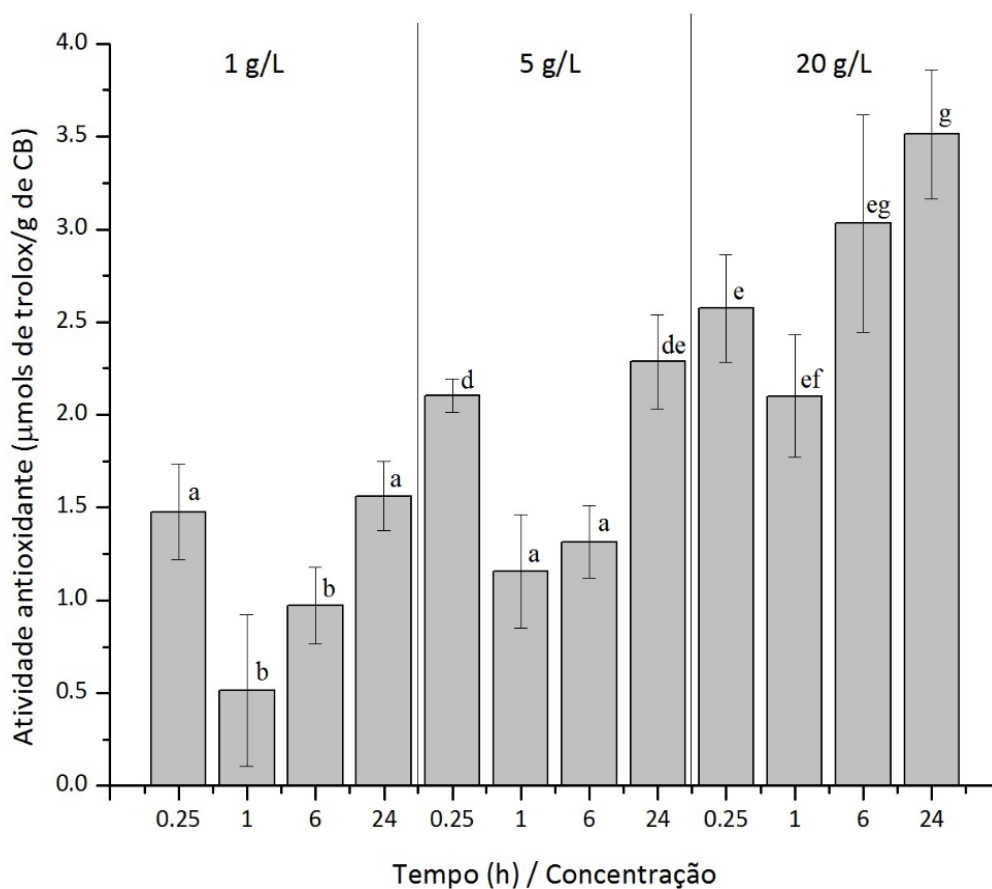
Figura B4 – Atividade antioxidante do imobilizado CB-HS úmida/HA – Adsorção em pH 7 e efeito da concentração de HA



Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$)

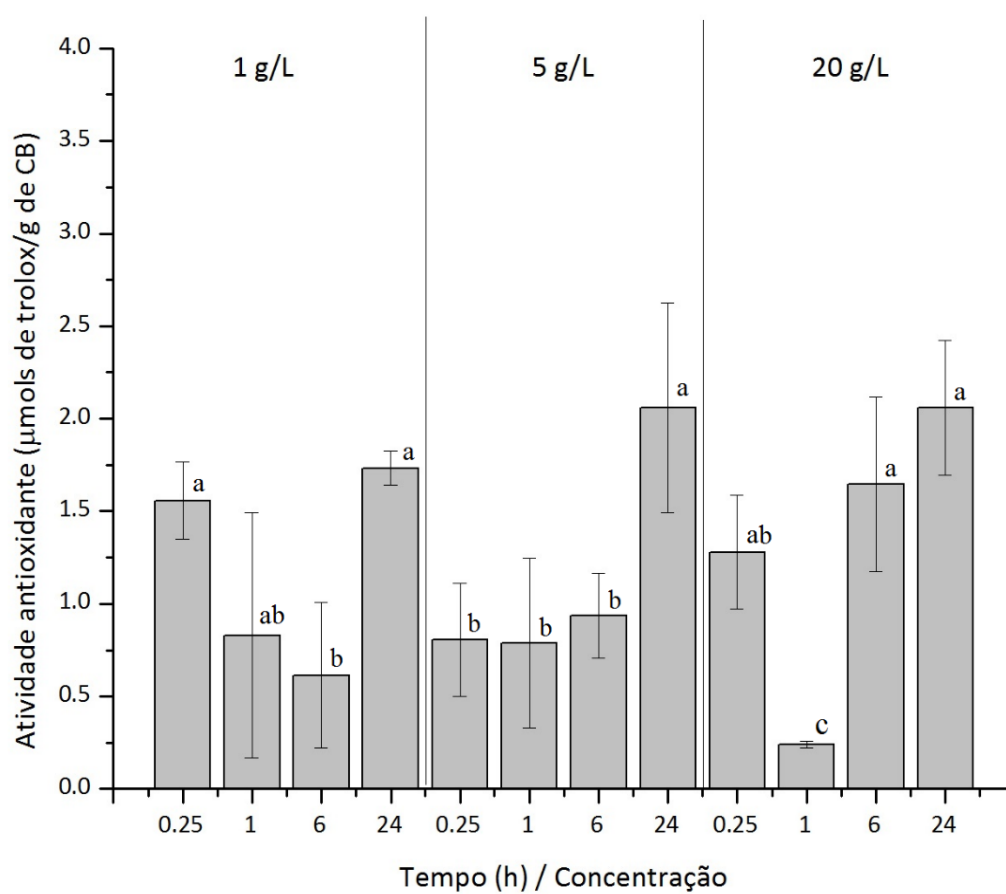
Embora filmes íntegros de CB para aplicações tenham sido estudados (NGUYEN *et al.*, 2008 e LIN *et al.*, 2015), filmes obtidos por casting podem ser mais vantajosos devido a versatilidade da tecnologia. Nos revestimentos (casting) é formada uma película fina em toda superfície do alimento mesmo em superfícies esféricas ou irregulares como por exemplo frutas. Já em filmes obtidos por impregnação/adsorção a superfície do alimento deve permitir o contato direto com a matriz, o que requer que o alimento seja minimamente processado.

Figura B5 – Atividade antioxidante do imobilizado CBCXM-HS úmida/HA – Adsorção em pH 3 e efeito da concentração de HA



Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0,1$)

Figura B6 – Atividade antioxidante do imobilizado CBCXM-HS úmida/HA – Adsorção em pH 7 e efeito da concentração de HA



Letras iguais sobrescritas na coluna não diferem significativamente ($\alpha < 0$)

APÊNDICE C - INCORPORAÇÃO DE NISINA EM FILMES DE CBNF-HS

Avaliou-se o efeito da incorporação de nisina na formulação de filmes de CBNF-HS. A nisina é um polipeptídeo antimicrobiano utilizado na indústria de alimentos e apresenta efeito contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Jiet *al.*, 2014). Inicialmente o efeito antimicrobiano da nisina comercial (Coalhopar) foi avaliada contra as linhagens *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 pelo método de difusão e disco (BARRY e THORNSBERRY, 1991) onde avaliou-se o efeito da concentração de nisina, pH e tipo de ácido na formulação da solução antimicrobiana. Os resultados são apresentados nas Figuras M1, M2 e M3.

Após esse estudo os filmes foram formulados seguindo-se a metodologia descrita neste trabalho com a substituição do hidrolisado pela solução de nisina na concentração de 50.000 UI/mL. Para o preparo da solução a nisina foi dissolvida em ácido cítrico 0,1 M e centrifugada a 15 G. O sobrenadante foi misturado com a suspensão de CBNF em diferentes proporções e seco em estufa para a obtenção do filme conforme procedimento descrito neste trabalho.

Todos os filmes com nisina apresentaram baixas propriedades mecânicas e formação de cristais. A quantidade de cristais foi reduzida com a diminuição da quantidade de nisina no filme.

Figura C1 – (a) Halos de inibição da solução de nisina 50.000 UI/mL contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, (b) Halos de inibição da solução de nisina 50.000 UI/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (c) Filme com CBNF 25%, (d) Filme com CBNF 50%, (e) Filme com CBNF 75%, (f) Filme com CBNF 90%.

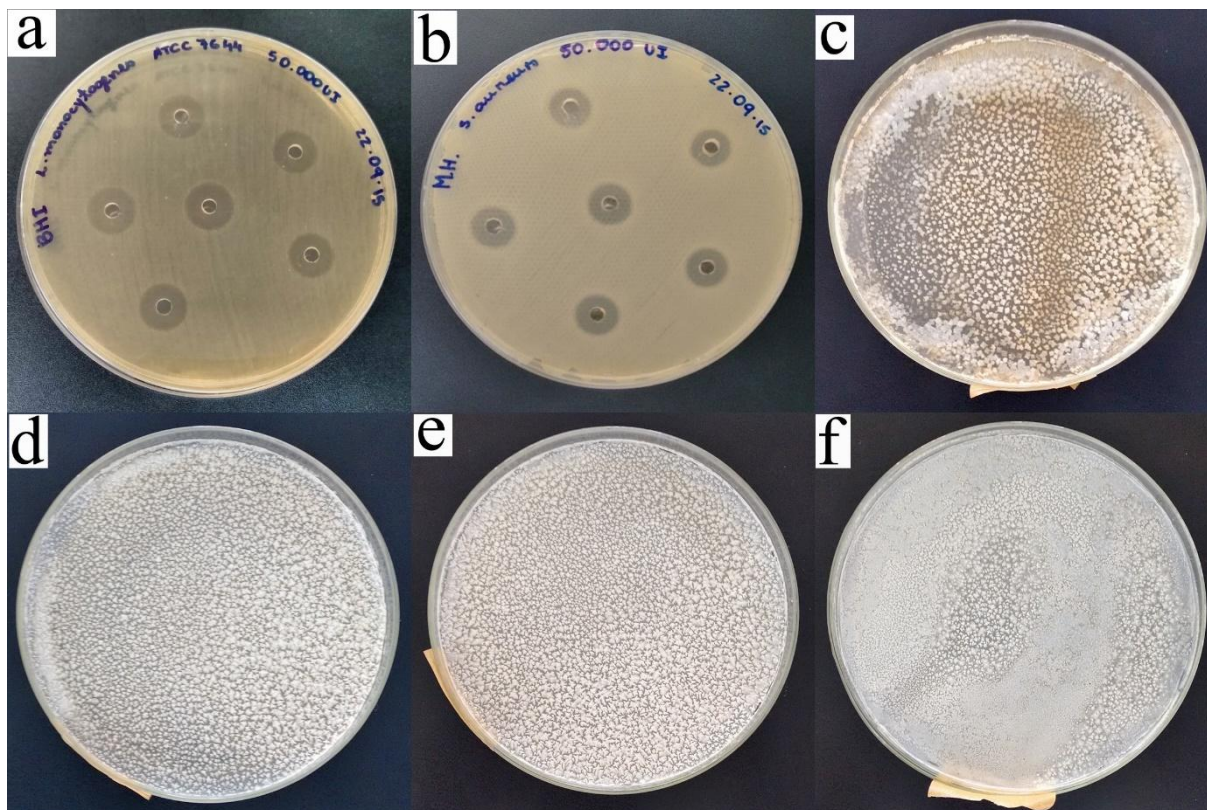


Figura C2 – Efeito do tipo de diluente da nisina comercial sobre o tamanho do halo de inibição. Concentração em Molaridade 0,1 ou 0,01 para cada ácido. AC - ácido cítrico, AA - ácido acético.

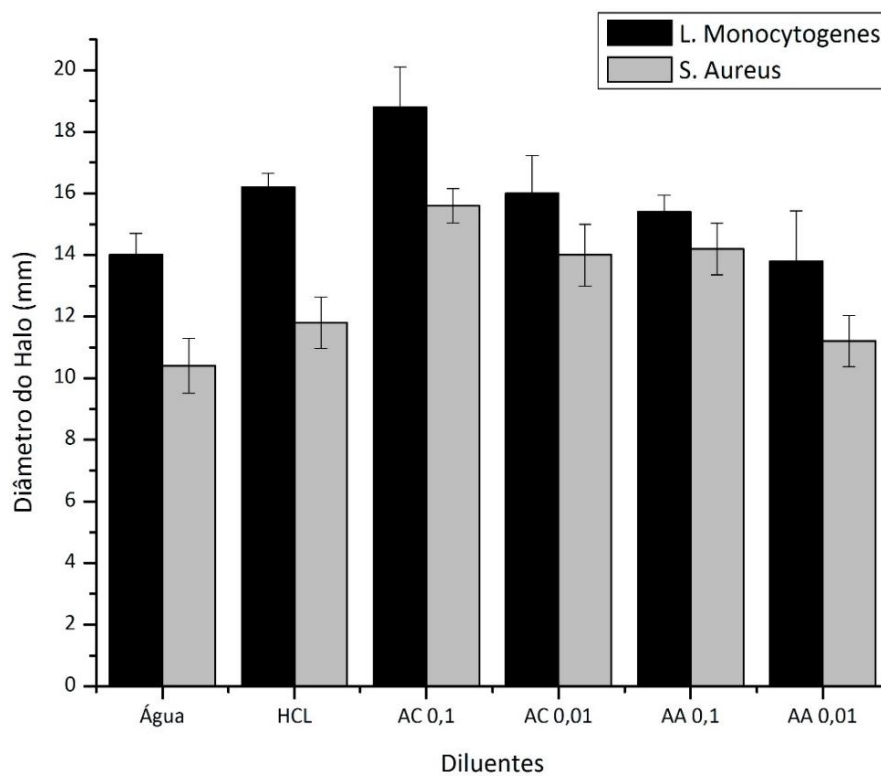


Figura C3 – Efeito da concentração de nisina comercial sobre o tamanho do halo de inibição. Diluição em ácido acético 0,1M.

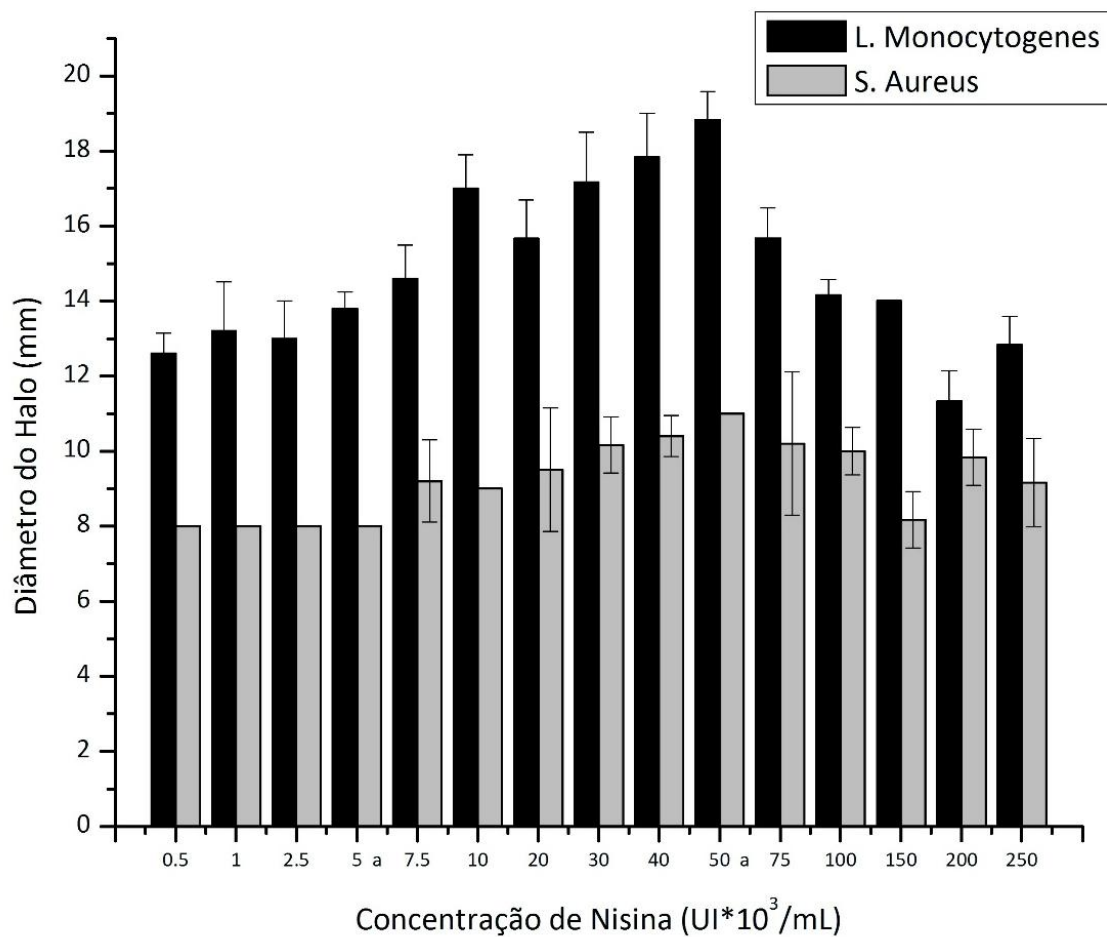
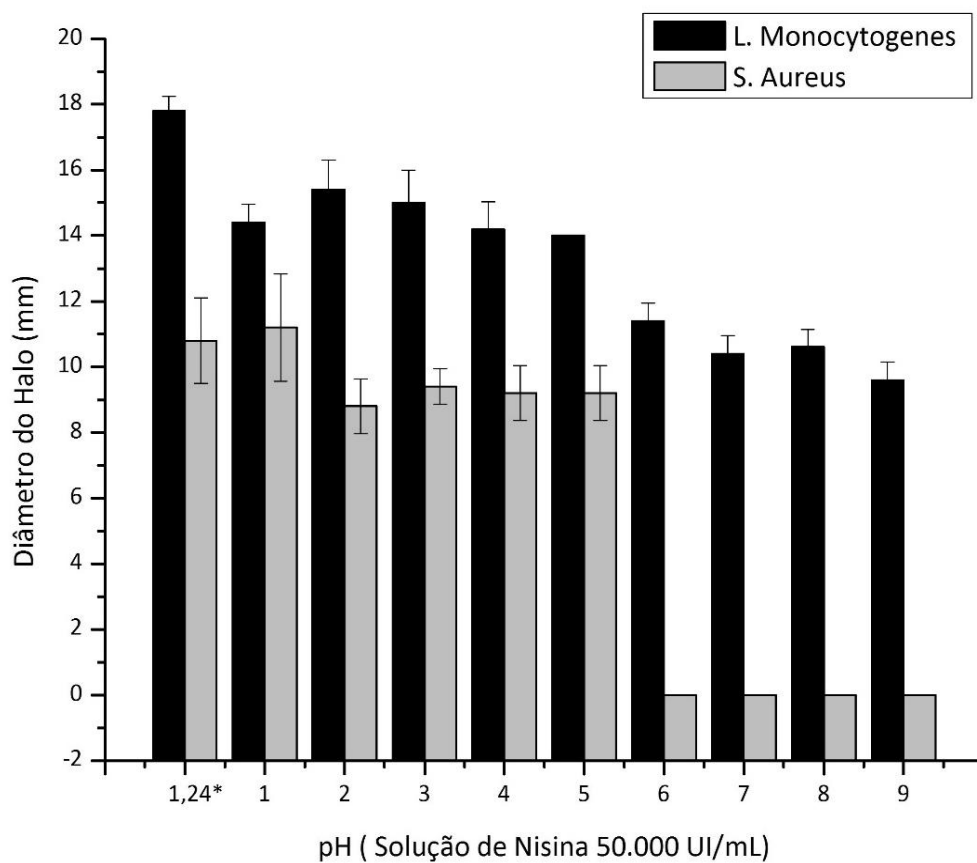


Figura C4 - Efeito do pH da solução final de nisina comercial sobre o tamanho do halo de inibição. Concentração de 50.000 UI/mL e diluição em ácido acético 0,1M. Ajuste do pH com NaOH para pH > 1,24 e HCL para pH 1.



APÊNDICE D - DIFRATOGRAMAS

Figura D1 - Difratoogramas dos filmes 1: (a) CB-HS, (b) CB-CM, (c) CBNF-HS, (d) CBNF-CM, (e) CBNF-HS-S50, (f) CBNF-CM-S50

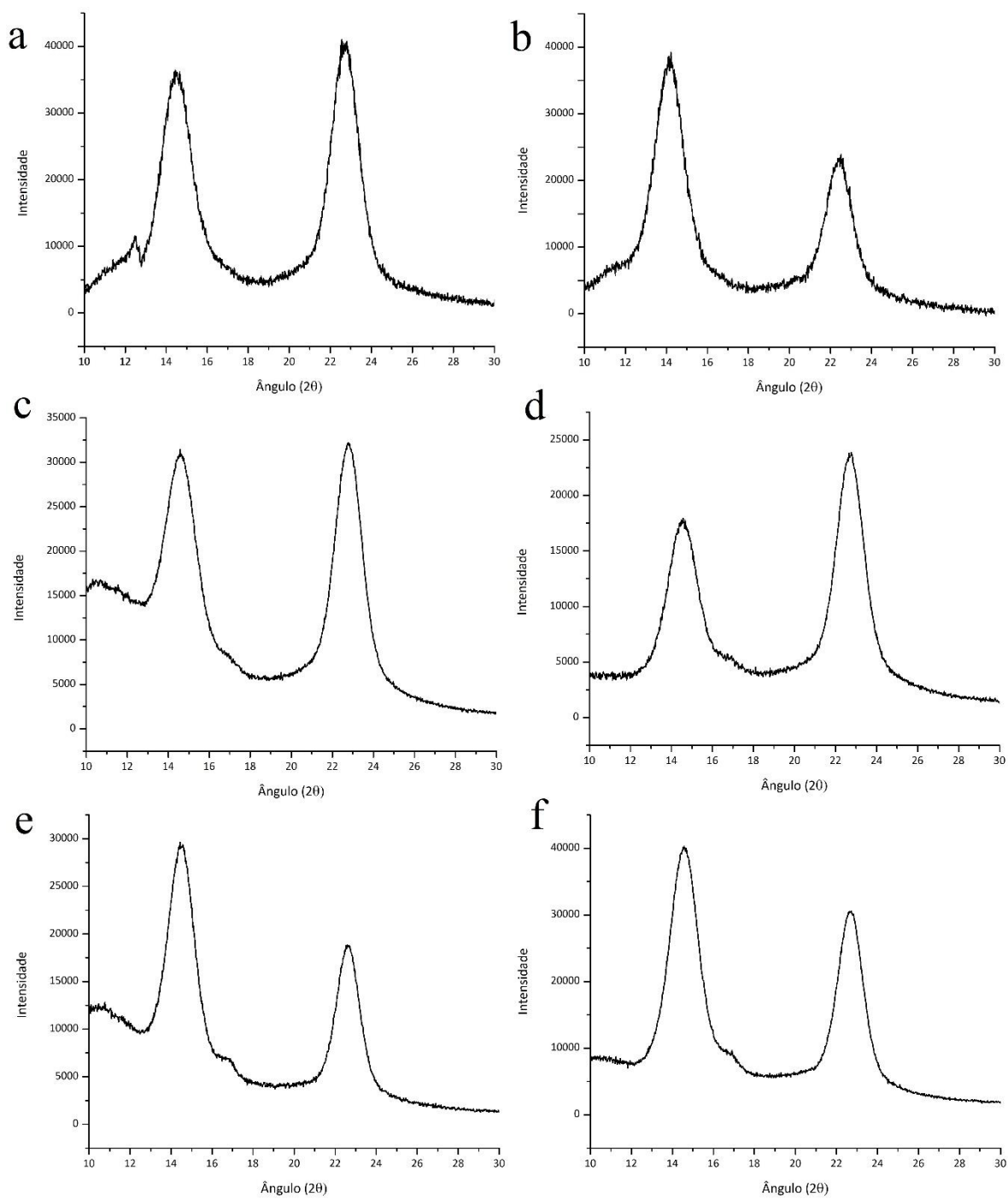


Figura D2 - Difratoogramas dos filmes 2: (a)CBNF-HS-G50, (b)CBNF-CM-G50, (c) CBNF-HS-S50-P5, (d)CBNF-CM-S50-P5, (e)CBNF-HS-S50-P2,5, (f)CBNF-CM-S50-P2,5

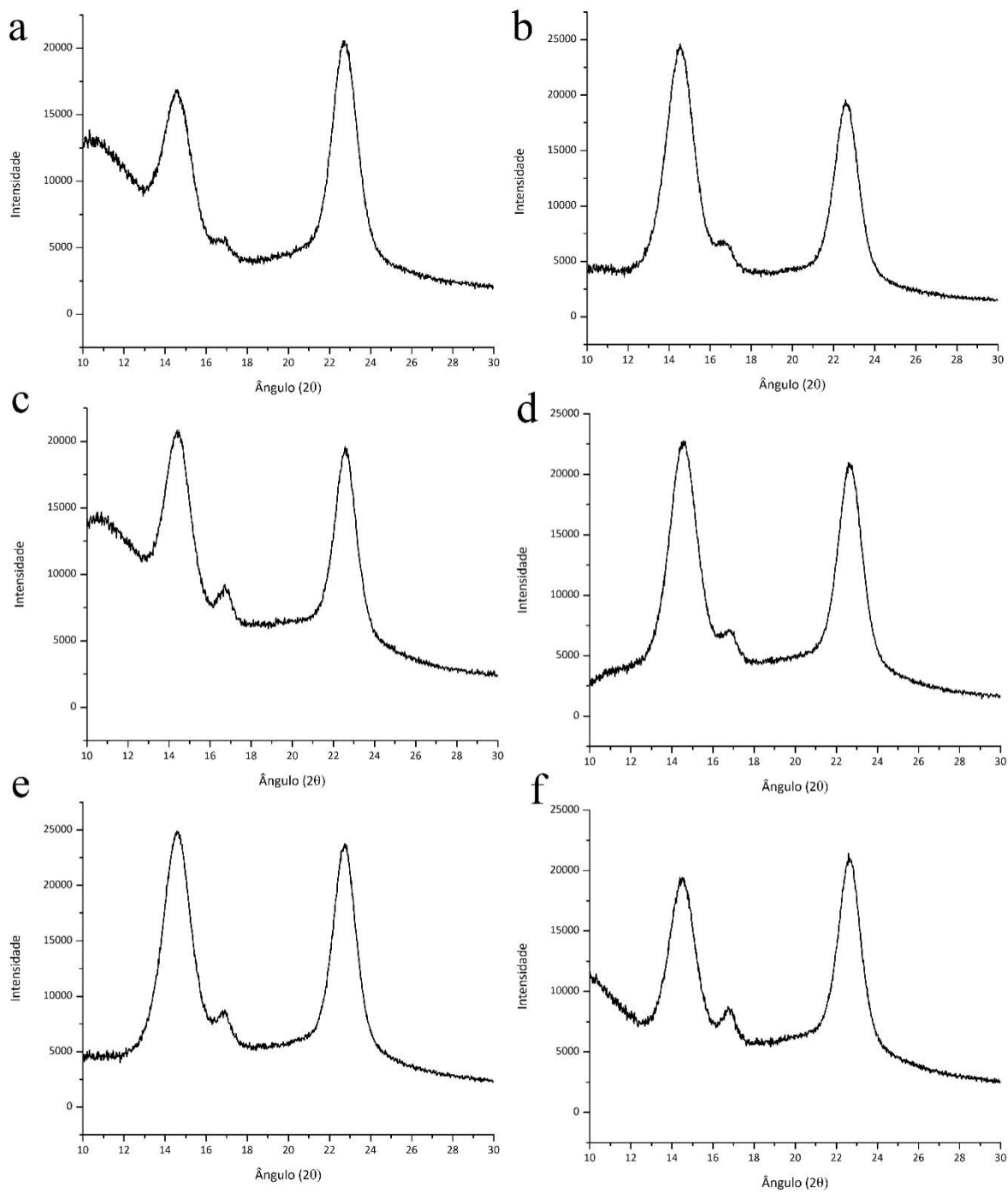
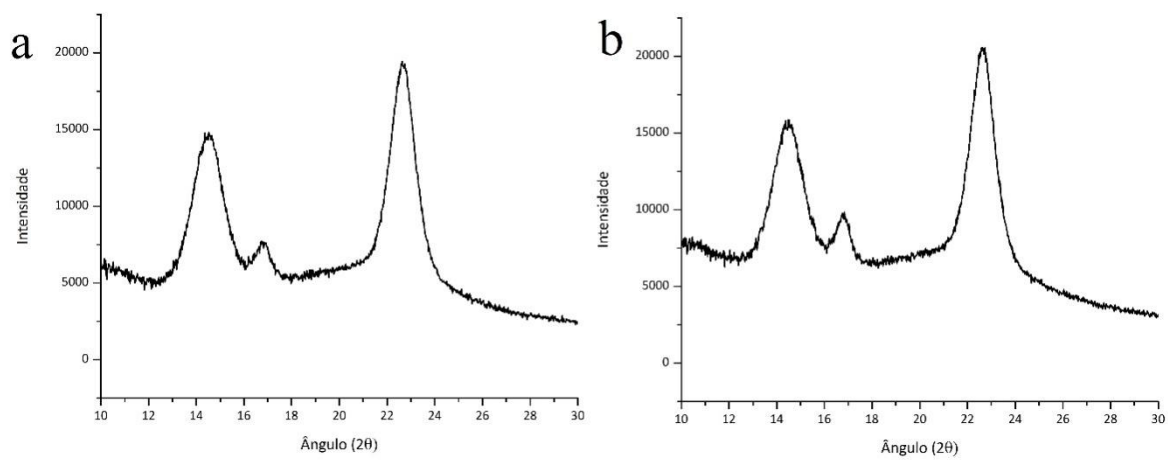


Figura D3 - Difratomogramas dos filmes 3: (a)CBNF-HS-S50-P7,5, (b)CBNF-HS-S50-P10

APÊNCIDE E - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA ALGUNS MODELOS DE LIBERAÇÃO ESTUDADOS

Tabela E1 - Coeficientes de regressão ajustados para modelo de primeira ordem

Fluido/ HA %	25 °C				4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água	0,45	0,86	0,89	0,95	0,04	0,43	0,80	0,47
Ácido acético 3% (v/v)	0,21	0,57	0,60	0,68	0,14	0,43	0,00	0,63
Etanol 10% (v/v)	0,54	0,90	0,97	0,96	0,69	0,77	0,89	0,89
Etanol 50% (v/v)	0,83	0,85	0,95	0,95	0,83	0,85	0,86	0,79

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela E2 - Coeficientes de regressão ajustados para modelo de segunda ordem

Fluido/ HA %	25 °C				4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	0,91	0,79	0,84	0,83	0,77	0,80	0,80	0,77
Ácido acético 3% (v/v)	0,48	0,80	0,8	0,8	0,76	0,80	0,75	0,78
Etanol 10% (v/v)	0,41	0,83	0,85	0,84	0,83	0,83	0,84	0,81
Etanol 50% (v/v)	0,48	0,83	0,85	0,86	0,87	0,87	0,86	0,91

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela E3 - Coeficientes de regressão ajustados para modelo de Weibull

Fluido/ HA %	25 °C				4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	0,83	0,90	0,82	0,91	0,55	0,71	0,80	0,76
Ácido acético 3% (v/v)	0,48	0,60	0,74	0,8	0,43	0,58	0,44	0,55
Etanol 10% (v/v)	0,43	0,78	0,79	0,81	0,59	0,55	0,74	0,73
Etanol 50% (v/v)	0,5	0,64	0,64	0,75	0,83	0,69	0,79	0,72

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

Tabela E4 - Coeficientes de regressão ajustados para modelo de Baker-Lonsdale

Fluido/ HA %	25 °C				4 °C			
	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%	HA 25%	HA 40%	HA 50%	HA 57%
Água Deionizada	0,42	0,69	0,70	0,83	0,01	0,12	0,21	0,21
Ácido acético 3% (v/v)	0,12	0,48	0,43	0,58	0,01	0,43	0,09	0,14
Etanol 10% (v/v)	0,22	0,71	0,89	0,89	0,18	0,59	0,58	0,65
Etanol 50% (v/v)	0,42	0,52	0,75	0,85	0,61	0,60	0,88	0,83

HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄)

APÊNDICE F - PERFIS DE LIBERAÇÃO: DADOS EXPERIMENTAIS
AJUSTADOS PELA EQUAÇÃO DE KORSMEYER-PEPPAS

Figura F1: Filme HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), 25°C

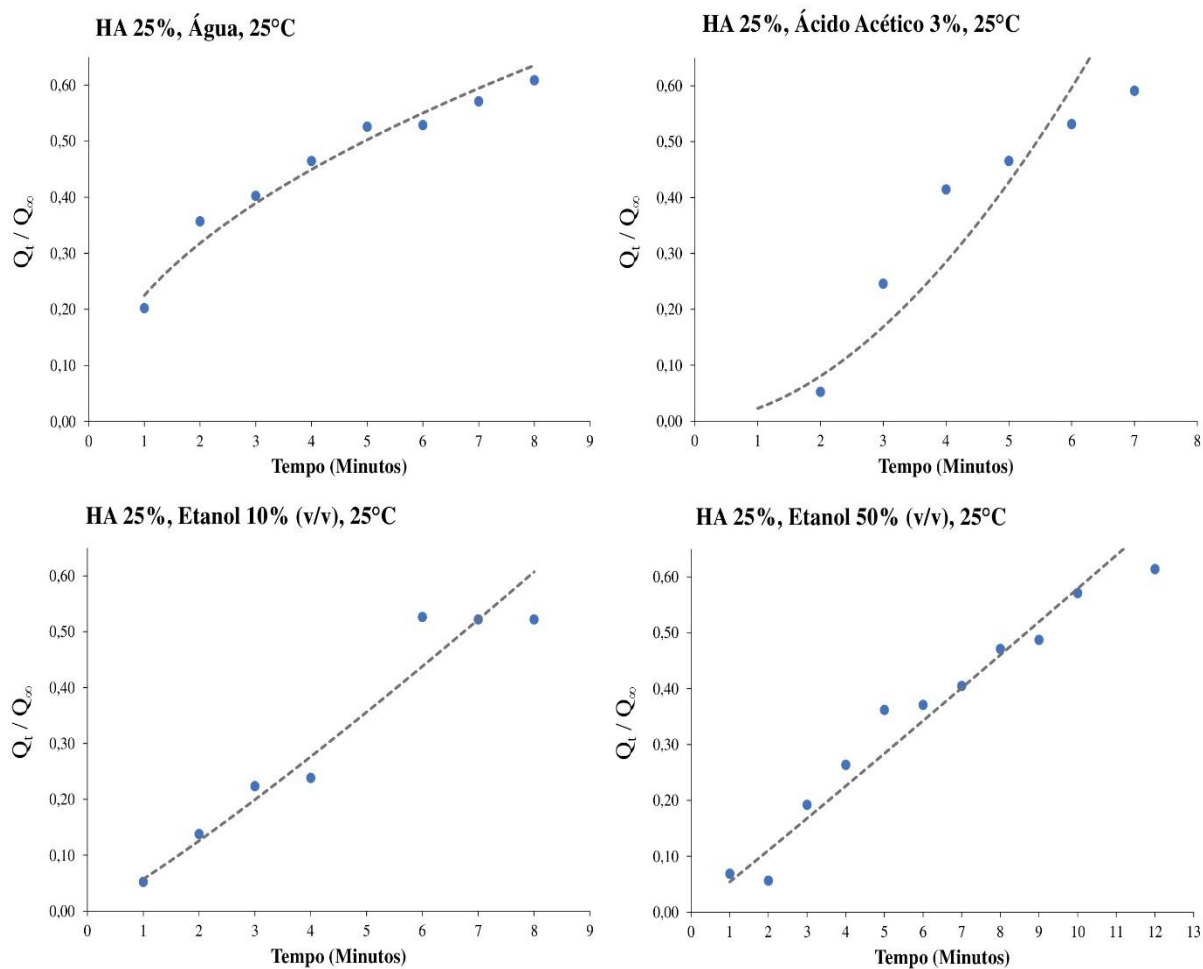


Figura F2: Filme HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), 25°C

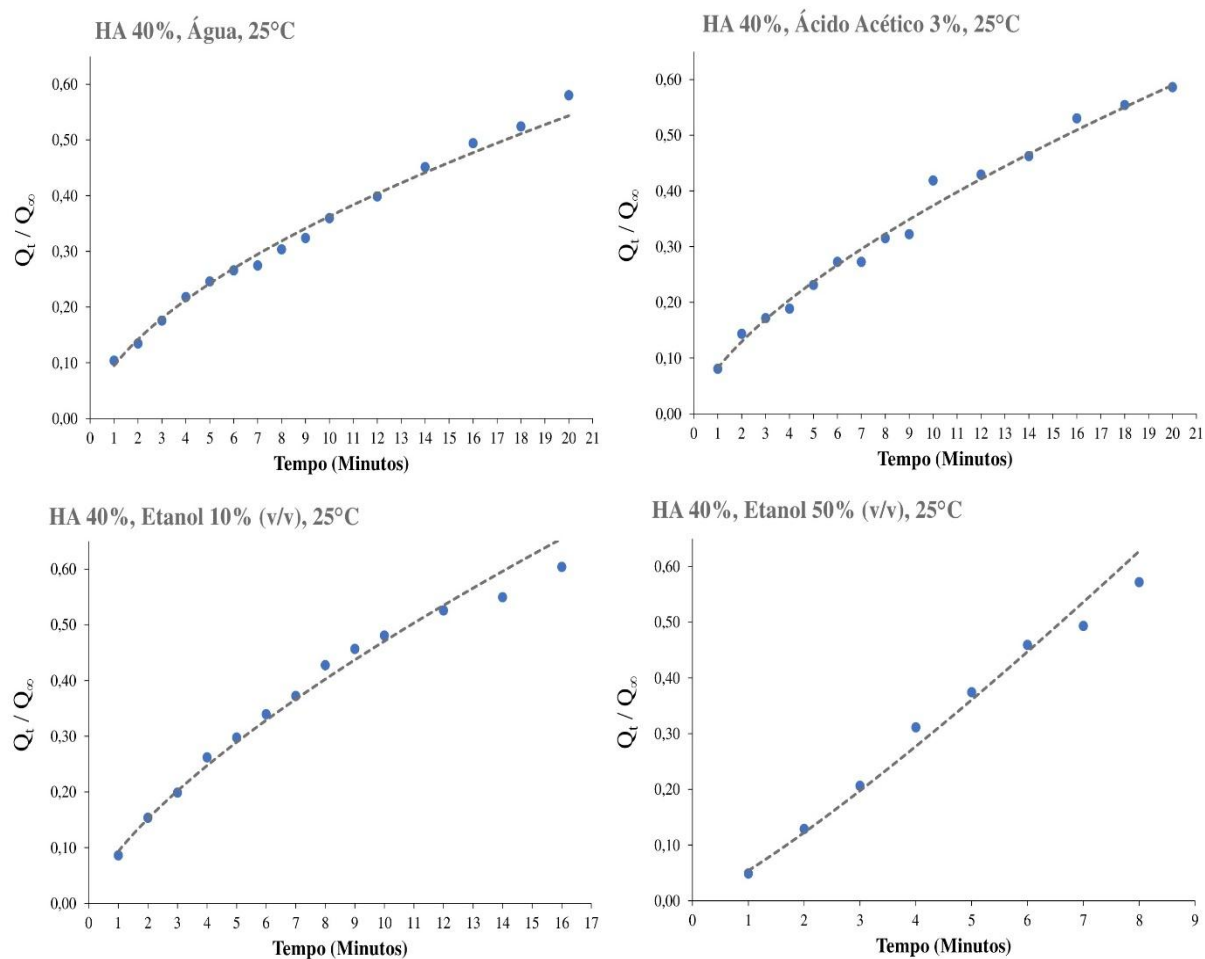


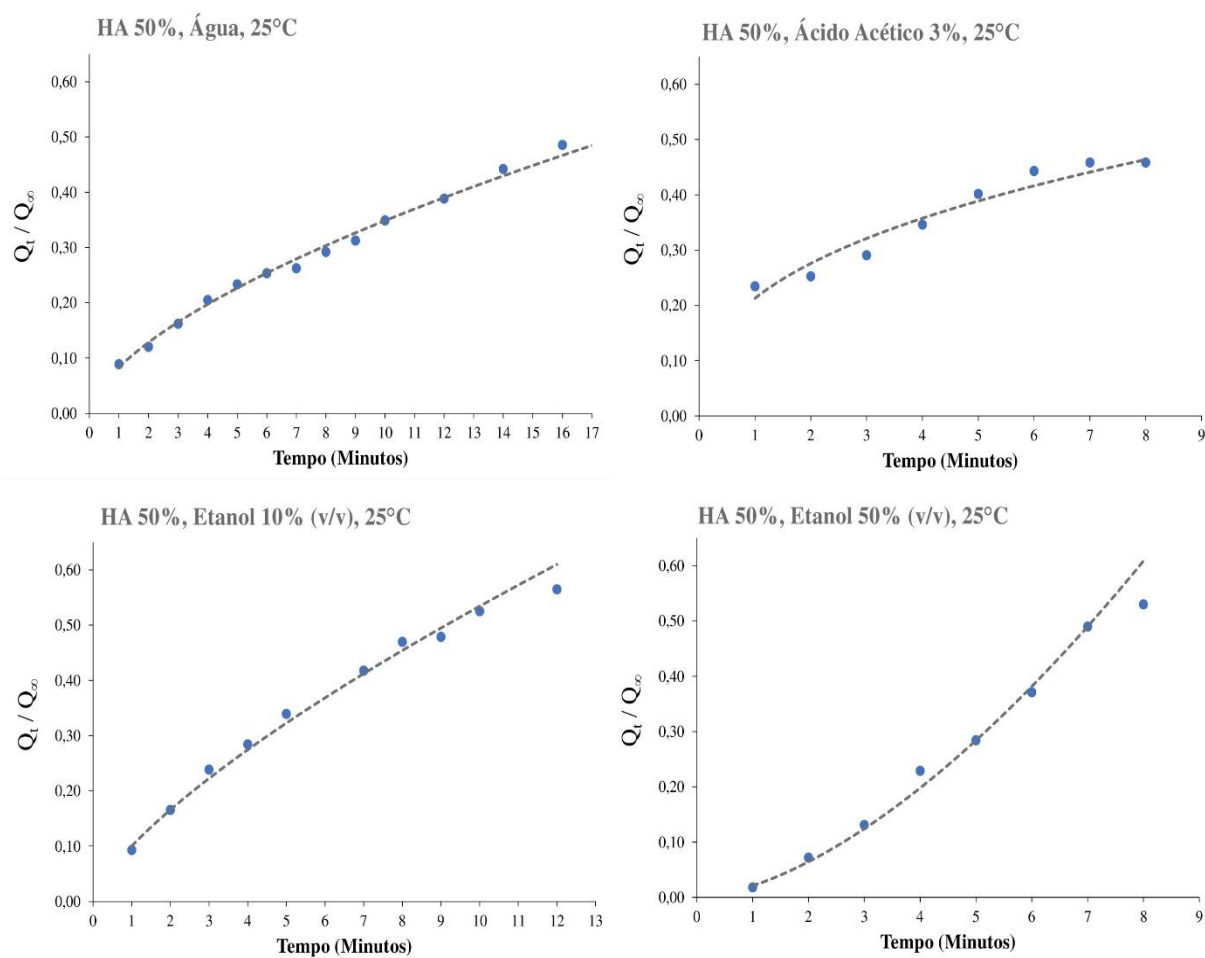
Figura F3: Filme HA 50% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), 25°C

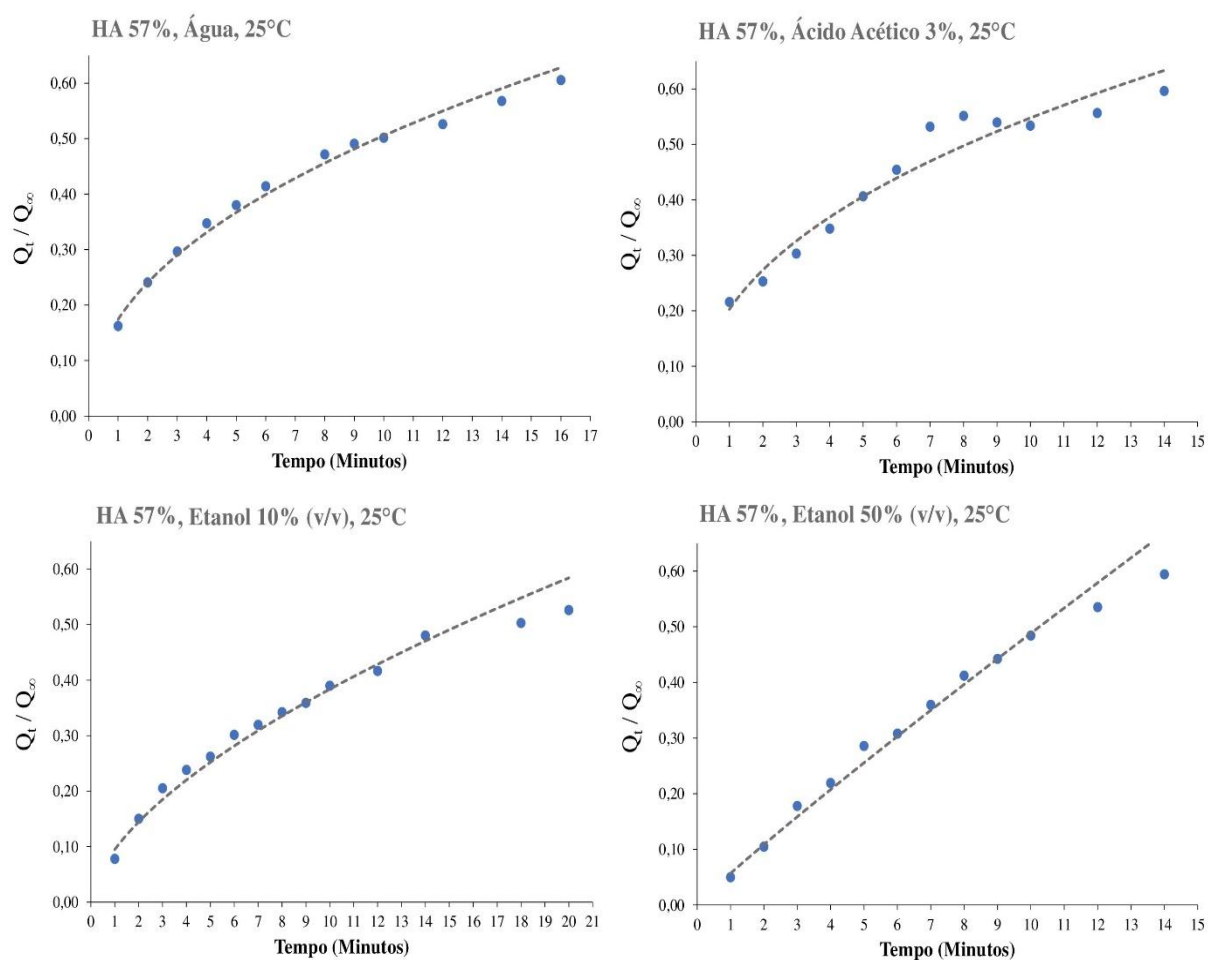
Figura F4: Filme HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄), 25°C

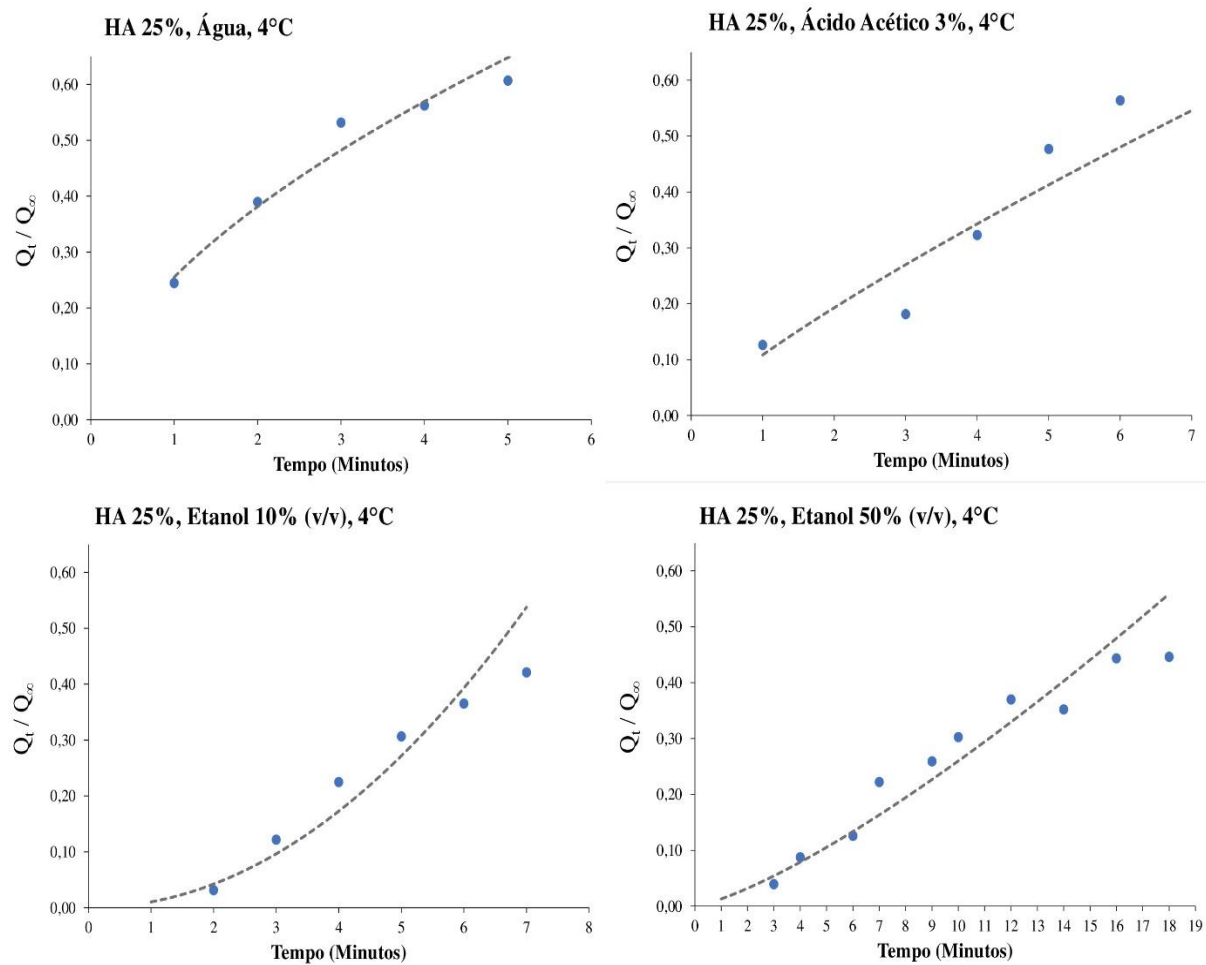
Figura F5: Filme HA 25% (HS₅₀HA₂₅S₂₅), 4°C

Figura F6: Filme HA 40% (HS₄₀HA₄₀S₂₀), 4°C

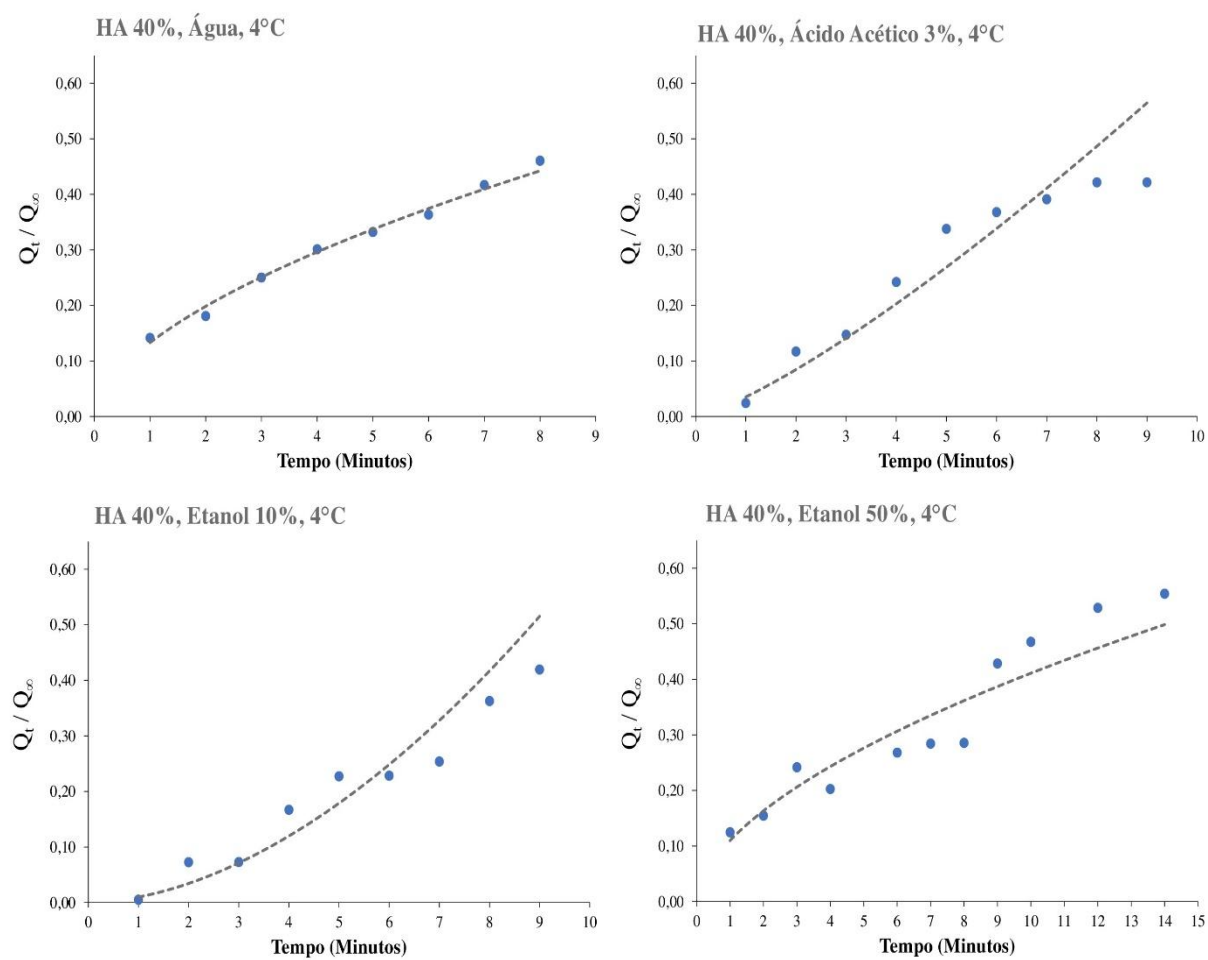


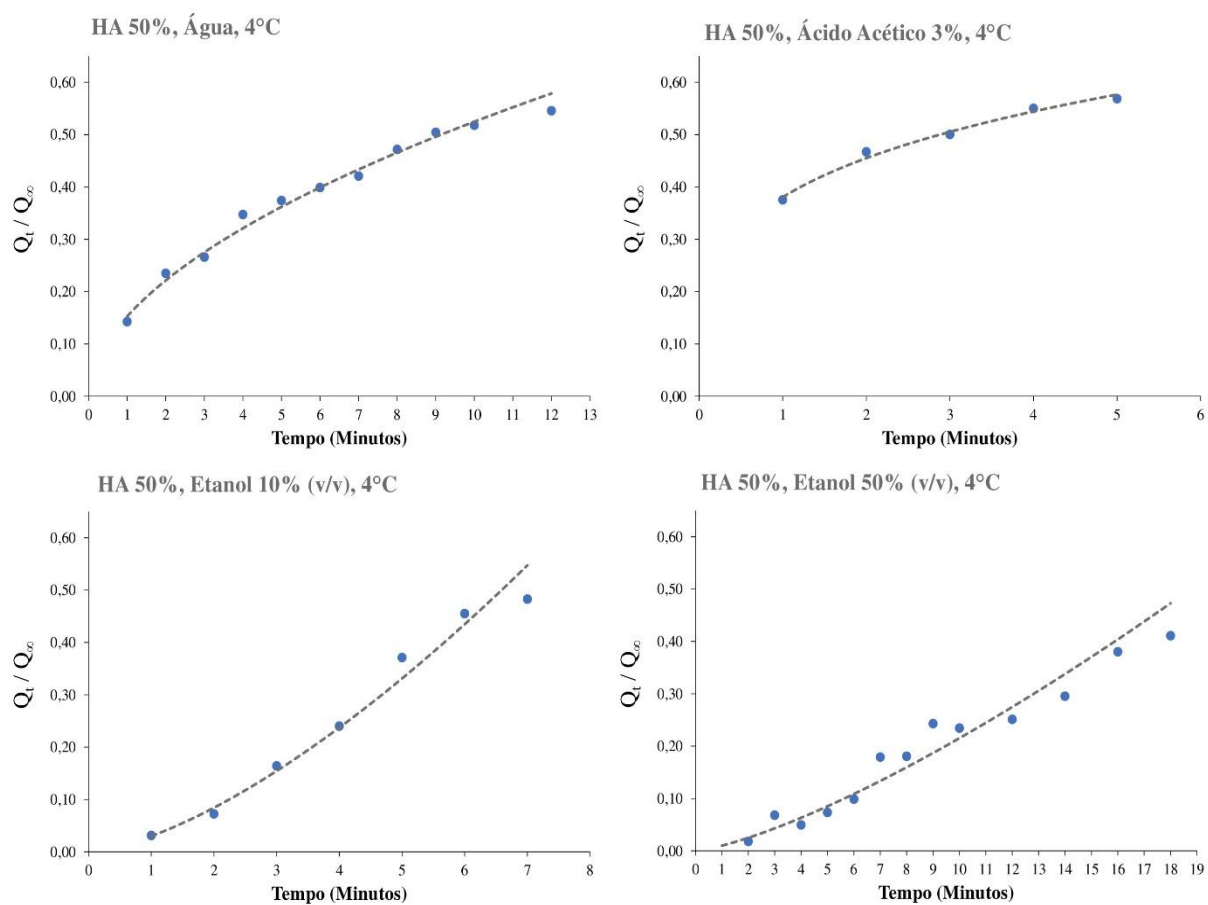
Figura F7: Filme HA 57% (HS₃₃HA₅₀S₁₇), 4°C

Figura F8: Filme HA 57% (HS₂₉HA₅₇S₁₄), 4°C